



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Diagnóstico laboratorial em cães e gatos

Vanessa Sofia Marques Duarte

Orientação:

Professora Doutora Maria Eduarda Marques
Madeira da Silva Potes

Doutora Maria Paula Martins Brilhante Simões

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2016



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Diagnóstico laboratorial em cães e gatos

Vanessa Sofia Marques Duarte

Orientação:

Professora Doutora Maria Eduarda Marques
Madeira da Silva Potes

Doutora Maria Paula Martins Brilhante Simões

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2016

Agradecimentos

Ao meu pai, por me permitir frequentar e concluir o mestrado integrado em Medicina Veterinária;

Ao meu namorado, por todo o apoio e confiança depositados;

À orientadora, pela paciência e compreensão e por toda a ajuda na elaboração deste relatório;

Ao diretor geral do laboratório Inno, Bruno Filipe Pina, pela oportunidade de realização deste estágio na sua empresa;

À minha coorientadora, Dr^a Paula Brilhante Simões, pelo estágio proporcionado, conhecimentos transmitidos e ajuda na elaboração deste relatório;

A todo o pessoal do Inno, em especial ao Dr. Augusto, Dr^a Joana, Dr^a Leonor e Dr. Ricardo, à Teresa e à Isabel, pela simpatia, compreensão, auxílio, confiança e pelos conhecimentos facultados;

A todos os meus amigos que me acompanharam durante este longo e difícil percurso, pela amizade, apoio e conselhos muito úteis;

À Dr^a Ana Oliveira um especial agradecimento, por ouvir os meus desabafos e por toda a força e confiança que me transmitiu;

À Dr^a Vera Lima, médica veterinária assistente do paciente Jó, que me facultou toda a informação necessária para poder completar o estudo de caso;

Ao Dr. José Maranhão, por ter impulsionado a tão aguardada conclusão deste relatório,

O meu muitíssimo obrigado!

Resumo

O relatório de estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, aqui apresentado, encontra-se dividido em quatro partes distintas. A primeira corresponde à descrição do local de estágio, a segunda engloba a descrição das atividades desenvolvidas com a compilação da respetiva casuística e a terceira consiste numa revisão de literatura sobre as principais áreas laboratoriais acompanhadas: Bioquímica, Hematologia e Urinálise. Na quarta e última parte é abordado um caso clínico de Leishmaniose Canina, acompanhado durante o período de estágio. Este foi realizado no Laboratório *Inno, Serviços Especializados em Veterinária, Lda.*, localizado em Braga, Portugal e abrangeu a área de Diagnóstico Laboratorial Veterinário.

A escolha do tema prendeu-se com o grande interesse pela área da Patologia Clínica, associado à sua enorme importância em Medicina Veterinária.

No decorrer do estágio, foram solicitadas 29967 análises: 19437 bioquímicas, 2964 hematológicas e 1031 urinálises. Neste relatório pretende-se destacar a importância destas áreas na formulação do diagnóstico médico-veterinário.

Palavras-chave: ***Patologia Clínica, Diagnóstico Laboratorial Veterinário, Bioquímica, Hematologia, Urinálise, Leishmaniose Canina.***

Laboratory diagnosis in dogs and cats

Abstract

This report of my curricular training integrated in the Veterinary Medicine Master Degree of Évora University is divided in three distinctive sections. The first one covers the description of the place where I develop my work - INNO, a specialized Veterinary Laboratory focused mainly on small animal diagnosis, placed in Braga, Portugal; the second one comprise the casuistic and the third is a systematic review of the main laboratory areas of actuation – Biochemistry, Hematology and Urinalysis. The fourth section describes one case of Canine Leishmaniosis accompanied during the period of training.

In this period the lab received 29967 analysis, including the following specific exams by areas: biochemistry (n=19437), hematology (n=2964) and urinalysis (n=1031).

The purpose of this report is enunciate and evolve about the main and crucial areas of medical diagnostic in small animal practice.

Keywords: ***Clinical Pathology, Veterinary Laboratorial Diagnostic, Biochemistry, Hematology, Urinalysis, Canine Leishmaniosis.***

A. Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	ii
A. Índice geral.....	iii
B. Índice de figuras.....	v
C. Índice de gráficos.....	v
D. Índice de quadros	vi
E. Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	vii
I. Introdução.....	1
Parte I: apresentação do local de estágio.....	2
Parte II: casuística.....	3
1. Análises bioquímicas	4
2. Hematologia.....	7
2.1. Hemograma.....	9
2.2. Hemograma manual.....	11
2.3. Contagem de reticulócitos	12
2.4. Esfregaço sanguíneo.....	12
2.5. Tipificação sanguínea	14
3. Imunologia.....	15
3.1. Teste de imunofluorescência indireta (IFI)	16
3.2. ELISA.....	17
3.3. Aglutinação.....	17
4. Urinálise.....	17
5. Endocrinologia.....	20
5.1. Avaliação da tiroide.....	21
5.2. Avaliação das glândulas adrenais.....	22
6. Citologia.....	23
6.1. Envio de amostras para o laboratório.....	25
7. Histopatologia	26
8. Parasitologia.....	27
8.1. Análise coprológica	28
8.2. Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia</i>	29
8.3. Técnica de Baermann	29

8.4.	Técnica de Knott.....	30
8.5.	Pesquisa de ectoparasitas	31
9.	Provas de coagulação.....	31
9.1.	Colheita e manuseamento de amostras	31
9.2.	Tempos de coagulação.....	32
10.	<i>Dermatophyte test medium</i> (DTM)	33
Parte III: Revisão bibliográfica.....		35
A.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	35
A1.	Parâmetros hepáticos:	35
A2.	Parâmetros pancreáticos:	44
A3.	Cobalamina e folato	47
A4.	Parâmetros renais:.....	49
A5.	Frutosamina	51
A6.	Creatina quinase (CK).....	52
B.	HEMATOLOGIA.....	53
B1.	Avaliação leucocitária	53
B2.	Avaliação eritrocitária	61
B3.	Avaliação plaquetária.....	69
C.	URIANÁLISE	71
C1.	Colheita de urina	71
C2.	Análise de urina.....	72
Parte IV: Caso Clínico – Leishmaniose Canina		86
a)	Identificação	86
b)	História clínica	86
c)	Diagnósticos presuntivos	86
d)	Abordagem laboratorial	86
e)	Interpretação de resultados.....	87
f)	Recomendações	87
g)	Diagnóstico definitivo.....	88
h)	Tratamento.....	88
i)	Monitorização de tratamento.....	89
j)	Interpretação de resultados.....	91
k)	Discussão de resultados	91

l) Conclusão	97
Conclusão.....	98
Referências Bibliográficas.....	99
ANEXOS.....	107

B. Índice de figuras

Figura 1: Fotografia representativa de amostras de soro normal (A), hemolisado (B e C), hemolisado e lipêmico (D) e icterico (E e F).	6
Figura 2: Agitador mecânico homogeneizando as amostras de sangue com EDTA.	9
Figura 3: Representação esquemática do sistema de laser do analisador hematológico automático.	10
Figura 4: Fotografia da câmara de Neubauer modificada usada no laboratório e representação esquemática das suas divisões com as respectivas medidas. Adaptado de Weiss e Tvedten, 2012a. WBC – leucócitos; R – eritrócitos.....	11
Figura 5: Capilar de microhematócrito evidenciando um soro icterico.	12
Figura 6: Ilustração da técnica de preparação de esfregaços sanguíneos usada.	13
Figura 7: Identificação dos vários componentes de um esfregaço sanguíneo. Adaptado de Metzger e Rebar, 2004a.....	13
Figura 8: Fotografias de um cartão de tipificação sanguínea de cão (esq.) e de um de gato (dir.), evidenciando um sangue DEA 1.1 + e outro de tipo B (esq. – esquerda; dir. – direita: adaptado de Brown e Vap, 2012).....	15
Figura 9: Fotografia ilustrativa do material usado na realização de uma urianálise tipo I (lista de trabalho, tira urinária, refratômetro e <i>falcon</i> com amostra de urina).....	20
Figura 10: Fotografias ilustrativas da aplicação da técnica de <i>squash</i> para espalhamento de materiais na preparação de lâminas citológicas.	24
Figura 11: Fotografia de dispositivo usado para a citocentrifugação, com resultado final à direita.	25
Figura 12: Fotografia ilustrativa da técnica de flutuação com consequente preparação das lâminas para a observação microscópica.	28
Figura 13: Fotografias de ovos parasitários mais comumente observados, em fezes de canídeos e felídeos sujeitas à técnica de flutuação, durante o período de estágio (A – oocistos de <i>Isospora</i> spp. e quistos de <i>Giardia</i> spp. 200x; B – quistos e trofozoítos de <i>Giardia</i> spp. 200x; C – quistos e trofozoítos de <i>Giardia</i> spp. 400x; D – ovos de <i>Toxocara</i> spp. e raros oocistos de <i>Isospora</i> spp. 100x; E – ovo de <i>Trichuris vulpis</i> 200x; F – ovo de <i>Ancylostoma</i> spp. 200x)....	29
Figura 14: Fotografia ilustrativa do aparelho de Baermann, antes da recolha da primeira gota de solução fecal para pesquisa microscópica de larvas pulmonares.	30
Figura 15: Electroforetograma sérico realizado no dia 12 de Janeiro de 2016.	88
Figura 16: Electroforetograma sérico obtido após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol.	90

C. Índice de gráficos

Gráfico 1: Frequência absoluta das análises solicitadas ($n=29967$), divididas pelas diferentes áreas laboratoriais. DTM – meio de teste para dermatófitos.	3
Gráfico 2: Distribuição percentual das análises bioquímicas por espécie ($n=19437$).	4

Gráfico 3: Frequência relativa (em %) das análises hematológicas solicitadas ($n=2964$).	7
Gráfico 4: Frequência relativa (em %) das análises hematológicas por espécie ($n=2964$).	8
Gráfico 5: Frequência relativa (em %) das análises solicitadas na área de imunologia ($n=1202$). Ac – anticorpos, FeLV – vírus da leucemia felina, Ag – antígeno, Ig – imunoglobulina, IFI – imunofluorescência indireta.....	16
Gráfico 6: Frequência absoluta dos vários tipos de análises realizadas em amostras de urina das diferentes espécies. C+F – Canídeos + Felídeos; Rácio Pur/Cur – rácio proteína urinária/creatinina urinária.....	18
Gráfico 7: Frequência absoluta das análises endocrinológicas mais solicitadas na espécie canina ($n=480$). T4 – tiroxina, TSH – hormona tireoestimulina, ACTH – hormona adrenocorticotrófica, U – urina, Hemog – hemograma, Bq – análises bioquímicas.....	21
Gráfico 8: Frequência absoluta das análises endocrinológicas mais solicitadas na espécie felina ($n=285$). T4 – tiroxina, Hemog – hemograma, Bq – análises bioquímicas, TSH – hormona tireoestimulina.	21
Gráfico 9: Frequência absoluta das análises citológicas realizadas ($n=834$).....	26
Gráfico 10: Frequência absoluta das análises histopatológicas realizadas ($n=811$).....	27
Gráfico 11: Frequência relativa (em %) das diferentes análises realizadas na área da Parasitologia ($n=272$).	27
Gráfico 12: Frequência absoluta das provas de coagulação realizadas ($n=176$), distribuídas por espécie. aPTT – tempo de tromboplastina parcial ativada, PT – tempo de protrombina, TT – tempo de trombina, AT III – antitrombina III.....	32

D. Índice de quadros

Quadro 1: Infecções parasitárias de cães e gatos passíveis de diagnóstico usando o teste de Baermann. Adaptado de Zajac e Saleh, 2013.	30
Quadro 2: Alterações laboratoriais típicas nas concentrações séricas de folato, cobalamina e TLI em várias desordens de má absorção. TLI – imunoreatividade semelhante à tripsina, IPE – insuficiência pancreática exócrina, N – normal, ID – intestino delgado. Adaptado de Tarpley e Bounous, 2011.	48
Quadro 3: Gradação da toxicidade neutrofílica de acordo com as alterações citoplasmáticas. Adaptado de Harvey, 2012.....	58
Quadro 4: Classificação da anemia, em termos de severidade, com base no valor de hematócrito em percentagem. Adaptado de Tvedten, 2010.....	62
Quadro 5: pH de formação e potenciais causas associadas à formação dos diferentes tipos de cristais encontrados comumente na urina de cães e gatos. Adaptado de Wamsley e Alleman, 2007.....	85
Quadro 6: Hemograma realizado a 12 de Janeiro de 2016.....	86
Quadro 7: Parâmetros bioquímicos analisados a 12 de Janeiro de 2016.	87
Quadro 8: Proteinograma sérico	87
Quadro 9: Serologia quantitativa realizada no dia 12 de Janeiro de 2016	88
Quadro 10: Hemograma realizado após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol. .	89
Quadro 11: Resultados dos parâmetros bioquímicos analisados após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol.....	90
Quadro 12: Proteinograma sérico realizado após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol.....	90
Quadro 13: Serologia realizada após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol.....	91

E. Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AATg: anticorpos anti-tireoglobulina
Ac: anticorpo
ACTH: *adrenocorticotrophic hormone*, em português, hormona adrenocorticotrófica
ADH: *antidiuretic hormone*, em português, hormona antidiurética
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADP: adenosina difosfato
Ag: antigénio
AHIM: anemia hemolítica imunomediada
AINE: anti-inflamatório não esteroide
ALT: alanina aminotransferase
ANA: anticorpos antinucleares
aPTT: *activated partial thromboplastin time*, em português, tempo de tromboplastina parcial ativada
ARN: ácido ribonucleico
AST: aspartato aminotransferase
AT III: antitrombina III
ATP: adenosina trifosfato
CBC: *count blood cells*, em português, contagem de células sanguíneas, isto é, hemograma
CHC: concentração de hemoglobina corpuscular
CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média
CID: coagulação intravascular disseminada
CK: *creatine kinase*, em português, creatina quinase
DAPP: dermatite alérgica à picada da pulga
DEA: *dog erythrocyte antigen*, em português, antigénio eritrocitário canino
DTM: *dermatophyte test médium*, em português, meio de teste para dermatófitos
ECA: enzima conversora de angiotensina
EDTA: ácido etilenodiaminotetra-acético
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*, em português, ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
EPO: eritropoietina
FA: fosfatase alcalina
FeLV: *feline leucemia virus*, em português, vírus da leucemia felina
FIV: *feline immunodeficiency virus*, em português, vírus da imunodeficiência felina
FSL: *front scatter light*, em português, luz dispersa frontal
GGT: gama glutamiltransferase
HCM: hemoglobina corpuscular média
HCT: hematócrito

Hpf: *high power field*, em português, campo de grande ampliação
IBD: *inflammatory bowel disease*, em português, doença intestinal inflamatória
ID: intestino delgado
IFI: imunofluorescência indireta
Ig: imunoglobulina
IL: interleucina
IPE: insuficiência pancreática exócrina
IRA: insuficiência renal aguda
IRC: insuficiência renal crônica
IRIS: International Renal Interest Society
ITU: infecção do trato urinário
L1: larvas de primeiro estadio
LCan: leishmaniose canina
LCR: líquido cefalorraquidiano
LLA: leucemia linfoblástica aguda
LLC: leucemia linfocítica crônica
LDH: lactato desidrogenase
Lpf: *low power field*, em português, campo de pequena ampliação
NK: *natural killer*
nRBCs: *nucleated red blood cells*, em português, eritrócitos nucleados
PAAF: punção aspirativa por agulha fina
PCV: *packed cell volume*, em português, volume globular compactado
PDFs: produtos de degradação da fibrina
PIF: peritonite infecciosa felina
PLI: *pancreatic lipase immunoreactivity*, em português, imunorreatividade da lipase pancreática
PLT: plaquetócrito
PNAAF: punção não aspirativa por agulha fina
PO: (administração) *per os*, em português, por via oral
PT: *prothrombin time*, em português, tempo de protrombina
PTH: *parathyroid hormone*, em português, hormona paratiroideia
PTHrp: *parathyroid hormone related protein*, em português, proteínas relacionadas com a hormona paratiroideia
Rácio A/G: rácio albumina/globulinas
Rácio Pur/Cur: rácio proteína urinária/creatinina urinária
Razão N:C: razão núcleo:citoplasma
RBC: *red blood cells*, em português, glóbulos vermelhos ou eritrócitos
RDW: *red cell distribution width*, em português, índice de distribuição do tamanho dos eritrócitos
SC: (administração por via) subcutânea

SDMA: *symmetric dimethylarginine*, em português, dimetilarginina simétrica

SFL: *side fluorescence light*, em português, luz fluorescente lateral

sGOT: *sérum glutamic oxaloacetic transaminase*, em português, transaminase oxaloacética glutâmica

sGPT: *sérum glutamic pyruvic transaminase*, em português, transaminase pirúvica glutâmica

SSL: *side scatter light*, em português, luz dispersa lateral

T3: triiodotironina

T4I: tiroxina livre

T4t: tiroxina total

TFG: taxa de filtração glomerular

TLI: *trypsin-like immunoreactivity*, em português, imunorreatividade semelhante à tripsina

TSH: *tireostimuline hormone*, em português, hormona tireoestimulina

TT: *thrombin time*, em português, tempo de trombina

VCM: volume corpuscular médio

VPM: volume plaquetário médio

WBC: *white blood cells*, em português, glóbulos brancos ou leucócitos

I. Introdução

O presente relatório pretende descrever o estágio curricular de final de curso, incluído no plano de estudos do 6º ano letivo do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade de Évora. Este estágio teve a duração de quatro meses e foi realizado na área de Diagnóstico Laboratorial, no Laboratório *Inno – Serviços Especializados em Veterinária, Lda.*, em Braga, no período de 4 de novembro de 2013 a 7 de março de 2014, sob a orientação da Professora Doutora Maria Eduarda Marques Madeira da Silva Potes e a coorientação da Doutora Maria Paula Martins Brilhante Simões.

O objetivo geral do estágio foi proporcionar aprendizagem, treino e aprofundamento de conhecimentos na área de Diagnóstico Laboratorial Veterinário, permitindo o desenvolvimento, em contexto profissional, das competências adquiridas durante a formação académica, nomeadamente, na vertente de Semiologia Médica.

O estágio teve como objetivos específicos o acompanhamento da rotina laboratorial, desde a receção, processamento das amostras com aplicação prática das várias técnicas de diagnóstico laboratorial, relacionamento dos resultados obtidos com os possíveis significados patológicos até à emissão de diagnósticos compatíveis.

O processo de reconhecimento da doença engloba três níveis, sendo o diagnóstico laboratorial, quando necessário, o último nível, após o proprietário do animal (primeiro nível) e o médico veterinário assistente (segundo nível) (Saliki, 2006).

Para além do papel no diagnóstico, o laboratório pode desempenhar também funções de consultoria, interpretação de resultados e de vigilância epidemiológica.

Sendo o diagnóstico um processo complexo que envolve múltiplas etapas, é essencial que haja uma comunicação clara entre os vários intervenientes – proprietário, médico veterinário e patologista clínico – para se alcançar um diagnóstico rápido e fiável.

O relatório de estágio apresentar-se-á dividido em quatro partes distintas. A primeira corresponderá à descrição do local de estágio, na segunda parte será apresentada toda a casuística inerente ao período de estágio e referidas todas as atividades acompanhadas e realizadas no mesmo. A terceira parte consiste numa revisão bibliográfica sobre três das áreas de patologia clínica com maior relevo no diagnóstico laboratorial veterinário: Hematologia, Bioquímica e Urinálise. Por fim, na quarta parte é descrita a abordagem laboratorial de um caso clínico de Leishmaniose Canina acompanhado durante o período de estágio.

Parte I: apresentação do local de estágio

A empresa Inno, com nome abreviado de *innovation*, surgiu em Braga no ano de 2007, com o objetivo de facultar uma melhor prestação de cuidados de saúde aos nossos animais de companhia e de facilitar o trabalho do médico veterinário através do acesso a serviços de laboratório veterinário e consultoria veterinária.

O laboratório Inno trabalha em parceria com outros laboratórios de diagnóstico, disponibilizando aos seus clientes um amplo catálogo de provas nas áreas de Hematologia, Coagulação, Bioquímica e Doseamento de Fármacos, Urinálise, Parasitologia, Microbiologia, Imunologia, Biologia Molecular, Toxicologia, Endocrinologia, Alergologia, Citologia e Histopatologia.

Para além disso, a empresa aposta numa equipa constituída essencialmente por médicos veterinários, em meios tecnologicamente avançados e em controlos de qualidade exigentes, de modo a assegurar uma resposta rápida e rigorosa às solicitações das clínicas e hospitais veterinários que a ela recorrem, contribuindo assim para o bem-estar da comunidade animal.

Ao início de cada dia de trabalho, no âmbito do controlo de qualidade interna, são analisadas amostras de controlo, isto é, soluções de composição analítica conhecida, cujos resultados deverão apresentar-se dentro dos intervalos de referência, em todos os equipamentos automáticos. Este sistema de controlo de qualidade permite alertar sobre alterações de reagentes e erros instrumentais, para que estes sejam rapidamente corrigidos, não interferindo com a exatidão e precisão dos resultados laboratoriais fornecidos.

O laboratório Inno encontra-se espacialmente dividido entre a zona de receção de amostras, laboratório de análises clínicas e de citologia e o laboratório de histopatologia. À zona de receção chegam diariamente amostras de todo o país, através de correio e transportadoras, e ainda de clínicas veterinárias das zonas de Aveiro, Porto e Braga, recolhidas por viaturas próprias do laboratório.

As amostras devem vir acompanhadas de uma requisição específica, fornecida pelo laboratório, na qual deverá estar discriminada a identificação da clínica/hospital e do médico veterinário requerente, os dados do animal (nome, espécie, raça, sexo, idade e história clínica), do proprietário, a indicação do material colhido (tipo, dia, hora e método da colheita e número de amostras) e as análises solicitadas. Podem ser requisitados parâmetros individuais ou perfis analíticos.

As amostras que dão entrada no laboratório são inseridas na base de dados interna, para que lhes seja atribuída uma etiqueta com um número de identificação específico. Esse número interno de identificação é agrupado em listas de trabalho de forma a orientar o trabalho por áreas de atuação específicas.

Parte II: casuística

Durante o período de estágio foram solicitadas 29967 análises, divididas pelas seguintes áreas apresentadas no gráfico 1.

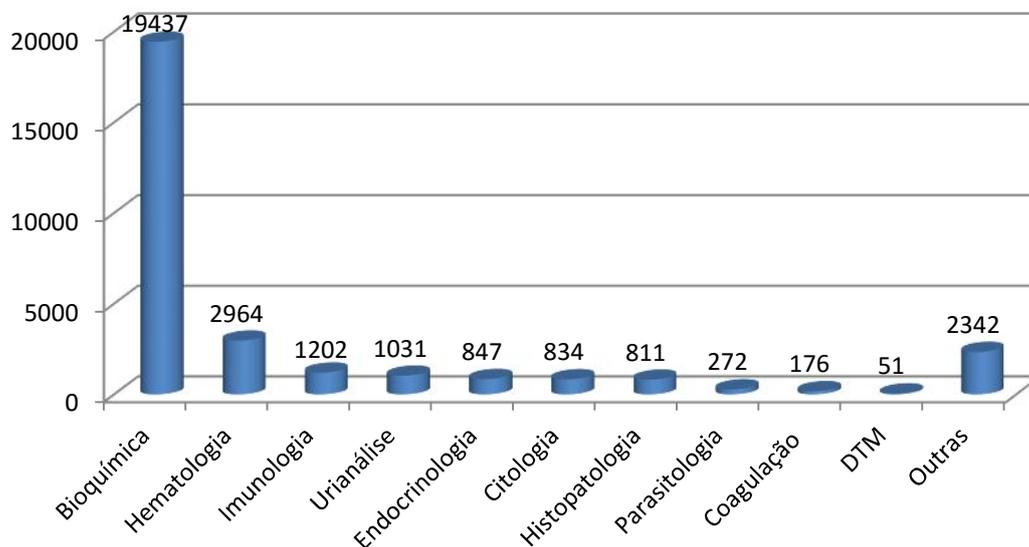


Gráfico 1: Frequência absoluta das análises solicitadas ($n=29967$), divididas pelas diferentes áreas laboratoriais. DTM – meio de teste para dermatófitos.

Como se pode constatar pela observação do gráfico acima, a maior parte dos pedidos foi dirigida às áreas de Bioquímica ($n=19437$), Hematologia ($n=2964$), Imunologia ($n=1202$) e Urianálise ($n=1031$). Estas áreas, exceto a Imunologia, foram também as mais acompanhadas durante o período de estágio e serão, por isso, as mais desenvolvidas neste relatório.

As áreas da Citologia e Histopatologia, por serem muito específicas, foram as menos exploradas. No entanto, houve a oportunidade de preparar as lâminas de citologia para observação microscópica e de assistir ao processo de preparação das amostras histopatológicas, desde a análise macroscópica, processamento automático, impregnação, inclusão, corte dos blocos de parafina e montagem em lâmina até à respetiva coloração.

Nesta parte do relatório, as diferentes áreas serão abordadas por ordem de solicitação de análises, da área mais solicitada para a menos solicitada. Não serão exploradas as áreas de Microbiologia (exceto o meio de teste para dermatófitos, DTM), Alergologia, Biologia Molecular e Toxicologia, representadas no gráfico na categoria “Outras”, por não terem sido acompanhadas durante o período de estágio, uma vez que estas análises são efetuadas em laboratórios parceiros. Os eletrólitos também não serão abordados devido aos mecanismos complexos de regulação, impossíveis de descrever de forma muito sucinta.

1. Análises bioquímicas

As análises bioquímicas são um instrumento de diagnóstico e monitorização poderoso em pacientes doentes ou em pacientes que estão sujeitos a terapia, mas igualmente importante na asserção do estado saudável de muitos animais (Rebar *et al.*, 2004).

Um perfil bioquímico é feito a partir de múltiplas determinações químicas sanguíneas que têm como objetivo “aceder” simultaneamente a vários sistemas de órgãos e compreender o seu estado vital (Rebar *et al.*, 2004).

No laboratório Inno, o perfil bioquímico é o mais requisitado e, em geral, o que inclui mais parâmetros a ser analisados. Durante o período de estágio foram requisitadas 19437 análises bioquímicas, incluindo as enzimas hepáticas (ALT – alanina aminotransferase; AST – aspartato aminotransferase; GGT – gama glutamil transferase; FA – fosfatase alcalina; LDH – lactato desidrogenase), as enzimas pancreáticas (amílase, lípase, PLI (imunorreatividade da lípase pancreática), TLI (imunorreatividade semelhante à tripsina)), a enzima muscular (creatina quinase, do inglês, *creatine kinase* – CK), as proteínas plasmáticas (albumina, globulinas, rácio albumina/globulinas, proteínas totais e proteinograma), os nutrientes e eletrólitos (glucose, colesterol, triglicéridos, folatos, cobalamina, ferro, cálcio total e ionizado, fósforo, magnésio, sódio, potássio, cloro), os metabolitos (amónia plasmática, bilirrubina total e bilirrubina direta, ácido úrico, ureia e creatinina), os ácidos biliares, a frutosamina e, ainda, 74 doseamentos de fármacos (fenobarbital, brometo de potássio, digoxina e levetiracetam). Estes parâmetros constituem um importante complemento ao diagnóstico de determinadas doenças, para além de permitirem monitorizar a evolução do tratamento, e ainda, no caso de doseamento de fármacos, saber se a dose administrada é a adequada.

A maioria das análises bioquímicas foram realizadas em amostras de canídeos, como está evidenciado no gráfico 2. O grupo dos animais de espécies exóticas inclui nesta área, assim como nas restantes áreas de patologia clínica exploradas, essencialmente, aves domésticas e animais de jardim zoológico e de centros de recuperação, tais como tartarugas, sitatungas, cangurus, lamas, girafas, babuínos, búfalos, abutres e flamingos, entre outros.

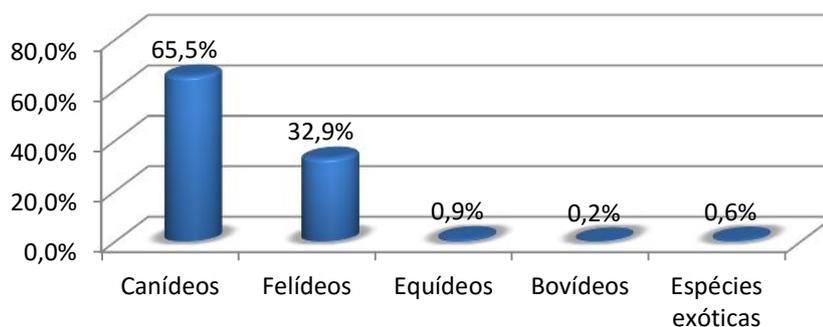


Gráfico 2: Distribuição percentual das análises bioquímicas por espécie (n=19437).

À chegada ao laboratório de análises clínicas, as amostras de sangue destinadas a provas bioquímicas, são, caso seja necessário, imediatamente centrifugadas a 3000rpm durante 10 minutos, de modo a separar-se a fração líquida, isto é o soro ou plasma, onde se realizam os doseamentos, da componente celular do sangue, consoante o sangue tenha sido colhido para um tubo sem ou com anticoagulante, respetivamente. No primeiro caso, o fibrinogénio será convertido num coágulo de fibrina, obtendo-se soro. Se, por outro lado, se usar algum anticoagulante aquando da colheita de sangue, esse inibirá a cascata de coagulação, obtendo-se plasma após a centrifugação (Allison, 2012a).

A fase líquida do sangue deve ser separada da componente celular para evitar a metabolização de certas substâncias séricas, nomeadamente a glicose, a qual é consumida pelas células sanguíneas a uma taxa aproximada de 10% por hora. Uma forma de evitar este consumo de glicose, passa pela colheita para um tubo com fluoreto de sódio, o qual inibe a ação de enzimas glicolíticas celulares (Weiser, 2012a).

As provas bioquímicas realizam-se, geralmente, em soro. Uma alternativa é a utilização de plasma, podendo optar-se por um tubo com heparina, anticoagulante que não interfere na maioria das determinações bioquímicas. As exceções são as proteínas totais, que serão ligeiramente mais altas no plasma devido à presença do fibrinogénio, e o potássio, que diminui ligeiramente em comparação com o nível sérico. A heparina é ainda necessária para a determinação de amónia plasmática sendo também muito usada em provas realizadas em sangue total (Weiser, 2012a).

O EDTA, que se apresenta sob a forma de sais - dissódico (Na_2), dipotássico (K_2) ou tripotássico (K_3), – atua como quelante de iões com elevada afinidade para formar complexos, tais como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , essenciais para o processo de coagulação. Sendo assim, a utilização do plasma com EDTA é inapropriada para a mensuração dos níveis sódio ou potássio, consoante o sal presente no tubo usado, de cálcio e de magnésio, assim como para a determinação da atividade de enzimas que usem esses catiões divalente como cofatores, tais como a fosfatase alcalina (Alves, 2013).

Após a separação das amostras, o soro/plasma é avaliado, registando-se o seu grau de hemólise, lipemia e icterícia, que poderão interferir nos testes e deverão ser tidos em conta aquando da interpretação dos resultados.

Na hemólise, isto é, lise eritrocitária, o soro/plasma aparece com uma coloração avermelhada devido à libertação de hemoglobina. Pode ocorrer *in vivo* numa situação hemolítica intravascular ou *in vitro* durante ou após a colheita de sangue, sendo esta última mais frequente por colheita ou manuseamento impróprio da amostra. A hemólise pode interferir com os ensaios espectrofotométricos por interferência da cor ou, menos comumente, aumentar falsamente os analitos que também se encontram no interior dos eritrócitos, como o K^+ , a CK e a AST, e deve ser evitada usando técnicas adequadas de colheita e separando a fração líquida da componente celular, após a formação do coágulo, que ocorre 15 a 30 minutos após a colheita do sangue (Weiser e Allison, 2012; Tvedten e Thomas, 2012).

Lipemia é a designação dada à coloração esbranquiçada e opaca do soro/plasma devida à presença de quilomicrons. Está geralmente associada a colheitas pós-prandiais mas também pode ocorrer em alterações do metabolismo lipídico. Pode impedir a transmissão de luz na espectrofotometria ou resultar numa aparente diluição das substâncias na componente aquosa do soro/plasma. Uma forma de a minimizar é fazendo colheitas após um período de jejum de 8 a 12 horas (Weiser e Allison, 2012; Tvedten e Thomas, 2012).

A icterícia, isto é, excessiva pigmentação amarela do soro/plasma, sugere hiperbilirrubinemia e também pode interferir com os testes espectrofotométricos (Weiser e Allison, 2012; Tvedten e Thomas, 2012). Na figura 1 encontram-se representados exemplos de amostras de soro normal, hemolisado, lipémico e icterício.

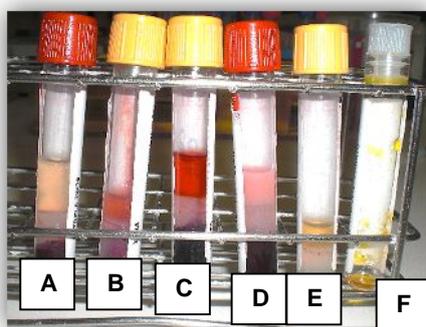


Figura 1: Fotografia representativa de amostras de soro normal (A), hemolisado (B e C), hemolisado e lipémico (D) e icterício (E e F).

Caso o soro ou plasma não seja imediatamente analisado, deverá ser refrigerado a quatro graus Celsius durante 24 a 48 horas, ou então congelado, para estabilizar a maioria dos seus constituintes químicos. Uma vez que as atividades enzimáticas diminuem rapidamente, deverão ser determinadas nas primeiras 24 horas após a colheita. Sabe-se ainda que a congelação pode acelerar significativamente a perda de atividade da ALT, não sendo recomendada (Weiser, 2012a).

No laboratório Inno, a maioria das provas bioquímicas são efetuadas num equipamento automático de espectrofotometria de absorvância (Mindray BS-380®) (Weiser, 2012b).

A espectrofotometria de absorvância é muito usada nos doseamentos bioquímicos. Nesta técnica analítica, um feixe de luz, com um determinado comprimento de onda, é direcionado para uma solução contendo a substância, ou o produto da mesma, que se quer detetar. Depois de medir a quantidade de luz absorvida, isto é, a absorvância da solução a analisar, é determinada a concentração da substância presente. Para medir as atividades enzimáticas o equipamento recorre a um ensaio cinético. Uma solução contendo um substrato da enzima de interesse é adicionado à amostra de soro/plasma, numa cuvete do espectrofotómetro. Quando a enzima sérica/plasmática começa a converter o substrato em produto, inicia-se a medição

periódica da absorvância, controlando-se assim a taxa de formação de produto. Por fim, esta taxa é convertida em atividade enzimática, apresentada em UI/L (Weiser, 2012b).

A PLI, TLI, folato e cobalamina são analisados por imunoensaio quantitativo, usando anticorpos espécie-específicos para detetar o antigénio (Ag) em questão. O sinal medido na amostra pela formação do complexo antigénio-anticorpo é comparado com o sinal obtido de padrões com concentrações conhecidas de Ag (Jensen, 2012).

O ionograma – sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cloro (Cl⁻) e cálcio ionizado (Ca²⁺) – é executado num equipamento que se baseia na técnica da potenciometria (StarlyteV[®]), método eletroquímico fundamentado no desenvolvimento e consequente medição de diferenças de potencial elétrico entre dois elétrodos ião-específicos (Weiser, 2012b).

2. Hematologia

A hematologia é o ramo da medicina que engloba a contagem e diferenciação dos elementos sanguíneos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos), a determinação dos seus índices no hemograma, o estudo da morfologia celular e a pesquisa de agentes infecciosos em esfregaço sanguíneo e a tipificação do grupo sanguíneo (Torrance, 2000)

No período de estágio, houve um total de 2964 amostras nesta área, distribuídas segundo o gráfico 3, sendo a maior parte pedidos de hemograma. O gráfico 4 representa a distribuição de análises por espécie, onde se destaca um grande predomínio de amostras de canídeos.

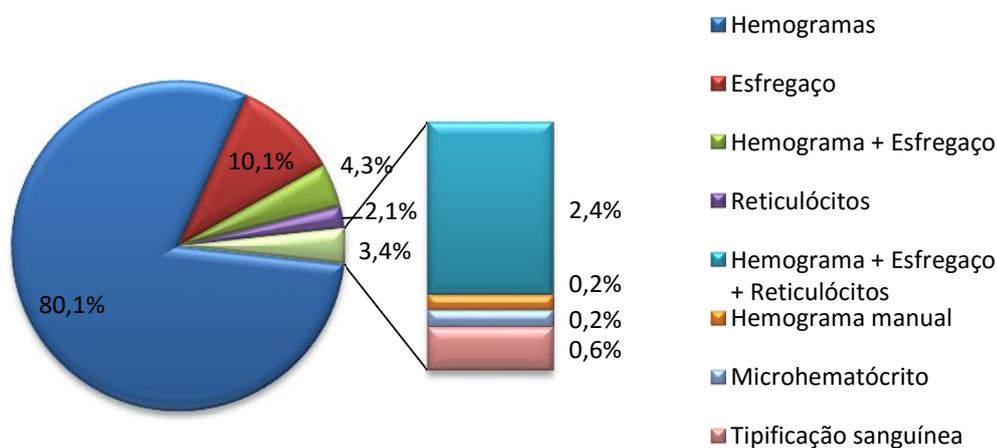


Gráfico 3: Frequência relativa (em %) das análises hematológicas solicitadas ($n=2964$).

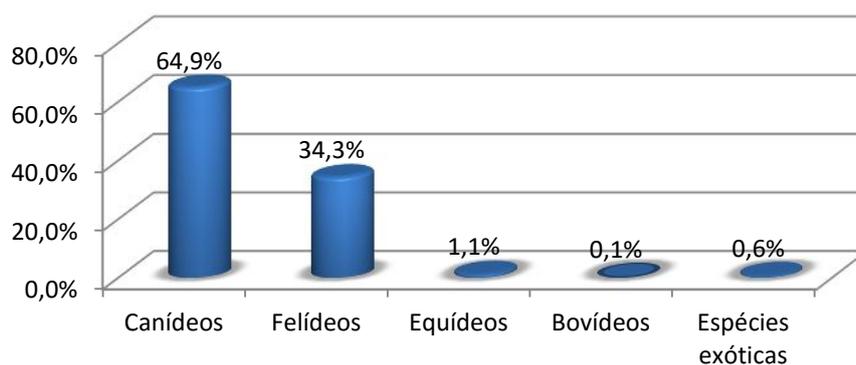


Gráfico 4: Frequência relativa (em %) das análises hematológicas por espécie ($n=2964$).

Para avaliação hematológica, o sangue deverá ser colhido para um tubo contendo ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), anticoagulante que melhor preserva o detalhe celular da maioria das espécies veterinárias (Weiss e Tvedten, 2012a). A exceção são alguns répteis e aves, cujo sangue hemolisa quando colhido para o EDTA, devendo-se nestes casos optar pela heparina (Harvey, 2012). Outra vantagem da escolha do EDTA é não interferir com a coloração dos leucócitos quando são usados corantes de Romanowsky (Metzger e Rebar, 2004a).

Uma forma de minimizar a ocorrência de agregados plaquetários e/ou leucocitários, que interferem com as contagens celulares no hemograma, reside na colheita de sangue para um tubo de citrato ou pela colheita direta para um tubo de vácuo. No entanto, o tubo de citrato geralmente não é usado para contagens celulares, devido à diluição do sangue em 10% pelo anticoagulante. Caso se use este tubo para a contagem das plaquetas, é necessário corrigi-la para esta diluição (Harvey, 2012).

Aquando da colheita de sangue, para qualquer tubo com anticoagulante, é muito importante respeitar o volume recomendado pelo fabricante, de forma a obter-se a proporção adequada de sangue e anticoagulante. Assim evitam-se falsas contagens e coagulações indesejadas. Após a colheita, o sangue deve ser cuidadosamente homogeneizado para evitar a sua hemólise e coagulação (Rebar *et al.*, 2004a).

Quando dão entrada no laboratório, as amostras de sangue destinadas à hematologia são colocadas no agitador mecânico, demonstrado na figura 2, durante cerca de 10 minutos, para uma homogeneização adequada do sangue, antes de se iniciar o seu processamento.

Todos os tubos de sangue com anticoagulante devem ser examinados quanto à presença de coágulos macroscópicos, antes de serem submetidos a testes hematológicos (Weiss e Tvedten; 2012a).



Figura 2: Agitador mecânico homogeneizando as amostras de sangue com EDTA.

Caso não seja imediatamente analisado, o sangue deverá ser refrigerado para minimizar alterações principalmente na linha eritroide. Weiss e Tvedten (2012a) referem que os eritrócitos começam a aumentar de volume seis horas após a colheita, o que provoca falsos aumentos do volume corpuscular médio (VCM) e, conseqüentemente, do hematócrito (HCT), e diminuições da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

2.1. Hemograma

O hemograma (do inglês, *count blood cells* – CBC) consiste num conjunto de testes hematológicos usados para descrever quantitativa e qualitativamente as células sanguíneas, permitindo detetar muitas alterações e condições patológicas (Weiss e Tvedten, 2012a). Está indicado na avaliação de qualquer paciente doente, com sinais vagos de doença ou sujeito a um tratamento prolongado, devendo, ainda, fazer parte de um painel pré-anestésico, geriátrico, de dador de sangue ou de rotina. Outra das suas indicações é na monitorização de animais com alterações hematológicas já diagnosticadas (Metzger e Rebar, 2004a).

O hemograma é constituído pelo leucograma, eritrograma e plaquetograma, que correspondem, respetivamente, às contagens das linhas leucocitária, eritrocitária e plaquetária. O primeiro engloba a contagem de leucócitos totais (por μL de sangue) e as contagens diferenciais relativa (percentagem) e absoluta (número de células por μL). O eritrograma abrange o número total de eritrócitos (por μL), a quantidade de hemoglobina (g/dL), o HCT (em percentagem), o VCM (em fL), a hemoglobina corpuscular média (HCM, em pg), a CHCM (em g/dL) e o índice de variação de tamanho dos eritrócitos (do inglês, *Red Cell Distribution Width* – RDW, em percentagem ou fL). Por fim, o plaquetograma consiste na contagem total de plaquetas (por μL), plaquetócrito (PLT, em percentagem) e volume plaquetário médio (VPM, em fL).

As contagens celulares são habitualmente feitas, de modo automático, por métodos de impedância ou óticos (citometria de fluxo). O Sysmex XT – 2000iV[®] é um dos analisadores hematológicos automáticos que apresenta estas duas metodologias.

No método de impedância, a amostra de sangue é diluída numa solução eletrolítica e lançada através de uma pequena abertura entre dois elétrodos. A passagem de cada célula sanguínea através dessa abertura provoca uma alteração na impedância elétrica e um pulso de voltagem mensurável. De acordo com o princípio de Coulter, a frequência de pulsos indica o número de células e a magnitude na alteração da resistência elétrica determina o tamanho celular (Rebar *et al.*, 2004a). O equipamento está calibrado para contar apenas as células que se apresentam dentro de um determinado intervalo de volume, correspondente ao dos eritrócitos e das plaquetas das diferentes espécies analisadas. A determinação do número de eritrócitos e do seu tamanho permite calcular o hematócrito e as concentrações de hemoglobina (Weiss e Tvedten, 2012a).

É fundamental a observação do histograma de eritrócitos e plaquetas, fornecido pelo equipamento automático, para detetar erros na separação das duas linhas celulares. Isto é bastante comum em sangues de felídeos, nos quais é frequente a sobreposição do tamanho das grandes plaquetas com o dos pequenos eritrócitos e quando estão presentes agregados plaquetários (Weiss e Tvedten; 2012a).

No método ótico, as células, depois de diluídas e coradas com uma substância fluorescente, passam individualmente através de um feixe de laser, absorvendo e dispersando a luz (figura 3). As contagens de células baseiam-se nas descontinuidades na passagem de luz, enquanto o tamanho e a complexidade celular interna são determinados pela luz dispersa frontal (do inglês, *front scatter light* – FSL) e lateral (do inglês, *side scatter light* – SSL), respetivamente. Por outro lado, a emissão do feixe laser para as células sanguíneas fluorescentes produz uma luz de maior comprimento de onda que a original. Quanto maior a concentração de corante, que depende do conteúdo de ácido ribonucleico (ARN), maior é a intensidade da luz fluorescente lateral (do inglês, *side fluorescence light* – SFL) (Harvey, 2012 e Sysmex Corporation, 2009). O sistema de citómetro de fluxo a laser fornece um diferencial leucocitário de cinco populações contagem de reticulócitos, eritrócitos e de plaquetas óticas, com base no tamanho e complexidade interna (Weiss e Tvedten, 2012a)

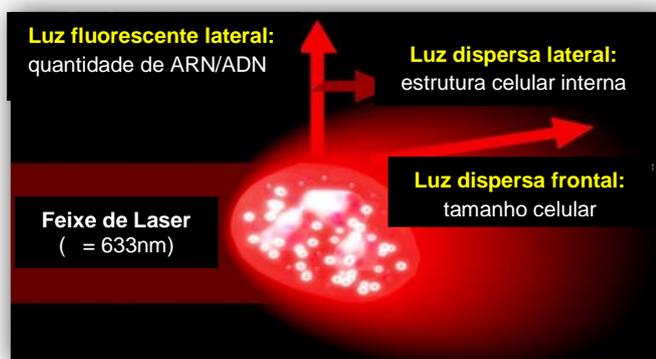


Figura 3: Representação esquemática do sistema de laser do analisador hematológico automático. Adaptado de Sysmex®, 2015.

Os resultados do hemograma são apresentados sob a forma numérica e gráfica, através de histogramas e gráficos de dispersão, os quais permitem uma visualização rápida da distribuição das diferentes linhas celulares. Outra das vantagens destes equipamentos é a presença de alertas (*flags*) sobre padrões anormais detetados nos gráficos.

Apesar da citometria de fluxo ser considerada o *gold standard* em hematologia automática, apresenta algumas limitações. Lilliehöök e Tvedten (2009) destacam como principais limitações do Sysmex XT – 2000iV® a incapacidade de deteção de desvios à esquerda, de alterações tóxicas, de linfócitos atípicos, de agregados plaquetários e eritrocitários, de fragmentos de eritrócitos, de eritrócitos resistentes à lise, de eritrócitos nucleados (nRBCs), de células blásticas e mastócitos; a ineficácia na identificação de basófilos e no reconhecimento de reticulócitos ponteados.

2.2. Hemograma manual

O hemograma de aves e répteis não pode ser realizado em analisadores automáticos devido ao facto destes animais possuírem eritrócitos e plaquetas nucleados, que o equipamento não consegue diferenciar dos leucócitos. Nestes casos, usa-se um hematocítmetro, como a câmara de Neubauer modificada representada na figura 4 e recorre-se ao método de Natt-Herrick, descrito no anexo 1, para realização das contagens de leucócitos e de eritrócitos.

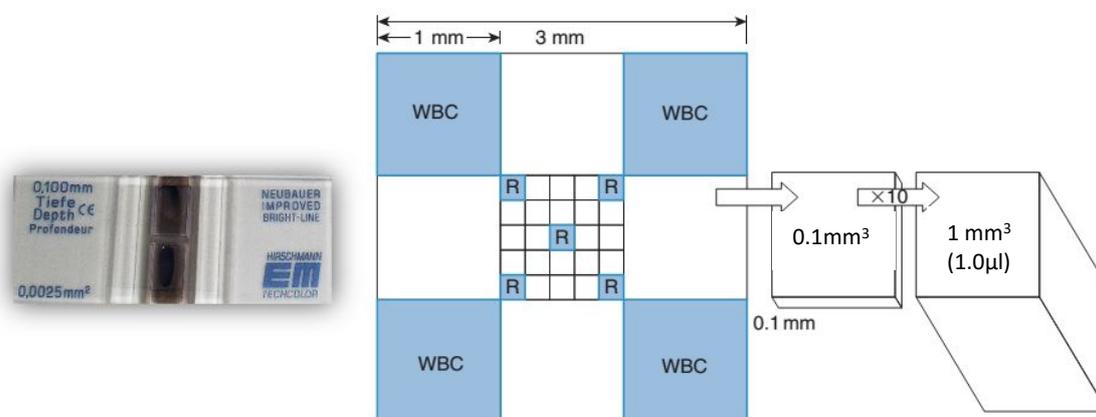


Figura 4: Fotografia da câmara de Neubauer modificada usada no laboratório e representação esquemática das suas divisões com as respetivas medidas. Adaptado de Weiss e Tvedten, 2012a. WBC – leucócitos; R – eritrócitos.

Os leucócitos contam-se em todos os quadrados grandes da câmara, sendo quantificados pela fórmula: $N^{\circ} \text{ leucócitos total}/\mu\text{L} = n^{\circ} \text{ células} + 10\% n^{\circ} \text{ células} \times 200$. Para quantificação do número total de eritrócitos usam-se cinco quadrados pequenos (os 4 das pontas e o central) do

quadrado grande do meio e a fórmula: N° eritrócitos total/ μ L= n° células x 10000 (Campbell, 1995).

O hemograma manual engloba ainda a medição da fração do volume total de sangue que é ocupado pelos eritrócitos (*packed cell volume* – PCV), a qual é determinada após centrifugação do sangue num tubo capilar. Na figura 5 encontra-se representado um tubo de microhematócrito após a centrifugação do sangue, no qual é possível identificar três frações distintas: plasma, *buffy coat* e depósito de eritrócitos. Dividindo a área ocupada pelos eritrócitos pela área total preenchida com sangue, e multiplicando por 100, obtém-se o PCV em percentagem, o qual pode ser facilmente determinado com o auxílio de uma escala de leitura (Villiers, 2005).



Figura 5: Capilar de microhematócrito evidenciando um soro icterício.

2.3. Contagem de reticulócitos

A contagem absoluta de reticulócitos é indicada para avaliar a existência ou não de uma resposta regenerativa, perante uma situação de anemia. Weiss e Tvedten (2012b) recomendam a sua realização em cães e gatos com hematócritos inferiores a 30% e a 20%, respetivamente.

No laboratório Inno, a contagem de reticulócitos é geralmente feita no analisador automático, através da citometria de fluxo. Contudo, a contagem manual é também usada recorrendo a uma mistura de igual volume de sangue com EDTA e de Novo azul-de-metileno. A contagem manual é usada principalmente para confirmar a contagem emitida pelo citómetro de fluxo em casos de discordância entre o grau de policromasia observado no esfregaço e a contagem de reticulócitos emitida no hemograma.

A contagem manual é muito mais morosa e imprecisa que a automática, devido à grande variação entre observadores. (Weiss e Tvedten, 2012b).

2.4. Esfregaço sanguíneo

Por cada hemograma solicitado é rotineiramente realizado um esfregaço sanguíneo, para identificação de agregados plaquetários, confirmação das contagens celulares emitidas pelo equipamento automático, observação da morfologia celular e identificação de hemoparasitas.

O esfregaço sanguíneo permite identificar inúmeras alterações morfológicas não detetadas pelo analisador hematológico, por isso a sua avaliação deveria constar de qualquer hemograma. É recomendada a realização do esfregaço na primeira hora após a colheita do sangue, evitando-se assim alterações artefactuais, que distorcem a morfologia eritrocitária e leucocitária, e a agregação plaquetária. Os artefactos mais comuns associados ao

envelhecimento da amostra são a crenação eritrocitária, hipersegmentação neutrofílica, distorção nuclear nos linfócitos e vacuolização nos neutrófilos e monócitos (Metzger e Rebar, 2004a).

De entre as várias técnicas de preparação de um esfregaço sanguíneo, o método das duas lâminas, representado na figura 6 e descrito no anexo 1, é o mais usado. O ângulo entre as duas lâminas poderá ser ajustado de acordo com a viscosidade do sangue, isto é, diminuído em sangues mais viscosos e aumentado em sangues mais fluidos (Harvey, 2012).



Figura 6: Ilustração da técnica de preparação de esfregaços sanguíneos usada.

O objetivo é obter um esfregaço de qualidade, constituído por três zonas distintas: o corpo, a monocamada e o bordo (figura 7).

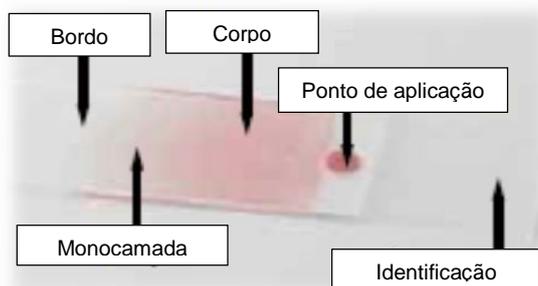


Figura 7: Identificação dos vários componentes de um esfregaço sanguíneo. Adaptado de Metzger e Rebar, 2004a.

O esfregaço, devidamente identificado, no canto fosco da lâmina, com o nome e código de identificação do animal, deve ser imediatamente seco e corado com colorações do tipo Romanowsky, como a Wright, Wright-Giemsa, ou colorações rápidas do tipo Diff-Quick®. É importante realizar uma boa secagem, fixação e lavagem para evitar artefactos de coloração, tais como inclusões eritrocitárias refráteis e precipitados de corante (Harvey, 2012).

O exame sistemático do esfregaço sanguíneo ao microscópio ótico deve iniciar-se com uma objetiva de menor ampliação (10x ou 20x), observando-se a lâmina na totalidade para verificar a espessura, distribuição celular e diferenciação das três zonas. Avalia-se o bordo em busca de microfilárias, organismos fagocitados, células atípicas e agregados plaquetários. O

corpo do esfregaço é examinado para pesquisa de *rouleaux* ou aglutinação eritrocitária. De seguida, passa-se à objetiva de 40x para verificar as contagens total e diferencial de leucócitos na zona de monocamada, isto é, uma área fina na qual os eritrócitos estão justapostos mas raramente se tocam, evidenciando a sua palidez central, depois de corados (Weiss e Tvedten; 2012a). Por último, recorre-se à objetiva de imersão (50x ou 100x) para analisar a morfologia das diferentes linhas celulares, identificar eventuais hemoparasitas e, se necessário, efetuar uma contagem estimada do número total de plaquetas (Metzger e Rebar, 2004a).

2.5. Tipificação sanguínea

Os testes de tipificação sanguínea são geralmente usados para conhecer o grupo sanguíneo de um possível dador ou recetor de sangue, permitindo fazer transfusões sanguíneas seguras.

No Laboratório Inno, usam-se *kits* de tipificação constituídos por cartões teste, onde são realizados ensaios de aglutinação, uma solução de controlo positivo (apenas no kit destinado a cães) e uma solução diluente.

Os cartões contêm poços de reação com liofilizados de anticorpos. Estes cartões possuem um poço de teste de autoaglutinação, no qual é apenas diluído o sangue do paciente a testar. Na presença de autoaglutinação é recomendada a lavagem de eritrócitos para evitar interferências nos resultados. Depois de excluída a autoaglutinação, testa-se, no cartão para cão, o controlo positivo, o qual deverá aglutinar quando misturado com o diluente no poço específico. Por fim, no último (s) poço (s) do cartão, testa-se o tipo de sangue do paciente misturando uma gota do seu sangue com uma gota de diluente. Na figura 8 encontra-se uma representação de um sangue canino DEA 1.1 positivo e de um sangue felino do tipo B. Estes *kits* rápidos permitem testar apenas o tipo DEA 1.1, o mais comum em cães, e os tipos A, B e AB em gatos (Brown e Vap, 2012).

O DEA 1.1 é considerado o grupo sanguíneo canino mais antigénico e clinicamente relevante, podendo as suas incompatibilidades causar reações hemolíticas agudas fatais, quando transfundido para cães previamente sensibilizados (Kessler *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011).

Têm sido descritos mais de 12 grupos sanguíneos caninos, muitos dos quais pertencentes ao sistema DEA (*dog erythrocyte antigen*): DEA 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. O sistema DEA 1 contém três alelos (DEA 1.1, 1.2 e 1.3), podendo os eritrócitos de cada indivíduo canino não exprimir os genes de nenhum destes alelos ou exprimir apenas de um, para além da expressão independente dos genes dos restantes grupos sanguíneos (Brown e Vap, 2012).

Uma das principais limitações da tipificação por ensaio de aglutinação em cartão é a sua baixa sensibilidade para detetar Ag DEA 1.1, quando estes se encontram em níveis inferiores aos dos anticorpos (Ac) presentes no poço de reação, devido ao fenómeno prozona. Nesse caso, deve ser adicionada uma gota adicional de diluente, de modo a obter-se uma proporção

equilibrada de Ac e Ag. Uma forma de evitar esse fenômeno é concentrar os eritrócitos de animais com PCV<10%. Outro aspecto negativo desta técnica é a possibilidade de ocorrência de falsos positivos, provavelmente por reação cruzada com Ag DEA 1.2. Assim, apenas as reações de aglutinação inequívocas (i.e., 2+) devem ser interpretadas como 1.1 positivas. Reações de aglutinação fracas devem ser confirmadas por outros testes de tipificação sanguínea, tais como a imunocromatografia em cartucho, migração em gel e a tradicional técnica de aglutinação em tubo (Kessler *et al.*, 2010; Brown e Vap, 2012).

Uma vez que estes *kits* caninos de aglutinação e imunocromatografia testam apenas a presença de Ag DEA 1.1, devem ser usados apenas para testar potenciais dadores. Caso estes sejam DEA 1.1 negativos, é recomendada a testagem posterior com antissoros mais específicos, de modo a descartar a presença de DEA 1.2, outro dos antígenos muito comum na população canina e capaz de causar uma severa reação de incompatibilidade quando transfundido para cães previamente sensibilizados (Brown e Vap, 2012).

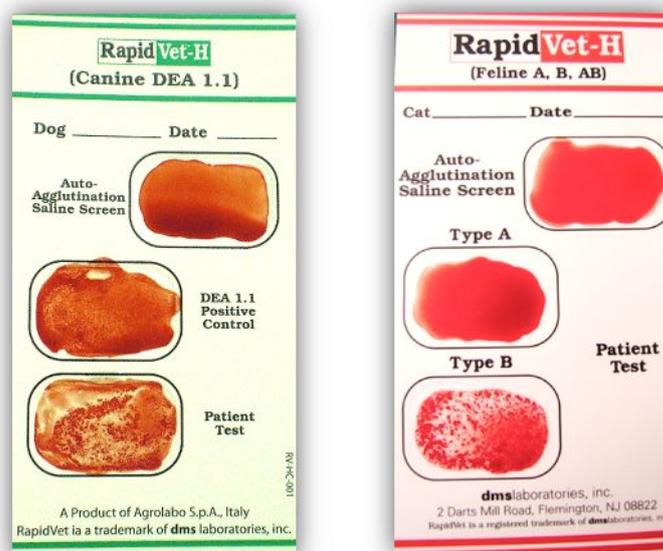


Figura 8: Fotografias de um cartão de tipificação sanguínea de cão (esq.) e de um de gato (dir.), evidenciando um sangue DEA 1.1 + e outro de tipo B (esq. – esquerda; dir. – direita: adaptado de Brown e Vap, 2012).

3. Imunologia

Os testes imunológicos podem ser usados para detectar Ag em amostras biológicas ou, mais comumente, evidenciar a presença de Ac específicos para determinado agente, demonstrando assim que o animal foi exposto a determinado organismo. Podem ainda ser feitas medições seriadas de Ac IgG ou IgM, com semanas de intervalos, de modo a evidenciar infecções progressivas ou regressivas (Day e Schultz, 2011).

A área de imunologia foi a terceira mais solicitada durante o estágio no laboratório Inno, com 1202 pedidos, entre provas de pesquisa de Ag e de Ac, essencialmente por ELISA e imunofluorescência indireta (IFI). O gráfico 5 evidencia que o teste mais solicitado foi, de longe, a pesquisa de Ac de *Leishmania infantum* pelo método ELISA (Leiscan®). Na fatia “Outros” estão incluídas testes serológicos de *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Babesia caballi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Borrelia burgdorferi*, *Neospora* spp., *Brucella canis*, Panleucopenia e Calicivírus felinos, anticorpos vacinais caninos e felinos, anticorpos anti-nucleares, fator reumatoide e ainda a pesquisa de Ag de *Parvovírus* spp. nas fezes.

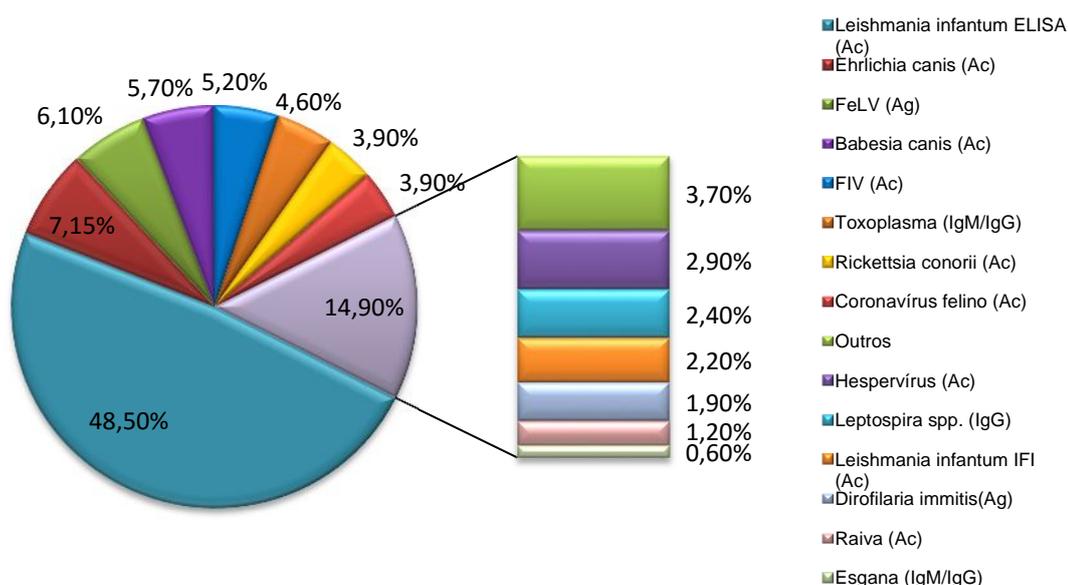


Gráfico 5: Frequência relativa (em %) das análises solicitadas na área de imunologia ($n=1202$). Ac – anticorpos, FeLV – vírus da leucemia felina, Ag – antígeno, Ig – imunoglobulina, IFI – imunofluorescência indireta.

3.1. Teste de imunofluorescência indireta (IFI)

A imunofluorescência indireta é um teste de imunodeteção que usa Ac marcados com fluorescência para destacar antígenos presentes em células ou dentro de secções histológicas (Warren, 2014).

Neste procedimento, o agente (isolado ou associado a culturas de células onde cresceu) está espalhado e fixo à superfície de lâminas. Ao juntar o soro, devidamente diluído, se o animal for positivo, ocorre a ligação Ag-Ac evidenciada pelo antissoro conjugado com um fluorocromo posteriormente adicionado. Quando a lâmina é depois observada ao microscópio, sob feixe de ultravioletas, a ligação Ag-Ac torna-se visível (Day e Schultz, 2011; Warren, 2014).

Como exemplo deste teste de diagnóstico, o Inno disponibiliza a deteção de anticorpos IgG para *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, Esgana, *Babesia canis*, *Rickettsia conorii* e *Neospora canis*.

3.2. ELISA

Os ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são testes imunoenzimáticos para detecção de Ac ou Ag. Na detecção de Ac (ELISA indireto), o Ag de interesse encontra-se na base dos poços da placa ELISA e os soros diluídos a processar são então adicionadas aos poços, seguindo-se uma lavagem para remover os Ac não ligados ao Ag. É depois adicionado um antissoro que, conjugado com uma enzima, se liga à ligação Ac-Ag. Após uma segunda lavagem é, por fim, adicionado um substrato cromogéneo que inicia uma mudança de cor medida, posteriormente, no espectrofotómetro (Day e Schultz, 2011; Warren, 2014).

Este método de diagnóstico é usado no diagnóstico de *Leishmania infantum*, vírus da esgana, coronavírus felino, vírus da imunodeficiência felina (*feline immunodeficiency virus* – FIV), etc. Por outro lado, o teste ELISA para detecção e quantificação de Ag (ELISA direto), possui inicialmente um antissoro na base dos poços com Ac específicos para o Ag de interesse. Ao adicionar o soro do animal, caso o Ag esteja presente na amostra, liga-se ao antissoro do teste (Day e Schultz, 2011; Warren, 2014). Como exemplo de testes para detecção de Ag temos a pesquisa do vírus da leucemia felina (*feline leucemia virus* – FeLV) e a pesquisa de *Dirofilaria immitis*.

3.3. Aglutinação

A aglutinação é um teste imunológico que envolve a interação direta entre o Ag e o Ac, a qual pode ser observada macro ou microscopicamente (Day e Schultz, 2011).

É o método de eleição para diagnóstico de *Leptospira* spp., no qual as bactérias vivas se ligam aos Ac, aglutinando (Greene *et al.*, 2012).

Um tipo particular de aglutinação é a hemaglutinação indireta, na qual o Ag de interesse se encontra na superfície de eritrócitos e, quando em contacto com os Ac específicos do soro a analisar, provoca uma aglutinação visível (Day e Schultz, 2011). Este é um dos métodos de diagnóstico de Toxoplasmose, no qual se pode quantificar o título de Ac anti-*Toxoplasma gondii*, assim como diferenciar a presença de anticorpos IgG e IgM ao usar um reagente que inibe a capacidade de aglutinação das IgM (Toxo-Hai Fumouze®, distribuído por Fumouze diagnostics).

4. Urianálise

A urianálise (ou análise de urina) é um teste laboratorial económico e sensível, de execução fácil e rápida, que fornece informações muito úteis sobre o estado geral do paciente (Wamsley e Alleman, 2007). A análise completa da urina inclui a avaliação das suas características físicas (cor, turvação e densidade urinária) e químicas (pH, concentração de proteínas, glicose, cetonas, bilirrubina, urobilinogénio, sangue oculto, leucócitos e nitritos) –

urianálise tipo I – bem como o exame microscópico do seu sedimento – urianálise tipo II (Chew *et al.*, 2011).

Como se pode ver pela observação do gráfico 6, a urianálise tipo I foi a análise de urina mais solicitada durante o período de estágio, com 377 pedidos num total de 1031 análises, provavelmente por estar incluída no perfil analítico destinado a animais geriátricos, sendo a análise mais solicitada na espécie canina, ao contrário da espécie felina, com maior número de urianálises tipo II.

A área da urianálise engloba ainda o rácio proteína urinária/creatinina urinária (Pur/Cur) e o estudo, qualitativo ou quantitativo, da composição dos cálculos urinários, o qual é realizado num laboratório externo. As culturas bacteriológicas de urina não são apresentadas no gráfico, porque foram incluídas na secção da microbiologia.

O rácio Pur/Cur é determinado através da divisão das concentrações de proteína e de creatinina, determinadas por espectrofotometria de absorvância, numa amostra de urina.

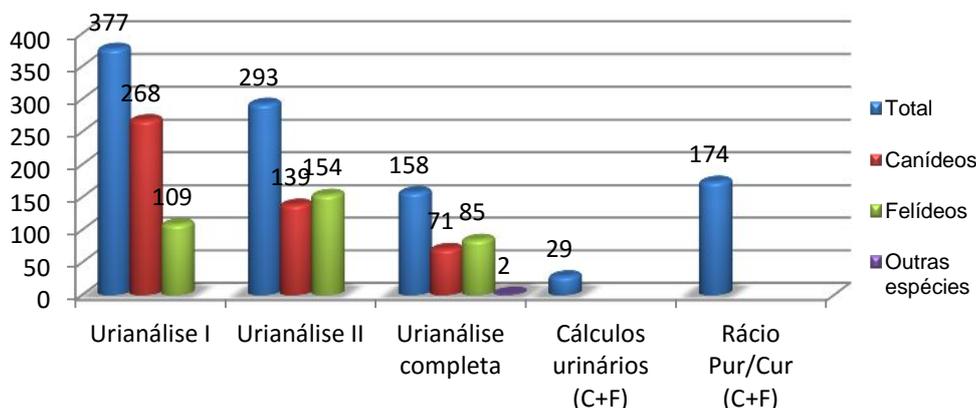


Gráfico 6: Frequência absoluta dos vários tipos de análises realizadas em amostras de urina das diferentes espécies. C+F – Canídeos + Felídeos; Rácio Pur/Cur – rácio proteína urinária/creatinina urinária.

A análise de amostras de urina, como meio de diagnóstico, é essencial, não só para descartar ou confirmar o diagnóstico de afeções suspeitas do trato urinário, mas também para fornecer informação sobre o funcionamento de outros órgãos e sistemas. Assim, a urianálise é muitas vezes incluída em perfis de investigação geral em pacientes com afeção de origem desconhecida, auxiliando no diagnóstico de várias afeções não urinárias, tais como, hiperadrenocorticism, diabetes *mellitus* ou *insipidus* central, falha hepática, doenças hemolíticas, rbdomiólise, polidipsia psicogénica, azotemia pré-renal e acidose sistémica. Permite, também, detetar patologias assintomáticas e monitorizar a evolução de qualquer doença, em termos de reversibilidade e de progressão. Para além disso, a análise de urina

possibilita, ainda, a supervisão da eficácia e da segurança da terapêutica, em termos de nefrotoxicidade (Osborne e Stevens, 1999; Meuten, 2012a).

Para a obtenção de todos os benefícios desta análise e de modo a evitar interpretações erróneas dos resultados obtidos, a realização de uma urianálise completa (tipo I e II) é recomendável (Wamsley e Alleman, 2007). Se houver necessidade, podem ainda ser feitas uroculturas e bioquímicas urinárias quantitativas (Barber, 2004).

Segundo Grauer (2009), a observação microscópica da urina para interpretação da urianálise pode ser comparável à observação microscópica do esfregaço sanguíneo para interpretação do hemograma, uma vez que a interpretação dos dados físicos e químicos está totalmente dependente do conhecimento da composição do sedimento urinário.

Na altura de interpretar os resultados da análise de urina deve ter-se em conta a hora e o volume da colheita e o modo como a urina foi colhida e armazenada, pois o objetivo é obter uma urina *in vitro* representativa da urina *in vivo*. Para minimizar ao máximo os erros de interpretação da urianálise, a urina deverá ser recolhida antes de se iniciar qualquer tratamento, nomeadamente fluidoterapia, antibióticos, glucocorticoides, diuréticos, anti-hipertensores e meios de contraste radiográficos. Todos estes fatores devem ser referidos na folha de requisição de análises, de modo a permitir uma interpretação o mais fidedigna possível dos resultados obtidos (Wamsley e Alleman, 2007).

A urina, idealmente 10 a 12 mL e no mínimo três mL, deve ser colhida para um recipiente estéril selável e identificado e, de preferência, opaco, e deve ser analisada, nos primeiros trinta minutos após a colheita (Wamsley e Alleman, 2007; Chew *et al.*, 2011). Caso não seja possível, deverá ser imediatamente refrigerada a 4°C até 12 horas, devendo ser estabilizada à temperatura ambiente antes de ser examinada (Barsanti, 2012). A congelação e o uso de conservantes estão contraindicados (Wamsley e Alleman, 2007).

A refrigeração inibe a proliferação bacteriana, preserva a morfologia celular e dos cilindros, contudo, pode inibir as reações enzimáticas da tira urinária, aumentar artefactualmente a densidade urinária e induzir a formação de cristais *in vitro*, principalmente de oxalato de cálcio dihidratado e de estruvite. Daí a importância de analisar amostras de urina que foram previamente estabilizadas à temperatura ambiente. O aumento da temperatura tende a dissolver cristais artefactuais, no entanto, caso estes se continuem a observar no sedimento urinário, deverá realizar-se um novo sedimento com uma amostra fresca de urina, de modo a confirmar o achado (Wamsley e Alleman, 2007).

A figura 9 ilustra o material usado na realização de qualquer urianálise tipo I no laboratório Inno. As técnicas usadas em urianálise encontram-se descritas no anexo 1.



Figura 9: Fotografia ilustrativa do material usado na realização de uma urianálise tipo I (lista de trabalho, tira urinária, refratômetro e *falcon* com amostra de urina).

5. Endocrinologia

Durante o período de estágio realizaram-se 847 análises endocrinológicas. As análises mais requisitadas ($n=765$), que estão representadas nos gráficos 7 e 8, permitem avaliar a função da glândula tireoide, das glândulas adrenais e a função ovárica. A determinação dos níveis de progesterona é também muito usada para identificar o momento ideal de cópula das cadelas ou para realização de cesarianas. As restantes 82 análises na área da endocrinologia correspondem a doseamentos de hormona paratiroideia (PTH) intacta, insulina, somatomedina, hormona antidiurética (ADH), renina, angiotensina, aldosterona, relaxina e de estrogénio.

As análises endocrinológicas foram realizadas, maioritariamente, através de imunoensaios quimioluminescentes altamente sensíveis na Immulite 1000®, em amostras de soro, plasma ou urina.

Como se pode constatar pela observação dos gráficos 7 e 8, a tiroxina total (T4t) foi a análise mais solicitada, tanto na espécie canina como felina.

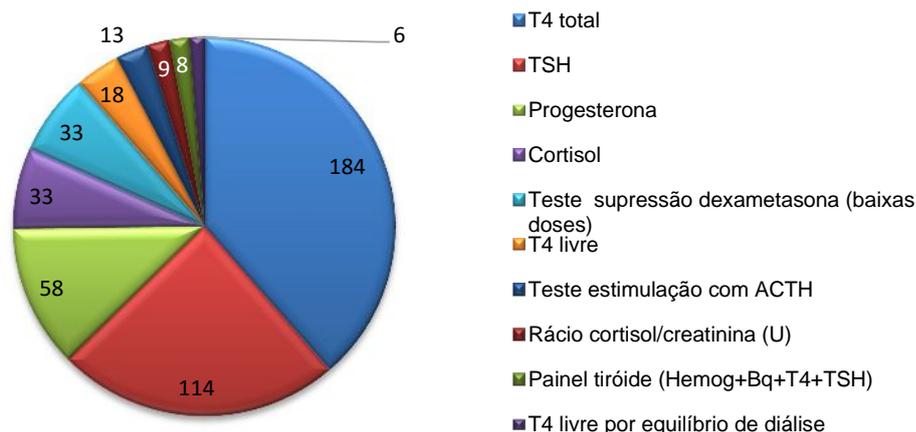


Gráfico 7: Frequência absoluta das análises endocrinológicas mais solicitadas na espécie canina ($n=480$). T4 – tiroxina, TSH – hormona tireoestimulina, ACTH – hormona adrenocorticotrófica, U – urina, Hemog – hemograma, Bq – análises bioquímicas.

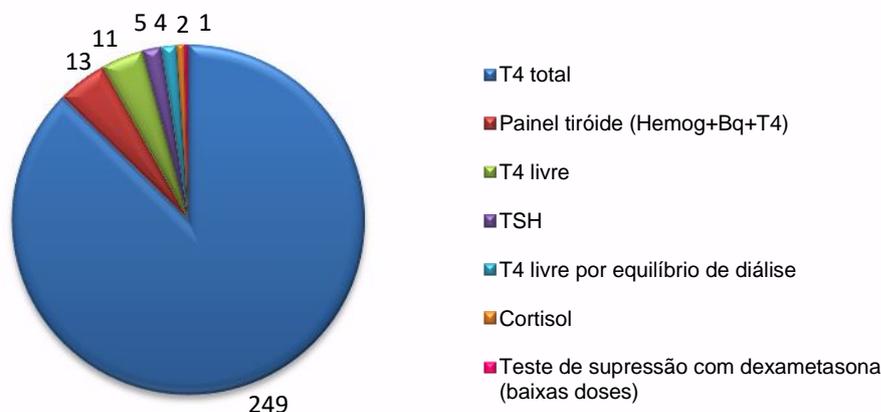


Gráfico 8: Frequência absoluta das análises endocrinológicas mais solicitadas na espécie felina ($n=285$). T4 – tiroxina, Hemog – hemograma, Bq – análises bioquímicas, TSH – hormona tireoestimulina.

5.1. Avaliação da tiroide

A determinação da concentração sérica da T4t permanece o teste inicial de eleição para o diagnóstico da forma clássica de hipertiroidismo felino, devido à sua alta sensibilidade e especificidade (Peterson *et al.*, 2015). O seu baixo custo faz com que seja rotineiramente usada para diagnóstico da doença em gatos com sinais clínicos compatíveis, tais como, perda de peso, polifagia, poliúria, polidipsia, aumento da vocalização, agitação e aumento da atividade, taquipneia e taquicardia, vômitos, diarreia e alopecia difusa (Carney *et al.*, 2016). Contudo, nem todos os gatos hipertiroides apresentam um aumento da concentração de T4t. Peterson *et al.* (2015), referem que até 10% dos gatos hipertiroides e mais de 30% dos gatos com hipertiroidismo precoce ou ligeiro, assim como, animais afetados por doenças não tireóideas concomitantes, podem apresentar concentrações séricas inalteradas de T4t.

Outros testes endocrinológicos que podem ajudar ao diagnóstico de formas não clássicas de hipertiroidismo felino são a T4 livre por equilíbrio de diálise, TSH associada à T4t, aumentando assim a sua especificidade de 69.9 para 98.8%, e o teste de supressão com triiodotironina (T3) (Peterson *et al.*, 2015; Carney *et al.*, 2016).

A determinação da T4t é um teste muito sensível mas pouco específico para o diagnóstico de hipotiroidismo. Se por um lado, uma concentração de T4t > 2 µg/dl permite excluir a doença, concentrações baixas de T4t não permitem confirmá-la, devido ao facto de doenças não tiroideias e alguns fármacos poderem inibir a secreção de T4 pela glândula tiroide. Assim, para confirmar uma suspeita clínica de hipotiroidismo, é recomendada a combinação da T4t com a TSH. Uma baixa concentração de T4t associada a uma alta concentração de TSH, em cães com quadro clínico compatível, confirma o diagnóstico (Alenza, 2011). Contudo, há cerca de um terço dos cães hipotiroides que apresenta uma TSH dentro do intervalo de referência (Espineira *et al.*, 2007). Pode ser necessário realizar testes adicionais, tais como a T4 livre por quimioluminescência ou por equilíbrio de diálise, quando a combinação da T4t e TSH não é conclusiva (Alenza, 2011).

5.2. Avaliação das glândulas adrenais

Outra análise bastante solicitada foi a determinação do cortisol canino, tanto basal como após estimulação com hormona adrenocorticotrófica (ACTH) ou após supressão com baixas doses de dexametasona.

5.2.1. Teste de estimulação com ACTH

O teste de estimulação com a ACTH avalia a reserva adrenocortical, sendo considerado o *gold standard*, para os diagnósticos de hipoadrenocorticism e de hiperadrenocorticism iatrogénico (Parry, 2013). É menos usado para o diagnóstico de hiperadrenocorticism espontâneo devido à baixa sensibilidade (57-63% em cães com tumores adrenais, 80-83% em cães com a forma hipofisária) e variável especificidade (59-93%) (Behrend *et al.*, 2013). É o único teste que permite a distinção entre as formas iatrogénica e espontânea de hiperadrenocorticism, para além de ser útil na monitorização de terapias com trilostano ou mitotano, usados no tratamento de hiperadrenocorticism (Herrtage, 2004; Parry, 2013).

Engloba dois doseamentos de cortisol sanguíneo, um antes e outro uma hora após a administração endovenosa de ACTH sintética. Deve evitar-se a administração de drogas que possam diminuir a resposta à ACTH, por suprirem o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, tais como, progestagénios, glucocorticoides e cetoconazol (Behrend *et al.*, 2013).

Em cães saudáveis, a concentração de cortisol basal encontra-se dentro do intervalo de referência e aumenta três a cinco vezes após a administração de ACTH. Por um lado, cães com hipoadrenocorticism típico, por atrofia adrenocortical, apresentam concentrações baixas de cortisol basal, que se mantêm abaixo dos níveis normais após a estimulação, tal como nos

animais com hiperadrenocorticismo iatrogénico. Por outro lado, concentrações altas de cortisol pós-estimulação com ACTH indicam hiperadrenocorticismo espontâneo. Nos casos de hipoadrenocorticismo natural secundário, por deficiência da ACTH endógena, os níveis de cortisol basal são baixos a normais e pode aumentar ligeiramente em resposta à administração de ACTH (Parry, 2013).

5.2.2. Teste de supressão com baixas doses de dexametasona

O teste de supressão com baixas doses de dexametasona é considerado o teste de eleição para o diagnóstico de hiperadrenocorticismo espontâneo. Apresenta uma sensibilidade de 85 a 100% e uma especificidade de 44 a 73% (Behrend *et al.*, 2013).

Consiste numa primeira colheita para determinação do cortisol basal, administração endovenosa de dexametasona e na colheita de uma segunda e terceira amostras de sangue, quatro e oito horas após a administração (Peterson, 2007).

Em cães saudáveis a concentração sérica de cortisol às quatro e oito horas após a administração de dexametasona encontra-se abaixo ou muito próxima do limite de deteção dos ensaios analíticos. O diagnóstico de hiperadrenocorticismo é feito quando não se verifica supressão na concentração de cortisol oito horas pós-administração. Ocasionalmente, tratamentos com fenobarbital podem produzir falsos positivos (Behrend *et al.*, 2013).

Na presença de um padrão inverso – no qual a concentração de cortisol oito horas pós-dexametasona está abaixo do *cut-off* e às quatro horas está aumentada –, muito sugestivo de hiperadrenocorticismo, devem fazer-se testes adicionais para confirmar a suspeita (Behrend *et al.*, 2013).

O teste de supressão com dexametasona pode ajudar a distinguir as formas hipofisária e adrenal de hiperadrenocorticismo. Se ocorrer supressão é provável que se trate da forma hipofisária, pois em cães com tumores adrenais há uma secreção independente de cortisol, não controlada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal. Contudo, a ausência de supressão não permite confirmar a origem adrenal, uma vez que em 25% dos cães com a forma hipofisária não há supressão. Uma supressão às quatro horas abaixo de 50% da linha basal, num teste com baixas doses de dexametasona, confirma a forma hipofisária (Behrend *et al.*, 2013).

6. Citologia

A citologia, isto é, a avaliação microscópica das células, é um exame muito útil para o médico veterinário no estabelecimento de um diagnóstico provisório ou mesmo definitivo, na determinação do prognóstico e ainda na formulação de um plano terapêutico (Radin e Wellman, 1998).

As suas principais vantagens são a facilidade e variedade de colheitas possíveis, de amostras provenientes de líquidos, órgãos, massas ou outras lesões, minimamente invasivas,

raramente necessitando de sedação, com raras complicações associadas; simplicidade da preparação dos espécimes; e rapidez dos resultados (Radin e Wellman, 1998). As principais desvantagens estão relacionadas com a má qualidade das amostras – falta de representatividade da lesão, mau espalhamento ou acondicionamento das amostras – e a ausência da arquitetura tecidual. Sempre que necessário, deverá recorrer-se à histopatologia de modo a confirmar ou complementar o diagnóstico citológico (Radin e Wellman, 1998).

Existem várias técnicas de colheita de amostras citológicas: a punção, aspirativa ou não aspirativa, por agulha fina (PAAF/PNAAF); impressão ou aposição; a raspagem; e a colheita por zaragatoa. A escolha da técnica a usar dependerá, essencialmente, do material a colher e do local onde será feita a colheita. (Meinkoth *et al.*, 2008).

Na preparação de lâminas de citologia, é necessário o espalhamento do material. Para amostras semissólidas, mucosas ou com grumos é utilizada a técnica de compressão ou *squash*, representada na figura 10 e descrita no anexo 1, tendo como objetivo a obtenção de uma monocamada celular que facilita a penetração do corante, aquando da coloração, e a avaliação citológica individual (Meyer *et al.*, 2010).



Figura 10: Fotografias ilustrativas da aplicação da técnica de *squash* para espalhamento de materiais na preparação de lâminas citológicas.

No caso de fluidos, a dispersão do material pode ser feita através da técnica de esfregaço usada em hematologia. A velocidade de espalhamento deve ser ajustada à viscosidade do fluido. Assim, em fluidos mais líquidos o movimento deverá ser mais rápido, enquanto nos mais viscosos deverá ser mais lento (Meyer *et al.*, 2010).

Em fluidos turvos e sanguinolentos, ou aparentemente pouco celulares (transudados, LCR), poderá recorrer-se, respetivamente, a duas técnicas de concentração: a centrifugação e a citocentrifugação. No primeiro caso, as lâminas são feitas com a técnica de compressão a partir do sedimento ressuspenso, após rejeição do sobrenadante. Na citocentrifugação, as células são todas condensadas num pequeno quadrado diretamente na lâmina, com o auxílio de um dispositivo específico, representado na figura 11 (Meyer *et al.*, 2010).

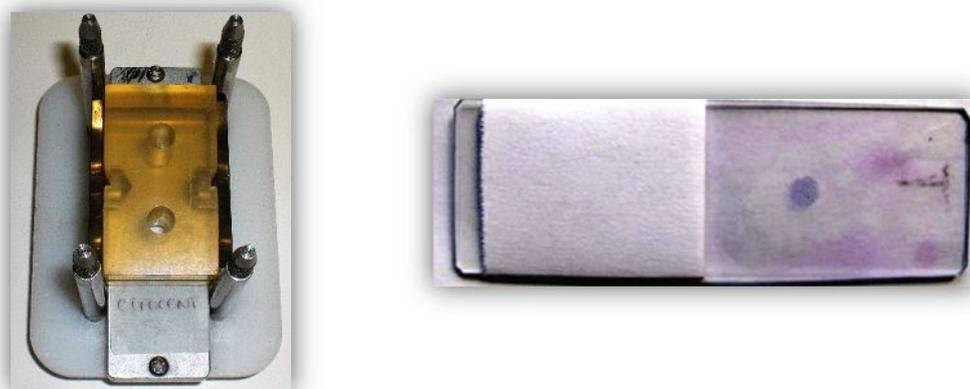


Figura 11: Fotografia de dispositivo usado para a citocentrifugação, com resultado final à direita.

Depois de preparadas, as lâminas são devidamente identificadas, coradas com a coloração usada na hematologia (Rapid-Diff II Stain®) e fixadas com um meio de montagem (resina transparente) e uma lamela, preservando assim o material para avaliações posteriores.

6.1. Envio de amostras para o laboratório

No envio de amostras ao laboratório é necessário ter alguns cuidados. Os fluidos devem ser imediatamente colocados em tubos com EDTA, para prevenir a formação de coágulos e preservar a morfologia celular (Meyer *et al.*, 2010). Caso o transporte até ao laboratório demore mais de 24h, o tubo de EDTA deve ser também acompanhado de lâminas preparadas na clínica, de modo a evitar as rápidas alterações celulares que se produzem em meios líquidos. Outro aspeto essencial é evitar o contacto do material com vapores de formol, os quais fixam as células, interferindo com a posterior coloração (Meinkoth *et al.*, 2008).

Quando se pretende fazer também uma cultura bacteriológica ou fúngica, deverá optar-se por uma colheita asséptica para um frasco estéril ou uma zaragatoa com meio de cultura, conforme a amostra em causa (Meyer *et al.*, 2010).

A casuística da área de Citologia está representada no gráfico 9, no qual se pode observar um grande predomínio da citologia simples.

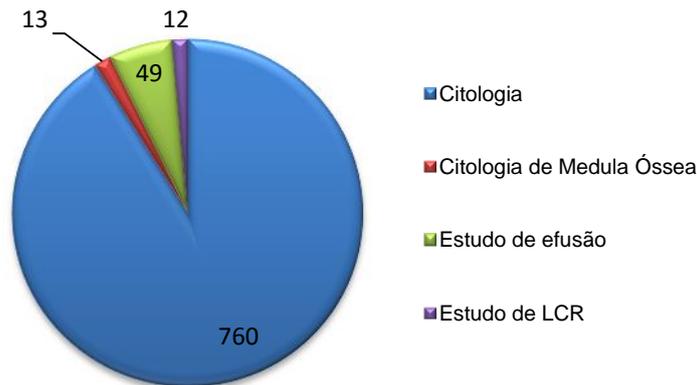


Gráfico 9: Frequência absoluta das análises citológicas realizadas ($n=834$).

7. Histopatologia

Durante o período de estágio foram solicitadas 811 análises histopatológicas, representadas no gráfico 10, de acordo com o tipo de análise.

A análise histopatológica engloba o processamento e observação macro e microscópica dos tecidos obtidos por biópsia incisional ou excisional (exérese). A biópsia incisional é um método pouco invasivo que consiste na remoção cirúrgica de parte de uma lesão para exame microscópico e para diagnóstico. A biópsia excisional permite a remoção total de uma lesão e inclui sempre tecido são adjacente. Esta apresenta uma finalidade terapêutica e de diagnóstico, contudo no caso de lesões malignas, é impreterível incluir uma margem alargada (idealmente superior a três centímetros) de tecido normal. A decisão e a capacidade de efetuar uma excisão com margens curativas é condicionada pela localização e pelo tipo do tumor em causa (Ehrhart e Withrow, 2007). No laboratório Inno efetuaram-se também raras análises histopatológicas de tecidos ou órgãos recolhidos durante a necropsia dos animais.

Para se alcançar um diagnóstico é necessário recorrer a um conjunto de técnicas histológicas essenciais na preparação de finos fragmentos de tecido, com cerca de três micrómetros de espessura, que permitam a visualização microscópica da arquitetura tecidual (Bacha e Bacha, 2003).

O material recolhido deve ser armazenado em formol a 10%, numa proporção tecido:fixador de um para dez e enviado para o laboratório. Neste é sujeito, numa primeira fase, a observação e corte em pequenos fragmentos representativos das lesões (macroscopia). Estes pequenos fragmentos de tecido são depois submetidos a uma série de processamentos que consistem, de forma resumida, na fixação de tecidos, seguida de desidratação, impregnação, inclusão, microtomia (corte fino), coloração, montagem das lâminas e observação microscópica (Bacha e Bacha, 2003).

Na montagem das lâminas utiliza-se um meio de montagem (resina transparente) e uma lamela associada. Este processo, para além de assegurar a conservação do corte corado, melhora a visualização ao microscópio ótico (Junqueira e Carneiro, 2004).

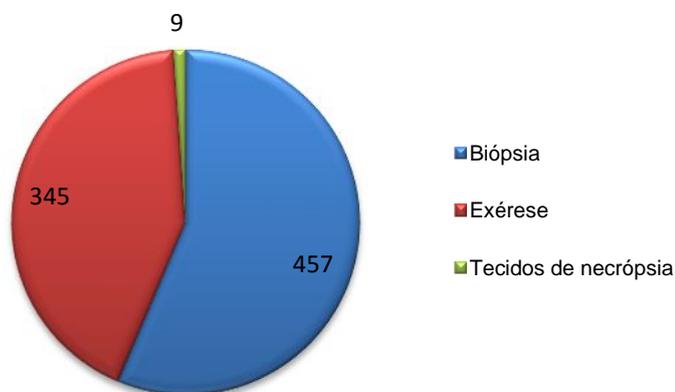


Gráfico 10: Frequência absoluta das análises histopatológicas realizadas (n=811).

8. Parasitologia

A parasitologia é a área que se dedica ao estudo dos parasitas.

As análises parasitológicas realizadas no laboratório Inno são a análise coprológica, para pesquisa de parasitas gastrointestinais, a pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia*, a técnica de Baermann, para isolamento e identificação de larvas de parasitas pulmonares, a pesquisa de microfilárias pela técnica de Knott, a pesquisa de ectoparasitas, em raspagens cutâneas ou amostras de cerúmen e a pesquisa de hemoparasitas em esfregaço sanguíneo. Esta última foi abordada na secção de Hematologia, não estando por isso representada no gráfico 11.

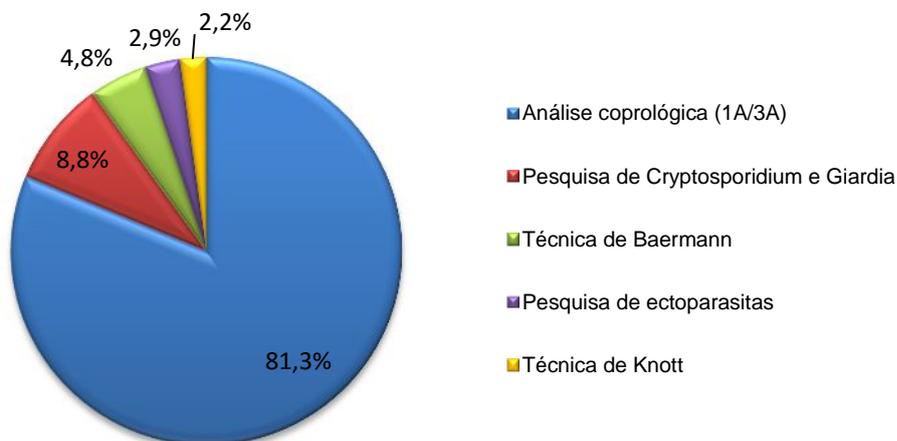


Gráfico 11: Frequência relativa (em %) das diferentes análises realizadas na área da Parasitologia (n=272).

8.1. Análise coprológica

A análise coprológica – mais solicitada durante o estágio, com 221 pedidos, num total de 272 análises parasitológicas – é composta por duas partes: a avaliação do aspeto macroscópico das fezes, em termos de forma e de substâncias presentes, e a observação microscópica do resultado da flutuação fecal em solução de sulfato de zinco a 45%.

a) Avaliação macroscópica

Quanto à forma, as fezes classificam-se em moldadas, moldadas ligeiramente pastosas, pastosas, diarreia pastosa, diarreia mucosa e diarreia líquida. A presença de materiais estranhos como ossos, alimento por digerir, sangue, ervas, parasitas adultos ou proglotes de cestodes também devem ser referidos. Esta primeira parte é muito importante pois pode orientar-nos em direção ao diagnóstico de doenças parasitárias (ou não parasitárias) específicas (Zajac e Conboy, 2012).

b) Processamento

A pesquisa de parasitas gastrointestinais baseia-se na técnica de flutuação, ilustrada na figura 12 e descrita no anexo 1. O princípio subjacente a esta técnica é que o material parasitário (ovos e quistos) presente nas fezes é menos denso que a solução de flutuação, permitindo que ascenda à superfície do recipiente, sendo depois recolhido para observação microscópica, sendo que a maioria dos detritos sedimentam (Zajac e Conboy, 2012).

De acordo com Zajac e Conboy (2012), a centrifugação aumenta a sensibilidade da técnica de flutuação, sendo particularmente útil em infeções de baixa carga parasitária, como as causadas por *Trichuris* spp. e *Giardia* spp. em canídeos e felídeos.

Na figura 13 encontram-se fotografias de alguns ovos mais comumente observados, em amostras de fezes de canídeos e felídeos sujeitas à técnica de flutuação, durante o estágio.



Figura 12: Fotografia ilustrativa da técnica de flutuação com conseqüente preparação das lâminas para a observação microscópica.

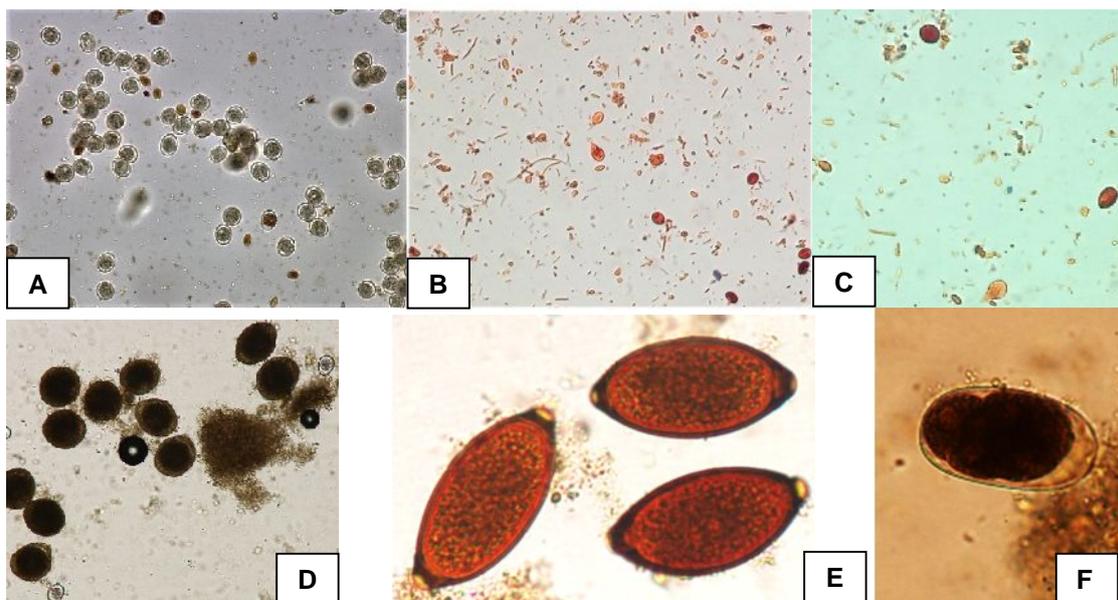


Figura 13: Fotografias de ovos parasitários mais comumente observados, em fezes de canídeos e felídeos sujeitas à técnica de flutuação, durante o período de estágio (A – oocistos de *Isospora* spp. e quistos de *Giardia* spp. 200x; B – quistos e trofozoítos de *Giardia* spp. 200x; C – quistos e trofozoítos de *Giardia* spp. 400x; D – ovos de *Toxocara* spp. e raros oocistos de *Isospora* spp. 100x; E – ovo de *Trichuris vulpis* 200x; F – ovo de *Ancylostoma* spp. 200x).

8.2. Pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia*

A pesquisa de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. é feita em esfregaços de fezes corados com uma coloração específica – Ziehl-Neelsen modificada – cujo protocolo está descrito no anexo 1. Os esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. surgem como estruturas de pequenas dimensões de coloração rosada e a *Giardia* spp. como pequenas estruturas verdes.

Durante o período de estágio não houve nenhuma pesquisa positiva.

8.3. Técnica de Baermann

A técnica de Baermann é usada para identificar larvas de nematodes de primeiro estágio (L1), causadores de infecções respiratórias, em amostras de fezes (Zajac e Saleh, 2013).

É importante usar fezes frescas para evitar a interferência de larvas que possam eclodir de ovos presentes nas amostras, como estrôngilos e ancilostomatídeos, e ser confundidas com larvas pulmonares (Zajac e Conboy, 2012).

Esta técnica é executada no aparelho de Baermann, representado na figura 14, de acordo com o protocolo exposto no anexo 1. As larvas presentes na amostra têm tendência a migrar distalmente ao longo do dispositivo, acumulando-se na ponta da pipeta, colocada no fundo de um tubo de plástico (Zajac e Conboy, 2012).

O quadro 1 auxilia na identificação de larvas isoladas com este procedimento



Figura 14: Fotografia ilustrativa do aparelho de Baermann, antes da recolha da primeira gota de solução fecal para pesquisa microscópica de larvas pulmonares.

Quadro 1: Infecções parasitárias de cães e gatos passíveis de diagnóstico usando o teste de Baermann. Adaptado de Zajac e Saleh, 2013.

Hospedeiro	Parasita	Localização das formas adultas	Características das larvas	Distribuição
Gato	<i>Aelurostrongylus abstrusus</i>	Bronquíolos terminais, canais alveolares	360-400 um; cauda curva em forma de S com espinho acessório	Muito difundido
Cão	<i>Strongyloides stercoralis</i>	Intestino delgado	150-390 um; cauda lisa com primórdio genital proeminente	Muito difundido
Cão	<i>Crenosoma vulpis</i>	Bronquíolos	260-340 um; cauda com um desvio ligeiro mas sem torção ou espinho	Principalmente Canadá Atlântico
Cão	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	Artérias pulmonares, coração direito	340-399um; cauda semelhante às espécies de <i>Aelurostrongylus</i>	Europa, Newfoundland-Labrador

8.4. Técnica de Knott

A técnica de Knott é um dos métodos de concentração de microfilárias em circulação.

Este método, cujo protocolo se encontra no anexo 1, baseia-se na lise dos eritrócitos e na fixação e concentração das microfilárias existentes em circulação, facilitando a sua deteção (Zajac e Conboy, 2012). Apesar de ser altamente específico, apresenta uma baixa

sensibilidade, existindo por isso muitos resultados falsos negativos, principalmente em felídeos, pois raramente apresentam microfilaremia (Lapin, 2012).

A Sociedade Americana de Dirofilariose e o Conselho Científico Europeu de Parasitas dos Animais de Companhia (ESCCAP) recomendam a realização do teste em qualquer cão que tenha apresentado um resultado positivo na pesquisa de Ag de *Dirofilaria immitis*, para determinar a necessidade de tratamento microfilaricida (Zajac e Conboy, 2012).

Também pode ser usada individualmente no diagnóstico de Dirofilariose, apesar da dificuldade em distinguir a microfilária da *Dirofilaria immitis* de outro tipo de microfilárias menos patogênicas detetadas na Europa, como a da *Dirofilaria repens*, da *Acanthocheilonema reconditum* e da *A. Grassi*, que parasitam o tecido subcutâneo e a da *Acanthocheilonema dracunculooides* que parasita o peritoneu (Zajac e Conboy, 2012).

8.5. Pesquisa de ectoparasitas

A pesquisa de ectoparasitas, isto é, de parasitas externos ao corpo do seu hospedeiro, é útil para a identificação de ácaros, devido às suas dimensões microscópicas, permitindo também detetar infestações por pulgas e piolhos. O material recolhido por raspagem, fita-cola e escovagem cutânea e o cerúmen deverão ser recolhidos para uma lâmina de vidro. Para observação microscópica, deve usar-se óleo mineral e uma lamela. Apesar de ter uma especificidade de 100%, apresenta uma sensibilidade relativamente baixa (cerca de 50%), falhando muitas vezes na deteção dos parasitas (Hill, 2002).

Durante o período de estágio não se observou nenhuma pesquisa positiva.

9. Provas de coagulação

As provas de coagulação são usadas para diagnóstico de desordens da hemóstase, tais como hemorragia ou tromboembolismo, e para monitorização de terapias anticoagulantes (ex.: heparina). A hemóstase é uma interação equilibrada entre vasos sanguíneos, plaquetas e fatores solúveis na formação e dissolução de coágulos, que tem como objetivos a preservação da estrutura e função vasculares e a manutenção da fluidez do sangue (Boudreaux *et al.*, 2011; Tvedten, 2012).

9.1. Colheita e manuseamento de amostras

O sangue deve ser colhido para um tubo de plástico com 3,8% de citrato trissódico, tendo o cuidado de evitar o arrastamento de fatores tecidulares que possam ativar falsamente as plaquetas e os fatores de coagulação. É essencial a mistura suave de uma parte de citrato com nove partes de sangue, de modo a evitar coagulações indesejadas ou diluições dos fatores de coagulação. A separação do plasma citrato dos restantes componentes sanguíneos deverá ocorrer nos primeiros 30 minutos após a colheita. Caso não seja imediatamente analisado,

poderá preservar-se os fatores VII e VIII, durante seis horas a 20°C, durante 48 horas a 4°C, ou através da congelação por tempo indeterminado (Tvedten, 2012).

As provas de coagulação realizadas durante o período de estágio estão representadas no gráfico 12 e permitem avaliar o funcionamento da hemóstase secundária e da fibrinólise. À exceção das provas de antitrombina (AT) III, que foram realizadas num laboratório externo, todas os testes de coagulação representados (tempo de protrombina – PT, tempo de tromboplastina parcial ativada – aPTT, tempo de trombina – TT e concentração de fibrinogénio) foram executados num analisador de coagulação baseado no método ótico (Sysmex CA-540®), que deteta o aumento da turvação da amostra de plasma provocado pela formação de fibrina (Boudreaux *et al.*, 2011).

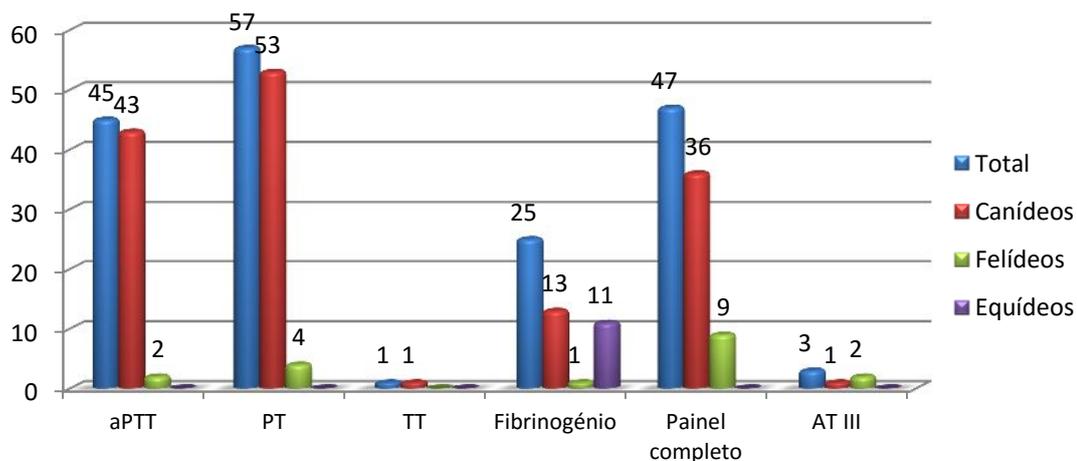


Gráfico 12: Frequência absoluta das provas de coagulação realizadas ($n=176$), distribuídas por espécie. aPTT – tempo de tromboplastina parcial ativada, PT – tempo de protrombina, TT – tempo de trombina, AT III – antitrombina III.

9.2. Tempos de coagulação

Os tempos de coagulação correspondem ao tempo (em segundos) necessário para a formação de um coágulo de fibrina em plasma citrato, após a adição de um ativador por contacto do sistema intrínseco (no caso do aPTT) ou extrínseco (no caso do PT) ou da adição de trombina (TT), associados ao cálcio. A deteção de aumento do PT ou do aPTT indica, respetivamente, uma atividade de fatores de coagulação da via intrínseca ou extrínseca inferior a 30% da atividade normal (Tvedten, 2012).

9.2.1. Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (aPTT)

O aPTT avalia as vias intrínseca e comum da cascata de coagulação, ou seja, todos os fatores de coagulação, exceto o VII. É usado para detetar a diminuição de um ou mais fatores de coagulação, como na hemofilia, coagulação intravascular disseminada (CID), deficiência adquirida de vitamina K, envenenamento por varfarina e insuficiência hepática (Tvedten, 2012).

9.2.2. Tempo de protrombina (PT)

O PT avalia as vias extrínseca e comum da cascata de coagulação. Geralmente é usado como único teste de coagulação para identificar envenenamentos por antagonistas da vitamina K, uma vez que o fator VII (via extrínseca) é, entre todos os fatores dependentes da vitamina K (II, VII, IX e X) o que apresenta menor tempo de meia vida (quatro a seis horas), fazendo com que o PT seja o primeiro tempo a aumentar nessas situações. É utilizado em conjunto com o aPTT para detetar outro tipo de coagulopatias (Tvedten, 2012).

9.2.3. Tempo de trombina (TT)

O TT avalia a concentração de fibrinogénio funcional, sendo inversamente proporcional à concentração deste. Pode estar aumentado em casos de diminuição da concentração de fibrinogénio (< 100mg/dL) ou da sua funcionalidade (disfibrinogenemias), ou na presença de inibidores da ação da trombina, como produtos de degradação da fibrina (PDFs) ou heparina. É um parâmetro útil no controlo da terapia com heparina (Boudreaux *et al.*, 2011).

O painel de coagulação engloba ainda o doseamento da concentração plasmática de fibrinogénio. Este é uma proteína plasmática solúvel que é convertida numa forma insolúvel (coágulo de fibrina) pela ação da trombina. O tempo de trombina é inversamente proporcional à concentração plasmática de fibrinogénio. O teste usado no laboratório mede o tempo de coagulação do plasma quando se adiciona excesso de trombina. Este tempo é depois comparado com o tempo de coagulação de preparações de fibrinogénio com concentrações conhecidas

A prova de AT III não foi acompanhada durante o estágio, não sendo por isso abordada neste relatório.

10. *Dermatophyte test medium* (DTM)

Durante o período de estágio foram solicitados 51 análises microbiológicas de DTM. O meio de teste de dermatófitos constitui, até à data, o método mais eficiente para cultura de dermatófitos, contendo antibióticos para inibir o crescimento bacteriano e anti metabolitos para inibir o crescimento de contaminantes fúngicos. No entanto, esta supressão de crescimento de microrganismos não é 100% efetiva. Por outro lado, falhas na colheita, condições de cultura e limites na identificação das culturas geram falsos negativos (Angus, 2005; Moriello e DeBoer, 2012).

De maneira a minimizar o número de falsos negativos, é aconselhado:

- Recolher no mínimo 10-20 pelos, com aspeto partido e fraco, e/ou escamas da periferia da lesão com sinais de inflamação ou com pústulas. É de grande vantagem recolher pelos com fluorescência na lâmpada de Wood (Angus, 2005), mas não só, pois apenas 50% dos isolados de *Microsporium canis* fluorescem, para além de poderem ocorrer

falsos positivos devido a tratamentos tópicos e à presença de agregados de queratina (Donaldson, 2011);

- Realizar suave higienização da área de recolha de material com gaze embebida em álcool e deixar secar antes da colheita. Este procedimento diminuirá o sobrecrecimento bacteriano e de fungos saprófitos que pode impedir o crescimento de dermatófitos (Medleau e Hnilica, 2006);
- Manter, após colheita, durante o armazenamento e durante a cultura, as amostras em tubos/frascos não fechados, em ambientes húmidos a uma temperatura compreendida entre os 24 e os 27°C, de modo a permitir a entrada de oxigénio e evitar a dissecação (Angus, 2005; Moriello *et al.*, 2010; Moriello e DeBoer, 2012) (Moriello *et al.* (2010) referem que a quantidade de luz não interfere no crescimento das colónias);
- Permitir o crescimento das colónias (*Microsporum canis* cresce normalmente em 14 dias, sendo que o género *Tricophyton* spp. pode demorar 21 dias) (Sharma *et al.*, 2012).

No laboratório Inno, os meios de cultura semeados são observados diariamente de modo a registar-se a cor de meio (amarelo/vermelho) e a caracterização das colónias, quanto à cor, aspeto, tamanho e número. A viragem de cor do meio, de amarelo para vermelho, aquando do aparecimento de uma determinada colónia, pode ser um indicador da presença de dermatófitos, uma vez que o DTM tem um indicador de pH, que muda para vermelho na presença de metabolitos alcalinos, produzidos pelos géneros *Microsporum*, *Tricophyton* e *Epidermophyton* (Medleau e Hnilica, 2006).

Ao fim de 14 ou 21 dias após o cultivo, recolhem-se as colónias com fita-cola e observam-se ao microscópio ótico, com o auxílio da coloração de Novo azul-de-metileno, para identificação do fungo presente.

Parte III: Revisão bibliográfica

A. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A1. Parâmetros hepáticos:

O fígado é um órgão do sistema digestivo que apresenta inúmeras funções: o metabolismo de hidratos de carbono, de lípidos, de proteínas, de hormonas e de vitaminas; a destoxificação e excreção de metabolitos e substâncias tóxicas; a digestão de gorduras e a produção da maioria dos fatores de coagulação. Tem uma grande capacidade de reserva, por isso, a insuficiência hepática só se desenvolve após a perda de 70 a 80% da sua massa funcional (Allison, 2012b).

Os testes laboratoriais para pesquisa de doença ou insuficiência hepática dividem-se em dois grandes grupos: testes de lesão hepática e provas de função hepática.

A1.1. Lesão hepática:

Os principais parâmetros indicadores de lesão hepática, no cão e no gato, são as enzimas intra-hepatocitárias – ALT e AST – e as enzimas induzidas por colestase, ação de fármacos e de hormonas – GGT e FA. É importante ter em conta que nem todas estas enzimas são hepatoespecíficas, podendo o seu aumento ter origem noutros órgãos ou tecidos, e que as suas atividades variam consoante a espécie (Bain, 2011).

A1.1.1. Alanina aminotransferase (ALT)

A ALT, anteriormente referida como sGPT, do inglês *serum glutamic pyruvic transaminase*, encontra-se, maioritariamente, livre no citosol dos hepatócitos, sendo por isso, a enzima mais específica de lesão hepática. No entanto, a sua presença no soro/plasma também pode ter origem numa necrose muscular ou em lise eritrocitária (Bain, 2011).

Aumentos ligeiros podem dever-se a lesões musculares, a exercício físico ou a hemólise. Por outro lado, aumentos significativos, isto é, três vezes acima dos valores de referência, ocorrem comumente em anoxia ou fraca perfusão hepática, trauma espontâneo ou pós-cirúrgico, hepatite crónica, cirrose, colangite e colangiohepatite, obstrução biliar aguda, necrose e lipidose hepáticas, pancreatite aguda, neoplasia, hiperadrenocorticismismo canino e hipertiroidismo felino, sépsis, após administração de determinadas drogas hepatotóxicas e, ainda, na hepatite crónica associada a aumentos dos níveis hepáticos de cobre, nas raças Dobermann pinscher, Bedlington terrier, Dálmata, West Highland white terrier e Labrador retriever (Allison, 2012b; Willard e Twedt, 2012).

A1.1.2. Aspartato aminotransferase (AST)

A AST, anteriormente designada por sGOT, do inglês *serum glutamic oxaloacetic transaminase*, está presente, em grande concentração, não só nos hepatócitos – livre no citosol ou no interior das mitocôndrias – mas, também, nos músculos esquelético e cardíaco e nos eritrócitos (Bain, 2011). Assim, aumentos significativos poderão ter origem nas mesmas

causas referidas anteriormente para a ALT, para além de lesões musculares e hemólise *in vivo* ou *in vitro* (Allison, 2012b). Segundo Willard e Twedt (2012), aumentos significativos da AST hepática tendem a refletir lesões mais severas nos hepatócitos, uma vez que, as mitocôndrias não são danificadas tão rapidamente quanto a membrana celular.

A1.1.3. Gama glutamiltransferase (GGT)

As enzimas de indução hepática (GGT e FA) estão associadas à membrana celular dos hepatócitos e das células epiteliais biliares.

A GGT existe em maiores concentrações no pâncreas e no rim, mas o aumento da sua atividade sérica indica colestase ou hiperplasia biliar, pois a pancreática é libertada nos ductos pancreáticos e a renal na urina, não se encontrando no sangue. Outra causa de aumento desta enzima é também a ação de esteroides (Allison, 2012b).

A1.1.4. Fosfatase alcalina (FA)

A FA está presente também em outros tecidos: osso, mucosa intestinal, córtex renal e placenta. Para além destas isoformas enzimáticas, existe, ainda, a isoforma induzida por corticosteroides em cães, forma modificada da isoenzima intestinal (Allison, 2012b).

Uma vez que, o tempo de meia-vida da FA intestinal, renal e placentária são escassos minutos, o aumento da atividade da FA é comumente secundário a colestase, aumento da atividade osteoblástica, indução por determinadas drogas ou hormonas, principalmente em cães, e a várias doenças crónicas, como a diabetes *mellitus* e o hipertiroidismo felino (Bain, 2011; Allison, 2012b; Willard e Twedt, 2012).

Willard e Twedt (2012) referem que as principais causas de aumentos superiores a três vezes o valor normal da FA, em cães, são a doença hepatobiliar, hiperadrenocorticismo, *stress*, terapia com glucocorticoides ou anticonvulsivos, sendo que os esteroides endógenos ou exógenos e a obstrução biliar extra-hepática podem aumentar a FA até mais de 10 vezes.

Uma forma de distinguir as várias isoformas de FA é mensurando a atividade desta enzima a 65°C. As únicas isoformas cuja atividade não é suprimida pelo calor são a isoenzima intestinal e a sua derivada isoforma induzida por corticosteroides (Allison, 2012b). Assim, tendo em conta o reduzido tempo de meia vida da primeira, comparando a atividade da FA, depois de sujeita a altas temperaturas, com a atividade inicial, podemos tirar conclusões quanto à origem do aumento da sua atividade enzimática.

Considera-se que se está na presença da isoforma induzida por corticosteroides, quando se mantém mais de 15% da atividade da FA depois de ter sido sujeita a 65°C. Este teste é bastante eficiente no diagnóstico de hiperadrenocorticismo canino quando usado em situações em que a atividade da enzima ultrapassa as 150U/L. Num estudo realizado em 1989, com 146 cães com suspeitas de hiperadrenocorticismo, apresentou uma sensibilidade de 92% e uma especificidade de 44%. Esta falta de especificidade deve-se ao facto da atividade da FA a 65°C poder dever-se a outras patologias, como a diabetes *mellitus* e o hipotiroidismo caninos ou à administração de drogas anticonvulsivas, como por exemplo o fenobarbital, que induzem as

enzimas microssômicas. Apesar de não ser aceitável para o diagnóstico definitivo da doença, é um teste de triagem rápido, económico e fiável na deteção de hiperadrenocorticismismo canino (Teske, 1989).

Nos gatos, qualquer aumento de FA é significativo, uma vez que, para além de terem menores níveis de FA hepatocelular, excretam-na rapidamente pelos rins (Willard e Twedt, 2012).

A FA felina é um indicador altamente específico de colestase, pois apesar de existirem outras isoenzimas (à exceção da induzida por corticosteroides, que é exclusiva dos cães), estas têm um tempo tão curto de meia-vida, inferior às seis horas da isoenzima hepatobiliar, que não chegam a acumular-se em circulação de gatos eutiroides (Metzger e Rebar, 2008). Por outro lado, em gatos com hipertiroidismo poderá detetar-se também a isoenzima óssea em circulação, para além da hepática, diminuindo assim a especificidade da FA na identificação de doença colestática (Galgut, 2013). Contudo, a sua sensibilidade para deteção de colestase é baixa, devido ao facto de ser produzida em pequenas quantidades e ter um tempo de meia-vida muito reduzido (6h) (Metzger e Rebar, 2008)

A1.2. Função hepática

Os testes de função hepática incluem a medição da concentração sérica de substâncias que, habitualmente, são removidas do sangue pelo fígado e metabolizadas ou excretadas pelo sistema biliar – bilirrubina, ácidos biliares, amónia, glicose e colesterol – e de compostos sintetizados pelo fígado – albumina, globulinas, ureia, glicose, colesterol e fatores de coagulação. No entanto, importa ter em atenção que as alterações destes compostos nem sempre têm origem numa insuficiência hepática (Allison, 2012b).

A1.2.1. Bilirrubina

A bilirrubina é o pigmento resultante, principalmente, da degradação da protoporfirina do grupo heme da hemoglobina, que ocorre após fagocitose eritrocitária pelos macrófagos do baço, fígado e medula óssea. Esta destruição pode ocorrer em eritrócitos envelhecidos, em processos hemolíticos intra- e extravasculares ou após hemorragias internas, dando origem à bilirrubina não conjugada ou indireta (Allison, 2012b). Esta é transportada, ligada à albumina, até ao fígado, onde sofre uma reação de glucoronidação, transformando-se numa molécula hidrossolúvel, a bilirrubina conjugada ou direta (Bain, 2011). A maior parte desta bilirrubina é secretada ativamente, contra o gradiente de concentração, para o sistema biliar, que a conduz até ao intestino delgado, sendo que uma pequena porção é reabsorvida. Caso não se ligue a proteínas é rapidamente excretada pelo rim. Por outro lado, se formar ligações covalentes com a albumina – bilirrubina delta ou biliproteína – permanece durante mais tempo em circulação (Bain, 2011; Allison, 2012b).

A hiperbilirrubinemia, isto é, o aumento das concentrações de bilirrubina, pode ter origem pré-hepática, hepática ou pós-hepática e traduzir-se numa coloração amarela de tecidos ou

fluidos corporais – icterícia. A primeira relaciona-se com o aumento da produção de bilirrubina secundária a doença hemolítica ou hemorrágica, que ultrapassa a capacidade de captação, conjugação e/ou secreção do fígado. A segunda ocorre devido à perda das funções de captação ou conjugação hepática e na sépsis e, a última, verifica-se na colestase, por obstrução do fluxo biliar intra-hepático (neoplasia, lipidose hepática ou hepatopatia por corticosteroides) ou extra-hepático (colangite, colelitíase, colecistite, pancreatite e enterite) (Bain, 2011).

Willard e Twedt (2012) defendem que a medição das duas frações, conjugada e não conjugada, não tem qualquer utilidade, uma vez que, as doenças hemolíticas, hepáticas e biliares provocam variações imprevisíveis na concentração de cada uma. A melhor forma de identificar a origem da hiperbilirrubinemia é avaliar outros parâmetros laboratoriais, tais como o hemograma e esfregaço sanguíneo e as atividades enzimáticas da GGT e de FA, de modo a poder confirmar ou descartar a existência de uma anemia, sugestiva de doença hemolítica, ou de uma doença colestática, respetivamente (Bain, 2011).

Não faz sentido falar em diminuições dos níveis de bilirrubina, uma vez que podem ser fisiologicamente nulos (Krimer, 2011).

A1.2.2. Ácidos biliares

Os ácidos biliares primários – ácido cólico e ácido quenodesoxicólico – são produzidos nos hepatócitos, a partir do colesterol. Depois são conjugados com aminoácidos, formando sais biliares, e armazenados, juntamente com a bília, na vesícula biliar. A ingestão de alimento estimula, via hormonal, a contração da vesícula biliar, levando à libertação dos ácidos biliares no intestino delgado, onde bactérias anaeróbias os convertem na forma secundária – ácido desoxicólico e litocólico (Hall e German, 2005; Allison, 2012b).

A sua função é a emulsificação das gorduras, facilitando a digestão e absorção destas e das vitaminas lipossolúveis. Depois de a cumprirem, são maioritariamente reabsorvidos pela circulação portal e reciclados, ou seja, captados pelo fígado e lançados novamente na vesícula biliar, através da circulação enteroportal. Só uma fração mínima se perde pelas fezes. Isto faz com que, em animais saudáveis, os níveis pós-prandiais de ácidos biliares aumentem ligeiramente (Allison, 2012b).

O teste de estimulação de ácidos biliares é o segundo teste mais sensível da função hepática, logo depois do teste de tolerância à amónia (Willard e Twedt, 2012). Faz-se uma primeira colheita de sangue após um jejum de cerca de 12 horas, de seguida, fornece-se ao animal alimento com uma quantidade moderada de gordura e, duas horas depois, volta a colher-se sangue (Bain, 2011).

Apesar de muito sensível, o aumento da concentração sérica de ácidos biliares não é específico de insuficiência hepática, podendo observar-se também em alterações da circulação portal, que desviam o sangue da passagem pelo fígado, impedindo-o de desempenhar a sua função de captação; na diminuição da excreção biliar, com conseqüente refluxo dos ácidos

biliares para a circulação sanguínea; e na contração espontânea da vesícula biliar durante o jejum (Bain, 2011).

É importante ter em conta que a hemólise e a lipemia podem interferir no doseamento por espectrofotometria, originando, respetivamente falsas diminuições e falsos aumentos, segundo Allison (2012b). No entanto, Willard e Twedt (2012) referem que, tanto a hemólise como a lipemia podem diminuir artefactualmente a concentração de ácidos biliares. Estas divergências entre autores estão provavelmente relacionadas com o uso de diferentes metodologias no teste.

A1.2.3. Amónia

A amónia é largamente produzida pela degradação dos aminoácidos e da ureia pela microflora gastrointestinal, sendo depois transportada pela circulação portal até ao fígado, onde vai ser transformada em ureia através de um ciclo enzimático. Uma insuficiência hepática traduz-se habitualmente no aumento da concentração de amónia plasmática devido à incapacidade da sua metabolização por parte do fígado (Bain, 2011).

O facto de ser uma substância muito volátil obriga a cuidados especiais na obtenção e no acondicionamento da amostra. O sangue deve ser recolhido, após um jejum de 8 a 12 horas, para um tubo com heparina, o qual deve ser imediatamente centrifugado para separação do plasma heparina da fração celular. Este deve ser refrigerado e analisado nos primeiros 15 a 30 minutos ou, então, rapidamente congelado e examinado dentro de dois dias (Bain, 2011). Colheitas após exercícios extenuantes, em cães, atrasos na separação do plasma e a sua conservação à temperatura ambiente, podem aumentar, artefactualmente, a concentração de amónia (Allison, 2012b).

A hiperamoniemia sugere uma insuficiência hepática, com perda de mais de 70% de hepatócitos funcionais, um shunt portossistémico congénito ou secundário a cirrose hepática, ou, raramente, a presença de deficiências no ciclo da ureia (Bain, 2011). Os níveis de amónia também podem aumentar após administração de ácido valpróico, asparaginase, narcóticos, diuréticos causadores de hipocalcemia e alcalose, hiperalimentação, ingestão de sais de amónia e de refeições ricas em proteína, incluindo sangue de hemorragias gastrointestinais (Willard e Twedt, 2012).

Nos gatos, a hiperamoniemia poderá dever-se a deficiências dietéticas em arginina, um aminoácido essencial necessário para a conversão enzimática da amónia em ureia (Burns, 2015).

A diminuição dos níveis de amónia pode resultar da administração de antibióticos intestinais, lactulose, culturas de *Lactobacillus acidophilus*, enemas e difenidramina (Willard e Twedt, 2012).

Ao contrário dos ácidos biliares, os níveis de amónia não são afetados pela colestase, uma vez que a sua captação e metabolização hepáticas são independentes do fluxo biliar,

dependendo apenas da circulação portal, sendo por isso mais específicos da função hepática, contudo, menos sensíveis (Allison, 2012b).

A1.2.4. Proteínas plasmáticas

Em conjunto, as proteínas plasmáticas desempenham uma função nutritiva, exercem pressão osmótica coloidal, participam na resposta inflamatória e imune e no processo de coagulação, para além de auxiliarem na manutenção do equilíbrio ácido-base (Evans, 2011).

As proteínas plasmáticas distribuem-se por dois grandes grupos: albuminas e globulinas. A albumina, produzida no fígado e regulada por citoquinas, é a proteína mais pequena e mais abundante, contribuindo para 75% da atividade osmótica coloidal do plasma. É uma importante proteína de transporte de ácidos gordos e biliares, bilirrubina, cálcio, hormonas e drogas. Por isso, alterações na sua concentração sérica influenciam os níveis destas substâncias (Allison, 2012a). As globulinas, produzidas essencialmente pelo fígado e ainda pelo tecido linfóide, são um grupo heterogéneo de proteínas que inclui as imunoglobulinas, proteínas do complemento, fatores de coagulação, enzimas e proteínas de transporte de lípidos, vitaminas, hormonas, hemoglobina extracelular e iões metálicos. Geralmente são classificadas, de acordo com a sua mobilidade eletroforética, em alfa (α), beta (β) e gama (γ) globulinas, uma vez que são as únicas que existem em quantidade suficiente para interferir no padrão da eletroforese. Por vezes as imunoglobulinas (gamaglobulinas) IgM e IgA migram para a fração β , produzindo uma ponte entre as regiões α e β (Allison, 2012a; Johnson, 2012).

A albumina e as α - e β -globulinas são conhecidas como proteínas de fase aguda negativa e positivas, respetivamente, devido ao fato das suas concentrações séricas sofrerem diminuições e aumentos durante a resposta sistémica aguda à inflamação. Outras importantes proteínas de fase aguda positivas são a proteína amiloide-A, no cão e no gato, e a proteína C-reativa no cão (Allison, 2012a). Estas proteínas são importantes na resposta imune, protegem contra o *stress* oxidativo gerado durante a resposta inflamatória e têm propriedades anti-infecciosas (Evans, 2011).

Determinações falsamente baixas de albumina podem ocorrer com a administração de anticonvulsivos e certos antibióticos, os quais competem com esta pela ligação ao verde de bromocresol, corante usado na metodologia mais comum de quantificação laboratorial veterinária das concentrações de albumina. Esta ligação provoca um desvio da coloração normal que interfere com a leitura espectrofotométrica (Evans, 2011).

A hipoalbuminemia seletiva, isto é, a diminuição da concentração de albumina não acompanhada pelo decréscimo da concentração de globulinas, ocorre, comumente, por diminuição da produção, na insuficiência hepática (cirrose, neoplasia) e no shunt portossistémico, na inanição, má digestão ou má absorção intestinal, e na inflamação; ou por aumento da perda, na enteropatia ou nefropatia com perda de proteína, por sequestro em cavidades corporais devido a efusões, lesões exsudativas cutâneas generalizadas, ou para manutenção dos níveis normais de proteínas totais, associada a hipergamaglobulinemia. O

parasitismo gastrointestinal é outra das causas importantes tanto por diminuição da produção como por aumento da perda (Allison, 2012a; Johnson, 2012).

A diminuição conjunta de albumina e globulinas, que se traduz em hipoproteinemia, deve-se a sobrehidratação ou a perda de ambas as proteínas numa hemorragia, enteropatia com perda de proteína, doenças cutâneas exsudativas severas e doenças efusivas (Allison, 2012a).

A hiperalbuminemia deve-se, por norma, a um aumento relativo da concentração de albumina secundário a desidratação, a qual também pode aumentar concomitantemente as globulinas séricas (Evans, 2011). Um aumento absoluto da concentração de albumina é raro mas pode ocorrer, segundo Allison (2012a), após a administração de glucocorticoides.

As α - e β -globulinas são sintetizadas pelo fígado, enquanto as gamaglobulinas (imunoglobulinas) têm origem no tecido linfóide. Assim, uma insuficiência hepática provoca ligeiras alterações nas globulinas séricas (Allison, 2012a). Os níveis de globulinas são determinados por subtração dos níveis de albumina ao total de proteínas séricas e estão intimamente relacionados com as imunoglobulinas (Johnson, 2012).

A hipoglobulinemia seletiva, ou seja, não acompanhada por diminuição da albuminemia, deve-se geralmente a uma diminuição da concentração de α - ou β -globulinas e ocorre, ocasionalmente, em cães e gatos com imunodeficiências congénitas ou adquiridas. Estas últimas verificam-se, em geral, secundariamente a quimio- ou radioterapia, fármacos, tóxicos ou a doenças linfoproliferativas, mas também podem ter origem numa falha da transferência da imunidade passiva (Allison, 2012a; Johnson, 2012).

A hiperglobulinemia seletiva tem origem no aumento das proteínas de fase aguda, aumento das imunoglobulinas, após estimulação antigénica em inflamações crónicas, ou na produção de imunoglobulinas anormais, nas doenças linfoproliferativas (paraproteinemia) (Johnson, 2012).

A concentração sérica de proteínas totais é um reflexo direto do nível conjunto das albuminas e globulinas, dando uma ideia da homeostase proteica. É importante salientar que os animais muito jovens têm valores de albumina e globulinas fisiologicamente mais baixos. Ao longo da idade, a albumina tem tendência a diminuir e as globulinas a aumentar, devido principalmente às imunoglobulinas e proteínas de fase aguda (Evans, 2011; Johnson, 2012).

A1.2.4.1. Rácio albumina/globulinas (A/G)

O rácio albumina/globulinas (A/G) é calculado matematicamente, sendo usado como auxílio na interpretação dos resultados das proteínas totais. O rácio mantém-se dentro dos intervalos de referência quando se verificam alterações, isto é, diminuições ou aumentos, semelhantes nas duas frações proteicas. A existência de um rácio anormal indica que há predominio da alteração numa fração. Assim, a diminuição do rácio ocorre quando há uma diminuição importante das albuminas, e/ou um aumento significativo das globulinas e o aumento do rácio ocorre secundariamente a diminuições consideráveis das globulinas (Evans, 2011).

A1.2.4.2. Proteinograma

O proteinograma consiste na separação, por eletroforese, e quantificação das principais proteínas no fluido a analisar. A eletroforese é realizada numa substância de suporte, como o acetato de celulose ou gel de agarose, na qual é colocada uma pequena quantidade de fluido, próximo da extremidade em que se encontra o cátodo, e aplicada uma corrente elétrica. A taxa de migração das proteínas varia consoante a intensidade da carga negativa e o tamanho de cada tipo de proteína. A albumina, como é a proteína mais pequena e apresenta a maior carga negativa em relação ao seu tamanho, migra mais rapidamente em direção ao ânodo, durante o tempo permitido para migração. Contrariamente, as gamaglobulinas são as proteínas que menos migram para o ânodo (Weiser, 2012a).

Assim que a separação eletroforética está completa, as frações proteicas são identificadas, consoante a sua ordem de migração, com a ajuda de corantes adicionados ao meio. Para facilitar a identificação e permitir a quantificação das diferentes proteínas separadas, as bandas de proteína são digitalizadas por um densitómetro, o qual determina a percentagem de proteína em cada fração, ao projetar luz através delas. Um fotodetector determina a largura e a densidade de cada fração emitindo um eletroforetograma, isto é, um gráfico de distribuição das diferentes proteínas identificadas (albumina, α_1 , α_2 , β e γ -globulinas). O equipamento possui ainda um pequeno processador que calcula a quantidade absoluta de proteína em cada fração, depois de se introduzir a concentração sérica de proteínas totais (Weiser, 2012a).

O proteinograma é indicado principalmente quando existe uma hiperglobulinemia de origem desconhecida, permitindo identificar inflamações agudas e distinguir gamopatias monoclonais e policlonais (Allison, 2012a; Johnson, 2012).

A síntese de proteínas de fase aguda (α_1 e α_2 -globulinas) em resposta a uma inflamação pode resultar numa hiperglobulinemia ligeira (Allison, 2012a)

As gamopatias, isto é, o aumento das γ -globulinas, podem ser classificadas em monoclonais ou policlonais, com base na homogeneidade do pico de γ -globulinas no padrão eletroforético. As policlonais têm picos de base larga, ou seja, mais larga que a base do pico das albuminas, que se devem ao aumento das quantidades de diferentes imunoglobulinas produzidas por uma população heterogénea de linfócitos B ou plasmócitos. Por outro lado, as gamopatias monoclonais aparecem como altos picos de globulinas (com uma altura superior a quatro vezes a largura da base das albuminas) de base estreita, com largura semelhante à do pico das albuminas, e resultam da produção aumentada de um único tipo de imunoglobulinas por um único clone de linfócitos B ou plasmócitos. Excecionalmente podem aparecer dois picos de base estreita (gamopatia biclonal), quando um clone neoplásico produz imunoglobulinas que migram separadamente (Allison, 2012a).

Condições geralmente associadas a gamopatias policlonais são a inflamação ou estimulação antigénica crónicas (infeções, doenças imunomediadas e doença hepática especialmente a forma crónica) e, mais raramente, o linfoma e a leucemia linfocítica. As gamopatias monoclonais normalmente têm origem no mieloma múltiplo, plasmocitoma

extramedular e também no linfoma e na leucemia linfocítica. Causas menos comuns destas são a erliquiose canina, pioderma crônica, enterocolite plasmocítica, leishmaniose visceral canina, estomatite linfoplasmocítica felina e ainda situações idiopáticas ou de significado indeterminado (Allison, 2012a).

A1.2.5. Glicose

O fígado tem um papel importante na homeostase da glicose. Esta, depois de ser absorvida no intestino delgado, é transportada, pela circulação portal, até ao fígado, onde é convertida pelos hepatócitos em glicogénio. Outras funções destas células são a gluconeogénese e a glicogenólise em situações de hipoglicemia. Uma insuficiência hepática tanto pode causar hipoglicemia como uma hiperglicemia pós-prandial prolongada (Allison, 2012b).

Causas extra-hepáticas de hipoglicemia são: o consumo excessivo de glicose por células normais, associado a hiperinsulinemia (iatrogénica ou patológica) ou não (no caso de células não dependentes da ação da insulina para captação de glicose sanguínea), ou por células neoplásicas; défices em hormonas hiperglicemiantes (glucagon, cortisol e hormona de crescimento), baixa ingestão ou má absorção de glicose ou de outras substâncias necessárias para a gluconeogénese, a sépsis e alguns fármacos como o etanol, salicilatos e sulfonilureia (Evans, 2011; Nelson, 2012).

Contrariamente, défices ou resistências à insulina (hipoglicemiante) ou doenças que causem aumentos de hormonas hiperglicemiantes, assim como a administração de determinados fluidos (dextrose) ou drogas (corticosteroides, acetato de megestrol, morfina, progestagénios, diuréticos tiazídicos, detomidina, quetamina, xilazina e fenotiazina) conduzem à hiperglicemia extra-hepática (Evans, 2011; Nelson, 2012).

A1.2.6. Ureia

Sendo a ureia sintetizada pelos hepatócitos, a partir da amónia (gerada pelo catabolismo das proteínas ingeridas e endógenas), a perda de função hepática provoca acumulação de amónia no sangue e a consequente diminuição da concentração sérica de ureia (Allison, 2012b).

No entanto, os níveis de ureia podem estar diminuídos por outras causas não hepáticas, tais como, ingestão de baixos níveis de proteína, administração de esteroides anabólicos, hipertiroidismo, aumento da diurese, final da gestação em fêmeas ou interferências no transporte de amónia até ao fígado (Grauer, 2009; Barsanti, 2012; Meuten, 2012).

Os animais jovens podem apresentar uma menor concentração fisiológica de ureia sérica devido à maior ingestão de líquidos, e consequente maior produção de urina, associada a uma taxa anabólica superior, característica de indivíduos em crescimento (Tripathi *et al.*, 2011).

A1.2.7. Colesterol

O colesterol é produzido, principalmente, pelo fígado e excretado, em grande parte, pela bÍlis. Assim uma alteração hepática pode originar hipocolesteremia, por diminuição da síntese, em casos de insuficiência hepática, ou hipercolesterolemia, associada a colestase (Allison, 2012b).

A diminuição dos níveis séricos de colesterol pode verificar-se também em enteropatias com perda de proteína (ex.: linfagiectasia intestinal), determinadas neoplasias e na desnutrição severa (Nelson, 2012).

O aumento da sua concentração sérica está ainda associado a dietas com alto conteúdo de gorduras, à colheita de sangue imediatamente após a alimentação, a hiperlipidemia primária ou secundária a diabetes *mellitus*, hipotireoidismo, hiperadrenocorticismos, e ao síndrome nefrótico (Nelson, 2012).

Evans (2011) refere que as alterações primárias ou hereditárias do metabolismo do colesterol são raras em animais domésticos, à exceção da raça canina Schnauzer miniatura.

A1.2.8. Fatores de coagulação

O fígado é a única fonte dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (II, VII, IX e X) e do fibrinogénio, para além de produzir também substâncias anticoagulantes (antitrombina, proteína C e proteína S). A colestase, conseqüente a uma doença hepática, impede a absorção de vitamina K, lipossolúvel, diminuindo assim a atividade dos fatores de coagulação derivados desta (Allison, 2012b). Quando a atividade destes é diminuída abaixo dos 30% verificam-se aumentos dos tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada (Bain, 2011). Outra das conseqüências da interferência no fluxo biliar é a menor funcionalidade das substâncias anticoagulantes. Assim, a doença hepática pode originar defeitos não só na hemóstase, mas também na fibrinólise, e ainda diminuição do número e disfunção das plaquetas (Allison, 2012b).

A2. Parâmetros pancreáticos:

O pâncreas é um órgão anexo do sistema digestivo constituído, maioritariamente, por uma porção exócrina (80%), composta por epitélio glandular produtor de enzimas digestivas, e uma porção endócrina – ilhotas de Langerhans – responsável pela síntese de hormonas reguladoras da homeostase de glicose (Allison, 2012c).

O diagnóstico das principais desordens do pâncreas exócrino baseia-se em dois factos: que a inflamação do seu parênquima – pancreatite – pode levar à ativação prematura e libertação de enzimas pancreáticas para o sangue, originando aumentos da sua atividade sérica; e que a perda de células acinares pancreáticas, que ocorre na insuficiência pancreática exócrina (IPE), resulta na produção e secreção insuficientes de enzimas pancreáticas, comprometendo a função digestiva (Allison, 2012c).

Na área das bioquímicas, são analisadas as seguintes enzimas pancreáticas: amilase, lipase, PLI e a TLI.

A amilase e a lipase não são exclusivamente produzidas pelo pâncreas, por isso, a alteração das suas atividades não é específica de alterações neste órgão. Apesar de não ter qualquer utilidade em gatos, o seu doseamento conjunto pode ser útil na detecção de pancreatite em cães, através de aumentos mais pronunciados das suas atividades séricas. Tendo em conta a baixa contribuição do pâncreas para a sua atividade sérica, a diminuição da amilase e da lipase não sugerem IPE (Tarpley e Bounous, 2011).

A2.1. Amilase

A amilase é produzida, essencialmente, pelo pâncreas, fígado e intestino delgado, sendo responsável pela hidrólise do amido em maltose e glucose. Depois de ser lançada na circulação, é filtrada pelo glomérulo, reabsorvida e inativada pelo epitélio tubular renal. Como tem baixa especificidade (57-77%) no diagnóstico de pancreatite canina, o seu doseamento é raramente indicado (Tarpley e Bounous, 2011).

O aumento da sua atividade sérica – hiperamilasemia – ocorre, mais severamente, na pancreatite (cerca de três a cinco vezes o limite superior do intervalo de referência segundo Allison (2012c)) mas também, em níveis ligeiros a moderados, na diminuição da taxa de filtração glomerular, e doenças que aumentem a produção ou diminuam a clearance da macroamilase (complexo de amilase ligada a imunoglobulinas), na diabetes *mellitus*, doença gastrointestinal e doença hepatobiliar, em neoplasias como o linfo- e o hemangiossarcoma e na manipulação cirúrgica do pâncreas (Bounous e Tarpley, 2011; Twedt e Willard, 2012) É importante ter em conta que um resultado normal não exclui a presença de pancreatite, devido à sua fraca sensibilidade (62-78% em cães) (Tarpley e Bounous, 2011).

A hipoamilasemia está normalmente associada a amostras lipémicas ou à administração de corticosteroides (Tarpley e Bounous, 2011).

A2.2. Lipase

A lipase é produzida, essencialmente, no pâncreas e no estômago e libertada no trato gastrointestinal para a digestão dos triglicéridos. É recolhida da circulação e inativada pelos rins. As baixas sensibilidade (60-75%) e especificidade (50-75%) fazem com que esta análise seja raramente recomendada no diagnóstico de pancreatite em cães (Tarpley e Bounous, 2011; Willard e Twedt, 2012).

Para além da pancreatite (na qual há geralmente, segundo Allison (2012c) um aumento de 3 a 5 vezes o limite superior do intervalo de referência), a doença renal com diminuição associada da taxa de filtração glomerular, a peritonite, a gastrite, a enterite, as doenças hepáticas (necrose e degenerescência gorda), a obstrução intestinal, a manipulação durante a laparotomia, as neoplasias (pâncreas, fígado e ducto biliar e coração) e a administração de corticosteroides também podem aumentar a atividade sérica da lipase (Tarpley e Bounous, 2011; Allison, 2012c; Willard e Twedt, 2012). O doseamento da lipase não deverá ser feito em

soro hemolisado, devido ao risco de inibição da sua atividade enzimática (Tarpley e Bounous, 2011).

A2.3. Imunorreatividades da lipase pancreática e semelhante à tripsina

A PLI e a TLI são testes laboratoriais específicos da função pancreática pois detetam apenas a lipase, tripsinogénio e tripsina produzidos pelo pâncreas (Allison, 2012c).

A2.3.1. Imunorreatividade da lipase pancreática (PLI)

Atualmente, a PLI é o teste laboratorial mais indicado no diagnóstico de pancreatite em cães e gatos. A sua sensibilidade varia proporcionalmente à severidade da doença, e é de 65-82% no cão e de 54-100% no gato. A especificidade é superior a 90% nas duas espécies (superior a 95% no cão e de 91% no gato) (Allison, 2012c).

Valores superiores a 400 µg/L, em cães, sugerem inflamação ou necrose pancreática, enquanto, no gato, a presença de pancreatite é provável com concentrações acima de 5.4 µg/L (Willard e Twedt, 2012).

Tarpley e Bounous (2011) referem que a taxa de filtração glomerular, a gastrite e a administração oral de prednisona não interferem nos resultados. No entanto, os valores podem estar aumentados em gatos com diabetes *mellitus*.

As concentrações de PLI podem ser fisiologicamente nulas, não se falando por isso em diminuições da sua concentração (Willard e Twedt, 2012).

A2.3.2. Imunorreatividade semelhante à tripsina (TLI)

A TLI é, no cão e no gato, altamente específica de doença pancreática, pois o tripsinogénio e a tripsina caninos e felinos têm origem exclusiva no pâncreas. Numa situação fisiológica, uma pequena quantidade dessas substâncias é libertada para o sangue. Enquanto uma lesão pancreática provoca aumentos, a perda de massa pancreática funcional origina diminuições dos níveis séricos de TLI (Tarpley e Bounous, 2011). Tem sensibilidade (33-36%) e especificidade baixas (65-90%) no diagnóstico de pancreatite em cães e gatos, sendo usada principalmente para o diagnóstico de IPE (Allison, 2012c).

Para doseamentos exatos de TLI recomenda-se um jejum de pelo menos 12 horas, para evitar falsos aumentos e, ao mesmo tempo, a lipemia que pode interferir com a medição (Allison, 2012c).

Na IPE, a diminuição da TLI é mais específica e sensível que a diminuição da PLI. O diagnóstico de IPE é feito quando se encontram concentrações de TLI inferiores a 2.5µg/L no cão e a 8 µg/L no gato. Em cães saudáveis, medições constantes entre o *cut-off* e o limite inferior do intervalo de referência, isto é, >2.5 e <5.0 µg/L, são consistentes com IPE subclínica secundária a atrofia pancreática parcial. Nestes casos deve voltar-se a repetir o teste. Alguns cães acabam por desenvolver a doença e outros não (Tarpley e Bounous, 2011; Willard e Twedt, 2012).

Valores elevados de TLI podem ocorrer quando há uma pancreatite, má nutrição, ou uma azotemia pré-renal ou renal (Bounous e Tarpley, 2011; Willard, 2012). Uma vez que, o tripsinogênio é filtrado e catabolizado pelas células tubulares renais, a diminuição da taxa de filtração glomerular prolonga a circulação de TLI, aumentando a sua concentração sérica (Tarpley e Bounous, 2011).

Segundo Allison (2012c), o doseamento de cobalamina e folatos é fortemente recomendado sempre que se determina a TLI sérica, uma vez que são comuns as suas alterações em cães e gatos com IPE, devendo ser prontamente corrigidas de modo a evitar interferências na resposta ao tratamento da mesma.

A3. Cobalamina e folato

O doseamento de cobalamina (vitamina B12) e de folato é usado para avaliar a capacidade de absorção intestinal, em casos inexplicados de perda de peso ou de diarreia crônica do intestino delgado (ID). No entanto, as fracas sensibilidade e especificidade destes testes geralmente impossibilitam a chegada a um diagnóstico etiológico preciso, devendo por isso ser associados a outras análises (Seddon, 2012).

A cobalamina é uma vitamina hidrossolúvel libertada das proteínas da dieta após a digestão pela pepsina gástrica, ligando-se depois à haptocorrina, de modo a ficar indisponível para absorção no estômago. As proteases pancreáticas libertam a vitamina B12 no intestino delgado, para que se ligue ao fator intrínseco, sintetizado pela mucosa gástrica canina e pelo pâncreas canino e felino, de forma a ser absorvida. Este complexo fator intrínseco-cobalamina é absorvido na parte distal, do ID, maioritariamente no íleo, através de um recetor específico, a cubilina, presente nos enterócitos (Tarpley, 2011; Seddon, 2012).

A diminuição da concentração sérica de cobalamina – hipocobalaminemia – pode ter origem numa doença severa do intestino delgado redutora da absorção intestinal, tal como doença intestinal inflamatória (do inglês, *Inflammatory Bowel Disease* - IBD) ou neoplasias; no sobrecrecimento bacteriano, no qual as bactérias, especialmente as anaeróbias, se ligam à cobalamina tornando-a indisponível para ser absorvida, para além de poderem produzir substâncias tóxicas para os enterócitos, com capacidade de danificar a bordadura em escova, interferindo com a absorção de cobalamina; na IPE e na ressecção cirúrgica do íleo (Steiner, 2004; Tarpley e Bounous, 2011; Seddon, 2012). Segundo Seddon (2012), determinadas raças caninas, como Border Collie, Schnauzer Gigante, Pastor Australiano e Beagle, têm predisposição para apresentarem recetores deficientes do complexo fator intrínseco-cobalamina, podendo exibir uma má absorção seletiva de cobalamina. Willard e Twedt (2012) referem ainda as doenças hepáticas e o hipertiroidismo como causas possíveis de diminuição da concentração sérica de cobalamina em gatos. Diminuições artefactuais ocorrem após a exposição à luz solar, a qual degrada rapidamente a vitamina B12 (Seddon, 2012; Willard e Twedt, 2012).

A hipercobalaminemia, apesar de ser incomum, pode ter origem numa suplementação vitamínica ou numa lesão do parênquima hepático, local de armazenamento da cobalamina (Seddon, 2012).

O folato, ácido fólico ou vitamina B9, proveniente de plantas de folhas verdes e de bactérias intestinais, é absorvido, sob a forma monoglutâmica, através de transportadores específicos presentes no intestino delgado proximal, principalmente no jejuno (Tarpley e Bounous, 2011; Seddon, 2012).

A diminuição da concentração sérica de folato ocorre em doenças do ID proximal, tais como IBD e neoplasias infiltrativas, ao interferirem com a absorção intestinal; ou após a administração de antibióticos (Seddon, 2012). A hipocobalaminemia, ao inibir a síntese de ácidos nucleicos, essenciais para a rápida divisão celular do epitélio intestinal, também interfere na absorção de folato devido à atrofia das criptas (Bounous e Tarpley, 2011).

Por outro lado, o aumento dos níveis séricos de folato sucede das excessivas suplementação vitamínica ou ingestão, da produção bacteriana exacerbada, no caso de sobrecrescimento bacteriano; ou do aumento da absorção, estimulado pela diminuição do pH intestinal, secundário ao excesso de suco gástrico ou à diminuição da secreção de bicarbonato, que podem ocorrer em casos de IPE (Seddon, 2012). Outra possível causa de hiperfolatemia é a diminuição do uso de folato para a síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) secundária a hipocobalaminemia, uma vez que, a vitamina B12 é necessária para a conversão de metilfolato em tetrahydrofolato, a forma ativa na síntese de ADN (Tarpley e Bounous, 2011). Aumentos artefactuais da folatemia podem ocorrer secundariamente a hemólise (Seddon, 2012).

O aumento de antigénios no lúmen intestinal, associado a dietas específicas, pode conduzir ao desenvolvimento de enteropatias que tanto podem estimular como inibir a absorção de folato, aumentando ou diminuindo a sua concentração sérica (Bounous e Tarpley, 2011; Seddon, 2012).

O quadro 2 auxilia na interpretação dos níveis séricos de TLI, cobalamina e folato.

Quadro 2: Alterações laboratoriais típicas nas concentrações séricas de folato, cobalamina e TLI em várias desordens de má absorção. TLI – imunorreatividade semelhante à tripsina, IPE – insuficiência pancreática exócrina, N – normal, ID – intestino delgado. Adaptado de Tarpley e Bounous, 2011.

Desordem	TLI	Cobalamina	Folato
IPE	Diminuído	Diminuída	Aumentado ou N
Sobrecrescimento bacteriano	N	Diminuída	Aumentado
Doença ID proximal	N	N	Diminuído
Doença ID distal	N	Diminuída	N
Doença difusa ID	N	Diminuída	Diminuído

A4. Parâmetros renais:

Os rins são órgãos do sistema urinário superior que apresentam múltiplas funções – filtração glomerular, reabsorção e secreção tubular, participação no sistema renina-angiotensina-aldosterona, síntese de eritropoietina e conversão da vitamina D na sua forma metabolicamente ativa (1,25-dihidroxicolecalciferol) – sendo essenciais para manter o volume e a composição do fluido extracelular equilibrados (Heiene e Lefebvre, 2007).

O glomérulo filtra o sangue, produzindo o filtrado glomerular, o qual é lançado nos túbulos renais. Estes reabsorvem a água, glicose, proteínas de baixo peso molecular e eletrólitos consoante as necessidades do organismo, originando a urina, produto final, através do qual, os metabolitos são excretados do organismo (Verlander, 2013)

Não existe um único teste laboratorial que permita avaliar simultaneamente todas as funções renais, contudo, Heiene e Lefebvre (2007) afirmam que a forma mais competente e sensível de avaliar toda a função renal é estimando a taxa de filtração glomerular (TFG).

A ureia e a creatinina são produtos metabólicos excretados essencialmente pelos rins, em cães e gatos, por isso, a mensuração dos seus níveis séricos, principalmente da creatinina é usada como indicador indireto da TFG (Squires, 2005).

A4.1. Ureia

A ureia existente em circulação é livremente filtrada pelo glomérulo, mas depois difunde-se passivamente (40-70%), do lúmen tubular para o sangue, de acordo com o estado de hidratação do animal e com o fluxo do filtrado glomerular dentro dos túbulos renais. Quanto maior for este último, menor será a reabsorção de ureia. Isto faz com que não seja um indicador tão fiável da TFG quanto a creatinina, a qual é totalmente eliminada pela filtração glomerular, pois não há qualquer reabsorção tubular. No entanto, este indicador carece de sensibilidade, tendo em conta que, o aumento da concentração sérica de creatinina só ocorre após a perda de três quartos da massa funcional renal, evidenciando a grande capacidade de reserva renal (Tripathi *et al.*, 2011; Meuten, 2012a).

Visto que existem fatores extrarrenais que influenciam as concentrações séricas de ureia e creatinina, devem ser doseadas em conjunto, para se poder chegar a conclusões diagnósticas.

Fatores extrarrenais que podem aumentar apenas os níveis de ureia são a ingestão de uma dieta altamente proteica, a hemorragia gastrointestinal, a administração de corticosteroides ou de tetraciclina e febre (Barsanti, 2012).

A4.2. Creatinina

A creatinina é um metabolito muscular, sintetizado a partir da creatina e creatina fosfato (Meuten, 2012a). A maioria da creatinina sérica tem origem endógena, a uma taxa constante, com uma pequena parte proveniente das fibras musculares absorvidas da dieta carnívora (Tripathi *et al.*, 2011).

A diminuição dos níveis de creatinina sérica pode estar associada a diminuições da massa muscular, que ocorrem na caquexia crônica severa e no hipertiroidismo, ou, raramente, a insuficiência hepática crônica, por diminuição da síntese hepática de creatina (Meuten, 2012a). É normal gatinhos e cachorros de dois a seis meses de idade apresentarem valores mais baixos devido à menor massa muscular e maior TFG (Barsanti, 2012).

O aumento isolado da sua concentração, isto é, não acompanhado por um aumento da ureia, pode derivar de trauma muscular ou de uma ingestão recente de carne (Tripathi, 2011; Barsanti, 2012). Meuten (2012a) refere que situações que aumentem o catabolismo muscular, como sépsis e caquexia, podem aumentar a libertação de creatina e assim aumentar ligeiramente a produção de creatinina, não interferindo, em regra, com a interpretação clínica.

De modo a evitar variações da concentração de creatinina, devido a influências extrarrenais, a Sociedade Internacional dedicada ao estudo das alterações renais (International Renal Interest Society – IRIS) recomenda a determinação da sua concentração sanguínea em duplicado, em pacientes estáveis em jejum.

O aumento conjunto das concentrações séricas de ureia e creatinina é designado por azotemia e resulta de diminuições da TFG. Esta diminuição pode ter origem em causas pré-renais, renais ou pós-renais, permitindo classificar a azotemia em três tipos (Barsanti, 2012).

Qualquer condição que diminua a perfusão renal pode resultar em azotemia pré-renal. Esta desenvolve-se após hipovolemia, principalmente por desidratação ou choque, ou devido a hipotensão, associada a insuficiência cardíaca ou à formação de trombos aórticos ou renais (Grauer, 2009; Tripathi *et al.*, 2011).

A azotemia renal ocorre devido à perda de função de cerca de 75% dos nefrónios (Tripathi *et al.*, 2011). A azotemia pós-renal é causada por uma obstrução ao fluxo de urina ou por rutura do trato urinário, com extravasamento de urina para a cavidade abdominal (Grauer, 2009). A diferenciação das azotemias pré-renal e renal obriga à realização de outros testes laboratoriais, tais como, a densidade urinária, rácio creatinina urinária: creatinina sérica, excreção fracionada de sódio, sedimento urinário, hemograma, e níveis de sódio, potássio, cálcio, proteínas totais, albumina e glicose (Grauer, 2009; Barsanti 2012)

As azotemias pré-renal e pós-renal resolvem, habitualmente, após a remoção da causa, exceto em situações crônicas ou severas, que, ao desencadearem lesões no parênquima renal, evoluem para uma azotemia renal secundária (Grauer, 2009).

A4.3. *Symmetric dimethylarginine (SDMA)*

Estimar a TFG pode auxiliar na avaliação clínica da função renal. O marcador bioquímico da TFG mais usado é a concentração de creatinina sérica. Contudo, a sua insensibilidade para detetar diminuições precoces na função renal e o facto de ser afetada por fatores extrarrenais, como o teor de massa muscular, fazem com que não seja o marcador mais fidedigno do funcionamento renal (Nabity *et al.*, 2015).

A SDMA (*symmetric dimethylarginine*) é uma arginina derivada da metilação intranuclear da L-arginina pela metiltransferase arginina-proteína, que é libertada para a circulação após proteólise, sendo primariamente eliminada pelo rim. Para além das suas influências extrarrenais serem menores que as da creatinina sérica, é uma molécula altamente estável no soro e no plasma, mesmo após vários ciclos de congelação e descongelação. Outras das suas vantagens comparativamente à creatinina é o facto de acompanhar a progressão da doença renal em cães e gatos, estando fortemente correlacionada com a TFG, e identificar a diminuição da função renal mais precocemente que a concentração de creatinina sérica e que a TFG. A SDMA deteta consistentemente perdas da função renal inferiores a 30% em cães com doença renal crónica (Nabity *et al.*, 2015).

Segundo as *guidelines* mais recentes da IRIS, um aumento persistente na concentração de SDMA > 14µg/dL sugere diminuição da função renal e pode permitir identificar o estadio I da doença renal crónica em cães e gatos com concentrações normais de creatinina sérica (isto é, <1.4 ou <1.6 mg/dL, respetivamente), assim como, pode levar à passagem do estadio 2 e 3 para os estadios 3 e 4, respetivamente, na presença de concentrações de SDMA 25 µg/dL e 45 µg/dL, em pacientes com baixa condição corporal, uma vez que o grau de disfunção renal está subestimado pela diminuição da percentagem de massa muscular.

A5. Frutosamina

A frutosamina é uma proteína glicosada muito usada em medicina veterinária, para determinação da concentração média de glicose durante as duas a três semanas anteriores, devido à sua ligação irreversível ao grupo amina das proteínas plasmáticas (Evans, 2011).

Como a sua concentração sérica só aumenta em hiperglicemias crónicas, permite distinguir diabetes *mellitus* de hiperglicemia ou de glicosúria renal induzidas pelo *stress*. É também usada na monitorização do tratamento da diabetes *mellitus* (Evans, 2011).

Os seus níveis podem estar artefactualmente diminuídos (isto é, sem diminuição associada da glicemia) em hipoproteinemias no gato; hipoalbuminemias, hiperlipidemia e azotemia em cães; hipertiroidismo no gato; infeções parasitárias por *Angiostrongylus vasorum* em cães; ou por manutenção da amostra à temperatura ambiente; e falsamente aumentados em cães hipotiroides (Allison, 2012c). A interferência das duas primeiras pode ser eliminada através do uso de fórmulas específicas para cães e gatos, que têm em conta os níveis séricos das proteínas de transporte da frutosamina felina canina (albuminas) e felina (Allison, 2012c)

O aumento da concentração de frutosamina indica aumento persistente da glicemia ou mau controlo terapêutico da glicose sanguínea em animais sujeitos a insulino terapia. Este teste tem uma sensibilidade de 93% em gatos e de 88% em cães, e uma especificidade de 86% em gatos e de 99% em cães no diagnóstico de diabetes *mellitus* (Allison 2012c).

A diminuição dos níveis séricos de frutosamina é compatível com hipoglicemia persistente, a qual pode derivar de um insulinoma (Allison, 2012c).

A6. Creatina quinase (CK)

A CK é uma enzima vital para a produção de energia muscular, ao transferir uma ligação fosfato altamente energética da creatina fosfato para a adenosina difosfato (ADP), transformando-a em adenosina trifosfato (ATP), necessária para a contração muscular. É também responsável pela transferência inversa do grupo fosfato (do ATP para a creatina fosfato), quando o músculo está em repouso (Hall e Bender, 2011).

É uma enzima dimérica constituída pelas subunidades B (cérebro) e M (músculo), existindo quatro tipos de isoenzimas: a CK-BB está presente no cérebro, nos nervos periféricos, no líquido cefalorraquidiano (LCR) e em pequenas quantidades em vísceras como o baço e rim; a CK-MB encontra-se no músculo cardíaco, nos intestinos, nos pulmões e no baço; a CK-MM localiza-se nos músculos esquelético e cardíaco e a CK-MT existe no interior de mitocôndrias de vários tecidos (Hall e Bender, 2011; Allison, 2012d)

As diferentes isoenzimas podem ser separadas por eletroforese ou por métodos imunológicos específicos para cada espécie, permitindo a determinação de cada fração (Hall e Bender, 2011).

A primeira e a terceira apresentam maior atividade sérica e, uma vez que, a CK derivada de lesão cerebral se encontra apenas no LCR, pois a barreira hematoencefálica impede que ela atinja o sangue, as alterações séricas são específicas de lesão muscular (Allison, 2012d).

Pode ser doseada no soro ou no plasma, apresentando no primeiro uma atividade maior devido à libertação de CK, das plaquetas, durante a formação do coágulo sanguíneo (Allison, 2012d).

Os aumentos da sua atividade sérica podem derivar de lesões no músculo esquelético (por trauma, toxinas, rabdomiólise de exercício, miosites bacterianas, virais ou parasitárias, convulsões, hipotireoidismo, hiperadrenocorticismos e distrofia muscular), no músculo cardíaco e no músculo liso, ou do catabolismo muscular em animais anoréticos. A magnitude do aumento correlaciona-se com a gravidade da lesão muscular (Allison, 2012d).

É importante ter em conta a idade e a raça do animal, quando se analisam amostras caninas. Cachorros até um mês de idade podem ter valores de CK quatro vezes superiores aos de um adulto, os quais são atingidos entre os sete e os doze meses de idade (Allison, 2012d). Hall e Bender (2011) referem ainda que cães de raças pequenas tendem a ter maiores atividades de CK.

Aumentos artefactuais ligeiros ocorrem em amostras hemolisadas, decorrentes essencialmente da libertação de enzimas eritrocitárias e seus intermediários que podem afetar as reações espectralométricas, em amostras ictericas e em amostras de sangue contaminadas com fluido muscular aquando da venopunção (Hall e Bender, 2011; Allison, 2012d). Diminuições artefactuais da CK têm origem na manutenção da amostra a temperaturas elevadas ou no uso de amostras congeladas (Levine e Levine, 2012).

B. HEMATOLOGIA

B1. Avaliação leucocitária

Do ponto de vista morfológico, os leucócitos são classificados em polimorfonucleares ou em mononucleares, consoante a segmentação do seu núcleo. Os leucócitos polimorfonucleares dos mamíferos são também designados de granulócitos, por conterem grande número de grânulos citoplasmáticos, e incluem os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Estes distinguem-se pelas características de coloração dos seus grânulos. Os monócitos e os linfócitos são leucócitos mononucleares ou agranulócitos (Harvey, 2012).

Todos os leucócitos participam na defesa do organismo, mas de modo funcionalmente independente (Weiss e Tvedten, 2012a).

Na avaliação leucocitária do esfregaço deve verificar-se a sua contagem total e diferencial, assim como, a sua morfologia, registando-se a presença de células imaturas, alterações tóxicas nos neutrófilos, presença de monócitos ativados e de linfócitos atípicos, aumento do número de linfócitos reativos (superior a cinco por cento em animais adultos) e inclusões infecciosas (Harvey, 2012).

B1.1. Alterações quantitativas

Para confirmar a leitura feita no hemograma deve fazer-se uma estimativa do número de leucócitos por μL de sangue. Para estimar o número total de leucócitos, Harvey (2012) sugere a multiplicação do número médio de leucócitos por campo de 100x, por 100 a 150, ou a multiplicação, por 400 a 600, do número médio de leucócitos por campo de 200x. O fator de correção usado dependerá do microscópio. Metzger e Rebar (2004b) recomendam dois métodos alternativos. A determinação do número total de leucócitos contando três a cinco campos de 200x ou a contagem do número médio em campos de 100x multiplicada por 2000. Sendo, que no primeiro caso, um valor de dez a vinte leucócitos por campo é considerado normal. A estimativa da contagem diferencial pode ser feita identificando 100 leucócitos consecutivos, em diferentes campos, com a objetiva de imersão, num padrão que abranja tanto os bordos como o centro do esfregaço. A percentagem de cada tipo de leucócito é depois multiplicada pelo número total de leucócitos, obtendo-se assim o número absoluto de cada tipo celular por microlitro de sangue (Harvey, 2012).

O termo leucocitose designa o aumento do número total de leucócitos em circulação, enquanto a designação leucopenia é usada para descrever a sua diminuição. O aumento do número absoluto dos diferentes tipos de leucócitos, em circulação, designa-se por neutrofilia, eosinofilia, basofilia, linfocitose e monocitose, e a sua diminuição é referida como neutropenia, eosinopenia, basopenia, linfopenia e monocitopenia (Weiss e Tvedten, 2012a).

Os leucócitos são células inflamatórias, por isso as alterações no leucograma são usadas, sobretudo, para identificar doenças inflamatórias e caracterizá-las, consoante o tipo e a

severidade. Sendo o neutrófilo o leucócito mais frequente no sangue, a leucocitose deve-se na maioria dos casos a neutrofilia (Tvedten e Raskin, 2012).

B1.1.1. Neutrófilos

O termo neutrófilo deriva do facto dos seus grânulos não corarem, ou aparecerem rosa pálido, nas colorações de rotina, da maioria dos mamíferos. Apresentam um citoplasma rosa claro ou ligeiramente basofílico e um núcleo segmentado, quando maduro, com cromatina condensada, que cora de azul a roxo (Harvey, 2012).

Os neutrófilos são essenciais na defesa contra microrganismos, principalmente bactérias, atuando através da libertação de armadilhas extracelulares, e da habitual fagocitose, de modo a destruir os agentes bacterianos ou fúngicos. A exceção são as espécies de *Yersinia*, *Listeria* e *Mycobacterium*, que conseguem sobreviver dentro dos fagócitos (Harvey, 2012).

A neutrofilia pode ser consequência do aumento da produção e/ou libertação de neutrófilos da medula óssea, da diminuição da sua migração para os tecidos, e do seu movimento do *pool* marginal para o *pool* circulante (Harvey, 2012). Tvedten e Raskin (2012) referem que os principais diagnósticos diferenciais de leucocitose neutrofílica são a inflamação, *stress* associado a glucocorticoides endógenos ou exógenos, para além do exercício, medo ou excitação desencadeadores da libertação de epinefrina. Nestes últimos casos, a leucocitose é temporária e classificada como fisiológica (Tvedten e Raskin, 2012).

Um desvio à esquerda, isto é, o aumento do número de neutrófilos imaturos não segmentados, como por exemplo, neutrófilos banda, metamielócitos ou mielócitos, é um indicador específico de inflamação, sendo as suas severidades proporcionais (Metzger e Rebar, 2004b; Tvedten e Raskin, 2012).

Uma vez que os neutrófilos são os leucócitos predominantes em circulação, a neutropenia traduz-se normalmente em leucopenia (Tvedten e Raskin, 2012). Deve-se geralmente à diminuição da libertação de neutrófilos da medula óssea (neutropenia primária), a aumento da migração tecidual ou da destruição ao nível da circulação (neutropenia secundária). O primeiro caso pode ter origem numa diminuição das células progenitoras (hipoplasia generalizada ou neutrofílica ou mieloptise) ou numa disgranulopoiese, que consiste numa maturação anormal das células precursoras (Harvey, 2012)

Condições hipoplásicas incluem reações idiossincráticas a drogas (ex.: fenilbutazona, trimetropim-sulfa, griseofulvina, cefalosporinas e fenbendazol), toxicidade por estrogénios, quimioterápicos citotóxicos, doenças virais ou por riquétsias e alterações hereditárias (Harvey, 2012).

As desordens mieloptísicas caracterizam-se pela substituição, na medula óssea, das células hematopoiéticas por células anormais, como as células neoplásicas. Para além de existir alteração do microambiente medular, verifica-se também um comprometimento da hematopoiese (Harvey, 2012).

Por outro lado, a neutropenia secundária, poderá derivar de uma demanda tecidual excessiva ou duma reação imunomediada. Em condições sépticas extensas e em endotoxemias, à neutropenia associa-se, normalmente, um desvio à esquerda degenerativo (Harvey, 2012). Fala-se em desvio degenerativo quando o número de neutrófilos segmentados é inferior ao de não segmentados (Tvedten e Raskin, 2012). Por outro lado, a destruição imunomediada pode ser induzida por alguns fármacos ou agentes infecciosos, como o *Anaplasma phagocytophilum* (Harvey, 2012).

B1.1.2. Eosinófilos

Os eosinófilos são leucócitos polimorfonucleares, embora menos lobulados que os neutrófilos, que devem o seu nome à afinidade dos seus grânulos citoplasmáticos para a eosina. O tamanho, forma e número de grânulos variam consoante a espécie. Na maioria das espécies, têm grânulos redondos, mas no gato, os grânulos têm forma de bastonete. Nos cães, os grânulos podem ser excepcionalmente grandes. Os eosinófilos dos galgos destacam-se pela abundante vacuolização (Harvey, 2012).

Os eosinófilos destroem parasitas, regulam a intensidade das reações de hipersensibilidade mediadas pela imunoglobulina (Ig) E e têm capacidade para promover a inflamação e causar danos nos tecidos (Tvedten e Raskin, 2012).

A eosinofilia ocorre em desordens que aumentam a produção de interleucina 5 (IL-5). Pode estar associada a doenças parasitárias, nomeadamente por nematodes ou trematodes, mas também por ácaros; a inflamações eosinofílicas da pele, pulmões e intestinos – órgãos ricos em mastócitos; reações de hipersensibilidade mediadas pela IgE, como dermatite alérgica à picada da pulga (DAPP) e asma; a leucemia eosinofílica crónica ou ao síndrome hipereosinofílico. Pode ocorrer ainda em granulomas eosinofílicos idiopáticos e, raramente, em granulomatose linfomatoide e outros tipos de tumores (Harvey, 2012).

Perante um aumento do número total de eosinófilos em circulação, deve procurar-se, em primeiro lugar, processos parasitários ou alérgicos, sendo estes os principais causadores. Na ausência destes, deverá pensar-se noutras reações inflamatórias, infeções por qualquer tipo de microrganismo ou em neoplasia, sem esquecer o síndrome hipereosinofílico e o complexo do granuloma eosinofílico. Rottweiler, Husky Siberiano, Malamute do Alasca e Cavalier King Charles são algumas das raças com maior predisposição para desenvolvimento de inflamações eosinofílicas (Tvedten e Raskin, 2012).

Uma vez que a contagem total de eosinófilos pode ser nula, a eosinopenia não tem grande significado (Krimer, 2011).

B1.1.3. Basófilos

Os basófilos são leucócitos polimorfonucleares de grânulos ácidos com afinidade para o corante básico, azul-de-metileno. Geralmente, o citoplasma é azul pálido e o núcleo menos segmentado que o dos neutrófilos. Nos cães, os grânulos citoplasmáticos são escassos e

roxos, sendo que nos gatos, são redondos ou ovais, violeta e mais numerosos, podendo camuflar o núcleo (Harvey, 2012).

Em animais saudáveis, são muito raros no sangue de cães e pouco frequentes em gatos e, por isso, podem não ser detetados pela contagem manual. Para além disso, não são identificados pelo Sysmex XT-2000iV®, dificultando a quantificação sanguínea destas células (Tvedten e Raskin, 2012)

Estas células são um componente das reações de hipersensibilidade, em conjunto com os mastócitos e os eosinófilos, sendo a basofilia acompanhada, geralmente, de eosinofilia. Participam na hemóstase, no metabolismo lipídico, na morte de células neoplásicas, para além de promoverem a rejeição de carraças (Harvey, 2012).

A basofilia pode estar associada a lipemia, a mastocitomas ou, raramente, a leucemia basofílica crónica, para além das causas já referidas de eosinofilia (Tvedten e Raskin, 2012).

B1.1.4. Linfócitos

A maioria dos linfócitos encontra-se nos órgãos linfoides – linfonodos, timo, baço e medula óssea – e apenas uma pequena percentagem (dois a cinco por cento) circula no sangue. São classificados em linfócitos B ou T, consoante a diferenciação ocorra na medula óssea/placas de Peyer do intestino (cães) ou no timo. A percentagem de cada um deles na circulação varia entre 50 e 75% para os T e entre 10 e 40% para os B, dependendo da espécie e da variabilidade individual. Os linfócitos *natural killer* (NK) correspondem somente a 5 a 10% dos linfócitos circulantes. Os diferentes tipos de linfócitos são morfologicamente indistinguíveis, não sendo possível quantificá-los através do exame do esfregaço sanguíneo (Harvey, 2012).

Os linfócitos são leucócitos mononucleares de tamanho variável, com elevada razão núcleo:citoplasma (N:C), principalmente nos mais pequenos. O núcleo é normalmente redondo, podendo ser oval ou ligeiramente dentado, com um padrão de cromatina inconstante. O citoplasma é geralmente azul pálido, sem grânulos, exceto nos linfócitos granulares, que apresentam granulação ocasional (Harvey, 2012).

Fazem parte da imunidade específica, sendo que os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral, ao diferenciarem-se em plasmócitos produtores de anticorpos, e os linfócitos T, através da produção e libertação de citoquinas, estão envolvidos na imunidade celular (Rebar *et al.*, 2005a)

A contagem total de linfócitos sofre grande variação ao longo da vida, por isso, é importante ter valores de referência adaptados não só à espécie, mas também à faixa etária. É normal os cães e os gatos mais jovens terem contagens superiores (Harvey, 2012; Tvedten e Raskin, 2012).

A linfocitose persistente significa, normalmente, uma estimulação do sistema imunitário secundária a uma inflamação ou infeção, principalmente crónica, viremia, doença imunomediada (ex.: anemia hemolítica imunomediada - AHIM) ou a imunização recente (Tvedten e Raskin, 2012). Pode dever-se também a exercício ou excitação, principalmente nos

gatos, sendo, nestes casos, uma alteração temporária, e mais raramente a hipoadrenocorticismo. Outras das causas possíveis são as leucemias linfoblástica aguda (LLA) ou linfocítica crónica (LLC) (Harvey, 2012).

A linfopenia ocorre em resposta a glucocorticoides endógenos e exógenos, os quais provocam sequestro nos órgãos linfoides e potenciam a apoptose dos linfócitos mais sensíveis. A libertação de glucocorticoides endógenos deve-se a um *stress* severo, o qual pode ser induzido por desordens sistémicas severas ou por inflamações agudas (Harvey, 2012). A diminuição do número de linfócitos circulantes pode dever-se também a muitas infeções virais, através do dano celular direto e da redistribuição dos linfócitos secundária ao *stress* e à exposição ao antigénio. A destruição por fármacos imunossupressores, a irradiação, e a perda de linfa rica em linfócitos no quilotórax, na enteropatia com perda de proteína e na linfagiectasia (cão), e as falhas da circulação linfática normal, por inflamação, infeção ou neoplasia são outros causadores de linfopenia (Harvey, 2012; Tvedten e Raskin, 2012).

B1.1.5. Monócitos

Os monócitos são leucócitos mononucleares com núcleo pleomórfico, que pode variar entre a forma de rim, banda ou contorcido, cuja cromatina é difusa ou ligeiramente agregada. O citoplasma é geralmente azul acinzentado e contém, muitas vezes, vacúolos de tamanho variável, para além de poder apresentar uma granulação fina roxa rosada. São normalmente maiores que os linfócitos e a razão N:C é inferior ou igual a um (Harvey, 2012).

São precursores dos macrófagos tecidulares, cujas funções são remover detritos necróticos, destruir fungos e alguns parasitas, inativar vírus, tentar remover corpos estranhos, retirar glóbulos vermelhos anormais ou envelhecidos da circulação e destruir células neoplásicas. Sendo assim, a monocitose é esperada em doenças inflamatórias em que haja grande necessidade de macrófagos, tais como, inflamações piogranulomatosas e granulomatosas, necrose, neoplasia, doenças hemorrágicas ou hemolíticas e doenças imuno-mediadas (Tvedten e Raskin, 2012). Também pode estar associada à administração de glucocorticoides, principalmente em cães, a leucemias monocíticas ou mielomonocíticas agudas e ao sarcoma histiocítico canino (Harvey, 2012).

A monocitopenia geralmente não é reportada, uma vez que o número de monócitos em circulação pode ser baixo ou mesmo nulo em cães e gatos saudáveis (Harvey, 2012).

B1.2. Avaliação morfológica

B1.2.1. Neutrófilos tóxicos

Classificam-se como tóxicos todos os neutrófilos que apresentam qualquer sinal de toxicidade no seu citoplasma - corpos de Döhle, granulação tóxica, aumento da basofilia, vacuolização espumosa e granulação tóxica, – ou no seu núcleo – cariólise, cariorréxis,

hiposegmentação, núcleo em donut e binucleação. Nos gatos é frequente, também, a existência de neutrófilos gigantes com alterações nucleares (Harvey, 2012).

É importante notar que, os corpos de Döhle – inclusões angulares azuladas constituídas por agregados de retículo endoplasmático rugoso –, estão muitas vezes presentes em número reduzido em neutrófilos de gatos sãos (Metzger e Rebar, 2004b; Harvey, 2012).

Estas alterações tóxicas ocorrem na medula óssea, antes dos neutrófilos serem libertados para a circulação, devido ao aumento da sua taxa de produção e necessidade de libertação precoce em resposta a sinais inflamatórios (Metzger e Rebar, 2004b).

Os neutrófilos tóxicos estão, maioritariamente, associados a endotoxinas bacterianas, derivadas de infeções como pneumonia, piotórax, piómetra, prostatite canina severa, peritonite e septicemia. Contudo, também podem ocorrer em infeções virais (parvovírus canino e felino e infeções respiratórias superiores), na anemia hemolítica imunomediada canina, na pancreatite aguda, na insuficiência renal aguda (IRA), na diabetes cetoacidótica, na lipidose hepática felina, na necrose tecidual, na intoxicação por zinco ou chumbo e no tratamento com fármacos citotóxicos (Metzger e Rebar, 2004b; Harvey, 2012).

Aquando da avaliação da toxicidade neutrofilica é importante registar a percentagem de neutrófilos tóxicos (5-10% = poucos; 11-30% = moderados; > 30% = muitos) e a severidade da alteração tóxica, de acordo com o quadro 3 (Tvedten e Raskin, 2012)

Quadro 3: Gradação da toxicidade neutrofilica de acordo com as alterações citoplasmáticas. Adaptado de Harvey, 2012.

Corpos de Döhle	Ligeira basofilia	Moderada basofilia e corpos de Döhle	Moderada basofilia e vacuolização	Basofilia intensa e vacuolização	Basofilia com grânulos tóxicos
1+	1+	2+	2+	3+	3+

B1.2.2. Neutrófilos banda

São neutrófilos imaturos que se caracterizam por não apresentarem nenhuma área do núcleo com diâmetro inferior a dois terços de qualquer outra área do mesmo. Nestas células o núcleo torce para se adaptar ao espaço citoplasmático, tomando comumente a forma de U ou S. A cromatina é proeminentemente condensada (Harvey, 2012).

O aumento do seu número em circulação – desvio à esquerda - indica inflamação de origem infecciosa ou secundária a uma doença imunomediada ou infiltrativa da medula óssea, podendo ocorrer, ainda, em leucemias mieloides crónicas e na anomalia de Pelger-Huët (Harvey, 2012). Esta é uma alteração hereditária do desenvolvimento leucocitário que se caracteriza por hipossegmentação nuclear dos granulócitos e monócitos, os quais apresentam cromatina condensada, e poucas ou nenhuma constrições nucleares, e que está associada a um forte desvio degenerativo à esquerda (Tvedten e Raskin, 2012).

B1.2.3. Hipersegmentação

Um lobo nuclear consiste numa parte do núcleo arredondada focal e distinta. Fala-se em hipersegmentação, ou desvio à direita, quando os neutrófilos, da maioria dos animais domésticos, apresentam pelo menos cinco lobos nucleares. Esta alteração está relacionada com o processo de envelhecimento normal do neutrófilo, podendo ocorrer na inflamação crónica, administração de glucocorticoides ou no hiperadrenocorticismismo, devido ao aumento do tempo em circulação. Outras causas possíveis são a neoplasia mieloide, defeitos hereditários na absorção de cobalamina em cães, deficiência em folato em gatos (raro), toxicidade por oxazolidinona e anfetamina e a administração prolongada de fenitoína em cães (Harvey, 2012).

B1.2.4. Linfócitos reativos

São linfócitos que proliferam, nos tecidos linfoides, em resposta a uma estimulação antigénica (vacinação recente ou doença infecciosa), aumentando de tamanho e exibindo uma basofilia citoplasmática mais acentuada. Geralmente, são poucos os que entram em circulação. Podem parecer-se com plasmócitos e conter, raramente, corpos de Russel no seu citoplasma. Estes correspondem a retículo endoplasmático dilatado com imunoglobulinas no seu interior. Nesta situação os linfócitos designam-se por células Mott (Metzger e Rebar, 2004b; Harvey, 2012). Segundo Tvedten e Raskin (2012), é normal encontrar raros linfócitos reativos em esfregaços sanguíneos de animais saudáveis e o aumento do seu número em circulação não tem grande significado diagnóstico uma vez que, nem sempre é proporcional ao grau de imuno-estimulação nem é patognomónico de nenhuma doença em concreto.

Quando apresentam núcleo contorcido, podem ser difíceis de distinguir dos monócitos. As grandes dimensões também dificultam a sua diferenciação dos linfócitos neoplásicos. Nestes casos podem ser classificados como linfócitos atípicos. Para além disso, podem ainda ser confundidos com precursores eritroides basofílicos (Harvey, 2012).

B1.2.5. Linfócitos atípicos

São linfócitos anormais de maiores dimensões, com núcleo dentado, que podem apresentar grandes grânulos citoplasmáticos azurófilos, e estar presentes em doenças infecciosas ou neoplásicas. A sua presença alerta para uma investigação adicional, como o estudo da medula óssea e avaliação citológica e histopatológica de tecidos linfoides (Metzger e Rebar, 2004b).

B1.2.6. Linfócitos granulares

São linfócitos médios a grandes, com maior quantidade de citoplasma, em detrimento do tamanho do núcleo, ponteados com grânulos roxos ou vermelhos. Pensa-se que possam ser células NK ou linfócitos T citotóxicos (Harvey, 2012).

B1.2.7. Monócitos ativados

São monócitos circulantes que se diferenciam em macrófagos quando há necessidade de fagocitose a nível sanguíneo (Rebar *et al.*, 2005b). Estímulos como a presença de produtos microbianos, certas citoquinas e alguns agentes inertes desencadeiam esta ativação, que se traduz num aumento do metabolismo celular, do funcionamento das enzimas lisossômicas e das atividades microbicidas e citocidas (Webb e Latimer, 2011).

Caracterizam-se por apresentar maior quantidade de citoplasma, com vacuolização mais proeminente e núcleo redondo a oval (Rebar *et al.*, 2005b). Os monócitos ativados podem ainda conter material fagocitado com importância diagnóstica, tais como: eritrócitos em caso de AHIM, leveduras em caso de infeções fúngicas sistêmicas, ou protozoários, como a *Leishmania* (Rebar *et al.*, 2005b).

B1.2.8. Inclusões parasitárias/infecciosas

➤ **Protozoários e Fungos**

O *Hepatozoon* spp. é um protozoário do qual se conhecem cerca de 50 espécies capazes de infetar mamíferos, mas apenas duas espécies estão documentadas em cães, *H. canis* e *H. americanum*. A ocorrência do último foi reportada apenas nos EUA. Os gamontes de *H. canis* observam-se no citoplasma de neutrófilos circulantes, os quais aparecem como grandes bastonetes com núcleo fracamente corado. Para além do *H. canis*, outras espécies de *Hepatozoon* podem infetar os gatos (Harvey, 2012).

Os neutrófilos e monócitos podem conter organismos fagocitados de *Leishmania infantum* e de *Histoplasma capsulatum*. Os monócitos felinos podem, ainda, apresentar grandes esquizontes de *Cytospora felis* (Harvey, 2012).

➤ **Bactérias**

Apesar de a bacteriemia ser comum, raramente é identificada em esfregaços de sangue corados, devido ao baixo número de bactérias em circulação. O diagnóstico só deve ser feito quando se observam fagocitadas no interior das células sanguíneas, por existir um elevado risco de contaminação dos corantes, principalmente quando estes também são usados para corar lâminas de citologia (Harvey, 2012).

O *Mycobacterium* spp. aparece como bacilos não corados no citoplasma de neutrófilos e monócitos (Harvey, 2012).

➤ **Riquétsias**

Nos granulócitos, durante a fase aguda da infeção, podem ser observadas mórulas de *Ehrlichia ewingii* e de *Anaplasma phagocytophilum*. Estas aparecem como agregados basofílicos de organismos dentro dos fagossomas, nos esfregaços corados, sendo mais frequentes nos neutrófilos que nos eosinófilos (Harvey, 2012).

Nos monócitos circulantes, podem ser raramente observadas mórulas basofílicas de *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* e *Neorickettsia risticii* (Harvey, 2012).

➤ **Esgana**

As inclusões do vírus da esgana formam-se nas células precursoras dos neutrófilos, na medula óssea, e podem ser observadas nas células circulantes durante a fase aguda. No esfregaço sanguíneo corado, aparecem como inclusões neutrofílicas vermelhas, redondas, ovais ou com forma irregular (Harvey, 2012).

B2. Avaliação eritrocitária

Os eritrócitos dos mamíferos são células anucleadas, que na maioria das espécies apresentam a forma de um disco bicôncavo, sendo conhecidos por discócitos. É esta forma que justifica a palidez central observada em esfregaços sanguíneos corados. Os cães são a espécie que apresenta eritrócitos maiores e com palidez central mais proeminente (Harvey, 2012)

As suas funções são transportar oxigénio aos tecidos, retornando o dióxido de carbono destes aos pulmões, e tamponar os iões hidrogénio (Harvey, 2012).

B2.1. Alterações quantitativas: eritrocitose vs anemia

Harvey (2012) define eritrocitose ou policitemia como um aumento no hematócrito, na quantidade de hemoglobina e na contagem de eritrócitos, acima dos valores de referência normais para determinado animal.

A eritrocitose pode ser relativa ou absoluta. O primeiro caso deve-se à hemoconcentração por perda do volume plasmático, que acontece em situações de desidratação, ou à contração esplénica (Weiss e Tvedten, 2012b). Apesar do hematócrito estar elevado, a massa total de eritrócitos está normal (Harvey, 2012). Por outro lado, a eritrocitose absoluta advém do aumento da produção de eritrócitos pela medula óssea e classifica-se em primária ou secundária (Weiss e Tvedten, 2012b). A eritrocitose primária corresponde a uma neoplasia mieloproliferativa, resultante de uma multiplicação autónoma de precursores eritroides isto é, independente do estímulo da eritropoietina (EPO). A secundária é uma consequência do aumento dos níveis da hormona estimulante da eritropoiese, que ocorre em situações de hipoxemia crónica; doenças renais que provoquem hipoxia local; tumores secretores de EPO e proteínas ou hormonas tipo EPO que mimetizem a ação da última (Harvey, 2012). De acordo com Weiss e Tvedten (2012), a eritrocitose secundária pode ser classificada como adequada ou inadequada, consoante ocorra ou não por necessidade de adaptação do organismo.

O termo anemia define a diminuição da massa de eritrócitos dentro do organismo. Fala-se em anemia relativa quando os parâmetros eritrocitários estão diminuídos a nível circulatório, apesar da massa eritroide total estar normal, como por exemplo, numa situação de sobrehidratação (Harvey, 2012).

A anemia é um achado clínico e laboratorial frequente que, por si só, não constitui diagnóstico. O grande objetivo do veterinário deverá ser a determinação da sua patogénese, de modo a instituir um tratamento adequado. Weiss e Tvedten (2012b) referem três causas para a sua origem: diminuição da produção efetiva de eritrócitos pela medula óssea, perda de sangue (hemorragia) ou aumento da destruição de eritrócitos (hemólise).

O grau de severidade da anemia pode ser um parâmetro útil para determinar a sua origem, sendo estabelecido consoante o valor do hematócrito (quadro 4).

Quadro 3: Classificação da anemia, em termos de severidade, com base no valor de hematócrito em percentagem. Adaptado de Tvedten, 2010.

	Cão	Gato
Ligeira	30-37	20-26
Moderada	20-29	14-19
Severa	13-19	10-13
Muito severa	<13	<10

As anemias ligeiras são geralmente secundárias a patologias em órgãos não hematopoiéticos, como, por exemplo, a anemia de doença inflamatória, neoplasia e de doenças renais, hepáticas, nutricionais ou endócrinas e resolvem-se corrigindo a causa. Por outro lado, as anemias moderadas a severas indicam mais frequentemente uma doença hematológica primária e exigem uma abordagem mais detalhada (Weiss e Tvedten, 2012b).

Além da severidade da anemia, é necessário avaliar a capacidade de resposta pela medula óssea. Para isso, faz-se geralmente uma primeira abordagem recorrendo aos índices eritrocitários, VCM e CHCM, fornecidos pelo hemograma. O VCM permite classificar a anemia em microcítica, normocítica ou macrocítica, consoante o volume corpuscular médio se encontre diminuído, normal ou aumentado, respetivamente. Já no que diz respeito à CHCM, usam-se os termos hipocrómica ou normocrómica, quando a concentração de hemoglobina corpuscular média está diminuída ou normal. Não existem anemias hiperocrómicas, porque o aumento da CHCM é artefactual. Teoricamente, uma anemia regenerativa é macrocítica hipocrómica, uma semirregenerativa ou ferropénica é microcítica hipocrómica, e uma anemia não regenerativa apresenta-se como normocítica normocrómica (Harvey, 2012).

Contudo, sendo estes índices valores médios, podem não refletir aumentos pequenos ou médios de eritrócitos macrocíticos hipocrómicos ou microcíticos hipocrómicos (Weiss e Tvedten, 2012). DeNicola *et al.*, 2006, referido por Weiss e Tvedten, 2012, reportaram que apenas 8% das amostras de sangue de 6752 cães com anemia regenerativa apresentaram aumento do VCM e diminuição da CHCM.

O indicador mais fiável de regeneração no cão e no gato é a contagem absoluta de reticulócitos, reportada em número de células por microlitro de sangue. Assim, considera-se

como anemia regenerativa, aquela em que se verifica um aumento adequado da eritropoiese, com um incremento da produção de reticulócitos proporcional à severidade da anemia (Weiss e Tvedten, 2012). Quando isto não se verifica, estamos perante uma anemia não regenerativa ou pré-regenerativa, uma vez que são necessárias 48 a 72 horas para que a resposta da medula óssea seja perceptível a nível periférico (Metzger e Rebar, 2004c).

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos, de maiores dimensões, constituídos por ribossomas, compostos por ARN para a síntese de hemoglobina, os quais, quando corados com Novo azul-de-metileno, aparecem como grânulos azuis. São classificados em ponteados ou agregados, consoante a distribuição celular do seu ARN ribossómico, sendo que a sua evolução varia consoante a espécie. Os reticulócitos caninos transformam-se em eritrócitos maduros um dia depois de serem libertados para o sangue. É esta maturação rápida que faz com que os reticulócitos de cão sejam maioritariamente agregados. Nos gatos, os reticulócitos agregados transformam-se, em cerca de meio-dia, em ponteados. Estes, por sua vez, demoram 10 a 12 dias a evoluir para o estado maduro, acumulando-se por isso em maior número no sangue (Weiss e Tvedten, 2012b).

A contagem manual de reticulócitos é muito mais imprecisa que a automática, devido à grande variação entre observadores. No entanto, é útil para detetar reticulócitos ponteados felinos, uma vez que nenhum equipamento os consegue contabilizar totalmente (Weiss e Tvedten, 2012b).

De modo a interpretar a resposta regenerativa felina, é importante estimar a percentagem de cada um deles num esfregaço sanguíneo corado com Novo azul-de-metileno, sendo que os ponteados apresentam três a 12 pontos isolados, e os agregados pelo menos 12 a 15 (Weiss e Tvedten, 2012b).

A presença de resposta regenerativa sugere que a anemia resulta de hemorragia ou de hemólise. Uma anemia não regenerativa indica geralmente uma diminuição da produção de eritrócitos pela medula óssea (Weiss e Tvedten, 2012b).

Quando se avalia o eritrograma, é importante ter em conta variações fisiológicas que ocorrem em determinadas raças, como é o caso dos Galgos, que apresentam valores mais altos de hematócrito, e em determinadas idades. É normal os cachorros apresentarem uma menor massa eritrocitária (Weiss e Tvedten, 2012b).

B2.2. Alterações morfológicas

B2.2.1. Macrocitose

É o aumento do VCM, que se traduz na presença de eritrócitos de maiores dimensões no esfregaço sanguíneo. A principal causa é a reticulocitose, isto é, o aumento do número absoluto de reticulócitos, mas também pode dever-se à presença de eritrócitos maduros provenientes de eritropoiese acelerada, ao intumescimento artefactual dos eritrócitos

provocado pelo contacto prolongado com o EDTA, a diseritropoiese congénita em caniches, a estomatocitose e a infeção pelo FeLV (Weiss e Tvedten, 2012b).

B2.2.2. Microcitose

É a diminuição do VCM, expresso, no esfregaço, pela observação de eritrócitos de menores dimensões. Ocorre frequentemente associada a deficiências em ferro, que impedem a produção adequada de hemoglobina. Também é comum em cães com shunt portossistémico e atrofia hepática. Está, ainda, presente em anemias sideroblásticas e em algumas síndromes mielodisplásicas caninas. É normal em cães de certas raças orientais, como Akita, Shiba e Chow-chow (Weiss e Tvedten, 2012b).

B2.2.3. Anisocitose

É a variação no diâmetro dos eritrócitos, em esfregaços de sangue corados (Harvey, 2012). No hemograma é determinada pelo aumento do RDW. Ocorre devido à presença de diferentes populações celulares após uma transfusão sanguínea, para além de poder ter origem na produção em quantidades significativas de eritrócitos menores ou maiores que o normal. Pode ser um sinal de regeneração, uma vez que os reticulócitos são macrócitos ou de diseritropoiese, quando associado a anemias não regenerativas (Harvey, 2012; Weiss e Tvedten, 2012b).

B2.2.4. Hipocromasia

É a diminuição da CHCM, traduzida pelo aumento da área de palidez central em esfregaços sanguíneos corados. Deve-se à carência em ferro. A hipocromasia não deve ser confundida com os torócitos, que correspondem a eritrócitos com artefactos de armazenamento (Harvey, 2012).

B2.2.5. Hiperchromasia

É o aumento artefactual da CHCM, que pode estar associado ao aumento dos esferócitos, presença de corpos de Heinz ou de lipemia, hemólise intravascular e lise eritrocitária durante ou após a colheita (Brockus, 2011).

B2.2.6. Policromasia

É a designação dada à presença de eritrócitos vermelho-azulados, em esfregaços de sangue corados. Estes eritrócitos policromatófilos são reticulócitos, que coram de vermelho e azul devido à combinação de hemoglobina e ARN ribossómico, no seu citoplasma. Em pequenos números, são normais em cães e gatos saudáveis. Em grande quantidade sugere uma medula óssea com atividade eritropoietica (Harvey, 2012). A policromasia deriva essencialmente dos reticulócitos agregados, já que os ponteados não têm ARN suficiente para adquirirem a cor azul da coloração Romanowsky. A sua magnitude reflete o grau de eritropoiese nos três a sete dias anteriores (Weiss e Tvedten, 2012b).

B2.2.7. Poiquilocitose

É o termo que descreve a presença de poiquilócios, ou seja, de eritrócitos com formas anormais no esfregaço sanguíneo. Ocorre em várias alterações relacionadas com fragmentação eritrocitária, tais como, coagulação intravascular disseminada (CID), doença hepática, neoplasia mieloide, mielofibrose, glomerulonefrite, hemangiossarcoma (cães) e, ainda, na anemia ferropénica severa, em danos oxidativos, toxicidade por doxorubicina e na diseritropoiese canina (Harvey, 2012). Outra causa de poiquilocitose é a crenação causada, principalmente por artefactos, mas também por alterações eletrolíticas, uremia e envenenamento por cascavel, que origina os equinócitos (Metzger e Rebar, 2004c).

Harvey (2012) refere designações específicas consoante a forma dos poiquilócitos:

- Acantócitos: eritrócitos com espículas de tamanho variável e irregularmente espaçadas, que se formam devido ao excesso de colesterol comparado com a quantidade de colesterol na membrana eritrocitária. Isto pode dever-se ao aumento da colesterolemia ou à presença de lipoproteínas com composição anormal. Estão relacionados com doença hepática ou com alterações que induzam fragmentação eritrocitária canina, como o hemangiossarcoma, CID e glomerulonefrite.
- Queratócitos: eritrócitos com uma ou duas projeções produzidas por rutura das vesículas dos pré-queratócitos. São reportados em anemia ferropénica, alterações hepáticas, toxicidade por doxorubicina em gatos, síndrome mielodisplásica e em várias desordens caninas em que haja também equinócitos e acantócitos.
- Estomatócitos: eritrócitos com áreas ovais ou alongadas de palidez central. Geralmente são um artefacto de esfregaços espessos, mas também podem ocorrer em sangues mais ácidos, associados à distribuição preferencial de drogas na camada interna da bicamada lipídica ou ao maior nível de água eritrocitária na estomatocitose hereditária do Schnauzer e Lulu da Pomerânia.
- Esferócitos: eritrócitos de forma esférica que perderam a sua forma bicôncava devido à perda de parte da membrana celular ou a alterações estruturais desta (Metzger e Rebar, 2004c). Apresentam um diâmetro diminuído e não exibem palidez central, tendo uma coloração mais intensa em esfregaços de sangue corados. São difíceis de identificar nos gatos, uma vez que, os seus eritrócitos apresentam uma palidez central menos evidente. Devem ser reportados sempre que existam mais de quatro a seis por campo de imersão. A principal causa em cães é a anemia hemolítica imunomediada (Metzger e Rebar, 2004c). Podem estar também associados a envenenamento por cobras, picadas de abelhas, toxicidade por zinco, parasitas eritrocitários, transfusão de sangue armazenado e diseritropoiese familiar em cães.
- Esquizócitos: fragmentos eritrocitários formados por lesões mecânicas dos eritrócitos circulantes. Mesmo em baixo número são clinicamente relevantes (Metzger e Rebar, 2004c). Podem estar presentes em anemia hemolítica microangiopática associada a

CID e hemangiossarcoma, anemia ferropénica severa, mielofibrose, insuficiência cardíaca, glomerulonefrite, síndrome hemolítico urémico, síndrome da veia cava caudal ou Dirofilariose, intoxicação por doxorubicina, doença hepática e diseritropoiese canina. Outra causa possível é a deficiência canina em piruvato quinase, estando, neste caso, associados a acantócitos.

- Leptócitos: eritrócitos finos com excesso de membrana celular, que têm, muitas vezes, aspecto hipocrômico. Podem aparecer dobrados, com uma barra de hemoglobina no centro ou como codócitos (células-alvo). Estes últimos apresentam um centro denso, rodeado por uma área clara e um rebordo de hemoglobina periférica, e podem encontrar-se em pequeno número em cães saudáveis, estando aumentados na anemia regenerativa e na diseritropoiese congênita caninas. Os leptócitos podem ser vistos na anemia ferropénica e raramente na insuficiência hepática.
- Eccentrócitos: eritrócitos cuja hemoglobina está deslocada para um lado da célula, deixando uma área pálida visível. Estão associados a dano oxidativo em cães e gatos, como na ingestão de cebola e alho, administração de acetaminofeno, diabetes cetoacidóticos, inflamação, neoplasia (principalmente linfoma), infecção por *Babesia canis*, administração de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), vitamina K, rodenticidas antagonistas da vitamina K e naftaleno e, ainda, na anestesia prolongada com propofol.
- Eliptócitos/Ovalócitos: eritrócitos com forma elíptica ou oval. Nos gatos, têm sido identificados em alterações da medula óssea, como neoplasia mieloide e leucemia linfoblástica aguda, para além da lipidose hepática, do shunt portossistémico e da toxicidade por doxorubicina. Já nos cães as causas são: mielofibrose, síndrome mielodisplásica, glomerulonefrite (equinoeliptócitos) e eliptocitocitose hereditária.
- Dacriócitos: eritrócitos em forma de lágrima, que apresentam uma extremidade alongada ou pontiaguda. Estão associados a neoplasias mieloides em cães e gatos e a glomerulonefrite ou hiperesplenismo em cães.
- Eritrócitos lisados: podem aparecer no esfregaço sanguíneo como eritrócitos fantasma, se tiverem origem numa hemólise intravascular recente ou numa hemólise *in vitro* no tubo após a colheita de sangue; ou como borrões vermelhos, caso a lise ocorra durante a preparação do esfregaço sanguíneo, a qual está comumente associada a amostras lipémicas.
- Eritrócitos nucleados (nRBCs): é normal encontrar pequenos números de rubricitos e metarrubricitos no sangue de cães e gatos saudáveis. Metzger e Rebar (2004c) consideram insignificativa a presença de até quatro nRBCs por cada 100 WBC, numa contagem leucocitária normal. O aumento do seu número é frequentemente visto em anemias regenerativas, podendo ocorrer, na ausência de anemia, em intoxicações por chumbo e em casos de lesão medular, como na septicemia, choque endotóxico, administração de drogas, e ainda no choque de calor, doença cardiovascular, trauma,

hiperadrenocorticismo e várias inflamações. O precursor eritroide mais frequente no sangue periférico é o metarrubricito. A presença frequente de precursores mais imaturos em anemias não regenerativas sugere mielodisplasia, neoplasia hematopoiética, doença infiltrativa da medula óssea, diminuição da função esplênica e diseritropoiese hereditária (Harvey).

B2.2.8. Rouleaux

O termo *rouleaux* designa a adesão de eritrócitos em forma de pilha de moedas, que surge frequentemente em gatos saudáveis. A sua formação está relacionada com a diminuição das cargas negativas repulsivas da superfície da membrana eritrocitária, que pode ser característica de algumas espécies, como é o caso dos gatos, ou que pode estar associada à presença de maiores concentrações de proteínas plasmáticas de alto peso molecular, como o fibrinogénio, haptoglobinas e imunoglobulinas. Podem ocorrer também em doenças linfoproliferativas que estimulem a secreção de imunoglobulinas (Harvey, 2012; Weiss e Tvedten, 2012b).

B2.2.9. Aglutinação

A aglutinação consiste na agregação de eritrócitos em cachos, de forma desordenada, devido à presença de Igs na sua superfície (Harvey, 2012). A sua presença sugere um processo imunomediado, como uma anemia hemolítica imunomediada ou induzida por fármacos, como por exemplo as cefalosporinas e a penicilina, reportadas por Metzger e Rebar (2004c). Harvey (2012) refere um caso de um gato com aglutinação mediada pelo EDTA.

Deve ser distinguida dos *rouleaux* através da diluição, em lâmina, de uma gota de sangue em EDTA com duas ou mais gotas de solução salina isotónica. Como nestes, há ligações mais fracas entre os eritrócitos, eles dispersam-se, ao contrário da aglutinação, em que existem imunocomplexos (Metzger e Rebar, 2004c).

B2.2.10. Inclusões intraeritrocitárias

➤ **Corpos de Howell-Jolly**

São pequenos fragmentos nucleares de forma esférica presentes nos eritrócitos, que coram de azul com colorações tipo Romanowsky. São fisiologicamente removidos da circulação pelos macrófagos do baço, podendo surgir em baixo número em gatos saudáveis, devido à arquitetura e menor capacidade eritrofagocitária do baço felino (Metzger e Rebar, 2004c). No cão, estão normalmente associados a anemia regenerativa ou a esplenectomia, aumentando também secundariamente a tratamentos com glucocorticoides ou quimioterápicos, que induzam a fragmentação nuclear (ex.: vincristina e ciclofosfamida). Estão ainda presentes na macrocitose benigna dos caniches (Harvey, 2012).

➤ **Corpos de Heinz**

São agregados de hemoglobina oxidada e precipitada ligados à superfície interna da membrana eritrocitária. Aparecem, nos esfregaços sanguíneos corados, rosa pálidos a vermelhos com colorações tipo Romanowsky, e azuis na coloração com Novo azul-de-metileno (Harvey, 2012).

Podem aparecer como projeções arredondadas de superfície nos eritrócitos intactos ou nos eccentrócitos, ou como inclusões dentro dos eritrócitos lisados, em situações de hemólise intravascular (Harvey, 2012).

É normal encontrar até 5% de Corpos de Heinz nos eritrócitos felinos devido à maior fragilidade da hemoglobina a oxidantes e à menor eficiência esplênica nesta espécie (Harvey, 2012). O aumento do seu número pode ocorrer em gatos secundário a diabetes *mellitus*, principalmente cetoadicóticos, hipertireoidismo, linfoma, repetidas anestésias com propofol e, ainda, secundariamente à administração de fenazopiridina, metionina e propilenoglicol. No cão, a sua presença ocorre em animais saudáveis esplenectomizados e na ingestão de zinco e vitamina K. Causas comuns de corpos de Heinz nas duas espécies são a presença de substâncias oxidantes, tais como, cebolas, acetaminofeno, azul-de-metileno, benzocaína, venenos de abelhas, cobras e aranhas. (Metzger e Rebar, 2004c; Harvey, 2012)

➤ **Ponteado basofílico**

É visto nos esfregaços de sangue corados, com uma coloração tipo Romanowsky, como pequenos agregados de ponteado azuis-escuros, correspondentes a ribossomas (Metzger e Rebar, 2004c). Ocorre, ocasionalmente, em anemias regenerativas em cães e gatos, e é frequente em intoxicações por chumbo, sendo também reportado num cão com diseritropoiese (Harvey, 2012).

➤ **Inclusões sideróticas**

São inclusões de ferro – corpos de Pappenheimer – que aparecem nos eritrócitos maduros (siderócitos) ou nucleados (sideroblastos), como grânulos basofílicos, nos esfregaços de sangue corados com coloração Romanowsky. A confirmação da sua presença só pode ser feita após coloração com o azul da Prússia. A presença de qualquer siderócito ou de sideroblastos anormais ou em grande número indica diseritropoiese e pode estar associada a tratamento com cloranfenicol, anemia sideroblástica ou a síndromes mielodisplásicas (Weiss e Tvedten, 2012b).

➤ **Agentes infecciosos**

Nos eritrócitos caninos e felinos podem também ser visualizados parasitas protozoários intracelulares (*Babesia* spp. e *Cytauxzoon felis*), bactérias epicelulares (*Mycoplasma canis* e *M. haemofelis*) e inclusões do vírus da esgana (Harvey, 2012).

Para a identificação de micoplasmas é importante que a amostra de sangue seja fresca e não refrigerada (Metzger e Rebar, 2004c).

B3. Avaliação plaquetária

As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos, libertados pelos megacariócitos, na medula óssea. O seu citoplasma adquire uma coloração azul clara com pequenos grânulos roxos avermelhados, em esfregaço corados com colorações de rotina. O seu tamanho varia consoante a espécie, sendo muito variável na espécie felina (Harvey, 2012; Tvedten, 2012).

As plaquetas são responsáveis pela hemóstase primária, que, por sua vez, desencadeia a ação da cascata de coagulação da hemóstase secundária, mantendo assim um equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise, de modo a preservar a estrutura e função vascular e a fluidez sanguínea (Tvedten, 2012).

A presença de qualquer defeito na parede vascular estimula a agregação plaquetária, para assegurar a hemóstase. As plaquetas de gato são particularmente sensíveis à agregação, o que pode interferir na uniformidade da distribuição de plaquetas. Para avaliar a precisão de qualquer contagem feita pelo equipamento automático é essencial a observação do esfregaço sanguíneo. Tvedten (2012) refere que a presença de poucos agregados plaquetários, de pequena dimensão, não parece interferir nas contagens, contudo, a existência de agregados frequentes ou de grande dimensão, tornam qualquer contagem, automática ou manual, imprecisa, situação que deve ser reportada.

Quando necessário, deve ser feita uma estimativa da contagem de plaquetas, na zona de monocamada do esfregaço sanguíneo. Multiplica-se o número médio de plaquetas, por campo de imersão, por 15000 a 20000, obtendo-se, assim, o número aproximado de plaquetas por microlitro de sangue (Harvey, 2012).

B3.1. Avaliação quantitativa: trombocitose vs trombocitopenia

A trombocitose consiste no aumento da contagem total de plaquetas acima do intervalo de referência (Harvey, 2012). Sabe-se que o baço é uma grande reserva de plaquetas (um quarto a um terço da massa plaquetária total), por isso, a esplenectomia e a contração esplénica, em resposta a uma estimulação adrenérgica, pode levar a um aumento do número de plaquetas em circulação (Tvedten, 2012).

A maior parte dos casos de trombocitose são reativos, por aumento da libertação de trombopoietina. Esta maior concentração de hormona pode dever-se a várias condições inflamatórias e neoplásicas, por intermédio de várias citocinas. A eritropoietina também induz trombocitose, em cães e gatos, em anemias agudas e ferropénicas por perda crónica de sangue (Harvey, 2012). Outras potenciais causas são as endocrinopatias (hiperadrenocorticismismo canino e hipertiroidismo felino) e os tratamentos imunossupressores (Harvey, 2012; Tvedten, 2012).

Quando se descartam todas as causas de trombocitose reativa, deverá pensar-se numa trombocitose neoplásica. Esta poderá ocorrer em várias neoplasias mieloides: trombocitemia

essencial, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mieloide crônica e, possivelmente, na eritrocitose primária em gatos (Harvey, 2012).

Existem ainda as falsas trombocitoses, associadas à presença de fragmentos eritrocitários, fragmentos citoplasmáticos de células nucleadas, lipemia, bactérias ou crioglobulinas (Harvey, 2012).

A trombocitopenia, isto é, a diminuição do número de plaquetas circulantes, pode ter várias origens, inclusive, em erros de colheita e manuseamento da amostra ou laboratoriais. Assim, antes de investigarmos a sua origem, devemos certificar-nos de que se trata de uma verdadeira trombocitopenia (Tvedten, 2012). As causas primárias incluem a diminuição ou defeitos da produção (agentes infecciosos, toxicidade e neoplasia medular), aumento da utilização na formação de trombos (doenças inflamatórias e CID) e aumento da destruição (imunomediada). A trombocitopenia de origem infecciosa (vírus, bactérias e protozoários) aparenta ser multifatorial, pois tanto pode ocorrer por interferências na trombopoiese como por ação imunomediada. Outras causas menos comuns são o sequestro esplênico e hemorragias externas agudas e massivas (Metzger e Rebar, 2004c; Harvey, 2012). Segundo Tvedten (2012), a severidade da trombocitopenia ajuda na sua interpretação e na escolha do tratamento.

É importante ter em conta a raça do animal quando se está a interpretar a contagem de plaquetas no hemograma, uma vez que, certas raças caninas, tais como Galgo, Cavalier King Charles Spaniel e Polish Ogar, apresentam uma contagem fisiológica geralmente mais baixa (Harvey, 2012).

B3.2. Alterações morfológicas

B3.2.1. Macroplaquetas

As macroplaquetas são plaquetas com um volume plaquetário médio aumentado, sendo que Harvey (2012) designa por macroplaqueta qualquer plaqueta com diâmetro igual ao superior ao do eritrócito. Ocorrem, normalmente, em situações de maior taxa de trombopoiese, em resposta ao incremento das necessidades periféricas (Metzger e Rebar, 2004c), exceto nos gatos, nos quais é normalmente comum encontrar plaquetas com o tamanho dos eritrócitos (Harvey, 2012).

Podem observar-se em cães com trombocitopenia regenerativa não imunomediada e em condições inflamatórias que estimulem o consumo ou destruição das plaquetas. Contudo, também podem estar presentes em cães e gatos com neoplasias mieloides, em gatos com trombocitopenia induzida pelo FeLV ou com hipertiroidismo, e em cães com deficiência em fosfofrutoquinase eritrocitária e muscular esquelética. São também frequentes na macrotrombocitopenia hereditária dos Cavalier King Charles (Harvey, 2012).

O volume plaquetar médio está, em geral, inversamente correlacionado com a contagem total de plaquetas. Assim, as macroplaquetas são comumente observadas em esfregaços

sanguíneos de cães trombocitopénicos. A sua maior atividade funcional faz com que algumas trombocitopenias severas, em cães, passem despercebidas (Tvedten, 2012).

Contudo, ao contrário do esperado, nem todas as trombocitopenias apresentam macroplaquetas, como é o caso da trombocitopenia canina imunomediada, devido à fragmentação plaquetária (Harvey, 2012).

Tvedten (2012) refere, ainda, as macroplaquetas artefactuais presentes em amostras de sangue com EDTA refrigeradas durante mais de quatro horas.

B3.2.2. Plaquetas ativadas

Durante a colheita e manuseamento da amostra de sangue, as plaquetas podem sofrer uma ativação parcial, apresentando, no esfregaço sanguíneo, uma forma irregular com processos citoplasmáticos – pseudópodes – que se estendem do corpo celular esférico. A total ativação faz com que os seus grânulos se agreguem centralmente, como se fosse um núcleo celular. Os agregados plaquetários formam-se frequentemente após esta ativação *in vitro*, podendo depois desgranular, aparecendo como um material azul claro no esfregaço corado (Harvey, 2012; Tvedten, 2012).

B3.2.3. Agentes infecciosos

O único agente infeccioso reportado como capaz de infetar especificamente as plaquetas caninas e felinas é o *Anaplasma platys*. Esta riquetsia aparece sob a forma de inclusões azuis intra-plaquetárias, em esfregaços sanguíneos corados com colorações tipo Romanowsky (Harvey, 2012).

C. URIANÁLISE

C1. Colheita de urina

A seleção do método de colheita de urina deve ter em atenção o estado clínico do paciente e o uso pretendido para a amostra (Wamsley e Alleman, 2007).

A cistocentese, isto é, a punção da bexiga, é o único método que permite a obtenção de uma amostra estéril, sendo o método de eleição para culturas bacteriológicas e para determinação da concentração de proteína urinária. No entanto, não deverá ser usada em animais com diátese hemorrágica, cistite enfisematosa, carcinoma de células de transição, atonia da bexiga, incontinência urinária, piómetra ou outros abscessos intra-abdominais junto à bexiga ou após uma cistotomia recente (i.e. há menos de uma semana). Também não é recomendada para pesquisa de hematúria, devido à possibilidade de hemorragia iatrogénica induzida pela própria punção vesical (Wamsley e Alleman, 2007; Chew *et al.*, 2011; Barsanti, 2012).

Caso se opte pela colheita por cateterização, deve limpar-se previamente o orifício uretral e a área circundante, para reduzir a contaminação da amostra de urina, e prevenir a introdução

de agentes patogénicos no trato urinário. A algaliação deve ser o menos traumática possível, precavendo contaminações com eritrócitos e células epiteliais de transição e consequentes obstruções urinárias, principalmente em gatos (Chew *et al.*, 2011).

Na micção espontânea, a rejeição dos primeiros e dos últimos jatos de urina, minimiza a sua contaminação com a flora dos tratos urinário inferior e genital (Tripathi *et al.*, 2011). Este último método é aceitável para uma avaliação inicial e o melhor para diagnóstico de hematuria, para além de não trazer qualquer risco para o paciente e poder ser usado pelo próprio dono do animal (Chew *et al.*, 2011).

A colheita da primeira urina da manhã só é vantajosa quando se pretende avaliar a capacidade de concentração urinária. O facto de a urina estar muito tempo armazenada na bexiga pode diminuir a viabilidade de possíveis microrganismos mais fastidiosos, produzindo falsos negativos nas culturas urinárias, e degenerar as suas células, devido ao contacto prolongado com o pH agressivo da urina e os seus compostos nitrogenados (Wamsley e Alleman, 2007).

C2. Análise de urina

C2.1. Características físicas

C2.1.1. Cor e turvação

A urianálise inicia-se com a avaliação visual da cor e da turvação, após homogeneização cuidada da amostra de urina. A urina normal pode apresentar vários tons de amarelo, facultados pelos urocromos - pigmentos urinários naturais -, de acordo com a sua concentração. A urina mais concentrada tende a apresentar uma tonalidade mais carregada, enquanto as mais diluídas podem ser praticamente incolores. A presença de bilirrubina pode conferir-lhe um amarelo mais forte. O amarelo escuro está normalmente associado à fotodegradação dos urocromos. Uma coloração rosada ou avermelhada ocorre na presença de porfinúria, hematuria ou hemoglobinúria. O vermelho acastanhado deriva da mioglobínúria, o castanho ou preto da conversão da hemoglobina em metahemoglobina em pH ácido. E, por fim, a oxidação *in vitro* da bilirrubina em biliverdina, a administração de azul-de-metileno e a infeção do trato urinário com *Pseudomonas* spp. resultam na produção de uma urina esverdeada (Wamsley e Alleman, 2007; Chew *et al.*, 2011).

A turvação pode ser determinada pela leitura de papel através da urina, e indica a presença ou ausência de partículas em suspensão, como cristais, bactérias, fungos, conteúdo celular, gotículas de gordura, muco e sémen (Osborne e Stevens, 2007; Wamsley e Alleman, 2007). A urina normal de cães e gatos é geralmente límpida. A presença de turvação, mesmo que ligeira, alerta para uma posterior investigação do sedimento urinário, de modo a poder identificar-se a sua origem (Tripathi *et al.*, 2011).

C2.1.2. Densidade urinária / Gravidade específica

A gravidade específica ou densidade urinária é a comparação entre o peso da urina e o peso de igual volume de água, refletindo a quantidade e o peso total de solutos presentes na urina (Chew *et al.*, 2011). Dá-nos uma indicação sobre a capacidade dos túbulos renais responderem à estimulação pela hormona antidiurética e conservarem a água, produzindo uma urina concentrada (Wamsley e Alleman, 2007). Deve ser determinada com o auxílio do refratômetro, que determina o índice refrátil da urina em comparação com o da água, uma vez que a tira urinária humana não é um indicador fiável da densidade urinária dos animais. Idealmente, deveria usar-se um refratômetro com escalas de densidade urinária independentes para cães e gatos e com compensação da temperatura (Chew *et al.*, 2011).

Barsanti (2012) refere que qualquer valor pode ser normal num cão ou gato convenientemente hidratado, uma vez que a densidade urinária depende do teor de água e da quantidade de solutos da dieta excretados pelo rim, da função renal e do estado de hidratação (Chew *et al.*, 2011). A densidade urinária deve, por isso, ser interpretada tendo em conta determinados dados do animal, como a idade, estado hídrico, doenças concomitantes, concentrações de ureia e creatinina séricas e de glicose e proteína na urina e a administração recente de agentes terapêuticos (Wamsley e Alleman, 2007). Este teste é particularmente importante na avaliação da função renal em animais desidratados ou azotémicos, sendo que em caso de desidratação, a urina de um cão, com mais de quatro semanas de idade, deverá apresentar uma densidade superior a 1,030 e a de um gato uma densidade maior que 1,035, para se poder descartar uma insuficiência tubular renal (Barsanti, 2012). É importante realçar que a densidade urinária pode não representar, apenas, a função de concentração tubular, estando falsamente aumentada em situações de glicosúria ou proteinúria severas (Wamsley e Alleman, 2007).

De modo a evitar a interferência de elementos celulares ou cristais presentes na leitura da densidade urinária no refratômetro, deve usar-se o sobrenadante de urina sujeita a centrifugação (Wamsley e Alleman, 2007).

A urina é classificada em hipostenúrica, isostenúrica ou hiperestenúrica, consoante a sua densidade seja, respetivamente, inferior, igual ou superior à do filtrado glomerular, que varia entre 1,008 e 1,012 (Barsanti, 2012).

C2.2. Características Químicas

A tira urinária apresenta secções coloridas impregnadas com reagentes específicos para cada teste, permitindo uma avaliação semiquantitativa dos componentes químicos da urina. A alteração da cor indica a presença ou ausência de determinadas substâncias, permitindo estimar de forma aproximada a sua quantidade (Tripathi *et al.*, 2011). Os resultados devem ser

interpretados à luz da densidade urinária para se ter uma ideia da sua significância (Chew *et al.*, 2011).

Chew *et al.* (2011) recomendam a utilização do sobrenadante de urina centrifugada, exceto na avaliação da bilirrubina, a qual pode ser adsorvida por cristais de cálcio presentes, impedindo a sua detecção pela tira. Os autores não recomendam a utilização de urina refrigerada, devido ao risco de inibição das reações enzimáticas e interferência na densidade urinária.

Apesar de ser um método simples e rápido na avaliação química da urina, apresenta algumas limitações: os nitritos e urobilinogênio não têm qualquer utilidade na abordagem a cães e gatos, a densidade urinária indicada pela tira não é fiável e a reação dos leucócitos não é sensível para cães nem específica para gatos (Wamsley e Alleman, 2007).

C2.2.1. pH

O pH da urina resulta da regulação renal das concentrações sanguíneas de hidrogênio (H^+) e de bicarbonato (HCO_3^-) (Tripathi *et al.*, 2011). Apesar do pH urinário variar consoante a dieta e o equilíbrio ácido-base, não é um indicador fiável do pH sanguíneo (Chew *et al.*, 2011). A dieta carnívora faz com que o pH fisiológico da urina de cães e gatos varie entre 5 e 7,5, contudo, Barsanti (2012) refere que qualquer pH pode ser normal.

Uma interpretação eficiente do pH urinário requer conhecimentos sobre o estado ácido-base do paciente, administrações terapêuticas, altura da colheita de urina em relação à alimentação e os achados do sedimento (Wamsley e Alleman, 2007).

A urina ácida ($pH < 7$) pode estar associada à ingestão de carne, acidose metabólica ou respiratória, acidúria paradoxal na alcalose metabólica com depleção de cloro e potássio (vómitos, diarreia), catabolismo proteico (anorexia e febre) e administração de agentes acidificantes. Contrariamente, a urina alcalina ($pH > 7$) ocorre após refeições recentes, em dietas ricas em vegetais e cereais, administração de agentes alcalinizantes, alcalose metabólica ou respiratória, acidose tubular renal, infeção do trato urinário (ITU) por bactérias produtoras de urease (geralmente *Staphylococcus* ou *Proteus* spp.), contaminação bacteriana ou por desinfetantes durante ou após a colheita, ou ainda devido à exposição prolongada da urina ao ar, por evaporação do dióxido de carbono (CO_2) (Chew *et al.*, 2011; Barsanti, 2012).

Por outro lado, saber o pH da urina também é essencial na interpretação de outros achados, tais como a proteinúria, falsa ausência de células e cilindros no sedimento e o tipo de cristais e urólitos que se poderão vir a formar na urina (Wamsley e Alleman, 2007).

C2.2.2. Proteína

Numa situação fisiológica, a filtração glomerular permite apenas a passagem de globulinas de baixo peso molecular e de uma pequena quantidade de albumina, as quais são maioritariamente reabsorvidas do filtrado pelos túbulos renais, permanecendo na urina uma quantidade mínima de proteína não detetada pelos testes laboratoriais (Tripathi *et al.*, 2011).

As tiras de urina detetam essencialmente a presença de albumina, sendo pouco sensíveis às globulinas e proteínas de Bence Jones, devendo ser usadas apenas como primeira abordagem (Tripathi *et al.*, 2011).

A proteinúria, isto é, uma concentração excessiva de proteína na urina, deverá ser sempre investigada. Em primeiro lugar, tem de se averiguar se é verdadeira ou artefactual, associada ao uso e armazenamento impróprio da tira, contacto com resíduos de antissépticos, ou ao pH muito alcalino da urina (pH 9). De seguida, deve avaliar-se a sua severidade à luz da densidade urinária. Para termos o mesmo grau de proteína na tira urinária, tem de haver uma maior perda numa urina diluída relativamente a uma urina concentrada. Uma proteinúria insignificante pode ser ignorada, exceto em animais com terapias nefrotóxicas, as quais devem ser imediatamente interrompidas, de modo a evitar o desenvolvimento de uma insuficiência renal. E por fim, é necessário determinar a sua origem: pré-renal, renal ou pós-renal (Barsanti, 2012).

A proteinúria pré-renal deriva da presença de pigmentos proteicos endógenos (hemoglobina e mioglobina) ou de proteínas de Bence Jones, e pode ser descartada com o auxílio do teste de sangue oculto da tira e com o doseamento sérico de globulinas. A proteinúria pós-renal é a mais comum e está associada a hemorragia ou inflamação ao nível da ou caudal à pélvis renal. O exame do sedimento urinário é essencial para poder descartar estas causas (Barsanti, 2012).

O diagnóstico de proteinúria renal só pode ser confirmado depois de excluir todas as possibilidades anteriores. É importante saber se esta é temporária ou persistente. A proteinúria renal temporária raramente é significativa e pode advir de exercício extenuante, febre, convulsões e congestão venosa renal. No caso de ser uma situação persistente (isto é, uma proteinúria detetada pelo menos três vezes, com duas ou mais semanas de intervalo entre as determinações), associada a disfunção glomerular ou tubular, é recomendada a realização de um rácio Pur/Cur de modo a determinar a sua gravidade (Barsanti, 2012).

A tira urinária pode não detetar a proteína (falsos negativos) em urinas muito ácidas ou diluídas (Tripathi *et al.*, 2011).

C2.2.2.1. Rácio proteína/creatinina na urina (Pur/Cur)

O rácio Pur/Cur deverá ser usado para determinar a severidade da proteinúria, depois de se descartar fontes de proteinúria extrarrenais, tais como causas pré-renais, hemorragia e inflamação. A determinação do rácio Pur/Cur permite, com uma única amostra de urina, obter uma informação semelhante à veiculada pela determinação de proteína em urina de 24h (Barsanti, 2012). No entanto, Tripathi *et al.* (2011) referem ainda que o rácio pode não ser totalmente fiável por refletir a função renal num curto período de tempo.

Na ausência de causas pré- e pós-renais, um rácio Pur/Cur inferior a 0.2 é considerado normal, por outro lado se for superior a 0.4 em gatos e superior a 0.5 em cães, respetivamente,

confirma a proteinúria renal. Valores intermédios são considerados duvidosos (*Guidelines IRIS*, 2016).

A determinação do rácio pode ser usada para ajudar a estabelecer o prognóstico de doenças renais crónicas caninas recentemente diagnosticadas e, quando realizado seriadamente, permite estadiar a progressão da doença renal e avaliar a resposta a terapia anti hipertensora e anti proteinúrica (Wamsley e Alleman, 2007). De acordo com as *guidelines* mais recentes da IRIS, o rácio deve ser determinado em pelo menos duas amostras de urina colhidas de forma assética, ao longo de duas semanas. Pacientes que apresentem persistentemente uma proteinúria inconclusiva, devem ser reavaliados num prazo de dois meses.

C2.2.3. Glicose

A glicose do filtrado glomerular é praticamente toda reabsorvida nos túbulos renais proximais, não se encontrando, geralmente, em quantidades que permitam a sua deteção, pela tira, na urina. A glicosúria ocorre quando a concentração sanguínea de glicose ultrapassa a capacidade de reabsorção do rim, o que se verifica na diabetes *mellitus*, hiperglicemia temporária induzida pelo *stress* em gatos, hiperadrenocorticism, pancreatite aguda, administração de determinadas drogas e, raramente, na acromegalia, diestro, hiper glucagonemia e hipertiroidismo e no feocromocitoma; ou quando existem doenças, congénitas ou adquiridas, dos túbulos renais proximais que interfiram com a reabsorção de glicose, tais como, síndrome de Fanconi, glicosúria renal primária, toxicidade por aminoglicosídeos ou insuficiência renal aguda com severa patologia tubular associada (Wamsley e Alleman, 2007).

Falsos positivos poderão ocorrer em hemorragias urinárias em pacientes com ligeira hiperglicemia, em gatos com obstrução uretral (pseudoglicosúria), após a administração de drogas como a cefalexina, amoxicilina, clavulanato, enrofloxacina e nitrofurantoína e na presença de oxidantes, como o peróxido de hidrogénio e o hipoclorito. Por outro lado, falsos negativos têm origem em sobre crescimento bacteriano *in vitro*, cetonúria, altas densidades ou baixos pH urinários e na presença de ácido ascórbico, tetraciclina ou formaldeído (Wamsley e Alleman, 2007; Chew *et al.*, 2011; Barsanti, 2012).

C2.2.4. Cetonas

As cetonas – betahidroxibutirato, acetoacetato e acetona – são pequenos ácidos orgânicos produzidos, normalmente, em quantidades mínimas, aquando da metabolização dos ácidos gordos para a produção de energia. Não são detetadas na urina de animais saudáveis sujeitos a uma alimentação equilibrada. O aumento da demanda de energia, devido a alterações no metabolismo de hidratos de carbono, como por exemplo na diabetes *mellitus* e na glicosúria renal, estimula a lipólise, aumentando a produção de subprodutos do catabolismo lipídico, dando origem à cetonúria (Wamsley e Alleman, 2007). As tiras de urina não detetam o

betahidroxibutirato, cetona mais abundante em cães e gatos e responsável pela acidose (Barsanti, 2012).

A causa mais comum de cetonúria é a cetoacidose diabética (Dibartola *et al.*, 2010). Outras potenciais causas são a anorexia prolongada, principalmente em animais jovens, dieta rica em gorduras e pobre em açúcares, febre, exercício ou frio extremos, hiperglucagonemia, hipoglicemia persistente, doença de armazenamento do glicogênio, lactação e gestação e pós-pancreatectomia (Wamsley e Alleman, 2007).

Falsas cetonúrias podem ocorrer associadas a vários fármacos, cistinúria, baixos pHs ou altas densidades. A presença de bactérias pode diminuir os níveis de cetonas na urina, levando a falsos negativos (Wamsley e Alleman, 2007).

C2.2.5. Bilirrubina

O normal metabolismo da hemoglobina, proveniente dos eritrócitos senescentes, resulta na formação hepática de bilirrubina conjugada, a qual é removida do organismo principalmente pela biliar, via trato gastrointestinal, e em menor extensão pela urina, após filtração glomerular (Wamsley e Alleman, 2007).

A bilirrubina não conjugada, por estar ligada à albumina, permanece em circulação, exceto em causas de nefropatia com albuminúria. No entanto, a tira urinária só detecta a bilirrubina conjugada (Wamsley e Alleman, 2007).

A bilirrubinúria, mesmo que ligeira, é um forte indicador de doença hemolítica ou hepatobiliar obstrutiva em gatos, devido ao seu alto limiar de excreção renal de bilirrubina conjugada. No entanto, não é muito útil em cães, porque para além de apresentarem um limiar de excreção renal baixo em urinas concentradas ($DU > 1,030$), as suas células epiteliais tubulares têm a capacidade de converter a hemoglobina em bilirrubina conjugada, e excretá-la na urina (Wamsley e Alleman, 2007). Por esta razão, o grau de bilirrubinúria canina deverá ser interpretado em conjunto com a densidade urinária. É considerado fisiológico, uma urina canina concentrada apresentar uma bilirrubinúria vestigial (+/-) a 1+. Maiores concentrações de bilirrubina poderão indicar hemólise, doença hepática, obstrução biliar extra-hepática, febre e jejum prolongado (Chew *et al.*, 2011).

A bilirrubina é sensível à luz, ao ácido ascórbico e ao ar, podendo, na presença destes, ser degradada ou oxidada a biliverdina, originando falsos negativos (Wamsley e Alleman, 2007). A bilirrubina urinária pode estar artefactualmente aumentada após a administração de grandes quantidades de fenotiazinas (Barsanti, 2012).

C2.2.6. Urobilinogénio

O urobilinogénio é um metabolito da bilirrubina conjugada, produzido no intestino pela ação bacteriana. É absorvido do intestino para o sangue portal, sendo reciclado no fígado e excretado, em grande parte, na biliar. Uma pequena quantidade é filtrada pelo glomérulo e eliminada na urina (Tripathi *et al.*, 2011).

O esperado é encontrar uma pequena fração na urina. A ausência de urobilinogénio urinário pode dever-se à obstrução do ducto biliar e variação diurna dos níveis de urobilinogénio. Por outro lado, o aumento da sua concentração na urina pode estar associado a doenças hemolíticas ou a diminuição da massa hepática funcional (Wamsley e Alleman, 2007).

A variação diurna dos seus níveis, a interferência de várias drogas, a instabilidade da substância, e a baixa sensibilidade do teste da tira urinária na sua deteção, fazem com que a pesquisa de urobilinogénio em amostras de urina não tenha grande significado clínico em medicina veterinária (Wamsley e Alleman, 2007).

C2.2.7. Sangue oculto

O teste de sangue oculto da tira urinária baseia-se na reação da peroxidase da hemoglobina e mioglobina, detetando a presença de eritrócitos intactos, hemoglobina derivada da lise eritrocitária, intravascular ou urinária, ou a presença de mioglobina proveniente de miócitos lesionados (Chew *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2011). A distinção entre estes achados só é possível com o auxílio do sedimento urinário, investigação de hemólise sérica e de lesão muscular. Caso seja necessário, pode recorrer-se também ao teste de precipitação da hemoglobina pelo sulfato de amónia ou a um proteinograma da urina, de modo a distinguir entre hemoglobinúria e mioglobinúria (Chew *et al.*, 2011)

O teste é muito sensível, conseguindo detetar o correspondente a um a dois eritrócitos por hpf (isto é, 400x), o que é considerado normal (até 5 RBCs/hpf) (Barsanti, 2012).

A presença de agentes oxidantes (por exemplo, desinfetantes) ou de fezes de pulgas podem produzir um falso positivo neste teste, contrariamente à presença de ácido ascórbico, captopril ou formol, que podem originar falsos negativos (Wamsley e Alleman, 2007; Barsanti, 2012).

A hemoglobinúria, secundária a hemólise sistémica, pode advir de uma transfusão sanguínea incompatível, anemia hemolítica imunomediada, CID, síndrome da veia cava na Dirofilariose, torção esplénica, choque de calor, hiposfosfatemia severa, toxicidade por zinco ou de deficiências enzimáticas eritrocitárias (Chew *et al.*, 2011). Já a hemoglobinúria devida à lise de eritrócitos pode ocorrer pelo contacto com urinas diluídas ou alcalinas (Barsanti, 2012).

A mioglobinúria, derivada de rabdomiólise severa, tem origem em contrações musculares persistentes na epilepsia, atropelamento, após exercício físico, choque de calor ou numa hipocalcemia severa (Chew *et al.*, 2011).

A origem da hematúria será abordada na avaliação do sedimento urinário.

C2.2.8. Leucócitos

A pesquisa de leucócitos na tira urinária baseia-se na atividade da esterase leucocitária, a qual é usada, em humanos, para indicar a presença de inflamação ou infeção do trato urinário e/ou genital. Este teste da tira urinária é pouco fiável em cães e gatos (Tripathi *et al.*, 2011) Nos cães, apesar de ser bastante específica (93,2%), é pouco sensível (46%) para a piúria, originando muitos falsos negativos. Na urina felina, apresenta uma sensibilidade moderada

(77%) mas baixa especificidade (34%), produzindo muitos falsos positivos. A confirmação de piúria em cães e gatos obriga, assim, à análise microscópica do sedimento urinário (Osborne e Stevens, 1999; Chew *et al.*, 2011).

C2.2.9. Nitritos

Os nitritos são a forma reduzida, por ação bacteriana, dos nitratos, constituintes normais da urina, provenientes da alimentação. Um teste positivo sugere bacteriúria significativa, no entanto, um resultado negativo, não permite excluir a sua presença. Por isso, não tem utilidade em cães e gatos (Osborne e Stevens, 1999).

C2.3. Sedimento urinário

O exame do sedimento urinário deve estar incluído em todas as urianálises de rotina, principalmente, quando se detetam alterações na urianálise tipo I.

A observação microscópica do sedimento permite determinar semi-quantitativamente a concentração de células, cilindros, microrganismos ou cristais, indicando potenciais alterações do trato geniturinário (Wamsley e Alleman, 2007).

De modo a minimizar interferências na interpretação de resultados, o sedimento deverá ser preparado e examinado de forma padronizada. A urina deverá ser o mais fresca possível, uma vez que os cilindros e as células presentes degeneram rapidamente em contacto com a urina (Chew *et al.*, 2011). Caso não seja analisada nos primeiros trinta minutos após a colheita, deverá ser refrigerada, de modo a evitar as alterações de pH, secundárias à proliferação de bactérias contaminantes e à evaporação do CO₂. As bactérias produtoras de urease, ao converterem a ureia em amónia, alcalinizam a urina, levando à fragmentação de células e cilindros e induzindo a formação de cristais *in vitro* (Osborne e Stevens, 1999).

As recomendações para a preparação do sedimento urinário variam consoante os autores. Enquanto, Osborne e Stevens (1999) recomendam a centrifugação ligeira (1500-2000 rpm durante 3-5 minutos), num tubo de fundo cónico, de 5 mL de urina, e o uso de 0.5mL de urina para ressuspensão do sedimento; Wamsley e Alleman (2007) referem que o volume de sobrenadante usado para ressuspender o sedimento urinário deverá corresponder sempre a 20% do volume total de urina centrifugada, o que no caso de 5 mL equivale a 1mL de sobrenadante.

Vários corantes podem ser usados para auxiliar na distinção das diferentes células e bactérias no exame a fresco do sedimento urinário. No entanto podem formar precipitados ou apresentar microrganismos contaminantes. Visto que, o corante acaba por diluir a concentração de células na urina, não deve ser usado para as contagens, devido ao risco de subestimação (Wamsley e Alleman, 2007).

Uma vez que a densidade urinária fornece informações úteis acerca da concentração relativa de água e elementos no sedimento urinário, os resultados deste devem ser sempre interpretados de acordo com a densidade da urina. Para além disso, é importante ter em conta

que urinas diluídas, com uma densidade inferior a 1.008, podem induzir a lise celular (Osborne e Stevens, 1999).

O significado da presença de células e bactérias não pode ser interpretado sem ter em atenção o método de colheita da urina. Células e bactérias em amostras não colhidas por cistocentese poderão ter origem numa contaminação do trato genital, assim como os eritrócitos, caso não se opte pela micção espontânea, podem resultar de um traumatismo associado ao método de colheita (Osborne e Stevens, 1999).

O número dos diferentes tipos de células considerado fisiológico depende do método de colheita de urina e será descrito aquando da abordagem dos eritrócitos, leucócitos e células epiteliais.

C2.3.1. Eritrócitos

Os eritrócitos aparecem, geralmente, em sedimentos urinários não corados, como estruturas ligeiramente refráteis, sem conteúdo interno, com uma coloração laranja pálida. A sua forma é determinada pela densidade urinária, apresentando-se com um aspeto crenado e distorcido em urinas concentradas, ou globular em urinas diluídas, podendo mesmo lisar nestas últimas. Em urinas isostenúricas mantêm a sua forma bicôncava (Wamsley e Alleman, 2007; Tripathi *et al.*, 2011). A permanência prolongada na urina faz com que percam a hemoglobina, aparecendo como células fantasma incolores (Osborne e Stevens, 1999).

É normal estarem, ocasionalmente, presentes no sedimento urinário de um animal saudável, sendo aceitável encontrar até três, cinco ou oito eritrócitos/hpf em urinas colhidas, respetivamente, por cistocentese atraumática, algaliação ou micção espontânea, de acordo com Chew *et al.* (2011). Wamsley e Alleman (2007) concordam com os valores anteriores no caso da cistocentese, mas discordam dos valores referidos para a algaliação e micção espontânea, considerando fisiológico encontrar até oito eritrócitos/hpf em urinas colhidas por estes dois métodos.

A existência de um número excessivo de eritrócitos na urina é designada por hematúria, a qual pode ser macroscópica ou apenas microscópica. Pode ter origem em qualquer local do trato urinário ou numa contaminação pelo trato genital, em casos de doença prostática, secreções penianas e prepuciais, doença uterina e corrimentos vaginais, vestibulares ou vulvares. Causas urinárias de hematúria são traumas (exógenos ou iatrogénicos), urolitíase, neoplasia, inflamação ou infeção do trato urinário, cistite idiopática felina, lesões induzidas por fármacos, doenças hemorrágicas sistémicas (intoxicação por varfarina, CID e trombocitopenia), nefrite ou nefrose, hematoma renal, infeções parasitárias principalmente por *Dictyophyma renale* e *Capillaria* spp., e, mais raramente, enfarte renal (Chew *et al.*, 2011). No cão, a causa mais comum é a ITU, enquanto no gato, ocorre mais frequentemente associada a cistite idiopática felina (Barsanti, 2012).

É importante ter em conta que as contagens poderão estar falsamente diminuídas em urinas hipostenúricas ou alcalinas devido a hemólise (Barsanti, 2012).

Caso a hematúria seja evidente a olho nu, o momento de saída de sangue na urina, ajuda a localizar a origem da hemorragia. A eliminação de sangue independente da micção ou mais intensa no seu início sugere uma hemorragia com origem na uretra, próstata ou prepúcio em cães machos, ou útero ou a vagina em fêmeas. Por outro lado, a saída de sangue no final da micção sugere uma origem vesical. A hematúria que persiste durante todo o período de micção poderá ter origem em qualquer parte do trato urogenital (Barsanti, 2012).

C2.3.2. Leucócitos

Na urina, podem ser encontrados neutrófilos (em maior número), eosinófilos, linfócitos e monócitos/macrófagos. O seu aspeto é variável, depende do tipo de leucócito presente e da influência de vários fatores, como a densidade urinária, pH e possíveis toxinas bacterianas, na sua morfologia. Em urinas frescas, aparecem como estruturas redondas com uma dimensão 1.5 a 2 vezes maior que os eritrócitos, com ou sem granulação citoplasmática, e com núcleo que pode ser redondo ou segmentado. Tal como os eritrócitos, retraem em urinas concentradas e expandem em urinas diluídas. A granulação citoplasmática pode ser própria do leucócito, no caso dos granulócitos, ter origem numa degeneração nuclear ou corresponder a material fagocitado, dificultando a distinção dos diferentes leucócitos numa preparação não corada (Osborne e Stevens, 1999).

A contagem pode diminuir artefactualmente em urinas alcalinas, hipotónicas ou que são sujeitas, durante um longo período de tempo, à temperatura ambiente (Barsanti, 2012). Osborne e Steven's (1999) referem que o número de leucócitos reduz para metade por cada hora que a urina é mantida não refrigerada.

É considerado normal, para Chew *et al.* (2011), a presença até três, cinco ou oito leucócitos/hpf em sedimentos de urinas colhidas por cistocentese, algaliação ou micção espontânea, respetivamente. Wamsley e Alleman (2007) concordam com os autores anteriores relativamente ao valor referido para a cistocentese mas referem que nos outros dois métodos de colheita é normal a presença até oito leucócitos/hpf.

O aumento do número de leucócitos na urina é designado por piúria e indica uma inflamação, séptica ou não, nalguma secção do trato urinário ou uma contaminação a partir do trato genital, a qual é, à partida, descartada numa colheita por cistocentese (Dibartola *et al.*, 2010; Barsanti, 2012).

A ITU é a principal causa de piúria em cães e gatos, seguida da urolitíase e da neoplasia (Barsanti, 2012). A prostatite, a piómetra e, menos comumente, as infeções por vírus, micoplasmas e ureaplasmas também podem originar piúria (Wamsley e Alleman, 2007). Chew *et al.* (2011) referem as infeções por fungos e leveduras como causas raras de piúria.

Numa situação de piúria deve investigar-se, com atenção, sinais de uma possível ITU, tais como a presença de agregados leucocitários e de bactérias, no sedimento urinário. Para que sejam visíveis ao microscópio ótico é necessária a presença de pelo menos 10000 bacilos/mL ou 100000 cocos/mL de urina (Wamsley e Alleman, 2007).

Mesmo que a piúria não seja acompanhada por outros indícios de infecção, é recomendada a realização de uma cultura bacteriológica de urina (Chew *et al.*, 2011; Barsanti, 2012). Esta também pode ser falsamente negativa quando os microrganismos não se encontram viáveis devido a uma administração prévia de antibióticos, armazenamento prolongado da urina, ou devido à presença de microrganismos altamente fastidiosos (Wamsley e Alleman, 2007).

Também pode acontecer o oposto, isto é, bacteriúria sem piúria associada, em contaminações da amostra de urina, durante a micção ou algaliação, uma vez que um trato urinário saudável só é estéril até a meio da uretra; ou mesmo durante o processamento, em sobrecrecimento bacteriano *in vitro* em urinas mal acondicionadas; e, ainda, em infecções urinárias silenciosas em indivíduos com hipercortisolemia, diabetes *mellitus* ou outros estados imunossupressores (Wamsley e Alleman, 2007).

C.2.3.3. Células epiteliais

A superfície epitelial do trato urogenital está em constante renovação, por isso, é frequente encontrar um pequeno número de células epiteliais (<5/cpa) em amostras de urinas normais. O aumento do seu número pode ocorrer em amostras colhidas por algaliação ou em pacientes com inflamação, hiperplasia ou neoplasia do trato urogenital (Wamsley e Alleman, 2007).

O trato urogenital é revestido por diferentes tipos de células epiteliais (escamosas, de transição e tubulares renais) sendo assim, a identificação do tipo presente no sedimento urinário pode auxiliar a reconhecer a sua origem. No entanto, a presença de células de transição altamente pleomórficas, associada ao fato de todas as células epiteliais se tornarem redondas em fluidos e degenerarem em contacto com a urina, torna a tarefa quase impossível, principalmente em sedimentos não corados (Wamsley e Alleman, 2007).

C2.3.4. Cilindros

Os cilindros são moldes cilíndricos dos túbulos renais compostos por uma matriz de mucoproteína de Tamm-Horsfall, libertada pelas células epiteliais tubulares distais, com ou sem células associadas. É o seu componente predominante que os permite classificar em hialinos, celulares, granulares ou cerosos (Chew *et al.*, 2011).

Formam-se por precipitação de material que possa estar presente no lúmen tubular (células, restos celulares, gotículas de gordura, hemoglobina e bilirrubina), principalmente a nível distal, devido à maior acidez, maior concentração de soluto e menor fluxo de urina nos túbulos distais e ductos coletores. Um aumento da quantidade de proteínas plasmáticas presentes no fluido tubular também favorece a precipitação de mucoproteína de Tamm-Horsfall. Caso estejam presentes algumas células aquando da sua formação, estas continuarão a degenerar ao longo do tempo, transformando o cilindro celular em granular e por fim num cilindro ceroso, rico em colesterol (Wamsley e Alleman, 2007; Chew *et al.*, 2011).

O número de cilindros observados no sedimento não está correlacionado com a severidade ou reversibilidade da doença renal, e a sua ausência não permite excluir a existência de uma alteração tubular, uma vez que, tendem a ser eliminados de forma intermitente e são frágeis,

estando sujeitos a uma rápida degeneração, principalmente em urinas alcalinas (Wamsley e Alleman, 2007; Tripathi *et al.*, 2011).

É considerada normal a presença de até dois cilindros hialinos e até um cilindro granular por *low-power field* – lpf – isto é, por campo de 100x do sedimento urinário. Os cilindros celulares são sempre um achado patológico. A presença de números anormais de cilindros no sedimento urinário é designada por cilindrúria e reflete alterações da atividade tubular renal (Chew *et al.*, 2011).

Barsanti (2012) refere ainda os pseudocilindros, que se podem formar por degeneração das células uroteliais em urinas colhidas há mais de 10 horas.

C2.3.4.1. Cilindros hialinos

Os cilindros hialinos são estruturas incolores e transparentes compostas por mucoproteína, que podem apresentar um pequeno número de gotículas de gordura ou lípidos. Têm normalmente um mínimo significado patológico, podendo formar-se temporariamente em situações de febre, exercício e congestão renal passiva. O aumento do seu número pode ocorrer ainda na proteinúria de origem renal (Wamsley e Alleman, 2007; Chew *et al.*, 2011).

Não devem ser confundidos com filamentos de muco, os quais não apresentam lados paralelos, nem extremidades regulares. O muco está normalmente associado a irritação uretral ou a secreções genitais em cães e gatos (Chew *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2011).

C2.3.4.2. Cilindros celulares

São designados de acordo com o tipo de célula predominante no seu interior. Raramente se observam devido ao atraso entre a colheita de urina e o exame do seu sedimento, associado ao facto das suas células degenerarem rapidamente. É normalmente necessário examinar a urina nos primeiros 15 minutos após a colheita para os poder detetar (Chew *et al.*, 2011).

Os cilindros de leucócitos são raros e indicam inflamação renal tubulointersticial. Esta pode estar associada a pielonefrite, nefrite intersticial aguda ou subaguda, nefrose ou glomerulonefrite exsudativa. A degeneração celular pode impossibilitar a diferenciação entre estes e os cilindros de células epiteliais tubulares renais (Chew *et al.*, 2011; Barsanti, 2012).

Os cilindros de eritrócitos são ainda mais raros que os de leucócitos, devido à sua maior fragilidade. A sua presença indica hemorragia para o interior dos túbulos ou lesão glomerular severa, como é o caso da glomerulonefrite, vasculite ou enfarte renal. Estes cilindros podem aparecer sob a forma de cilindros de hemoglobina, devido à perda da membrana celular dos eritrócitos (Chew *et al.*, 2011; Barsanti, 2012).

Os cilindros de células epiteliais contêm células de descamação dos túbulos renais e ocorrem em doenças renais em que há lesão tubular severa, como a necrose tubular aguda ou a pielonefrite (Chew *et al.*, 2011; Barsanti, 2012).

Existem ainda os cilindros mistos nos quais se consegue identificar mais que um tipo celular. Quando se não se consegue distinguir o tipo de células presente no cilindro, este é classificado com cilindro de células degeneradas (Chew *et al.*, 2011).

C2.3.4.3. Cilindros granulares

Os cilindros granulares são o tipo mais comum e são constituídos por células degeneradas e, ocasionalmente, detritos tubulares associados à matriz mucoproteica. Em número excessivo sugerem degeneração tubular acelerada, podendo ocorrer também em pacientes com doença glomerular, nos quais grandes quantidades de proteínas plasmáticas filtradas precipitam na urina (Chew *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2011).

C2.3.4.4. Cilindros cerosos

Os cilindros cerosos são estruturas mais largas sem conteúdo granular e com extremidades retas, que contêm muitas vezes fissuras. Formam-se nos ductos coletores, após degeneração dos cilindros granulares, e indicam lesões tubulares crônicas, severa estase urinária e mau prognóstico. Estão associados a estados avançados de doenças renais crônicas (Chew *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 2011).

C2.3.5. Cristais

A presença de cristais na urina é denominada por cristalúria e indica a sua sobressaturação com substâncias cristalogénicas. Uma vez que a formação de cristais é bastante influenciada por fatores *in vitro* como a temperatura, evaporação, pH da urina e pela técnica de preparação do sedimento, a pesquisa de cristais deve ser feita em urinas recentemente colhidas e não refrigeradas (Tripathi *et al.*, 2011). Segundo Chew *et al.*, (2011), a refrigeração aumenta a precipitação de qualquer tipo de mineral presente.

Os cristais de estruvite, oxalatos e fosfatos amorfos são comuns na urina de cães e gatos saudáveis e geralmente têm pouco significado clínico (Tripathi *et al.*, 2011).

A cristalúria não é sinónimo de urolitíase, assim como a urolitíase nem sempre se manifesta por cristalúria. No entanto, uma cristalúria persistente, numa urina fresca, é um fator de risco para o desenvolvimento de urólitos e também para a formação de rolhões uretrais em gatos.

A observação de cristais no sedimento urinário deverá ser reportada descrevendo o tipo de cristal presente, a quantidade aproximada, o tamanho e a sua disposição (individual ou agregada). Aquando da interpretação destes achados, deve ter-se sempre em conta o intervalo de tempo entre a colheita e a análise e a existência ou não de refrigeração da urina (Chew *et al.*, 2011).

Na avaliação de sedimentos de urina recentemente colhida, a existência de um grande número de cristais, cristais de maiores dimensões ou que estejam agregados, sugere uma maior probabilidade de urolitíase (Chew *et al.*, 2011).

O quadro 5 indica o pH urinário e as causas mais comuns associadas à formação dos diferentes tipos de cristais encontrados comumente na urina de cães e gatos.

Quadro 5: pH de formação e potenciais causas associadas à formação dos diferentes tipos de cristais encontrados comumente na urina de cães e gatos. Adaptado de Wamsley e Alleman, 2007.

Cristal	pH de formação	Potenciais causas
Estruvite (fosfato amoníaco magnésiano)	Neutro e alcalino	Refrigeração por mais de uma hora Comum em animais saudáveis ITU por bactérias urease-positivas Alcalinização da urina Urólitos estéreis ou associados a infecção
Oxalato de cálcio di-idratado	Em qualquer pH urinário	Armazenamento superior a uma hora (com ou sem refrigeração) Animais saudáveis Acidificação da urina Urolitíase de oxalato de cálcio Hipercaleiúria (por hipercalemia ou hipercortisolemia) Hiperossalúria (ingestão de vegetais ricos em oxalato, etilenoglicol ou chocolate)
Oxalato de cálcio monoidratado	Ácido ou neutro	Hiperossalúria
Bilirrubina	Ácido	Comuns, em pequeno número, em urinas caninas concentradas, principalmente de machos Alteração do metabolismo da bilirrubina (doença hemolítica/ hepatobiliar)
Fosfatos amorfos	Alcalino	Insignificantes, em animais saudáveis
Uratos amorfos e biurato de amônia	Ácido	Má formação portossistêmica Doença hepática severa Urolitíase de biurato de amônia Sem significado patológico quando presentes em baixo número em Dálmatas e Bulldog Inglês
Cistina	Ácido e neutro	Defeito no transporte de aminoácidos nos túbulos renais proximais
Iatrogênicos: - Sulfonamidas - Xantina - Meio de contraste	Ácido e neutro Ácido -	Administração de antibióticos sulfonamidas Administração de alopurinol Administração de agentes de contraste radiográfico

C2.3.6. Gordura

A gordura aparece sob a forma de gotículas altamente refráteis de tamanho variável, as quais se encontram num plano superior às células, não devendo ser confundidas com eritrócitos. A sua presença na urina não tem, geralmente, qualquer significado patológico e é comum em gatos (Tripathi *et al.*, 2011).

C2.3.7. Espermatozoides

A presença de espermatozoides é comum na urina, colhida por micção espontânea, de machos inteiros ou fêmeas recentemente inseminadas (Tripathi *et al.*, 2011).

Parte IV: Caso Clínico – Leishmaniose Canina

a) Identificação

O Jó é um canídeo macho, inteiro, de raça indeterminada, com 6 anos de idade.

b) História clínica

Vivia exclusivamente fora de casa, em Miranda do Douro, e a única profilaxia que tinha feito era a vacina antirrábica (Rabigen da Virbac®), não sendo desparasitado interna nem externamente.

Em Agosto de 2015, o proprietário notou o aparecimento de lesões cutâneas, que se foram tornando cada vez mais exuberantes, apatia e perda progressiva de peso.

Foi à consulta no dia 11 de Janeiro de 2016, com queixa de lesões cutâneas nos quatro membros, hiporrexia, prostração e baixa condição corporal.

c) Diagnósticos presuntivos

O Jó apresentava sinais clínicos inespecíficos. Contudo, tendo em conta a ausência de desparasitação ou vacinação, os principais diagnósticos diferenciais foram infeções parasitárias, fúngicas, bacterianas e/ou virais. Outras causas possíveis eram afeções alérgicas ou neoplasias. De modo a investigar-se a etiologia do processo, foram requisitados meios complementares de diagnóstico a um laboratório veterinário.

d) Abordagem laboratorial

No dia 12 de Janeiro de 2016, recebeu-se no laboratório Inno, uma amostra de sangue com EDTA e uma amostra de soro. As análises requisitadas foram o hemograma e conjunto de bioquímicas séricas (creatinina, ureia, ALT, proteínas totais, albumina e globulinas).

Os resultados da analítica solicitada encontram-se nos quadros 6 e 7. Os valores a negrito estão fora dos intervalos de referência.

Quadro 6: Hemograma realizado a 12 de Janeiro de 2016. WBC – White Blood Cells, RBC – Red Blood Cells, VCM – Volume Corpuscular Médio, CHM – Concentração de Hemoglobina Média, CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW – Red cell Distribution Width, PLT – Plaquetas.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
WBC	5.69	6.0-17.0	x10 ³ /μL
Neutrófilos	4.42	3.0-11.8	x10 ³ /μL
Linfócitos	0.75	1.0-4.8	x10 ³ /μL
Monócitos	0.14	0.2-2.0	x10 ³ /μL
Eosinófilos	0.38	0.1-1.3	x10 ³ /μL
Basófilos	0.00	0.0-0.5	x10 ³ /μL
RBC	5.81	5.50-8.50	x10 ⁶ /μL
Hemoglobina	13.2	12.0-18.0	g/dL

Hematócrito	41.3	37.0-55.0	%
VCM	71.1	60.0-74.0	fL
CHM	22.7	19.5-24.5	pg
CHCM	32.0	31.0-36.0	g/dL
RDW	18.0	12.0-18.0	%
PLT	250	200-500	x10 ³ /μL

Quadro 7: Parâmetros bioquímicos analisados a 12 de Janeiro de 2016. ALT – Alanina aminotransferase.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Creatinina	0.87	0.5-1.7	mg/dL
Ureia	25.6	17.0-60.0	mg/dL
ALT	24.5	10.0-109.0	U/L
Proteínas totais	8.6	5.4-7.5	g/dL
Albumina	3.31	2.3-3.7	g/dL
Globulinas	5.30	2.7-4.4	g/dL

e) Interpretação de resultados

Leucopenia com linfopenia ligeiras.

Hiperproteinemia com hiperglobulinemia.

f) Recomendações

Com o objetivo de identificar as alterações responsáveis pela hiperglobulinemia, o laboratório recomendou a realização do proteinograma sérico, cujos resultados estão descritos no quadro 8. Na figura 15 está representado o eletroforetograma sérico.

Quadro 8: Proteinograma sérico. A/G – Albumina/globulinas

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Proteínas totais	8.6	5.4-7.5	g/dL
Albumina	3.31	2.3-3.7	g/dL
Globulinas	5.30	2.7-4.4	g/dL
1-globulinas	0.12	0.2-0.5	g/dL
2-globulinas	1.34	0.3-1.1	g/dL
-globulinas	1.21	0.6-1.2	g/dL
-globulinas	2.63	0.5-1.8	g/dL
Rácio A/G	0.63	0.6-1.1	-

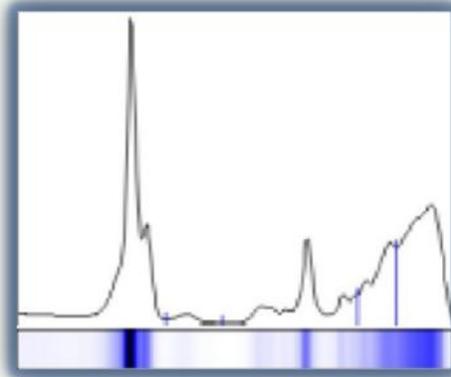


Figura 15: Electroforetograma sérico realizado no dia 12 de Janeiro de 2016.

O paciente Jó apresentava aumento das γ - e α -globulinas e gamopatia policlonal (evidenciada na figura 15), indicativas de estimulação antigénica crónica.

Uma vez que o animal vivia numa área endémica de leishmaniose e não fazia qualquer profilaxia, a principal suspeita recaiu sobre a infeção com *Leishmania infantum*. Para confirmar a infeção foi solicitada a realização da pesquisa de Ac anti-*Leishmania*, através do método de ELISA indireto (Leiscan®). O resultado da serologia, que se encontra no quadro 9, evidencia um alto título de Ac, indicativo de infeção e de leishmaniose clínica.

Quadro 9: Serologia quantitativa realizada no dia 12 de Janeiro de 2016. Rz – Razão.

Parâmetro	Resultado	Valor de referência
Leiscan®	Positivo muito alto (Rz=4.1)	Negativo (Rz<0.9)

g) Diagnóstico definitivo

Leishmaniose clínica canina com alterações cutâneas secundárias.

h) Tratamento

A médica veterinária assistente instituiu tratamento específico para a leishmaniose composto por miltefosina durante 28 dias e alopurinol *ad eternum*.

Foi colocada uma coleira de libertação lenta impregnada com deltametrina e uma pipeta de permetrina e imidaclopride. Aconselhou-se também o proprietário a pulverizar as paredes e telhados do abrigo do canídeo com inseticidas de longa duração.

A medicação englobou ainda AINEs, antibióticos e champôs para tratamento das lesões cutâneas.

i) Monitorização de tratamento

Um mês após o início do tratamento da leishmaniose, foi requisitada uma nova avaliação laboratorial do hemograma, bioquímicas séricas (proteínas totais, albumina, globulinas, glicose, creatinina, ureia, ALT, FA e bilirrubina total séricas) proteinograma e serologia quantitativa por ELISA indireto. Os resultados obtidos estão registados nos quadros 10, 11, 12 e 13, sendo que os valores a negrito se encontram fora dos intervalos de referência.

Foi também solicitada a realização de esfregaço sanguíneo para identificação de alterações morfológicas. Observaram-se abundantes agregados de eritrócitos, que após a prova de soro, se comprovou serem *rouleaux* e não autoaglutinação.

Na figura 16 encontra-se a representação do padrão eletroforético das proteínas séricas obtido após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol.

Na folha de requisição vinha a informação que o paciente encontrava-se clinicamente muito melhor: as lesões cutâneas começaram a cicatrizar, estava muito ativo, tinha recuperado o apetite e algum do peso perdido.

Quadro 10: Hemograma realizado após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol. WBC – White Blood Cells, RBC – Red Blood Cells, VCM – Volume Corpuscular Médio, CHM – Concentração de Hemoglobina Média, CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média, RDW – Red cell Distribution Width, PLT – Plaquetas, VPM – Volume Plaquetar Médio.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
WBC	12.30	6.0-17.0	x10 ³ /μL
Neutrófilos	7.50	3.0-11.8	x10 ³ /μL
Linfócitos	2.46	1.0-4.8	x10 ³ /μL
Monócitos	0.74	0.2-2.0	x10 ³ /μL
Eosinófilos	1.60	0.1-1.3	x10 ³ /μL
Basófilos	0.00	0.0-0.5	x10 ³ /μL
RBC	4.97	5.50-8.50	x10 ⁶ /μL
Hemoglobina	10.5	12.0-18.0	g/dL
Hematócrito	30.3	37.0-55.0	%
VCM	61.0	60.0-74.0	fL
CHM	21.1	19.5-24.5	pg
CHCM	34.7	31.0-36.0	g/dL
RDW	18.0	12.0-18.0	%
PLT	577	200-500	x10 ³ /uL
VPM	10.3	5.0-15.0	fL

Quadro 11: Resultados dos parâmetros bioquímicos analisados após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol. ALT – Alanina aminotransferase, FA – Fosfatase Alcalina.

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Proteínas totais	8.5	5.4-7.5	g/dL
Albumina	3.28	2.3-3.7	g/dL
Globulinas	5.22	2.7-4.4	g/dL
Glicose	50.2	76.0-119.0	mg/dL
Creatinina	1.1	0.5-1.7	mg/dL
Ureia	45.0	17.0-60.0	mg/dL
ALT	37.5	10.0-109.0	U/L
FA	44	1.0-114.0	U/L
Bilirrubina total	0.0	0.0-0.3	mg/dL

Quadro 12: Proteinograma sérico realizado após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol. A/G – Albumina/globulinas

Parâmetros	Resultados	Valores de referência	Unidades
Proteínas totais	8.5	5.4-7.5	g/dL
Albumina	3.28	2.3-3.7	g/dL
Globulinas	5.22	2.7-4.4	g/dL
1-globulinas	0.07	0.2-0.5	g/dL
2-globulinas	1.10	0.3-1.1	g/dL
-globulinas	1.43	0.6-1.2	g/dL
-globulinas	2.62	0.5-1.8	g/dL
Rácio A/G	0.63	0.6-1.1	-

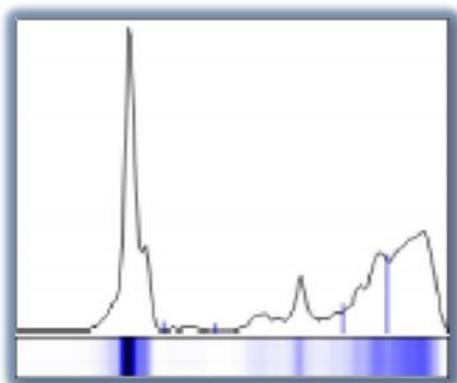


Figura 16: Eletroforetograma sérico obtido após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol.

Quadro 13: Serologia realizada após 28 dias de tratamento com miltefosina e alopurinol.

Parâmetro	Resultado	Valor de referência
Leiscan®	Positivo muito alto (Rz=3.6)	Negativo (Rz<0.9)

j) Interpretação de resultados

Eosinofilia ligeira. Anemia ligeira normocítica normocrômica. *Rouleaux* (no esfregaço sanguíneo). Trombocitose ligeira.

Hiperproteinemia com hiperglobulinemia.

Aumento das α e γ -globulinas. Gamopatia policlonal.

Alto título de Ac anti *Leishmania infantum*.

k) Discussão de resultados

A leishmaniose canina (LCan) provocada pela *Leishmania infantum* é uma grave doença zoonótica com distribuição mundial, que tem ganho uma importância crescente tanto em regiões endémicas como em regiões não endémicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Em Portugal, Shalig *et al.* (2013) referem a existência de quatro focos principais de LCan: a província de Trás-os-Montes e Alto Douro, a região de Lisboa, a província do Algarve e o município de Évora.

Sendo o paciente Jó um cão exclusivamente de exterior, numa área onde a infeção é endémica (Miranda do Douro), estava constantemente exposto à picada de mosquitos vetores do género *Phlebotomus*, uma vez que não fazia qualquer profilaxia repelente de insetos (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Os sinais clínicos manifestados pelo animal – lesões cutâneas generalizadas, diminuição do apetite, prostração e baixa condição corporal – eram inespecíficos e poderiam ter diversas etiologias. Todavia, a anamnese apontava para uma maior probabilidade de se tratar de um processo parasitário ou infeccioso, pelo facto do animal não ser desparasitado, nem vacinado.

A LCan é uma doença sistémica crónica que pode envolver qualquer órgão, tecido ou fluido biológico. Os sinais clínicos manifestados pelos animais afetados são muito variados, dependendo dos mecanismos patogénicos causadores de doença, dos órgãos atingidos e da diversidade da resposta imunitária de cada hospedeiro (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

As alterações mais frequentes na leishmaniose canina são, por ordem decrescente, as lesões cutâneas, linfadenomegalia, intolerância ao exercício, perda de peso progressiva, prostração, polidipsia, lesões oculares, anorexia, vômitos e diarreia, alterações locomotoras, onicogribose, esplenomegalia palpável, epistaxe e melena (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Nos casos atípicos da doença, que são cada vez mais frequentes, podem observar-se alterações neurológicas e cardiovasculares, lesões osteolíticas e osteoproliferativas (Verde *et al.*, 2013).

A abordagem diagnóstica ao paciente Jó foi realizada de forma integrada e gradual, tendo em conta a história, os sinais clínicos encontrados e os resultados de análises laboratoriais

básicas (não específicas) e análises específicas para a avaliação da resposta imunitária do hospedeiro (Paltrinieri *et al.*, 2010).

As análises realizadas incluíram hemograma e esfregaço sanguíneo, bioquímica e proteinograma séricos e serologia quantitativa. Apesar de ser recomendada a realização de uma urianálise e de um rácio Pur/Cur, estes não foram realizados, pois o animal não apresentava sinais de comprometimento renal, tais como, poliúria, polidipsia ou azotemia (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Os resultados da analítica sanguínea revelaram, numa primeira fase, uma leucopenia com linfopenia, hiperproteinemia com hiperglobulinemia, por aumento das α e γ -globulinas, gamopatia policlonal e alto título de Ac anti *Leishmania infantum*. Numa segunda fase, após um mês de tratamento específico contra a leishmaniose, para além das alterações bioquímicas referidas, identificou-se uma eosinofilia ligeira, anemia ligeira normocítica normocrômica e trombocitose ligeira, que substituíram a leucopenia e linfopenia prévias. No esfregaço sanguíneo observaram-se *rouleaux*.

Estas alterações clínico patológicas estão de acordo com a literatura científica. Baneth e Solano-Gallego (2012) referem que os achados mais comuns são a hiperproteinemia com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia com consequente diminuição do rácio A/G, proteinúria, anemia ligeira a moderada geralmente não regenerativa, teste de Coombs positivo, aumento do título de Ac antinucleares (ANA), trombocitopenia, aumento da atividade da ALT e FA, azotemia, leucocitose ou leucopenia.

A hiperproteinemia é geralmente atribuída à hiperglobulinemia α e γ e está quase sempre associada a uma hipoalbuminemia. Esta deve-se, em regra, à perda de proteína por nefropatia, doença hepática, má nutrição prolongada ou a uma combinação entre ambas. A hipoalbuminemia também pode ter origem numa compensação da hiperglobulinemia, de forma a manter os níveis normais de proteínas séricas (Koutinas *et al.*, 1999).

A proteinúria e a azotemia, muitas vezes presentes, advêm do comprometimento renal secundário a glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

O aumento da atividade das enzimas hepáticas deve-se à presença de lesão hepática secundária à infeção por *Leishmania infantum* (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A anemia, na LCan, pode ser ligeiramente regenerativa ou não regenerativa dependendo do mecanismo patogénico que a origina. No primeiro caso, deve-se a uma perda de sangue (epistaxe ou melena) ou a hemólise (por autoanticorpos, imunocomplexos ou por alteração das proteínas da membrana eritrocitária). Por outro lado, a anemia não regenerativa derivará de uma diminuição da eritropoiese (secundária à interferência de mediadores inflamatórios no processo eritropoiético associada à infeção crónica, à deficiência em ferro, a insuficiência renal crónica (IRC) ou a displasia eritroide) ou da existência de infeções concomitantes, tais como a erliquiose monocítica (Saridomichelakis, 2009).

A trombocitopenia tem, geralmente, origem numa destruição imunomediada secundária à infeção por *Leishmania* (Tvedten, 2012; Harvey, 2012).

Apesar de não ser muito frequente, o paciente Jó apresentava um aumento do número total de plaquetas circulantes. Este pode ser explicado pela existência de mediadores inflamatórios que estimulam a produção de trombopoietina, originando uma trombocitose reativa; ser uma consequência da resposta medular à maior concentração de eritropoietina produzida secundariamente à anemia; ou ser apenas resultado de uma contração esplênica. Esta contração ocorre após estimulação adrenérgica do baço, resultante da excitação causada pela manipulação no consultório veterinário (Tvedten, 2012; Harvey, 2012).

A leucocitose ocorre em resposta à inflamação e ao *stress* induzido pela infecção parasitária (Tvedten e Raskin, 2012).

A linfopenia é esperada num processo inflamatório agudo e/ou severo. Outra das causas possíveis é a perda de linfa rica em linfócitos, quando há interferências na circulação linfática por doenças inflamatórias/infecciosas (Tvedten e Raskin, 2012).

A presença de infecção por *Leishmania infantum* não significa obrigatoriamente doença. Cães infetados clinicamente saudáveis, isto é, com infecção subclínica, não apresentam nem alterações no exame físico, nem alterações nos testes laboratoriais de rotina, tais como, hemograma, perfil bioquímico e urianálise, apesar de terem infecção confirmada. Por outro lado, um cão doente, isto é com leishmaniose clínica, apresenta sinais clínicos e/ou alterações clínico patológicas associadas à infecção (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

De acordo com Baneth e Solano-Gallego (2012), a resposta imunitária desenvolvida pelos cães no momento da infecção, ou posteriormente a esta, parece ser o fator mais importante na determinação da suscetibilidade ao desenvolvimento da doença. Os linfócitos T-*helper* CD4⁺, podem induzir o sistema imune a desenvolver uma resposta humoral (Th2) ou uma imunidade celular (Th1). O predomínio de citocinas Th2 confere maior suscetibilidade ao desenvolvimento de leishmaniose clínica, sendo que a resistência a esta advém de um predomínio de citocinas Th1 (Paltrinieri *et al.*, 2010).

A partir do momento em que as formas promastigota de *Leishmania* são inoculadas na pele do animal, pelo flebótomo, são reconhecidas três vias possíveis: a eliminação do parasita, combatendo a infecção; uma resposta imune celular Th1 adequada, com desenvolvimento de infecção subclínica, sem ou com sintomas muito ligeiros; ou uma resposta humoral Th2 ineficaz, que leva ao aparecimento de sinais clínicos com diferentes graus de severidade. A resistência do cão ao desenvolvimento de leishmaniose clínica depende do desenvolvimento de uma resposta imune celular tipo Th1 eficaz, envolvendo CD4⁺, através da síntese de IL-2, IL-12, fator de necrose tumoral e interferão . Este último ativa a produção de radicais tóxicos de oxigénio e azoto, que apresentam efeito leishmanicida. Por outro lado, se a resposta derivar dos linfócitos Th2, a produção de IL-4 e IL-10 leva ao agravamento do quadro clínico. Estudos recentes parecem demonstrar que a capacidade do animal desenvolver uma resposta imune protetora tem uma base genética. Assim existem raças mais resistentes à leishmaniose clínica, tais como, o Podengo de Ibiza, Yorkshire Terrier e Caniche, e raças mais suscetíveis,

como Pastor Alemão, Boxer, Cocker Spaniel e Rottweiler (Miranda *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Mur, 2012).

Testes específicos para detetar a infeção/doença por *Leishmania infantum* dividem-se em testes diretos e em testes indiretos. Os testes diretos englobam a demonstração microscópica do protozoário em preparações citológicas ou espécimes histopatológicos, a cultura do organismo num meio apropriado e a deteção de ADN do mesmo usando métodos de biologia molecular. Nos testes indiretos, não se deteta o parasita, mas a resposta imunitária específica do hospedeiro, como é o caso da serologia. Esta técnica determina a presença, ou não de Ac anti-*Leishmania infantum* no soro de um possível hospedeiro, podendo quantificá-los, caso se trate de um método quantitativo (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Para confirmar o diagnóstico de leishmaniose em animais com história clínica e alterações anatomopatológicas sugestivas, a abordagem de eleição inclui a identificação do parasita através das técnicas de citologia ou imunohistoquímica, em lesões cutâneas, e a avaliação dos níveis de Ac específicos, recorrendo a um teste serológico quantitativo (Verde *et al.*, 2013).

As técnicas serológicas quantitativas, ao detetarem e quantificarem as imunoglobulinas anti-*Leishmania* presentes, são as mais usadas no diagnóstico definitivo de um animal doente, sendo também muito úteis na investigação de animais com infeções subclínicas. As técnicas mais usadas são a IFI, o ELISA e o *Western blotting*. Níveis elevados de Ac indicam infeção e doença. Na maioria dos casos clínicos, um título alto, isto é, duas a quatro vezes o título basal (título limiar de positividade ou *cut-off*) pode ser considerado diagnóstico de leishmaniose clínica. Contudo, a presença de um baixo título de anticorpos (uma ou duas vezes superior ao limiar), implica o uso de técnicas diretas para confirmar ou descartar a infeção por *Leishmania* (Verde *et al.*, 2013; Paltrinieri *et al.*, 2010).

Neste caso em particular, usou-se apenas a serologia quantitativa, através de ensaio imunoenzimático (Leiscan®), para confirmar a leishmaniose clínica, uma vez que o título de Ac do paciente era muito alto (Rz=4.1). Num estudo de 2014, Solano-Gallego *et al.* verificaram que este teste tem uma melhor performance no diagnóstico serológico da LCan que a IFI, apresentando uma sensibilidade de 92.5% e uma especificidade de 100%, contra os respetivos 86.9% e 91.7% da IFI.

Os resultados do Leiscan® são apresentados sob a forma de uma razão entre as absorvâncias da amostra testada e do controlo positivo baixo. O valor obtido está correlacionado com o título de Ac correspondente na IFI. O Jó apresentaria assim um título de Ac superior a 1:1280 na IFI, usando um *cut-off* de 1:80 (Leiscan® da Esteve Veterinária).

De acordo com as *guidelines* mais recentes (2011) do LeishVet – grupo de cientistas veterinários, provenientes de instituições académicas da Europa e bacia do Mediterrâneo, com grande interesse clínico e científico na LCan – o paciente Jó encontrava-se no segundo estadio clínico (de quatro) de LCan, correspondente a doença moderada, cujo prognóstico é bom a reservado (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Este sistema de estadiação da LCan baseia-se nos sinais clínicos, nas alterações clínico-patológicas e no *status* serológico de cães infetados com *Leishmania infantum* e sugere diferentes protocolos de tratamento de acordo com o estadio em que cada paciente se encontra (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A médica veterinária assistente instituiu um plano terapêutico composto pela associação oral de miltefosina com alopurinol, durante 28 dias, em alternativa ao mais comumente usado (antimoniato de meglumina (SC) e alopurinol (PO)), evitando assim possíveis efeitos de nefrotoxicidade e o desenvolvimento de abscessos cutâneos ou celulite. Para além, disso sendo uma medicação por via oral, facilitava a sua administração em casa pelo proprietário (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Um estudo recente refere que ambas as terapias (miltefosina ou antimoniato de meglumina), combinadas com alopurinol, produzem melhorias clínicas significativas em cães, com grande redução da carga parasitária dos linfonodos, após três meses de tratamento. Nesse estudo houve recidiva em quatro cães tratados com miltefosina e em apenas um cão tratado com antimoniato de meglumina, sugerindo que este último apresenta melhor eficácia clínica que o primeiro. Os autores referem ainda que o uso do alopurinol como terapia de manutenção é essencial para estabilizar a leishmaniose canina (Manna *et al.*, 2015).

A domperidona é outro princípio ativo eficaz, tanto no tratamento de infeções ligeiras e moderadas, como na prevenção da LCan (Mur, 2012). É uma droga anti dopaminérgica que pode atuar como citoquina proinflamatória capaz de estimular uma resposta imunitária tipo Th1, induzindo os linfócitos NK e a ativação dos macrófagos (Roura, 2013).

As vantagens do seu uso são o baixo custo, a administração oral, a ausência de reações adversas e uma eficácia preventiva de 80% (Ochoa *et al.*, 2002; Roura, 2013).

O Jó, tal como a maioria dos cães, apresentou uma melhoria clínica após um ciclo de tratamento de 28 dias. Contudo, continuava com um alto de título de Ac anti-*Leishmania*. Solano-Gallego *et al.* (2011) recomendam a avaliação da história clínica, um exame físico completo e testes laboratoriais de rotina – incluindo hemograma, perfil bioquímico, eletroforese sérica e urianálise completa com rácio Pur/Cur em cães proteinúricos – após o primeiro mês de tratamento e a cada três a quatro meses durante o primeiro ano. Caso o animal recupere completamente com a terapia, deve-se voltar a reavaliar de seis em seis meses ou de ano a ano. Segundo estes autores, a serologia deverá ser realizada a cada seis meses ou a cada ano, após o tratamento inicial.

Embora muitos cães consigam eliminar a doença, a *Leishmania* raramente é completamente eliminada com os fármacos disponíveis (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Assim, os cães tratados geralmente continuam a ser um reservatório da infeção para os vetores, mas numa menor extensão do que antes do tratamento (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O tratamento com alopurinol pode ser descontinuado na ausência de alterações clínicas e laboratoriais associada a uma diminuição marcada dos níveis de Ac, isto é, até se obter uma serologia quantitativa negativa ou *borderline* (i.e., duvidosa) (Solano-Gallego *et al.*, 2011). A

interrupção também deve ocorrer quando não é possível controlar ou diminuir a xantúria com dietas de baixo teor de purinas ou com doses mais baixas de alopurinol, evitando o desenvolvimento de cristais/urólitos de xantina (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

De acordo com Baneth e Solano-Gallego (2012), são frequentes as recidivas que necessitam de novos ciclos de tratamento.

Foi recomendado, ao proprietário do Jó, o uso de produtos veterinários com princípios ativos repelentes de flebotomos, evitando o aumento da sua carga parasitária e também o contágio de outros animais ou mesmo humanos.

Solano-Gallego *et al.*, 2011 recomendam a aplicação de inseticidas tópicos de longa ação em cães que vivem ou que vão viajar para áreas endêmicas. Pipetas com permetrina e imidaclopride têm atividade repelente contra o vetor *Phlebotomus perniciosus* durante três semanas e devem ser aplicadas dois dias antes da viagem. Já as coleiras com deltametrina repelem o mosquito durante cinco a seis meses, devendo ser colocadas pelo menos uma a duas semanas antes de viajar.

É também aconselhada a administração da domperidona durante 30 dias, duas a três vezes por ano, dependendo da endemicidade da infecção na área geográfica em questão (Roura, 2013).

Um estudo recente demonstrou que o risco dos cães tratados com domperidona desenvolverem a leishmaniose clínica é sete vezes menor que nos cães não tratados. Verificou-se que a implementação de um programa de tratamento que englobasse quatro ciclos de 30 dias de tratamento com a domperidona, por ano, reduziria o risco de desenvolvimento da LCan clínica em áreas com alta prevalência da doença (Sabate *et al.*, 2014).

Existem apenas duas vacinas caninas registradas que conferem proteção significativa contra a Leishmaniose Canina: Leismune®, no Brasil, e a CaniLeish®, na Europa. Estas são constituídas por frações purificadas de *Leishmania infantum* associadas a adjuvantes derivados da saponina. Induzem uma forte imunidade, predominantemente do tipo Th1, de longa duração, de modo a controlar a progressão da infecção e a transmissibilidade do parasita ao vetor (Gradoni, 2015).

Segundo Oliva *et al.* (2014), a CaniLeish® apresenta uma eficácia de 68.4% na prevenção da infecção ativa e confere um nível de proteção de 92.7%.

A CaniLeish®, quando administrada de acordo com as recomendações do fabricante (isto é, uma vacinação primária composta por três doses aplicadas com três semanas de intervalo, seguido de um reforço anual), providencia uma redução significativa do número de animais ativamente infetados e uma diminuição significativa da probabilidade de desenvolvimento da doença clínica. Nos cães que, apesar de vacinados, desenvolvem a doença, a sua progressão é geralmente mais lenta e a severidade menor. Uma vez que a vacina não confere proteção completa a todos os cães, deve ser combinada com repelentes de insetos e inseticidas. Desta forma, aumenta-se a capacidade do sistema imunitário controlar qualquer infecção, ao mesmo tempo que se diminui o risco de transmissão da *Leishmania* (Oliva *et al.*, 2014).

A vacina deve ser combinada com os inseticidas tópicos, de modo a prevenir o estabelecimento de infeção introduzida pela picada dos vetores que resistiram ao inseticida (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Outras medidas sugeridas na prevenção da picada dos mosquitos são: manter os cães dentro de casa do anoitecer até ao amanhecer, durante a época dos flebótomos, isto é, do final da Primavera até ao final do Outono; evitar o desenvolvimento de micro-*habitats* favoráveis aos flebótomos próximos dos locais que o animal frequenta; e usar inseticidas ambientais (Baneth e Solano-Gallego, 2012; Paltrinieri *et al.*, 2010).

I) Conclusão

O diagnóstico da LCan é difícil e complexo, devido ao grande número de sinais clínicos e anatomopatológicos que podem ser compatíveis com outras doenças e, também, devido ao facto de não existirem provas laboratoriais que sejam 100% específicas e sensíveis.

É, portanto, essencial que haja integração de todos os elementos recolhidos, desde a história clínica e exame físico até a meios complementares de diagnóstico mais específicos, que permitam a identificação do protozoário e/ou a presença de *Ac anti-Leishmania infantum*.

A presença frequente do parasita e da doença em Portugal alerta para a grande necessidade de medidas profiláticas, tais como, a aplicação de inseticidas/repelentes tópicos nos cães e a sua vacinação. Os inseticidas/repelentes tópicos, para além de prevenirem o desenvolvimento de infeção em cães saudáveis, ao serem aplicados em animais já infetados, previnem a eventual transmissão do parasita a outros cães, e, a outros hospedeiros, nomeadamente o Homem, tornando mais segura a convivência entre pessoas e animais.

O acompanhamento deste caso clínico permitiu, à estagiária, a aquisição de novos conhecimentos sobre a LCan, principalmente na área de diagnóstico laboratorial. Para além disso, alertaram-na para a necessidade de incluir frequentemente a doença nas listas de diagnósticos diferenciais, devido ao facto de poder manifestar-se de diversas formas e de ser endémica em Portugal.

Conclusão

A realização deste estágio permitiu, à autora, compreender a grande importância do diagnóstico laboratorial em Medicina Veterinária.

Apesar de todas as limitações derivadas, essencialmente, da dissociação do Laboratório da área Clínica, tais como: a impossibilidade de contacto direto com o animal na sua apresentação clínica e a perda de dados necessários ao processo de diagnóstico, na ponte fracamente estabelecida entre o médico veterinário assistente e o patologista clínico, o Laboratório é essencial para a confirmação de um diagnóstico presuntivo, através da realização de análises específicas em equipamentos automáticos e precisos, que muitas vezes não estão ao dispor dos Centros de Atendimento Médico-Veterinários, e da interpretação dos resultados obtidos por uma equipa especializada em Patologia Clínica.

Durante a realização do estágio constatou-se que ainda se cometem muitos erros no envio das amostras para laboratório. É imprescindível que o médico veterinário responsável pelo caso clínico forneça dados da história e exames clínicos, assim como, suspeitas de diagnóstico, de modo a direcionar a investigação e facilitar a obtenção de um diagnóstico.

Verificou-se um grande predomínio de análises realizadas em amostras de canídeos, na maioria dos testes acompanhados durante o período de estágio. Quanto às áreas laboratoriais houve um maior número de análises efetuadas em Bioquímica, Hematologia e Urinálise, para além da Imunologia, o que realça a importância dessas três áreas na investigação laboratorial de qualquer afeção.

Ao longo do período de estágio notou-se, também, uma solicitação crescente de provas laboratoriais, evidenciando a preocupação cada vez maior dos proprietários com a saúde dos seus animais de companhia.

As áreas mais exploradas pela autora foram a Hematologia e a Urinálise, integrando a realização de esfregaços sanguíneos e de urinálises, observação microscópica de esfregaços sanguíneos e de sedimentos urinários, a leitura de microhematócritos e da densidade urinária em refratómetro e a interpretação de todos os resultados obtidos. A área das Análises Bioquímicas foi também muito acompanhada, através da discussão dos resultados obtidos e sua relação com possíveis afeções. Por outro lado, a área da Citologia não foi tão abrangida, tendo ficado a curiosidade e o interesse de saber mais.

O estágio realizado no Laboratório Inno foi imensamente útil para a autora, uma vez que, lhe possibilitou a consolidação de conhecimentos adquiridos nas disciplinas de cariz laboratorial e clínico ao longo do curso de Medicina Veterinária e a aquisição de experiência em muitas técnicas e procedimentos laboratoriais.

Referências Bibliográficas

- Alenza DP (2011) Canine hypothyroidism: ¿how do we diagnose it? In Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional Avepa, 2011 – Barcelona, Spain. [Acedido a 10 de Maio de 2016, disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2011/lectures/eng/109.pdf>]
- Allison RW (2012a) Laboratory Evaluation of Plasma and Serum Proteins. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 460-475.
- Allison RW (2012b) Laboratory Evaluation of the Liver. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 401-424.
- Allison RW (2012c) Laboratory Evaluation of the Pancreas and Glucose Metabolism. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp.425-440.
- Allison RW (2012d) Laboratory Detection of Muscle Injury. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 476-479.
- Alves GM (2013) Efeitos dos anticoagulantes – citrato de sódio, EDTA-K3 e heparina sódica nas análises hematimétricas e bioquímicas em Araras Canindé (*Ara ararauna*), Tigre d'água (*Trachemys scripta*) e Pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*). Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, pp. 18-19.
- Angus JC (2005) Better results from fungal cultures. In *North American Veterinary Conference 2005*. Orlando, Florida, 8-12 Jan. 2005 [Acedido a 20 de Julho de 2014. Disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2005/SAE/087.pdf?LA=1>]
- Bacha JWJ & Bacha LM (2003) Princípios Gerais de Histologia. In Atlas Colorido de Histologia Veterinária, 2ª Edição: Roca, Ltda, São Paulo, Brasil, pp. 1-10.
- Bain PJ (2011) Liver. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN:978-0-8138-2014-9, pp. 211-230.
- Baneth G & Solano-Gallego L (2012) Global Aspects of Leishmaniosis. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat* ed. Greene, C.E., Fourth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4160-6130-4, pp. 734-746.
- Barber, PJ (2004) The kidney. In *Feline Medicine and Therapeutics* ed. Chandler, E. A., Gaskell, C. J. & Gaskell, R. M., 3rd Edition: Blackwell Publishing, Oxford, United Kingdom, ISBN: 1-4051-0032-X, pp. 281-311.
- Barsanti JA (2012) Urinary Disorders. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1437706574, pp. 126-155.
- Behrend EN, Kooistra HS, Nelson R, Reusch CE & Scott-Moncrieff JC (2013) Diagnosis of Spontaneous Canine Hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). doi: 10.1111/jvim.12192
- Bohn AA (2012) Laboratory Evaluation of Electrolytes. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 378-392.
- Boudreaux MK, Spangler EA & Welles EG (2011) Hemostasis. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 107-144.

- Brockus CW (2011) Erythrocytes. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 3-44.
- Brown D & Vap LM (2012) Principles of Blood Transfusion and Crossmatching. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, p. 205-222
- Burns K (2015) Feline Nutrition – Cats Are Not Small Dogs!. In 37th anual OAVT Conference & Trade Show. [Acedido a 25 de Abril de 2016, disponível em <http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=6603077&pid=11442&>]
- Campbell, TW (1995) Avian Hematology and Cytology, Second Edition: Iowa State University Press, USA, ISBN: 978-0-8138-2970-8, pp. 7-11.
- Campbell TW (2012) Hematology of Birds. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, p. 238-276
- Carney HC, Ward CR, Bailey SJ, Bruyette D, Dennis S, Ferguson D, Hinc A & Rucinsky, AR (2016) 2016 AAFP Guidelines for the Management of Feline Hyperthyroidism. doi: 10.1177/1098612X16643252
- Chew DJ, DiBartola SP & Schenck PA (2011) Urinalysis. In *Canine and Feline Nephrology and Urology*, Second Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-0-7216-8178-8, pp. 1-30.
- Church DB (2004) Canine Hypoadrenocorticism. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology* ed. Mooney, C.T. & Peterson, M.E., Third Edition: British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 0-905214-72-2, p.176.
- Day MJ e Schultz RD (2011) Serological Testing. In *Veterinary Immunology Principles and Practice*, Manson Publishing, London, England, ISBN: 978-1-84076-143-6, pp. 39-48.
- DeNicola DB, Matthews JÁ, Fernandes PJ & Frye MB (2006). Comparison of reticulocyte counts to mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration in anemic dogs. Presentation at the International Society for Animal Clinical Biochemistry.
- Dibartola SP (2012) Electrolyte and Acid-Base Disorders. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4377-0657-4, pp. 112-125.
- Dixon RM (2004) Canine Hypothyroidism. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology* ed. Mooney, C.T. & Peterson, M.E., Trhird Edition: British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 0-905214-72-2, pp. 84-90.
- Donaldson D (2011) Eyelid Disease...Medical and Surgical Management. In Proceedings of SCIVAC International Congress, 2011 – Rimini, Italy. [Acedido a 25 de Abril de 2016, disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/scivac/2011/Donaldson3.pdf?LA=1>]
- Ehrhart NP & Withrow SJ (2007) Biopsy Principles. In *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* ed. Withrow, S.J. & Vail, D.M., Fourth Edition: Saunders Elsevier, Missouri, USA, ISBN: 978-0-7216-0558-6, pp. 147-153.
- Espineira MMD, Mol JÁ, Peeters ME, Pollak YWEA, Iversen L, Dijk JEv, Rijnberk A & Kooistra HS (2007) Assessment of Thyroid Function in Dogs with Low Plasma Thyroxine Concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **27**: 1292-1304.
- Evans EW (2011) Proteins, Lipids, and Carbohydrates. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 173-210.
- Ferguson DC e Hoening M (2011) Endocrine System. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 295-330.

- Ferreira RRF, Gopegui RR & Matos AJF (2011) Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00311.x
- Galgut B (2013) Clinicopathologic Assessment of the Liver. In Western Veterinary Conference 2013. [Acedido a 25 de Abril de 2016, disponível em <http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=6031749&pid=11371&>]
- George JW & Zabolotzky SM (2011) Water, Electrolytes, and Acid Base. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 145-172.
- Gradoni L (2015) Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. *Veterinary Parasitology*, **208** (1): 94-100.
- Grauer GF (2009) Clinical Manifestations of Urinary Disorders. In *Small Animal Internal Medicine* ed. Nelson, R. W. & Couto, C.G., Fourth Edition: Mosby Elsevier, USA, ISBN: 978-0-3230-4881-1, pp. 607-622.
- Greene CE, Sykes JE, Moore GE, Goldstein, RC & Schultz, RD (2012) Leptospirosis. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat* ed. Greene, C.E., Fourth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4160-6130-4, pp. 439-440.
- Hall EJ & German AJ (2005) Laboratory evaluation of hepatic disease. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology* ed. Villiers, E., Blackwood, L., Second Edition: British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 978-0-9052-1479-5, pp. 184-206.
- Hall RL & Bender HS (2011) Muscle. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 283-294.
- Harvey JW (2012) *Veterinary Hematology – A Diagnostic Guide and Color Atlas*, Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4377-0173-9, pp. 11-32, 49-163, 191-207.
- Heiene R & Lefebvre HP (2007) Assessment of renal function. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology* ed. Elliot, J. & Grauer, G.F., Second Edition: British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 978-0-905214-93-1, pp. 117-125.
- Herrtage ME (2004) Canine Hyperadrenocorticism. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology* ed. Mooney, C.T. & Peterson, M.E., Third Edition; British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 0-905214-72-2, pp. 162-165.
- Hill PB (2002) *Small Animal Dermatology – a practical guide to the diagnosis and management of skin diseases in dogs and cats*, Butterworth Heinemann, Edinburgh, United Kingdom, ISBN: 0-7506-4804-X, pp. 148-176.
- IRIS.- International Renal Interest Society [Acedido a 10 de Maio de 2016, disponível em <http://www.iris-kidney.com/guidelines/index.html>]
- Jensen WA (2012) Immunodiagnostics: Current Use and Future Trends in Veterinary Medicine. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 51-58.
- Johnson MC (2012) Immunologic and Plasma Protein Disorders. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1437706574, pp. 278-293.
- Junqueira LC & Carneiro J (2004). *Histologia Básica*, Décima Edição: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, pp. 1-3.
- Kessler RJ, Reese J, Chang D, Seth M, Hale AS & Giger Urs (2010) Dog erythrocyte antigens 1.1, 1.2, 3, 4, 7, and *Dal* blood typing and cross-matching by gel column technique. doi 10.1111/j.1939-165X.2010.00249.x

- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A & Plevraki KG (1999) Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, **35**: 376-383.
- Krimer PM (2011) Generating and Interpreting Test Results: Test Validity, Quality Control, Reference Values, and Basic Epidemiology. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 365-382.
- Lapin M (2012) Microbiology and Infectious Disease. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, pp. 315-336.
- Levine JM e Levine GJ Neurologic Disorders (2012). In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4377-0657-4, pp. 304-314.
- Lilliehöök I & Tvedten H (2009) Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. *Veterinary Clinical Pathology*, **38** (2): 173, 179-181.
- Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P & Gravino AE (2015) Long-term follow-up of dogs with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. doi: 10.1186/s13071-015-0896-0
- Medleau L, Hnilica KA (2006). *Small Animal Dermatology – A Color Atlas and Therapeutic Guide*, Second Edition: Saunders Elsevier, Missouri, USA, ISBN: 978-0-7216-2825-7, pp.17-18.
- Meinkoth JH, Cowell RL & Tyler RD (2008) Sample Collection and Preparation. In *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat* ed. Cowell, R.L., Tyler, R.D., Meinkoth & J.H., DeNicola, D.B., Third Edition: Mosby Elsevier, Missouri, USA, ISBN: 978-0-323-03422-7, pp. 1-15.
- Metzger FL & Rebar AR (2004a) Three-minute peripheral blood film evaluation: Preparing the film. *Veterinary Medicine*, December, 2004, pp. 3-5.
- Metzger FL & Rebar AR (2004b) Three-minute peripheral blood film evaluation: The leukon. *Veterinary Medicine*, December, 2004, pp. 14-16.
- Metzger FL & Rebar AR (2004c) Three-minute peripheral blood film evaluation: The erythron and thrombon. *Veterinary Medicine*, December, 2004, pp. 8-13.
- Metzger FL & Rebar AH (2008) Liver Disease Case Challenge: Catching it before your patients turn yellow. In Western Veterinary Conference 2008. [Acedido a 25 de Abril de 2016, <http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=3862340&pid=11253&>]
- Meuten D (2012a) Laboratory Evaluation and Interpretation of the Urinary System. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 323-377.
- Meuten D (2012b) Parathyroid Glands and Calcium and Phosphorus Metabolic Pathology. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 545-568.
- Meyer DJ, Connolly S & Hemg HG (2010) The Acquisition and Management of Cytology Specimens. In *Canine and Feline Cytology – A Color Atlas and Interpretation Guide* ed. Raskin, R.E. & Meyer, D.J., Second Edition: Saunders Elsevier, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4160-4985-2, pp. 4-8 e p. 13.

- Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L & Ramis A (2008) Characterization of sex, age and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, **85**: 35-38.
- Mooney CT & Peterson ME (2004) Feline Hypertiroidism. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology* ed. Mooney, C.T. & Peterson, M.E., Third Edition: British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 0-905214-72-2, pp. 100-102.
- Moriello KA, Verbrugge MJ, Kesting RA (2010). Effects of temperature variations and light exposure on the tie to growth of dermatophytes using six different fungal culture media inoculated with laboratory strains and samples obtained from infected cats. *Journal of Feline Medicine Surgery*, **12**(12): 988-990.
- Moriello KA, DeBoer DJ. (2012). Cutaneous Fungal Infections. In *Infectious Diseases of the dog and cat*. Ed. Greene, C.E., 4th edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4160-6130-4, pp. 588-682.
- Mur ES (2012) What's new on canine leishmaniosis? In Proceedings of the Southern European Veterinary Conference & Congreso Nacional AVEPA, 2012 – Barcelona, Spain. [Acedido a 20 de Fevereiro de 2016, disponível em <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2012/lectures/eng/24.pdf>]
- Naby MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramili M, Obare E, Rakitin A, Aguiar J & Relford R (2015) Symmetric dimetilarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **29** (4): 1036-1044.
- Nelson RW (2012) Endocrine, Metabolic, and Lipid Disorders. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1437706574, pp. 156-190.
- Ochoa PG, Perez MG, Hernandez JAC, Curdi JL, Ramos JJZ & Sarasa JIA (2002) Domperidone Against Leishmaniasis: Preliminary Results from First Therapeutic Trial. In WSAVA 2002 Congress. [Acedido a 1 de Maio de 2016, disponível em <http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=3846351&pid=11147&>]
- Oliva G, Nieto J, Manzillo VF, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Carrillo E, Butaud T, Guegan L, Martin V, Cuisinier A, McGahie D, Gueguen S, Cañavate C, Gradoni L. (2014) A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naive Dogs Exposed to Two Leishmania infantum Transmission Seasons. doi:10.1371/journal.pntd.0003213
- Osborne CA & Stevens JB (1999) Urinalysis: A Clinical Guide to Compassionate Patient Care, Bayer Corporation, Kansas, USA, ISBN:1-884254-42-X, pp. 41-44, 71, 123-124, 126-150.
- Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X & Zatelli A (2010) Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **236**: 1184-1191.
- Parry NMA (2013) Diagnosis of hypoadrenocorticism in dogs. doi: 10.1111/j.2044-3862.2012.00224.x
- Peterson ME (2007) Diagnosis of Hyperadrenocorticism in Dogs. doi 10.1053/j.ctsap.2007.02.007
- Peterson ME, Guterl JN, Nichols R & Rishniw M (2015) Evaluation of Serum Thyroid-Stimulating Hormone Concentration as a Diagnostic Test for Hyperthyroidism in Cats. doi: 10.1111/jvim.13585
- Radin MJ & Wellman ML (1998) Interpretación de la Citología Canina y Felina. Clinical Handbook Series, Nestlé Purina PetCare Company, Missouri, USA, pp.7-11. [Acedido a 20 de Julho de 2015, disponível em

http://www.academia.edu/10800015/Libro_Interpretaci%C3%B3n_de_la_Citolog%C3%ADa_Canina_y_Felina

- Rebar AH, Boon GD & Christian JA (2004) Biochemical Profiling in the Dog and Cat. Clinical Handbook Series, Nestlé Purina Petcare Company, Missouri, USA, ISBN: 0-9678005-4-4, pp. 5-6.
- Rebar A, MacWilliams P, Feldman BF, Metzger F, Pollock RVH & Roche J (2004a) Laboratory Methods in Hematology. In *A Guide to Hematology in Dogs and Cats*. Teton Newmedia, Jackson WY. [Acedido a 15 de Junho de 2014, disponível em <http://www.ivis.org/advances/Rebar/Chap3/chapter.asp?LA=1>]
- Rebar A, MacWilliams P, Feldman BF, Metzger F, Pollock RVH & Roche J (2004a) Monocytes: Overview, Quantity, Morphology. In *A Guide to Hematology in Dogs and Cats*. Teton Newmedia, Jackson WY. [Acedido a 15 de Junho de 2014, disponível em <http://www.ivis.org/advances/Rebar/Chap8/chapter.asp?LA=1>]
- Roura X (2013) Prevention of Canine Leishmaniasis: Now and in the Future. In 23rds ECVIM-CA Congress, 2013. [Acedido a 1 de Maio de 2016, disponível em <http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=5889059&pid=11384&>]
- Sabate D, Llinás J, Homedes J, Sust M & Ferrer Lluís (2014) A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Preventive Veterinary Medicine*, **115** (1-2): 56-63.
- Saliki JT (2006) The role of diagnostic laboratories in disease control. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05283.x
- Saridomichelakis MN (2009) Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, **20**: 471-489.
- Shallig HDFH, Cardoso L & Semião Santos SJ (2013) Seroepidemiology of canine leishmaniosis in Évora (southern Portugal): 20-year trends. *Parasites & Vectors*, **6**: 100.
- Sharma A, Sharma M & Chandra S. (2012). Influence of temperature and relative humidity on growth and sporulation of some common dermatophytes. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, **2** (4): 1-6.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G & Baneth G (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, **165**: 1-18.
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G & Baneth G (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, **4**: 86.
- Squires RA (2005) Laboratory evaluation of renal disorders. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology* ed. Villiers, E., Blackwood, L., Second Edition: British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 978-0-9052-1479-5, pp. 169-183.
- Steiner JM (2004) The Good, the Bad and the Ugly: Bacterial Microflora of the Gastrointestinal Tract. In Northeast Veterinary Conference 2004. [Acedido a 25 de Abril de 2016, disponível em <http://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?id=3850498&pid=8710&>]
- Sysmex Corporation (2009) Technical Information. In *Sysmex XT-2000iV/ XT-1800iV Instructions for Use*. Sysmex Corporation, Kobe, Japan, pp. 16-1 – 16-32.
- Tarpley HL e Bounous DI (2011) Digestive System. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 231-252.

- Teske E, Rothuizen J, de Bruijne JJ & Rijnberk, A (1989) Corticosteroid-induced alkaline phosphatase isoenzyme in the diagnosis of canine hypercorticism. *The Veterinary Record*, **125**: 12-14.
- Torrance A (2000) Overview of Haematological Diagnostic Techniques. In *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*, ed. Day, Mackin, M. A. & Littlewood J., British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 0-905214-39-0, pp. 3-17.
- Tripathi NK, Gregory CR & Latimer KS (2011) Urinary System. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 253-282.
- Tvedten H (2010) Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia. In *Schalm's Veterinary Hematology* ed. Weiss, D.J. & Wardrop, K.J., Sixth Edition: Wiley-blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1798-9, pp. 152-161
- Tvedten H & Thomas JS (2012) General Laboratory Concepts. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1437706574, pp. 1-11.
- Tvedten H & Raskin RE (2012) Leukocyte Disorders. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4377-0657-4, pp. 63-91.
- Tvedten H (2012) Hemostatic Abnormalities. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4377-0657-4, pp. 92-111.
- Verde M, Navarro L & Pardo M (2013) Diagnóstico de leishmaniose canina. *Clínica Animal*, **2**: 22-27.
- Verlander JW (2013) Glomerular Filtration. In *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology* ed. Kein, B. G., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4377-2361-8, pp. 460-468.
- Wamsley & Alleman R (2007) Complete Urinalysis. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology* ed. Elliot, J. & Grauer, G.F., Second Edition: British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England, ISBN: 978-0-905214-93-1, pp. 87-116.
- Warren AL (2014) Veterinary Clinical Laboratory Immunology. In *Basic Veterinary Immunology* ed. Callahan, G.N. & Yates, R.W., University Press of Colorado, Colorado, USA, ISBN: 978-1-60732-218-4, pp. 298-317.
- Webb JL & Latimer KS (2011) Leucocytes. In *Duncan & Prasse's Veterinary Laboratory Medicine Clinical Pathology* ed. Latimer, K.S., Fifth Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2014-9, pp. 52-53.
- Weiser G (2012a) Sample Collection, Processing, and Analysis of Laboratory Service Options. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M.A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T.W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 34-39.
- Weiser G (2012b) Laboratory Technology for Veterinary Medicine. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 3-33.
- Weiser G & Allison RW (2012) Perspectives in Laboratory Data Interpretation and Disease Diagnosis. In *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* ed. Thrall, M. A., Weiser, G., Allison, R. W. & Campbell, T. W., Second Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-1027-0, pp. 40-50.
- Weiss DJ & Tvedten H (2012a) The Complete Blood Count, Bone Marrow Examination and Blood Banking – General Comments and Selected Techniques. In *Small Animal Clinical*

Diagnosis by Laboratory Methods ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4377-0657-4, pp. 12-37.

- Weiss DJ e Tvedten H (2012b) Erythrocyte Disorders. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1-4377-0657-4, pp. 38-62.
- Willard MD & Twedt DC (2012) Gastrointestinal, Pancreatic and Hepatic Disorders. In *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* ed. Willard, M.D. & Tvedten, H., Fifth Edition: Elsevier Saunders, Missouri, USA, ISBN: 978-1437706574, pp. 191-225.
- Zajac AM & Conboy GA (2012) *Veterinary Clinical Parasitology*, 8th Edition: Wiley-Blackwell, Iowa, USA, ISBN: 978-0-8138-2053-8, pp. 3-8, 14-15, 187-190.
- Zajac AM & Saleh M (2013) O teste de Baermann: Ensaie este teste de detecção de parasitas na sua clínica. *Veterinary Medicine*, **15** (89): 33-38.

ANEXOS

Anexo 1 – Métodos e técnicas aplicadas durante o período de estágio

Método de Natt-Herrick para hemogramas manuais de aves e répteis

Num tubo *ependorf*, juntam-se 995 µL de corante Natt Herrick com 5 µL de sangue, de modo a obter uma diluição de 1:200, e coloca-se no agitador durante 15 minutos. Com um tubo capilar coloca-se uma gota da solução no bordo da lamela que se encontra sobre a câmara. Coloca-se papel de filtro húmido na base de uma placa de Petri e, sobre ele, a câmara de Neubauer, permitindo o repouso da solução sanguínea, durante pelo menos cinco minutos, e a contagem de células num só plano, para além de evitar a desidratação. Observa-se ao microscópio ótico (Campbell, 2012).

Técnica de esfregaço – Método das duas lâminas

Usando um capilar de microhematócrito, coloca-se uma pequena gota de sangue com EDTA, devidamente homogeneizado, próximo de uma extremidade de uma lâmina de vidro nova. Apoia-se o bordo de uma segunda lâmina à frente da gota de sangue, formando um ângulo de 30° a 45° sobre a primeira, e desliza-se para trás. Assim, que a lâmina de espalhamento toca o sangue, deixa-se que este se disperse ao longo do seu bordo e, com um movimento rápido e suave, empurra-se até ao final da lâmina de apoio, criando um esfregaço longo em forma de bala ou cometa (Harvey, 2012).

O esfregaço é devidamente identificado no canto fosco da lâmina com o nome e código de identificação do animal, e seco ao ar, para depois ser corado com Rapid-Diff II Stain®. Esta é uma coloração rápida do tipo Diff-Quick®, pertencente ao grupo das colorações Romanowsky. É constituída por três soluções, o fixador (metanol), o corante vermelho (solução de eosina) e o corante azul (azul-de-metileno) (Rebar e Metzger, 2001). Depois de convenientemente lavado, para remover o excesso de corantes, é bem seco com o auxílio do secador, de modo a evitar a formação de artefactos (Rebar e Metzger, 2001).

Urianálise tipo I

A urianálise inicia-se com a análise da cor e da turbidez da amostra de urina, após homogeneização cuidada. A turbidez é avaliada com base na facilidade de leitura de uma folha de papel através da amostra urina e classificada em límpida, ligeiramente turva ou turva.

Na urianálise tipo I, determina-se a densidade urinária específica com o auxílio do refratómetro. Os componentes químicos são depois avaliados através da tira urinária, colocando, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, uma gota de urina em cada quadrado da tira, evitando que a urina arraste os reagentes ao longo desta e, escorrendo lateralmente e, de forma rápida, o excesso de urina. A leitura de cada teste deverá ser feita entre 30 e 120 segundos de acordo com as indicações do fabricante. Na presença de uma urina muito pigmentada opta-se por centrifugar a amostra a baixas rotações, usando-se depois o sobrenadante para análise da tira, facilitando assim a leitura dos resultados.

Urianálise tipo II

Coloca-se um volume representativo da amostra de urina, de preferência 3 a 5mL, num tubo de fundo cónico, o qual irá ser submetido a uma centrifugação de 1500rpm, durante 5 minutos. De seguida, remove-se o sobrenadante com uma pipeta, permitindo que cerca de 0,5mL permaneçam no fundo do tubo. Com o auxílio da pipeta, ressuspende-se o sedimento no sobrenadante remanescente, e transfere-se uma gota para uma lâmina de vidro, cobrindo-se depois com uma lamela quadrada. A observação ao microscópio ótico é feita, sem qualquer corante, com o diafragma fechado para criar contraste.

Técnica de squash para espalhamento de amostras citológicas

Coloca-se uma pequena quantidade de amostra na extremidade de uma lâmina de vidro e apoia-se uma segunda lâmina perpendicular a esta, de forma a comprimir suavemente o material entre as duas, fazendo-se deslizar esta última sobre a primeira, permitindo o espalhamento e redistribuição do material ao longo da lâmina inicial.

Técnica de flutuação

Com o auxílio da vareta, coloca-se uma pequena quantidade de fezes (três a cinco gramas) num gobelé, adiciona-se cerca de 15 mL de solução de sulfato de zinco a 45% e mistura-se bem até dissolução completa. Transfere-se o conteúdo do gobelé, através de um funil revestido com gaze, para um tubo de fundo cônico, o qual é colocado a centrifugar a 1500 rpm, durante cinco minutos. Após a centrifugação, perfaz-se o tubo com a solução de flutuação até formar um menisco convexo e coloca-se uma lamela por cima. Aguarda-se cerca de 30 minutos para que todo o material parasitário flutue junto à lamela, a qual é depois colocada sobre uma gota de soluto de Lugol, aplicada previamente numa lâmina de vidro devidamente identificada (figura 10). A observação microscópica é feita com a objetiva de 10x, podendo recorrer-se à objetiva de 20x ou de 40x para confirmar ou descartar a presença de determinada forma parasitária.

Pesquisa de *Cryptosporidium* e *Giardia* – Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada

Faz-se um esfregaço fecal e deixa-se secar ao ar. Fixa-se em metanol durante três minutos, depois cobre-se a lâmina com fucsina carbólica forte e deixa-se atuar durante 15 a 20 minutos. Remove-se totalmente o corante com água corrente. Cobre-se a lâmina com metanol com 1% HCl durante 15 a 20 segundos. Lava-se bem com água corrente. Adiciona-se verde malaquite a 0,4% durante 30 a 60 segundos e volta a lavar-se minuciosamente com água da torneira. Deixa-se secar ao ar e observa-se ao microscópio ótico recorrendo às objetivas de 40x e 100x.

Técnica de Baermann

Embrulha-se uma pequena quantidade de fezes numa gaze ou compressa e coloca-se dentro de um passador, o qual é colocado no funil do aparelho de Baermann. Coloca-se uma ponta de pipeta de 1 mL na extremidade inferior do tubo do aparelho, a qual é hermeticamente fechada. Enche-se com água a 37°C e deixa-se repousar durante 8 horas. De seguida, abre-se cuidadosamente o fecho do tubo e recolhe-se a primeira gota que sai da ponta de pipeta para uma lâmina de vidro. Cobre-se com uma lamela quadrada (24x50mm) e observa-se ao microscópio ótico com as objetivas de 4x ou 10x.

Técnica de Knott

Num tubo de fundo cônico mistura-se 1 mL de sangue com EDTA com 9 mL de formol a 2%. Coloca-se a agitar no agitador mecânico até a solução ficar límpida. Centrifuga-se a 1500rpm, rejeita-se o sobrenadante e reconstitui-se o sedimento para recolher uma gota para uma lâmina de vidro. Junta-se uma gota de Novo azul-de-metileno para criar contraste. Coloca-se uma lamela e observa-se ao microscópio ótico com a objetiva de 10x.