

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EMPREGO DA FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS (IPF) E DA
CONTAGEM DE MEGACARIÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA NO
DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM TROMBOCITOPENIA.

KATIANE LOHN DE SOUZA

BOTUCATU, SP

Julho, 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EMPREGO DA FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS (IPF) E DA
CONTAGEM DE MEGACARIÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA NO
DIAGNÓSTICO DE PACIENTES CANINOS COM
TROMBOCITOPENIA.

KATIANE LOHN DE SOUZA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Professora Titular Regina Kiomi Takahira

BOTUCATU, SP

Julho, 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Souza, Katiane Lohn de.

Emprego da Fração de Plaquetas Imaturas (IPF) e da contagem de megacariócitos na medula óssea no diagnóstico de cães com trombocitopenia / Katiane Lohn de Souza. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Regina Kiomi Takahira

Capes: 50503030

1. Hematologia. 2. Medula óssea. 3. Megacariócitos. 4. Plaquetas.

Palavras-chave: Hematologia; Medula óssea; Megacariócitos; Plaquetas imaturas; Plaquetas reticuladas.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Título da Dissertação - Emprego da Fração de Plaquetas Imaturas (IPF) e da Contagem de Megacariócitos na Medula Óssea no Diagnóstico de Cães com Trombocitopenia.

Impacto científico esperado: Validação de um novo método diagnóstico pouco invasivo para trombocitopenia que acomete entre outras espécies, os cães, impactando de forma importante o diagnóstico e prognóstico dos pacientes.

Impacto social: Este método diagnóstico permitirá, direcionar o diagnóstico de forma menos invasiva, precoce e onerosa aos responsáveis do paciente, além de melhor monitoramento terapêutico e prognóstico.

Impacto econômico: A diminuição do custo aliada à efetividade do método na escolha do tratamento e com isso, uso racional dos recursos destinados à saúde.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Title of project - Use of Immature Platelet Fraction (IPF) and Bone Marrow Megakaryocyte Count in the Diagnosis of Dogs With Thrombocytopenia.

Expected scientific impact: Validation of a new, less invasive diagnostic method for thrombocytopenia in dogs, among other species, significantly impacting the diagnosis and prognosis of patients.

Social impact: This diagnostic method will allow directing the diagnosis in a less invasive and costly way to the patient's guardians, in addition to better therapeutic monitoring and prognosis.

Economic impact: The best cost effectiveness of the method in choosing the treatment and with this, rational use of resources destined for health.

Nome da autora: Katiane Lohn de Souza

Título: EMPREGO DA FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS (IPF) E DA
CONTAGEM DE MEGACARIÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA NO DIAGNÓSTICO
DE PACIENTES CANINOS COM TROMBOCITOPENIA

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Titular Regina Kiomi Takahira
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Dra. Samantha Ive Myashiro
Membro titular
Tecs Laboratórios
Belo Horizonte, MG

Prof Titular Nayro Xavier de Alencar
Membro titular
Departamento de Patologia e Clínica Veterinária
Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói, RJ.

Data da defesa: 03 de julho de 2024.

AGRADECIMENTOS

Não sou uma pessoa religiosa no sentido de participar ativamente de alguma religião ou igreja, mas não há como agradecer a Deus a oportunidade de poder estar aqui escrevendo esta dissertação, de poder me ofertar ferramentas e de me fazer enxergar oportunidades nas quais eu utilizei para chegar até aqui.

A família sempre é a base de tudo. Sempre agradeço meus pais por me proporcionarem asas para voar tão longe, seja na graduação que já fiz em uma cidade distante deles, quanto para voos mais longos, como a residência e agora, na minha vida profissional e na pós-graduação.

Agradeço também à família que eu e Michael estamos construindo. Ele sempre é meu maior incentivador, me impulsionando para aceitar novos desafios, por acreditar no meu potencial, por me dar o suporte necessário para tal e por ter paciência e bom humor para superar os momentos de estresse. Nessa reta final, tudo isso tem sido ainda mais importante, ainda mais que além de estar escrevendo esta dissertação, estamos aqui esperando a chegada do nosso Pedrinho.

Agradeço a FMVZ-Unesp – Campus de Botucatu, que mais uma vez está sendo minha casa durante minha trajetória acadêmica. Agradeço a todos os professores que acompanhei durante esta etapa. Todos trouxeram muitas informações que me fizeram construir este trabalho, especialmente professor Pantoja que me fez perder o “trauma” da estatística que adquiri na graduação e me fez admirar e entender este conteúdo. A equipe da Seção Técnica da Pós-graduação, sempre solícitos e ágeis, além de toda a coordenação do curso, através da professora Reneé, sempre extremamente educada e profissional.

Um agradecimento mais que especial a minha orientadora, professora Regina Takahira que aceitou me orientar, mesmo à distância, visto que rodamos todo o nosso projeto fora de Botucatu. Já são 14 anos (contando estágio, residência e agora o mestrado) que tenho a oportunidade de conviver e poder ser orientada de uma das profissionais e pessoas mais queridas e respeitadas da Patologia Clínica Veterinária nacional e até mesmo internacional. Tenho enorme orgulho em poder ser sua orientada.

Ao Provet, por meio do Rubem Montoni Júnior, que me permitiu executar meu projeto utilizando a rotina e toda estrutura laboratorial de ponta que este laboratório de excelência tem a oferecer e especialmente ao Ricardo Duarte Lopes, que junto à professora Regina, plantou a sementinha deste projeto, além de ser um grande apoiador e praticamente um coorientador. Suas dicas e pontos a discutir no trabalho foram de total importância para o enriquecimento desta dissertação.

Aos meus amigos do Provet, especialmente Lilia que colheu uma boa parte das medulas da rotina e entregava os termos do projeto para os responsáveis assinarem. As anestesistas Bárbara e Lilian sempre parceiras nas colheitas, das mais tranquilas as mais desafiadoras e as “meninas da bancada” Eleiza, Déborah, Jana, Celina, Silvana e Yoná que sempre ficaram de olho em potenciais pacientes para o meu projeto. Eleiza e Déborah tem um agradecimento especial pois, me auxiliaram colhendo medulas, lendo e revisando as lâminas e laudos dos pacientes que fizeram parte deste trabalho.

A minha “hemocitossócia”, Mariana Rossi, que também auxiliou na revisão, leu lâminas de muitos casos de mielograma que estão aqui nesta dissertação, agradeço por acreditar no meu trabalho e me estimular a ter novos desafios.

Aos meus amigos de residência e da vida, Lesma, Bob, Poka, Carol Kimie e especialmente Thiaguete e Carol Martins, graças as conversas de incentivo que tivemos algumas vezes que este projeto de mestrado está sendo finalizado.

Aos amigos Priscila, Chaiane, Ana Paula, Ana Maira, Luiza e “Tailândia” por fazerem parte da minha vida e acreditarem no meu potencial.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance Code 001”

SUMÁRIO

RESUMO	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	19
2.1 Trombopoiese	20
2.2 Trombocitopenia	22
2.2.1 Trombocitopenia imunomediada (TIM)	23
2.3. Contagem de megacariócitos na medula óssea	25
2.4. Plaquetas reticuladas em cães	25
3. OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Comissão de Ética	28
4.2 Delineamento amostral	28
4.3 Critérios de exclusão de pacientes	29
4.5 Colheita de medula óssea	30
4.6 Análises laboratoriais	31
4.6.1 Hemograma e mielograma	31
4.7 Análise estatística	35
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	50
6.1 Celularidade da medula óssea	51
6.2 Diferentes técnicas de quantificação de megacariócitos na medula óssea	51
6.3 Contagem de plaquetas e megacariócitos	53
6.4 Fração de plaquetas imaturas e megacariócitos	53
6.5 Volume plaquetário médio e IPF	57
6.6 Trombocitopenia imunomediada e IPF	58
7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS	61
Anexo 1	69
ARTIGO CIENTÍFICO	82

LISTA DE ABREVIATURAS

%: porcentagem

μL: microlitro(s)

AUC: Área sob a curva

CKCS: Cavalier King Charles Spaniel

EPO: eritropoietina

fL: fentolitro

Flt3L: *FMS Like Tyrosine Kinase 3 Ligand*

FSC: *forward scattered light*

GM – CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

IG: Imunoglobulina

IL: Interleucina

IPF: Fração de Plaquetas Imaturas

IPF (%) Fração de Plaquetas Imaturas Relativa

IPF (#): Contagem absoluta de Plaquetas Imaturas

IV: intravenoso

Kg: quilograma(s)

Mk: megacariócito

mL: mililitro(s)

nº: número

PI: plaqueta(s) imatura(s)

PLT: plaqueta(s)

PR: plaqueta(s) reticulada(s)

PR (%): plaqueta reticulada relativa

PR (#): plaqueta reticulada absoluta

ROC: *Receiver Operating Characteristic*

SCF: *stem cell factor*

SFL: *side fluorescent light*

TIM: trombocitopenia imunomediada

TO: *Tiazole Orange*

TPO: trombopoietina

VPM: Volume plaquetário médio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatísticas descritivas (média e desvio padrão) entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.	35
Tabela 2 - Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a contagem de megacariócitos por campo entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.	35
Tabela 3 - Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a contagem de megacariócitos por espícula entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.	36
Tabela 4 - Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a contagem plaquetária entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.	36
Tabela 5 - Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a fração de plaquetas imaturas (%) entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.	36
Tabela 6 - Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a contagem absoluta da fração de plaquetas imaturas entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.	37
Tabela 7 - Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para o VPM entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.	37

Tabela 8 - Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a celularidade medular entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.	37
Tabela 9 - Coeficientes de correlação de Pearson entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024.	38
Tabela 10 - Coeficientes de correlação de Pearson entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024. N=52.	43
Tabela 11 - Coeficientes de correlação de Pearson no grupo I (normoplasia megacariocítica) entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024. N=20.	44
Tabela 12 - Coeficientes de correlação de Pearson no grupo II (hiperplasia megacariocítica) entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024. N=18	44
Tabela 13 - Coeficientes de correlação de Pearson no grupo III (hipoplasia megacariocítica) entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024. N=14	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema demonstrando a estaca maturativa dos megacariócitos por meio de endomitoses. Fonte: arquivo pessoal. 20
- Figura 2** - Colheita de medula óssea em úmero proximal com agulha tipo Illinois (à esquerda). Medula óssea depositada em placa de Petri com diversas espículas que serão capturadas (setas) para confecção das lâminas (à esquerda). 30
- Figura 3** - Gráfico de dispersão gerado no canal de plaquetas fluorescentes pelo equipamento Sysmex XN-V (Kobe, Japão), onde é determinado o parâmetro IPF. A área em verde limão (seta) demonstra a quantidade de plaquetas jovens. 31
- Figura 4** - Paciente com contagem plaquetária normal (308.000/ μ L) e IPF 0,8% (A). Paciente trombocitopênico (140.000/ μ L) e IPF 21,6% (B). 32
- Figura 5** - Campo de 100x demonstrando a ausência de megacariócitos tanto nas espículas, quanto no campo, sugerindo hipoplasia megacariocítica. 33
- Figura 6** - Campo de 100x demonstrando a presença de 5 megacariócitos nas espículas e 9 no campo, sugerindo normoplasia megacariocítica. 33
- Figura 7** - Campo de 100x demonstrando a presença de 36 megacariócitos nas espículas (imagem à esquerda) e cerca de 50 no campo (imagem à direita), sugerindo hiperplasia megacariocítica. 34
- Figura 8** - Distribuição da contagem de megacariócitos por campo entre os três grupos amostrados. Hiper: cães com hiperplasia de

megacariócitos (Grupo II); hipo: cães com hipoplasia de megacariócitos (Grupo III); n: = cães com normoplasia de megacariócitos (Grupo I). 39

Figura 9 - Distribuição da contagem de megacariócitos por espícula entre os três grupos amostrados. Hiper: cães com hiperplasia de megacariócitos (Grupo II); hipo: cães com hipoplasia de megacariócitos (Grupo III); n: = cães com normoplasia de megacariócitos (Grupo I). 40

Figura 10 - Distribuição do IPF (%) entre os três grupos amostrados. Hiper: cães com hiperplasia de megacariócitos (Grupo II); hipo: cães com hipoplasia de megacariócitos (Grupo III); n: = cães com normoplasia de megacariócitos (Grupo I). 41

Figura 11 - Distribuição do IPF absoluto entre os três grupos amostrados. Hiper: cães com hiperplasia de megacariócitos (Grupo II); hipo: cães com hipoplasia de megacariócitos (Grupo III); n: = cães com normoplasia de megacariócitos (Grupo I). 42

Figura 12 - Correlação ($r= 0,946$) entre as contagens de megacariócitos por diferentes técnicas (por campo e por espículas). 46

Figura 13 - Correlação ($r= 0,26$) entre as contagens de megacariócitos por campo e IPF (%). 46

Figura 14 - Correlação ($r= 0,22$) entre as contagens de megacariócitos por espícula e IPF (%). 47

Fugura 15 - Correlação ($r= 0,75$) entre IPF(%) e IPF absoluto. 47

Figura 16 - Curva ROC de IPF (#) utilizando os valores dos 2 grupos trombocitopênicos demonstrando uma área sobre a curva de 0,709, 48

p=0,019 com valor geral do modelo de 0,53 e um ponto de corte de 15700.

Figura 17 - Curvas ROCs IPF absoluto (linha vermelha) e IPF (%) (linha azul) utilizando os valores dos 2 grupos trombocitopênicos demonstrando para IPF (#) uma área sobre a curva de 0,709, p=0,019 com valor geral do modelo de 0,53 e um ponto de corte de 15700 μ L e para IPF (%) de 0,703, p=0,022 com valor geral do modelo de 0,53 e um ponto de corte de 19,5%.

SOUZA, K.L. EMPREGO DA FRAÇÃO DE PLAQUETAS IMATURAS (IPF) E DA CONTAGEM DE MEGACARIÓCITOS NA MEDULA ÓSSEA NO DIAGNÓSTICO DE CÃES COM TROMBOCITOPENIA. Botucatu, 2024. 70p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO

A contagem de megacariócitos na medula é indicada para avaliar a trombopoiese em resposta a uma trombocitopenia imunomediada (TIM). Entretanto, existem dificuldades em relação a colheita e qualidade da amostra e de padronização da contagem de megacariócitos. A Fração Imatura de Plaquetas (IPF) avalia a fração de plaquetas jovens no sangue periférico sendo uma ferramenta que pode prever a resposta medular frente a trombocitopenia de forma não invasiva e acurada. O objetivo deste trabalho foi comparar as diferentes técnicas de contagem de megacariócitos na medula óssea e sua correlação com a determinação do parâmetro IPF para validá-lo como ferramenta de rotina hematológica para diagnóstico e monitoramento de pacientes com TIM. Foram avaliados 18 cães saudáveis sem alterações no hemograma e mielograma, 20 animais com trombocitopenia ($<150.000/\mu\text{L}$) com hiperplasia megacariocítica e diagnóstico presumido de TIM e 14 animais com trombocitopenia e hipoplasia megacariocítica. Foi colhido sangue para realização do hemograma e determinação do parâmetro IPF e colheita de medula de óssea para quantificação de megacariócitos por duas técnicas e correlação com o parâmetro IPF. A correlação entre as duas técnicas de contagem de megacariócitos foi elevada ($p<0,001$). Há diferença significativa ($p<0,0028$) no IPF relativo apenas entre animais saudáveis e com hiperplasia megacariocítica. Para o IPF absoluto, houve diferença apenas entre o grupo de pacientes saudáveis e com hipoplasia megacariocítica ($p=0,014$). Não houve correlação entre IPF absoluto e relativo e megacariócitos medulares. A ausência de correlação observada não nos permite estabelecer relações de contagem de IPF com o aumento do número de megacariócitos.

Palavras-chave: Hematologia, Megacariócitos, Medula óssea, Plaquetas imaturas, Plaquetas reticuladas.

SOUZA, K.L. USE OF IMMATURE PLATELET FRACTION (IPF) AND BONE MARROW MEGAKARYOCYTE COUNT IN THE DIAGNOSIS OF DOGS WITH THROMBOCYTOPENIA. Botucatu, 2024. 70p. Dissertação, (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ABSTRACT

The megakaryocyte count in the bone marrow is indicated to evaluate thrombopoiesis in response to immune-mediated thrombocytopenia (IMT). However, there are difficulties in relation to sample collection, quality and standardization of megakaryocyte counts. The Immature Platelet Fraction (IPF) evaluates the fraction of imature platelets in peripheral blood and is a tool that can predict the bone marrow response to thrombocytopenia in a non-invasive way. The objective of this paper was to compare the different techniques for counting megakaryocytes in bone marrow and their correlation with the determination of the IPF parameter to validate it as a routine hematological tool for diagnosing and monitoring patients with IMT. 18 healthy dogs without changes in blood count and bone marrow analysis were evaluated, 20 animals with thrombocytopenia ($<150,000/\mu\text{L}$) with megakaryocytic hyperplasia and presumed diagnosis of TIM and 14 animals with thrombocytopenia and megakaryocytic hypoplasia. Blood was collected to perform the blood count and determine the IPF parameter and bone marrow collection to quantify megakaryocytes using two techniques and correlation with the IPF parameter. The correlation between the two megakaryocyte counting techniques was high ($p<0.001$). There is a significant difference ($p<0.0028$) in the relative IPF only between healthy animals and those with megakaryocytic hyperplasia. For the absolute IPF, there was a difference only between the control group and the group with megakaryocytic hypoplasia ($p=0.014$). There was no correlation between absolute and relative IPF and medullary megakaryocytes. The lack of correlation does not allow us to establish relationships between IPF counts and the increase in the number of megakaryocytes.

Keywords: Hematology, Megakaryocytes, Bone marrow, Reticulated platelets, Thrombocytopenia

1 INTRODUÇÃO

A trombocitopenia em cães é uma das alterações hematológicas mais frequentes na rotina laboratorial. Os mecanismos de resposta medular à trombocitopenia podem ser classificados em três grupos principais: trombocitopenia com aumento da trombopoiese; trombocitopenia com trombopoiese normal ou diminuída; trombocitopenia por sequestro anormal de plaquetas (PANKRAZ, *et al.*, 2009).

A trombocitopenia imunomediada (TIM) é uma das causas mais comuns de trombocitopenia e pode ter origem primária ou secundária a processos inflamatórios, neoplásicas, medicamentos, entre outras.

O diagnóstico de TIM geralmente é dado pela associação dos achados do hemograma, associado ao mielograma que pode apresentar hiperplasia da série megacariocítica, ou hipoplasia, quando a destruição é direcionada aos megacariócitos. Outros exames também são necessários para exclusão de outras causas de trombocitopenia ou definição de uma causa de base (infecciosas ou inflamatórias) quando a TIM é secundária. (NELSON e COUTO, 2023).

O mielograma é indicado nos casos de citopenias periféricas persistentes, sem causa extramedular definida. Em casos de pacientes com suspeita de TIM é uma ferramenta diagnóstica que pode auxiliar no seu diagnóstico quando há hiperplasia de megacariócitos medulares e exclusão de outras causas que justifiquem a trombocitopenia.

Para avaliação da trombopoiese fazemos a análise quantitativa e morfológica dos megacariócitos. Entretanto, esta avaliação é muito subjetiva e possui muitas variações de acordo com o modo de confecção das lâminas e experiência do profissional (MYLONAKIS, *et al.*, 2005).

Há formas não invasivas que tentam avaliar de forma indireta a trombopoiese. Uma delas é a quantificação de plaquetas reticuladas no sangue periférico. Estas são plaquetas jovens recém liberadas na circulação. A porcentagem de plaquetas reticuladas pode ser utilizada como um teste não invasivo para prever e monitorar a trombopoiese em cães ao invés de avaliar

a megacariocitopoiese que é uma metodologia subjetiva, lenta e que requer profissional qualificado (WEISS, 1998; OLLERS, 2016). A quantificação das plaquetas reticuladas pode ser realizada por citometria de fluxo de sangue periférico corado com *Tiazole Orange* ou de forma automatizada por meio de contadores hematológicos baseados em citometria de fluxo.

O parâmetro IPF (Fração de Plaquetas Imaturas) é uma segunda forma de quantificar as plaquetas reticuladas no sangue periférico por meio de contadores hematológicos automatizados de forma simples, rápida, sem a necessidade de cuidados adicionais na colheita e armazenamento, além de não necessitar preparo prévio da amostra para seu processamento (BUTARELLO, 2020).

O objetivo deste trabalho é avaliar a Fração de Plaquetas Imaturas (IPF), como um método não invasivo para avaliar a trombopoiese em cães, comparando os diferentes métodos de contagem de megacariócitos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Trombopoiese

A trombopoiese é o mecanismo fisiológico de produção das plaquetas (THRALL, 2015). As plaquetas dos mamíferos são produzidas de grandes células “multinucleadas” chamadas megacariócitos (HARVEY, 2012). Estas células são derivadas de uma célula tronco bipotencial eritroide e megacariocítica (BROOKS, *et al*, 2022). As plaquetas são as principais células envolvidas na hemostasia primária dos animais, mas também participam da hemostasia secundária e de processos inflamatórios (ZACHARY, 2021).

Os megacariócitos são produzidos principalmente na medula óssea, assim como em outros sítios hematopoieticos como o baço. Durante os estágios iniciais do desenvolvimento dos megacariócitos, as células progenitoras sofrem divisão celular típica e à medida que adquirem especificidades de linhagem, em estágios posteriores de desenvolvimento, os megacariócitos iniciam várias endomitoses (Figura 1)., processo no qual anáfase, telófase e citocinese são ignoradas, resultando na divisão do DNA sem divisão celular. (BROOKS, 2022). Geralmente 2 a 5 reduplicações (endomitoses) nucleares ocorrem resultando em 8 a 64 conjuntos de cromossomos (8N - 64N) em megacariócitos maduros, em

comparação com dois conjuntos de cromossomos (2N) na maioria das células do corpo (HARVEY, 2012).

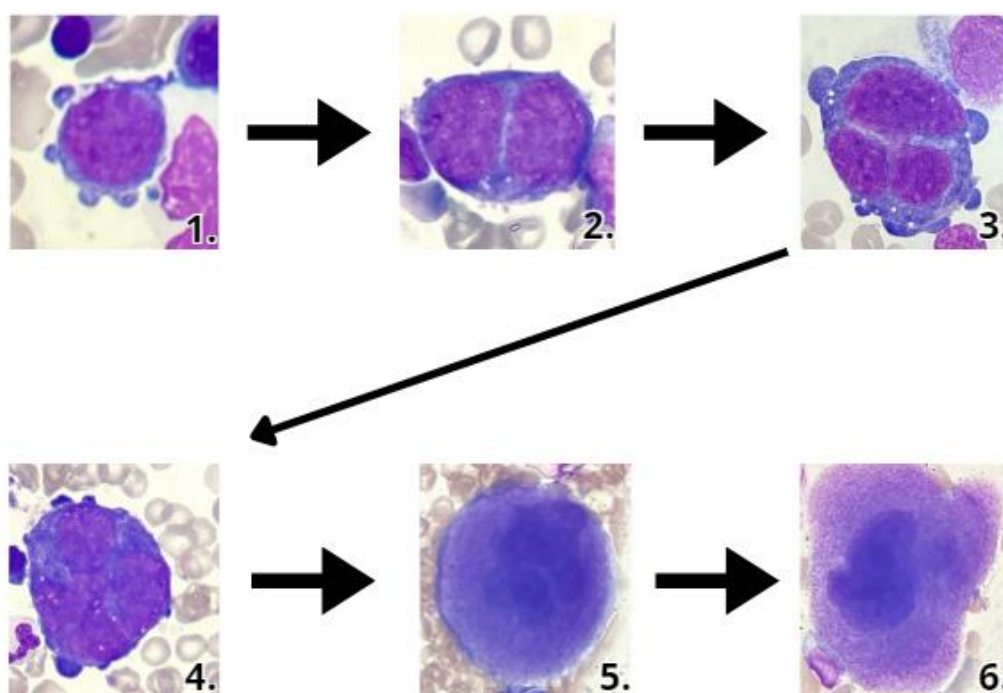


Figura 1. Esquema demonstrando a escala maturativa dos megacariócitos por meio de endomitoses. 1. Megacarioblasto; 2. Promegacariócito com 2 núcleos; 3. Promegacariócito com 4 núcleos, 4. Megacariócito imaturo; 5. Megacariócito maduro. Fonte: arquivo pessoal. Coloração: Wright, Giemsa, Leishman. Aumento: 1000x.

Várias citocinas podem estimular ou aumentar a proliferação e expansão de células progenitoras de megacariócitos. Fatores que podem estar envolvidos incluem *stem cell factor* (SCF), FMS Like Tyrosine Kinase 3 Ligand (Flt3L), Interleucina 3 (IL-3), *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), Interleucina 11 (IL-11) e eritropoietina (EPO). A trombopoietina (TPO) é o principal estimulador da produção de plaquetas, estimulando a proliferação de megacariócitos, sobrevivência e tamanho (ploidia). A TPO também aumenta transitoriamente a resposta agregatória das plaquetas aos agonistas. Cada megacariócito é capaz de gerar até três mil plaquetas (KAUSHANSKI, 2008).

Os megacariócitos estão próximos aos sinusoides venosos, estendem suas projeções citoplasmáticas para os lúmens vasculares e liberam fragmentos

citoplasmáticos ligados à membrana (plaquetas) na circulação sanguínea. A eliminação ordenada de plaquetas é parcialmente facilitada pelos microtúbulos de $\beta 1$ -tubulina dentro dos megacariócitos (ZACHARY, 2022).

Embora várias células de vários tecidos possam produzir TPO, incluindo células do estroma renal e células da medula óssea, os principais locais de produção de TPO parecem ser as células endoteliais do fígado. A quantidade de TPO produzida no corpo parece ser relativamente constante. Receptores de TPO (receptores c-Mpl) presentes nas plaquetas circulantes e em megacariócitos em maturação podem ligar, internalizar e degradar a TPO, fornecendo feedback negativo sobre a produção de plaquetas. Consequentemente, a concentração sanguínea de TPO se eleva em caso de trombocitopenia resultante de hipoplasia megacariocítica. Em contraste, as concentrações sanguíneas de TPO são muito menores em pacientes com trombocitopenia imunomediada pois há hiperplasia megacariocítica medular, além de ocorrer uma rápida renovação plaquetária, resultando em aumento da ligação e remoção de TPO do sangue (HARVEY, 2012).

2.2 Trombocitopenia

A trombocitopenia é a diminuição da contagem plaquetária no sangue sendo uma alteração hematológica comum em cães (WEISS, 1999; REBAR *et al.*, 2003).

As trombocitopenias podem ser classificadas em cinco grupos de acordo com a sua fisiopatogenia e quantificação da série megacariocítica na medula óssea: trombocitopenia por diminuição da meia vida das plaquetas com aumento da trombopoiese; trombocitopenia por destruição de plaquetas maduras em nível periférico ou medular, também com aumento da trombopoiese em grande parte dos casos, especialmente se a destruição for direcionada à plaquetas maduras circulantes; trombocitopenia por sequestro anormal de plaquetas, encarceramento esplênico ou consumo em casos de sangramento, com trombopoiese normal ou diminuída, trombocitopenias congênitas antes consideradas raras, são agora identificadas com frequência crescente. Esses distúrbios plaquetários são reconhecidos não apenas com base na contagem de plaquetas (estimativa automatizada e manual), volume plaquetário médio (VPM),

morfologia plaquetária, mas também utilizando testes moleculares. A análise hematológica de rotina usando analisadores hematológicos automatizados frequentemente detecta trombocitopenia de gravidade variável em certas raças de cães, ou seja, Cavalier King Charles Spaniels (CKCS), Cairn e Norfolk Terriers, Greyhounds e Akita Inu (SINGH, *et al*, 2005; CORTESE, 2020,) e ainda um quinto grupo, as pseudotrombocitopenias por erros pré-analíticos na obtenção da amostra sem alterações na trombopoiese (PANKRAZ, *et al.*, 2009; DONATO, 2021).

Tanto as pseudotrombocitopenia quanto as trombocitopenias raciais são causas não patológicas que devem ser levadas em consideração ao excluir causas de trombocitopenia durante a avaliação do paciente (ŽMIGRODZKA, *et al.*, 2014; NELSON E COUTO, 2023).

Entre os sinais clínicos mais comuns em cães com trombocitopenia, estão petéquias e/ou equimoses, sangramento de mucosas (epistaxe e sangramentos gastrintestinais que geram hematoquezia ou melena), hematúria, hifema e sangramentos prolongados secundários a traumatismos. Sua gravidade é variável em relação a magnitude da trombocitopenia e o grau de disfunção plaquetária (NEEL, 2010; STOCKHAM E SCOTT, 2011).

2.2.1 Trombocitopenia imunomediada (TIM)

Entre as principais condições associadas à trombocitopenia incluem doenças infecciosas, imunomediadas, neoplásicas ou uma miscelânea dessas (WEISS, 1999).

A TIM é a principal causa de trombocitopenia acentuada em cães (CORTESE, 2020).

A trombocitopenia imunomediada pode ser de origem primária ou secundária. As trombocitopenias primárias são idiopáticas, não sendo definido um agente causal. A principal classe de anticorpos associada a TIM é a imunoglobulina G (IgG). (CORTESE, 2020) A TIM caracteriza-se pela ligação de imunoglobulinas a receptores de superfície plaquetária levando a precipitação das glicoproteínas (GP) Ib (Fator de von Willebrand) e IIb/IIIa (receptor de fibrinogênio) em cães (NEEL, *et al*, 2010). A presença de anticorpos

antiplaquetários acelera a remoção e destruição das plaquetas pelo sistema mononuclear fagocítico (STOCKHAM E SCOTT, 2011).

O diagnóstico de TIM primária é estabelecido pela exclusão de outras causas de trombocitopenias (SCHWARTZ, *et al*, 2014).

Cadelas, especialmente das raças Cocker Spaniel Poodles, Pastor Alemão e Old English Sheepdog são super-representadas, sugerindo uma predisposição genética (NELSON E COUTO, 2023).

As trombocitopenias secundárias aparecem como consequência de uma condição prévia. Doenças infecciosas, neoplasia, drogas e transfusões sanguíneas são citados como fatores desencadeantes (CORTESE, 2020). Sobre as causas infecciosas, foram identificados anticorpos que podem se ligar às plaquetas em cães com dirofilariose, angiostrongilose e babesiose (em cães naturalmente infectados por *Babesia canis* ou experimentalmente por *B. gibsoni*) (WILKERSON, *et al*, 2001; GOODARD, 2015).

Os sinais clínicos são aqueles de um defeito hemostático primário e incluem petéquias, equimoses e sangramentos de mucosa. A TIM é de início agudo ou hiperagudo em cães. O hemograma de cães com TIM é caracterizado por trombocitopenia moderada a acentuada, com ou sem anemia, dependendo do grau de hemorragia espontânea e a presença ou ausência de anemia hemolítica imunomediada (AHIM) concomitante (NELSON E COUTO, 2023).

Segundo Stockham e Scott (2011), uma variedade de testes especializados foram desenvolvidos para ajudar no diagnóstico de TIM canina. Como a patogênese envolve a adesão de anticorpos antiplaquetários a antígenos na superfície plaquetária, a detecção de anticorpos ligados às plaquetas pode confirmar o diagnóstico. (SCHWARTZ, 2014). Entretanto, este teste não está facilmente disponível na rotina e apesar de sensível, ainda possui baixa especificidade para detecção de TIM primária em cães. O diagnóstico permanece principalmente o de exclusão (SCOTT, 2011, SCHWARTZ, 2014).

O diagnóstico da TIM é difícil, geralmente realizado por exclusão (JEON, *et al.*, 2019). O mielograma pode ser realizado como uma ferramenta para direcionamento do diagnóstico de TIM (LEVINE e BROOKS, 2019). A avaliação da medula óssea tipicamente revela hiperplasia megacariocítica, embora hipoplasia pode ser ocasionalmente encontrada (NELSON E COUTO, 2023).

Na medicina veterinária, quando a colheita de medula óssea não é possível, PANKRAZ, *et al.*, (2009) compararam as contagens de plaquetas jovens por citometria de fluxo e plaquetas reticuladas em pacientes saudáveis e trombocitopênicos. Foi observado aumento nas frações plaquetárias imaturas em cães com trombocitopenia hiperproliferativa; no entanto, com tempo curto de estabilidade da amostra (<18 horas) e elevados coeficientes de variação. BACHMAN, *et al.*, (2015), juntamente a testes de anticorpos conseguiram distinguir pacientes com TIM primária de outras causas de trombocitopenia com alta sensibilidade, porém baixa especificidade.

2.3 Contagem de megacariócitos na medula óssea

As indicações mais comuns para citologia de medula óssea são a observação de uma ou mais citopenias no sangue periférico sem uma causa de base conhecida (RASKIN e MESSICK, 2012).

A quantificação e morfologia dos megacariócitos deve ser realizada em áreas que contém espículas ósseas em menor aumento (utilizando objetiva de 10x). Entretanto, estas células não estão uniformemente distribuídas na medula óssea, consequentemente, é difícil estimar a contagem de megacariócitos de forma acurada (HARVEY, 2012, RASKIN e MESSICK, 2012).

As publicações que avaliam a contagem de megacariócitos em pacientes sadios variam consideravelmente de acordo com a preparação das lâminas (*squash* de uma gota ou espícula, ou esfregaço) e pela metodologia de quantificação destas células (megacariócitos/campo ou megacariócitos/espícula) (MYLONAKIS, *et al.*, 2005).

A contagem relativa de megacariócitos em relação ao total de células nucleadas na amostra não é indicada porque proporcionalmente estas células estão em pequena quantidade na medula óssea e são facilmente identificadas nas lâminas no menor aumento (MYLONAKIS, *et al.*, 2005).

2.4 Plaquetas reticuladas em cães

As plaquetas reticuladas são plaquetas jovens recém liberadas na circulação. Foram descritas pela primeira vez em 1969, por microscopia óptica, em amostra corada com azul de metileno em um paciente canino com perda

aguda de sangue (COOPERSMITH, 1969; JORNET-RIUS, *et al*, 2023). Elas são maiores, possuem elevada concentração de RNA para síntese proteica, sendo comparadas aos reticulócitos das hemácias e podem ser detectadas através de citometria de fluxo e alguns analisadores hematológicos (DALE, 1995; SMITH, 2002; STOCKHAM E SCOTT, 2011).

As plaquetas imaturas levam cerca de 24 a 36 horas na circulação para maturarem, seu RNA é progressivamente degradado e seu volume diminui (DALE, 1995; JORNET-RIUS, *et al*, 2023).

A porcentagem de plaquetas reticuladas pode ser utilizada como um teste não invasivo para prever e monitorar a trombopoiese em cães ao invés de avaliar a megacariocitopoiese que é uma metodologia subjetiva, lenta e que requer profissional qualificado (WEISS, 1998; OLLERS, 2016).

A avaliação das plaquetas reticuladas por citometria de fluxo é realizada com o sangue periférico preparado e corado com *Tiazole Orange* (TO). Esse atravessa a membrana celular intacta e se liga ao RNA plaquetário e aos nucleotídeos dos grânulos emitindo fluorescência (SMITH, 2002). Um aumento na fluorescência pode estar relacionado com um aumento no tamanho da plaqueta ou com o aumento da concentração de RNA dentro das plaquetas (STOCKHAM E SCOTT, 2011).

O primeiro método totalmente automatizado para contagem de plaquetas reticuladas, baseado em citometria de fluxo, foi estabelecido com o analisador de reticulócitos R-3000 (Toa Medical, posteriormente Sysmex Corporation, Kobe, Japan) (MEINTKER, 2020).

Na última década novos métodos em analisadores hematológicos comerciais permitiram a quantificação automatizada da fração de plaquetas imaturas (IPF), um equivalente a contagem de plaquetas imaturas (PI). Lançado em 2017, o Sysmex XN-V (XN – 1000V; Sysmex) é um analisador hematológico multiespécies automatizado que trouxe vários avanços, como uma função que permite a criação de novos *gates* para parâmetros desejados (DAVENPORT, 2021). Este equipamento utiliza corantes fluorescentes: polimetina e oxazina, que possuem afinidade a estruturas de ácidos nucleicos como mitocôndrias e o retículo endoplasmático das plaquetas. (JEON, *et al*, 2020). As células coradas passam através de um semicondutor de diodo com feixe de laser e a dispersão direta da luz resulta na determinação do volume celular e intensidade de

fluorescência (conteúdo de RNA) emitido e aferido. As frações plaquetárias imaturas são diferenciadas pela intensidade de sua fluorescência porque as plaquetas mais jovens contêm maior volume celular e maior quantidade de RNA que emitem fluorescência quando analisadas pelo citômetro de fluxo (JEON, *et al*, 2020).

O IPF representa a fração de plaquetas imaturas e sua taxa de produção é análoga aos reticulócitos para eritropoiese. O IPF pode ser expresso em porcentagem do total das plaquetas contadas ou em valor absoluto. Tem sido demonstrado que o IPF consegue distinguir entre o aumento ou diminuição da produção plaquetária (CREMER, 2011).

A quantificação das plaquetas reticuladas (PR) ou da fração de plaquetas imaturas (IPF) permite diferenciar as causas de trombocitopenia, principalmente naquelas em que a etiologia é multifatorial. Possui alta sensibilidade e especificidade em diferenciar trombocitopenias por consumo ou aplasia medular (KAJIHARA, 2007; STOCKHAM E SCOTT, 2011; MEINTKER, 2020).

A contagem de plaquetas fluorescentes (reticuladas) permanecem estáveis por mais de 24h armazenadas a 4°C. Em contrapartida, IPF (%) e o valor absoluto de IPF (#) permanecem estáveis por até 48 horas. Entretanto, devido a maior variabilidade e aumento destes parâmetros a partir de 12 horas de armazenamento a 4°C, estes parâmetros têm pouca utilidade clínica para amostras armazenadas a 4°C por 24 horas (GREBERT, 2021; JORNET-RIUS, *et al*, 2023).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a utilidade do parâmetro IPF como forma de avaliação não invasiva de estimar a trombopoiese em cães com trombocitopenia, especialmente naqueles com diagnóstico presumido de trombocitopenia imunomediada.

3.2 Específicos

- Comparar as duas técnicas de quantificação de megacariócitos (contagem de megacariócitos por campo x por espícula) na citologia de medula óssea.
- Correlacionar os valores de IPF em animais com TIM e a quantificação de megacariócitos na medula óssea.
- Definir pontos de corte para IPF absoluto e relativo que diferenciem pacientes com trombocitopenia com hiperplasia da série megacariocítica e diagnóstico presumido de TIM e pacientes com trombocitopenia por hipoplasia da série megacariocítica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comissão de Ética

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, sob número 0338/2023.

4.2 Delineamento amostral

Foram incluídos 52 cães adultos, machos e fêmeas de todas as raças, sem limite de idade, com solicitação de mielograma obtidos através da rotina do laboratório PROVET Veterinária Diagnóstica localizado em São Paulo, SP. Para

a seleção dos pacientes foi realizada uma revisão dos resultados de hemograma, mielograma, ultrassonografia abdominal e exames de PCRs ou imunológicos (ELISA ou imunocromatográficos) para doenças infecciosas (*Ehrlichia* sp., *Babesia* sp., *Anaplasma* sp., *Leishmania* sp., *Rickettsia* sp., *Hepatozoon* sp.) quando estes últimos fossem disponíveis. Todos os exames foram colhidos e analisados no mesmo centro diagnóstico. Também foram obtidos os dados da anamnese com os responsáveis do paciente no momento do atendimento e colheita do material.

Os cães foram distribuídos em três grupos da seguinte forma: o grupo I, composto por 18 cães sem alterações hematológicas no hemograma, mielograma e demais exames laboratoriais e de imagem quando disponíveis, grupo II composto por 20 animais, com histórico de trombocitopenia ($<150.000/\mu\text{L}$) e diagnóstico presumido de trombocitopenia imunomediada por meio dos achados do mielograma (hiperplasia megacariocítica), correlação com hemograma, exclusão de causas como perda sanguínea, sequestro esplênico e causas infecciosas. O grupo III, composto por 14 animais, com trombocitopenia ($<150.000/\mu\text{L}$) por hipoplasia megacariocítica por possíveis causas infecciosas, neoplásicas entre outras.

O consenso de diagnóstico de trombocitopenia imunomediada (LEVINE, *et al.*, 2024) que estipulou o ponto de corte de 100.000 plaquetas/ μL foi publicado após a colheita dos dados.

4.3 Critérios de exclusão de pacientes

Foram excluídos do experimento pacientes que atenderam os critérios laboratoriais anteriores, porém com amostras de hemograma e/ou mielograma colhidas externamente ao laboratório. Também foram excluídos aqueles animais que estavam em tratamento com corticosteroides, imunossupressores ou imunomoduladores nos últimos 30 dias antes da coleta das amostras. Pacientes do grupo I e II que apresentem algum teste molecular ou imunológico positivo durante a avaliação do seu histórico ou no momento da análise do mielograma. Foram excluídos os animais em que se observaram agregados plaquetários na avaliação do esfregaço sanguíneo.

4.4 Colheita do sangue

Foram colhidos 2 mL de amostra de sangue periférico para o hemograma no momento da admissão do paciente no centro diagnóstico, previamente ao procedimento anestésico, preferencialmente a partir da veia jugular ou cefálica. A amostra foi colhida em tubo com anticoagulante EDTA K3 7,5% (Vacuette®, Greiner Bio One International GmbH, São Paulo) para a realização do hemograma e determinação do valor do IPF (Fração Imatura de Plaquetas). As amostras foram mantidas sob temperatura ambiente e processadas em até 6h após a sua colheita.

4.5 Colheita de medula óssea

Os pacientes foram anestesiados, conforme protocolo de anestesia inalatória definido pelo médico veterinário anestesista do centro diagnóstico para obtenção de medula óssea. O protocolo anestésico envolveu o uso de Propofol – 6,0mg/kg IV para indução anestésica e manutenção com Isoflurano durante o procedimento. Utilizou-se fentanil 1 a 5 µg/Kg IV para a analgesia transprocedimento e dipirona 0,06mL/Kg IV no pós-imediato.

As amostras de medula óssea foram obtidas preferencialmente da asa do ílio ou úmero proximal (Figura 2.) com agulha do tipo Illinois (Unit® São Paulo, Brasil) acopladas a seringa de poliestireno (BD®, São Paulo) de 10 mL. A seringa foi preparada previamente com 3 gotas de solução de EDTA 3% diluído em solução fisiológica estéril. Foram aspirados cerca de 2 mL de medula óssea. O material colhido foi depositado em uma Placa de Petri de vidro e as espículas foram capturadas com auxílio de tubo capilar. As lâminas foram confeccionadas imediatamente após a colheita pelas técnicas de *squash* e/ou esfregaço. O restante do material obtido acondicionado em tubo sem anticoagulante e mantido sob refrigeração, caso fosse necessária a confecção adicional de lâminas ou encaminhamento da amostra para realização de exames de biologia molecular.



Figura 2. Colheita de medula óssea em úmero proximal com agulha tipo Illinois (à esquerda). Medula óssea depositada em placa de Petri com diversas espículas que foram capturadas (setas) para confecção das lâminas (à direita).

4.6 Análises laboratoriais

4.6.1 Hemograma e mielograma

O hemograma foi realizado em analisador hematológico de citometria de fluxo e impedância Sysmex® XN-V (XN – 1000V; Sysmex Corporation, Kobe, Japão), com o canal de plaquetas fluorescentes (PLT-F), um canal específico para contagem plaquetária após coloração, ativado para determinação do IPF relativo (IPF%) e absoluto (IPF#). Os dados obtidos pelo semicondutor à laser geraram um gráfico de dispersão bidimensional (Figura 3). O eixo X do gráfico representa a intensidade lateral de fluorescência (*side fluorescent light – SFL*) e o eixo Y indica a intensidade da luz à frente (*forward scattered light – FSC*) (Figura 4). A morfologia celular, a contagem diferencial e avaliação plaquetária (estimativa e presença de agregados plaquetários) foram confirmadas por meio do esfregaço sanguíneo corado com Diff Quick (Panótico rápido, Laborclin®).

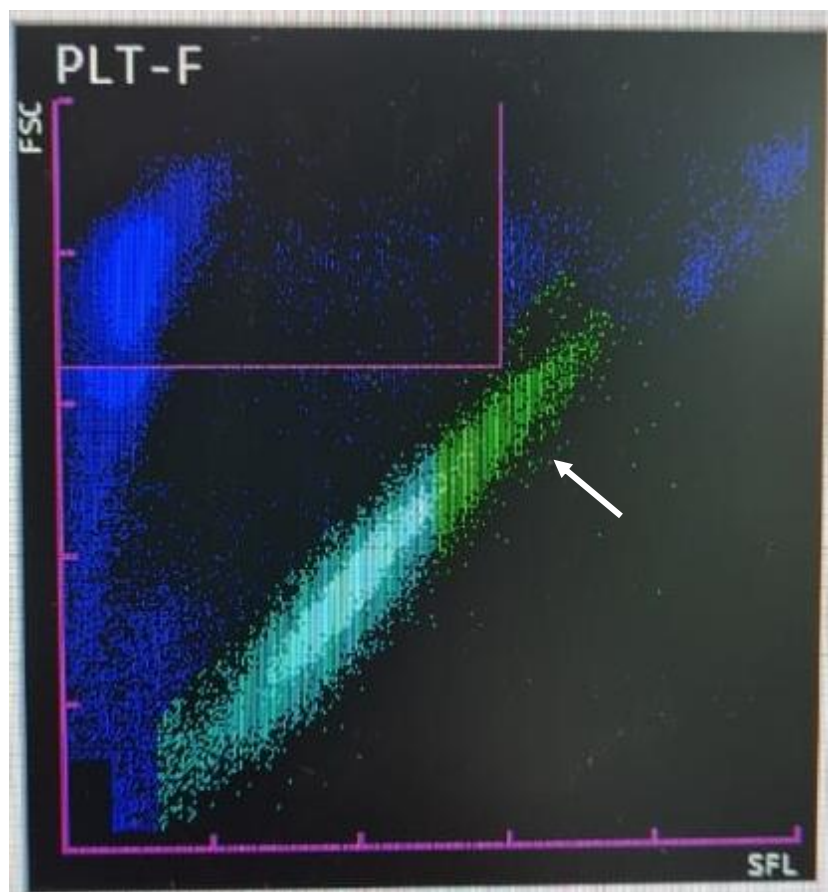


Figura 3. Gráfico de dispersão gerado pelo equipamento Sysmex® XN-V (Kobe, Japão) gerado no canal de plaquetas fluorescentes, onde é determinado o parâmetro IPF. A área em verde limão (seta) demonstra a quantidade de plaquetas jovens.

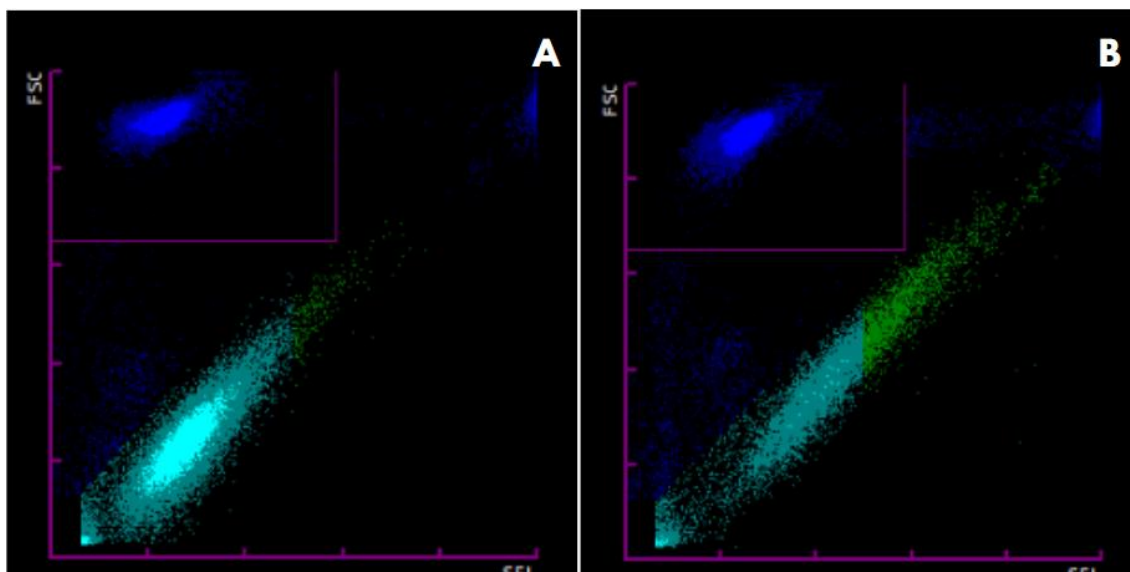


Figura 4. Paciente com contagem plaquetária normal (308.000/ μ L) e IPF 0,8% (A). Paciente trombocitopênico (140.000/ μ L) e IPF 21,6% (B).

O mielograma foi realizado por meio da avaliação das lâminas coradas em corador automático (SlideInk II® – Vyttra Diagnósticos, Bragança Paulista, SP) com o kit de coloração baseado em Wright, Giemsa e Leishman da Colorgram (Vyttra Diagnósticos Bragança Paulista, SP) por pelo menos dois observadores experientes. A avaliação da série megacariocítica foi realizada por duas metodologias. Na primeira, os megacariócitos foram quantificados pela média do número de células por 10 espículas de tamanho médio, que ocupem aproximadamente 1/3 do campo de 100x do microscópio Nikon E200 (Tokio, Japão), e na segunda, pela média do número de células por campo de 100x (objetiva de 10x) por meio da contagem de 20 a 25 campos na tentativa de obtenção de um coeficiente de variação de 20% segundo MISCHKE, 2002 e HARVEY, 2012.

Normoplasia megacariocítica foi considerada quando observadas entre 3 a 10 megacariócitos (Figura 6) por espícula, hipoplasia megacariocítica quando observamos menos de 3 megacariócitos (Figura 5.) por espícula e hiperplasia megacariocítica acima de 10 megacariócitos por espícula (Figura 7) (HARVEY, 2011; COWELL, 2019).

Quanto a avaliação por campo, foram considerados animais normoplásicos os que obtiverem cerca de 5 a 15 megacariócitos por campo de 100x, hipoplasia megacariocítica quando observamos menos de 5

megacariócitos por campo e hiperplasia megacariocítica acima de 15 megacariócitos por campo (MISCHKE, 2002).

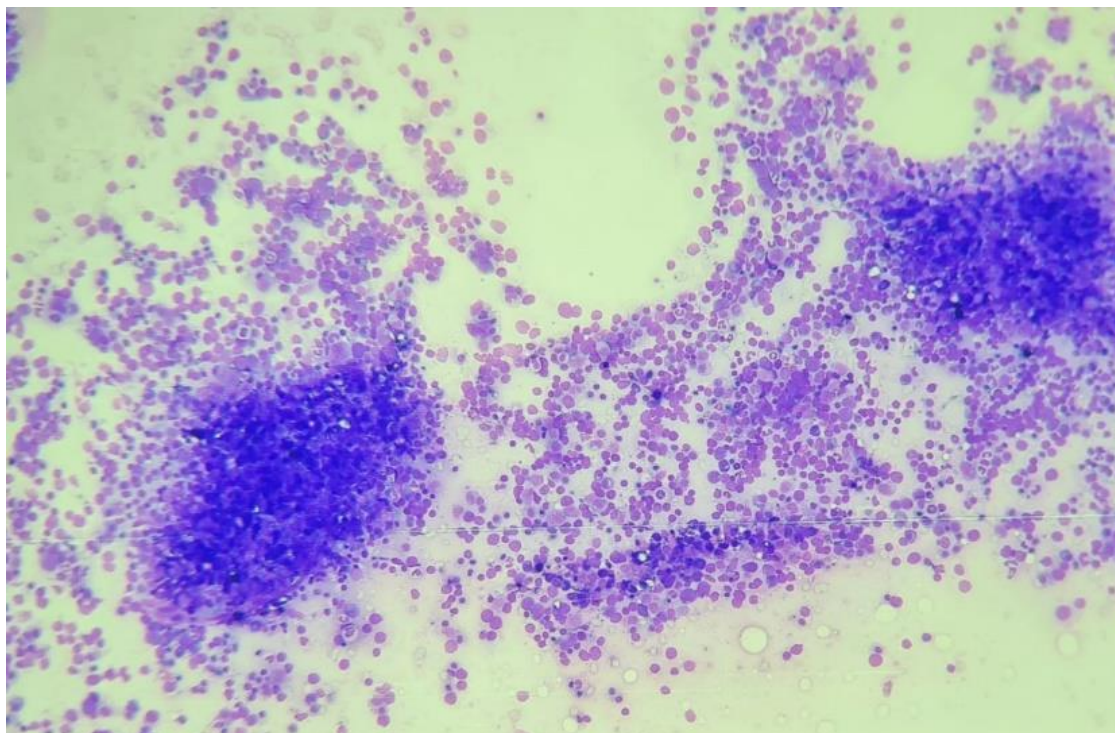


Figura 5.: Campo de 100x demonstrando a ausência de megacariócitos tanto nas espículas, quanto no campo, sugerindo hipoplasia megacariocítica.

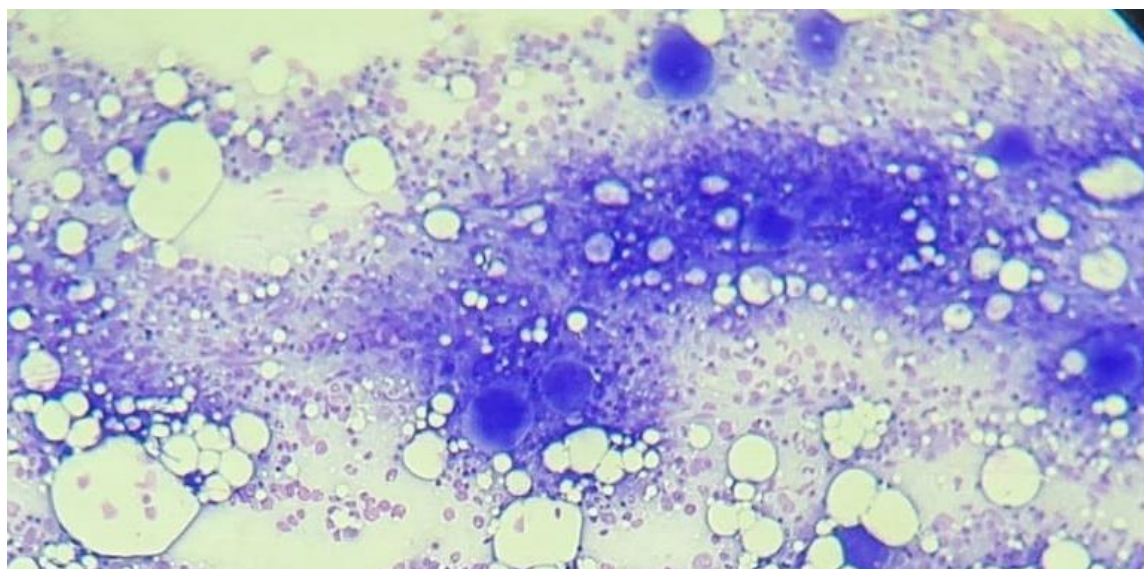


Figura 6. Campo de 100x demonstrando quantidade normal de megacariócitos por espícula e campo sugerindo normoplasia megacariocítica.

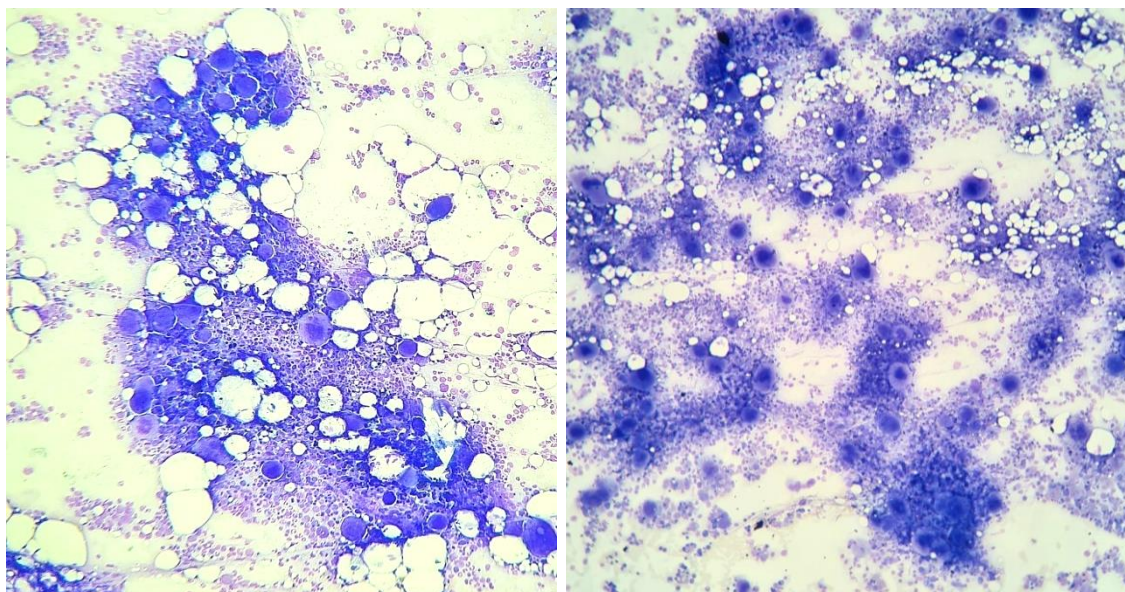


Figura 7. Campo de 100x demonstrando a presença de diversos megacariócitos nas espículas (imagem à esquerda) e cerca de 50 no campo (imagem à direita), sugerindo hiperplasia megacariocítica.

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando recursos do programa estatístico SAS® Studio. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Wilcoxon (não-paramétrico) e análise de variância (ANOVA) para os dados paramétricos. Resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. A correlação de Pearson também foi realizada. Para determinação do uso clínico do IPF absoluto e relativo e possíveis pontos de corte com todos os níveis com sensibilidade e especificidade associadas, os dados foram atribuídos e plotados em curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e a área sob a curva (AUC) foi calculada por meio dos programas SAS® Studio e IBM SPSS Statistics®.

5 RESULTADOS

Foram analisados resultados de hemograma e mielograma de 70 pacientes e destes, 52 atenderam integralmente aos critérios de seleção, foram distribuídos nos grupos da seguinte forma: 20 pacientes apresentando hiperplasia megacariocítica e trombocitopenia com diagnóstico presuntivo de TIM, 18 cães sem alterações hematológicas e normoplasia da medula óssea,

inclusive a série megacariocítica e 14 animais com hipoplasia megacariocítica e trombocitopenia.

Houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre as contagens de megacariócitos entre grupos pelas duas metodologias utilizadas (contagem por campo e contagem por espícula). O coeficiente de variação entre as contagens de megacariócitos por campo e por espículas entre os grupos foram respectivamente grupo I: 35%/campo, 23%/espícula, grupo II: 22,5%/campo, 21,2%/espícula e grupo III: 76,50%/campo e 71,5%/espícula. As estatísticas descritivas de cada grupo encontram-se sumarizadas na Tabela 1.

A celularidade da medula óssea em pacientes do grupo I (saudáveis) foi de $50\% \pm 10,7$, entre os pacientes do grupo II (hiperplasia megacariocítica) $64,5\% \pm 15,5$ e no grupo III (hipoplasia megacariocítica) $48\% \pm 26,2$.

Tabela 1. Estatísticas descritivas (média e desvio padrão) entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Parâmetros	Normoplasia megacariocítica	Hiperplasia megacariocítica	Hipoplasia megacariocítica
Nº animais	18	20	14
Mk/campo	$9,6 \pm 3,4$	$22,6 \pm 5,1$	$1,7 \pm 1,3$
Mk/espícula	$5,2 \pm 1,2$	$13,7 \pm 2,9$	$0,7 \pm 0,4$
Contagem plaquetária ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$294 \pm 106,3$	$71,7 \pm 61,5$	$46,6 \pm 42,4$
IPF (%)	$7,0 \pm 6,8$	$19,8 \pm 15,1$	$10,4 \pm 8,6$
IPF (#) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$20,2 \pm 18,3$	$12,2 \pm 11,6$	$5,8 \pm 5,2$
VPM (fL)	$8,8 \pm 3,7$	$10,9 \pm 3,2$	$10,4 \pm 2,5$
Celularidade Medular (%)	$50 \pm 10,7$	$64,5 \pm 15,5$	$46,7 \pm 25,6$

Tabela 2. Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a contagem de megacariócitos por campo entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Grupos	Número de animais	MK/Campo		
		Mediana	Q1	Q3
Normoplasia megacariocítica	18	9,1	8,0	11,5
Hiperplasia megacariocítica	20	21,7	18,3	15,6
Hipoplasia megacariocítica	14	1,0	0,6	2,4

Tabela 3. Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a contagem de megacariócitos por espícula entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Grupo	Número de animais	MK/Espícula		
		Mediana	Q1	Q3
Normoplasia megacariocítica	18	5,4	4,4	6,0
Hiperplasia megacariocítica	20	12,3	11,8	15,6
Hipoplasia megacariocítica	14	0,5	0,3	0,9

Tabela 4. Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a contagem plaquetária entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Grupo	Número de animais	Contagem Plaquetária ($\times 10^3/\mu\text{L}$)		
		Mediana	Q1	Q3
Normoplasia megacariocítica	18	265	222	391
Hiperplasia megacariocítica	20	62,5	17,5	116,5
Hipoplasia megacariocítica	14	36,0	10	63

Tabela 5. Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a porcentagem da fração de plaquetas imaturas (%) entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Grupo	Número de animais	IPF (%)		
		Mediana	Q1	Q3
Normoplasia megacariocítica	18	5,1	2,6	10,5
Hiperplasia megacariocítica	20	16,5	8,4	22,0
Hipoplasia megacariocítica	14	10,7	3,1	13,7

Tabela 6. Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a contagem absoluta da fração de plaquetas imaturas entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Grupo	Número de animais	IPF (mil/μL)		
		Mediana	Q1	Q3
Normoplasia megacariocítica	18	11,3	5,7	39,4
Hiperplasia megacariocítica	20	8,2	2,8	18,3
Hipoplasia megacariocítica	14	5,1	0,2	10,4

Tabela 7. Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para o VPM entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Grupo	Número de animais	VPM (fL)		
		Mediana	Q1	Q3
Normoplasia megacariocítica	18	10,5	7,9	10,9
Hiperplasia megacariocítica	20	11,6	8,9	12,7
Hipoplasia megacariocítica	14	11,5	8,9	12,2

Tabela 8. Estatísticas descritivas (mediana e intervalos interquartis) para a celularidade medular entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Grupo	Número de animais	Celularidade medular (%)		
		Mediana	Q1	Q3
Normoplasia megacariocítica	18	50,0	40	60
Hiperplasia megacariocítica	20	60	55	80
Hipoplasia megacariocítica	14	47,5	25	60

As médias e desvios padrão do grupo I (normoplasia megacariocítica) para a contagem plaquetária foram de $294 \pm 106,3$ plaquetas por μL , para a contagem de megacariócitos por campo foi de $9,6 \pm 3,4$ e por espícula de $5,2 \pm 1,2$. No grupo II (hiperplasia megacariocítica e diagnóstico presuntivo de TIM) foram de $71,7 \pm 61,5$ mil plaquetas por μL , para a contagem de megacariócitos por campo foi de $22,6 \pm 5,1$ e por espícula de $13,7 \pm 2,9$. No grupo III (hipoplasia megacariocítica e trombocitopenia) os valores para a contagem plaquetária foi

de $45,4 \pm 43,9$ plaquetas por μL , para a contagem de megacariócitos por campo foi de $1,7 \pm 1,3$ e por espícula de $0,7 \pm 0,5$.

Quanto aos parâmetros plaquetários, no grupo I, as médias e desvios-padrão para o IPF foi de $7,0 \pm 6,8\%$, IPF (#) $20,2 \pm 18,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ e VPM de $8,8 \pm 3,7$ fL; no grupo II o IPF foi de $19,8 \pm 15,1\%$, IPF (#) $12,2 \pm 11,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ e VPM de $10,9 \pm 3,2$ fL e no grupo III o IPF foi de $10,2 \pm 8,8\%$, IPF (#) $5,6 \pm 5,4 \times 10^3/\mu\text{L}$ e VPM de $10,4 \pm 2,6$ fL.

Tabela 9. Estatísticas (média e desvio padrão e *p-value*) entre os grupos de cães, de acordo com a celularidade da série megacariocítica. São Paulo, SP, 2022-2024.

Parâmetros	Grupo I (média $\pm$ DP)	Grupo II (média $\pm$ DP)	Grupo III (média $\pm$ DP)	Valores de referência*	<i>p-value</i>
Mk/campo	$9,64 \pm 3,38^a$	$22,63 \pm 5,07^b$	$1,66 \pm 1,32^c$	Até 15	<0,001
Mk/espícula	$5,22 \pm 1,20^a$	$13,68 \pm 2,95^b$	$0,66 \pm 0,47^c$	3 - 10	<0,001
Contagem plaquetária ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$294,0 \pm 106,58^a$	$71,75 \pm 61,52^b$	$46,64 \pm 42,49^b$	179 - 550	<0,001
IPF (%)	$6,99 \pm 6,76^{a,c}$	$19,85 \pm 15,16^b$	$10,49 \pm 8,58^{a,b,c}$	0 - 5,8	0,0026
IPF ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$20,17 \pm 18,27^a$	$12,21 \pm 11,6^{a,b}$	$5,81 \pm 5,25^b$	1,9 - 26,8	0,0133
VPM (fL)	$8,8 \pm 3,68^a$	$10,88 \pm 3,24^a$	$10,46 \pm 2,49^a$	10 - 12	0,1320
Celularidade (%)	$50,0 \pm 10,71^{a,c}$	$64,5 \pm 15,55^b$	$46,7 \pm 25,61^c$	25 - 75	0,090

Letras iguais na mesma linha indicam ausência de diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

A distribuição dos grupos por campo (Figura 8) e por espícula (Figura 9), além das distribuição do parâmetro IPF (%) (Figura 10) e IPF (#) (Figura 11) entre os grupos estão nas figuras a seguir:

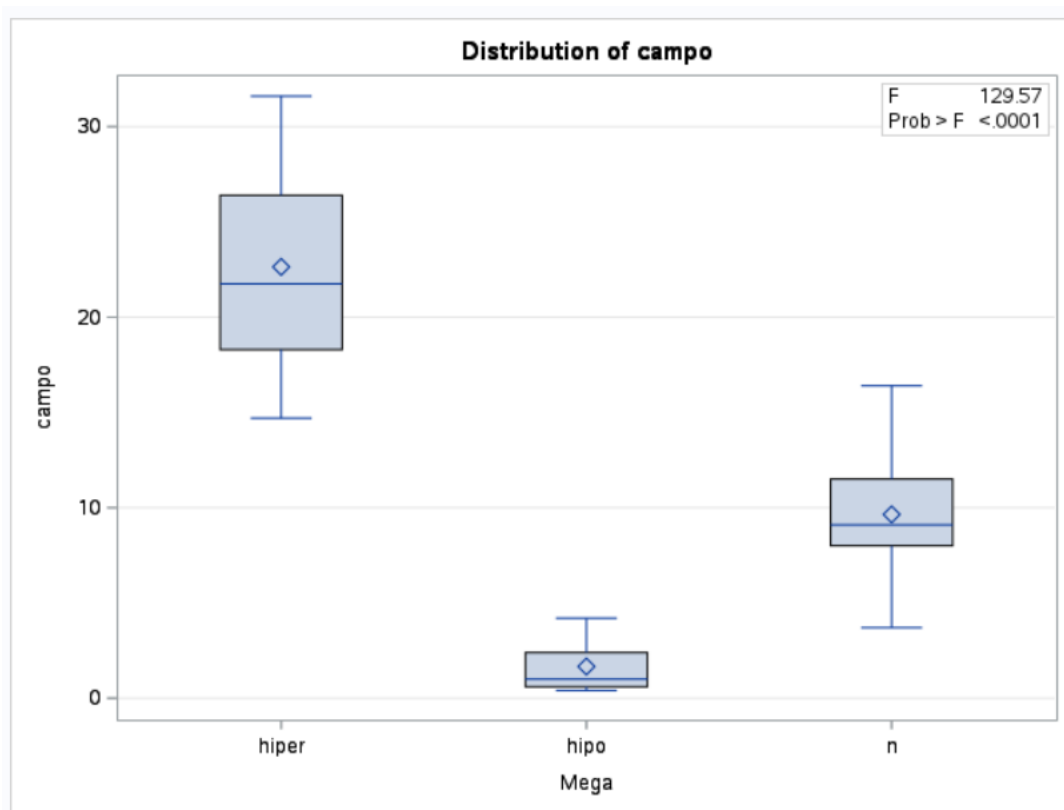


Figura 8. Distribuição da contagem de megacariócitos por campo entre os três grupos amostrados. Hiper: cães com hiperplasia de megacariócitos (Grupo II); hipo: cães com hipoplasia de megacariócitos (Grupo III); n: cães com normoplasia de megacariócitos (Grupo I).

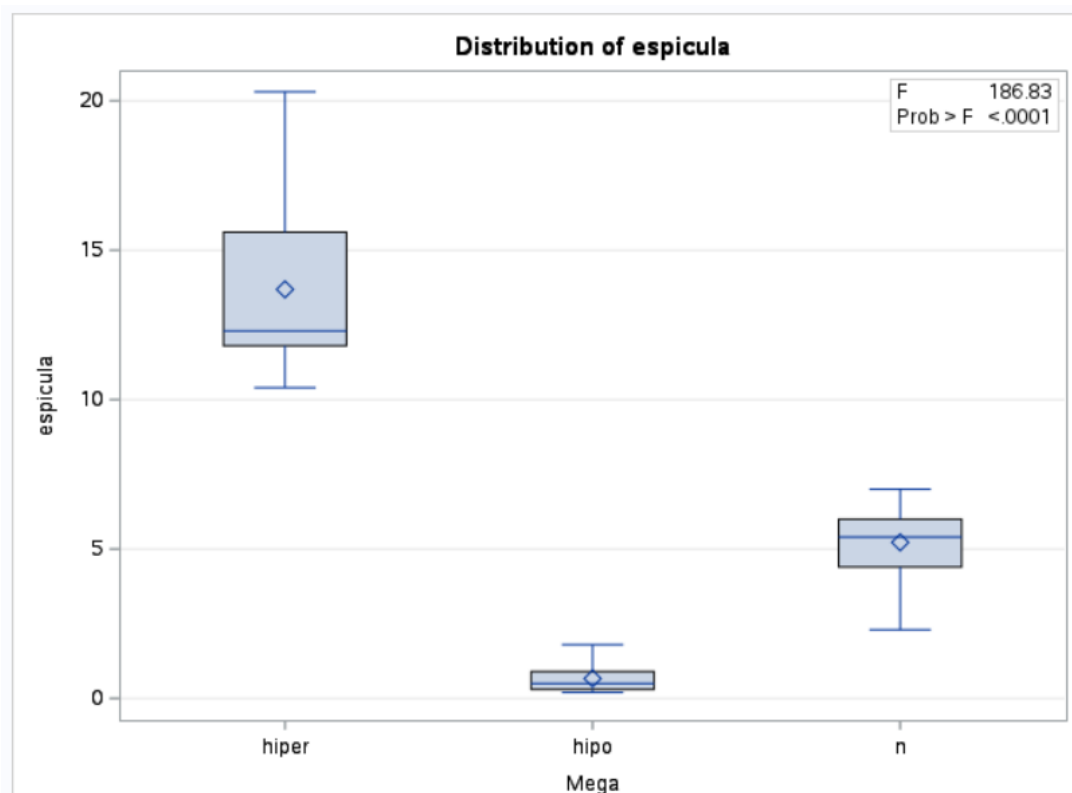


Figura 9. Distribuição da contagem de megacariócitos por espícula entre os três grupos amostrados. Hiper: cães com hiperplasia de megacariócitos (Grupo II); hipo: cães com hipoplasia de megacariócitos (Grupo III); n: cães com normoplasia de megacariócitos (Grupo I).

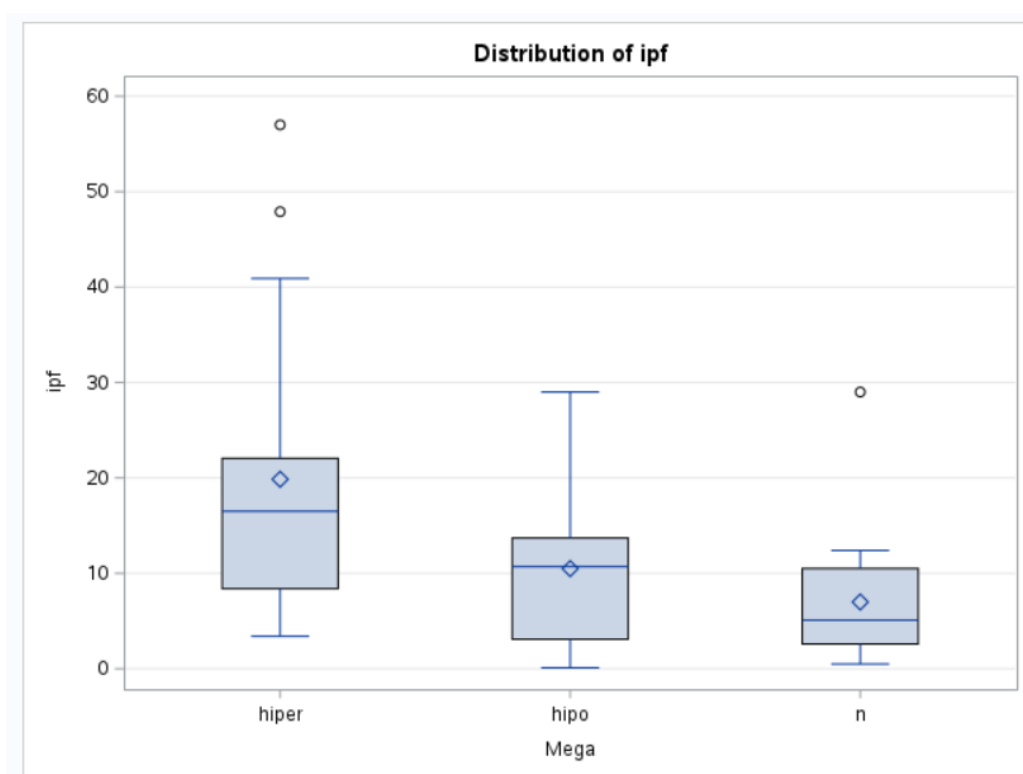


Figura 10. Distribuição do IPF (%) entre os três grupos amostrados. Hiper: cães com hiperplasia de megacariócitos (Grupo II); hipo: cães com hipoplasia de megacariócitos (Grupo III); n: cães com normoplasia de megacariócitos (Grupo I)

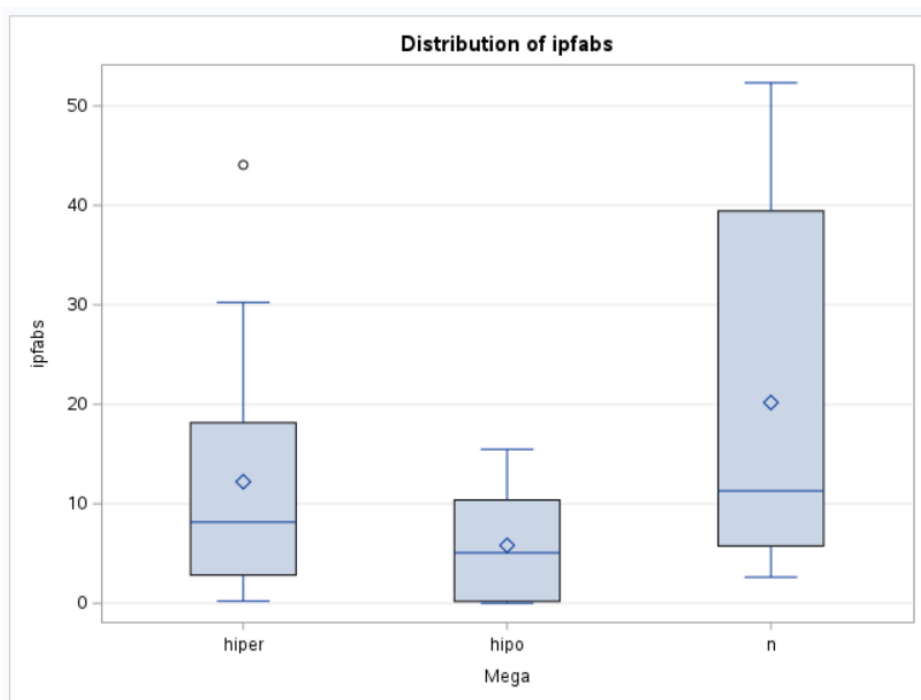


Figura 11. Distribuição do IPF absoluto entre os três grupos amostrados. Hiper: cães com hiperplasia de megacariócitos (Grupo II); hipo: cães com hipoplasia de megacariócitos (Grupo III); n: cães com normoplasia de megacariócitos (Grupo I).

A correlação de Pearson foi realizada entre os parâmetros megacariócitos por campo, megacariócitos por espícula, contagem plaquetária, IPF e VPM dos cães de todos os grupos (Tabela 10).

Tabela 10. Coeficientes de correlação de Pearson entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024. N=52.

	Campo	Espícula	Contagem plaquetária (μL)	IPF (%)	IPF (#) (μL)	VPM (fL)
Mk/Campo	1	0,946 ($p<0,01$)	-0,092 ($p=0,52$)	0,26 ($p=0,06$)	0,06 ($p=0,63$)	<0,01 ($p=0,92$)
Mk/Espícula		1	-0,16 ($p=0,25$)	0,22 ($p=0,11$)	-0,01 ($p=0,94$)	<0,01 ($p=0,98$)
Contagem plaquetária (mm^3)			1	-0,30 ($p=0,026$)	0,572 ($p<0,0001$)	-0,27 ($p=0,05$)
IPF (%)				1	0,32 ($p=0,02$)	0,12 ($p=0,36$)
IPF (#) (μL)					1	-0,11 ($p=0,40$)
VPM (fL)						1

Mk=megacariócitos

Foi observada correlação positiva alta e significativa ($p<0,01$) apenas entre as contagens de megacariócitos por campo e por espícula ($r=0,946$, $p<0,01$). Correlação moderada entre IPF (#) e contagem plaquetária ($r=0,572$, $p<0,0001$) e baixa entre IPF (#) e IPF (%) ($r=0,32$, $p=0,02$). Correlação negativa e baixa entre IPF% e contagem plaquetária ($r=-0,30$, $p=0,026$) e contagem plaquetária e VPM ($p=-0,27$, $p=0,05$). Não foram observadas correlações significativas ($p>0,05$) entre os demais parâmetros.

Tabela 11. Coeficientes de correlação de Pearson no grupo I (normoplasia megacariocítica) entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024. N=18.

	Campo	Espícula	Contagem plaquetária (μL)	IPF (%)	IPF (#) (μL)	VPM (fL)
Mk/Campo	1	0,78 ($p=0,0002$)	-0,18 ($p=0,49$)	0,12 ($p=0,63$)	0,02 ($p=0,92$)	-0,32 ($p=0,1$)
Mk/Espícula		1	-0,29 ($p=0,25$)	0,10 ($p=0,69$)	-0,05 ($p=0,08$)	-0,43 ($p=0,08$)
Contagem plaquetária (mm^3)			1	-0,56 ($p=0,82$)	0,45 ($p=0,05$)	-0,26 ($p=0,29$)
IPF (%)				1	0,75 ($p<0,001$)	0,04 ($p=0,86$)
IPF (#) (μL)					1	-0,23 ($p=0,34$)
VPM (fL)						1

Mk=megacariócitos

No grupo controle, foi observada correlação positiva alta e significativa ($p<0,05$) entre as contagens de megacariócitos por campo e por espícula ($r=0,78$, $p=0,0002$) e entre a IPF% e IPF (#) ($r=0,75$, $p<0,001$). Não foram observadas correlações significativas ($p>0,05$) entre os demais parâmetros.

Tabela 12. Coeficientes de correlação de Pearson no grupo II (hiperplasia megacariocítica) entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024. N=20.

	Campo	Espícula	Contagem plaquetária (μL)	IPF (%)	IPF (#) (μL)	VPM (fL)
Mk/Campo	1	0,561 (p=0,015)	0,10 (p=0,68)	-0,28 (p=0,25)	-0,07 (p=0,75)	-0,53 (p=0,02)
Mk/Espícula		1	-0,37 (p=0,12)	-0,561 (p=0,015)	-0,46 (p=0,59)	-0,18 (p=0,45)
Contagem plaquetária (mm^3)			1	-0,20 (p=0,39)	0,58 (p=0,006)	0,24 (p=0,29)
IPF (%)				1	0,47 (p=0,03)	-0,12 (p=0,39)
IPF (#) (mm)					1	0,37 (p=0,1)
VPM (fL)						1

Mk=megacariócitos

No grupo II (hiperplasia megacariocítica) foi observada correlação positiva moderada e significativa ($p < 0,05$) entre as contagens de megacariócitos por campo e por espícula ($r = 0,561$, $p = 0,0051$), IPF (#) contagem plaquetária ($r = 0,58$, $p = 0,006$). Correlação positiva e baixa entre IPF (%) e IPF (#) ($r = 0,47$, $p = 0,03$) e correlação negativa moderada entre Mk/espículas e IPF (%) ($r = -0,561$; $p = 0,015$). Não foram observadas correlações significativas entre ($p > 0,05$) entre os demais parâmetros.

Tabela 13. Coeficientes de correlação de Pearson no grupo III (hipoplasia megacariocítica) entre métodos de quantificação de megacariócitos, contagem plaquetária e parâmetros plaquetários de cães São Paulo, SP, 2024. N=14.

	Campo	Espícula	Contagem plaquetária (μL)	IPF (%)	IPF (#) (μL)	VPM (fL)
Mk/Campo	1	0,93 (p<0,001)	0,41 (p=0,14)	-0,03 (p=0,90)	0,20 (p=0,47)	0,48 (p=0,07)
Mk/Espícula		1	0,20 (p=0,49)	-0,05 (p=0,84)	0,008 (p=0,97)	0,49 (p=0,07)
Contagem plaquetária (mm³)			1	0,12 (p=0,68)	0,69 (p=0,005)	0,48 (p=0,09)
IPF (%)				1	0,67 (p=0,008)	0,46 (p=0,09)
IPF (#) (mm					1	0,57 (p=0,03)
VPM (fL)						1

Mk=megacariócitos

No grupo III (hipoplasia megacariocítica) foi observada correlação positiva alta e significativa ($p < 0,05$) apenas entre as contagens de megacariócitos por campo e por espícula ($r = 0,93$, $p < 0,01$). Correlação moderada e positiva entre IPF (%) e IPF (#) ($r = 0,66$, $p = 0,008$), contagem plaquetária e IPF (#) ($r = 0,69$, $p = 0,005$) e IPF# e VPM ($r = 0,57$, $p = 0,03$). Não foram observadas correlações significativas entre ($p > 0,05$) entre os demais parâmetros.

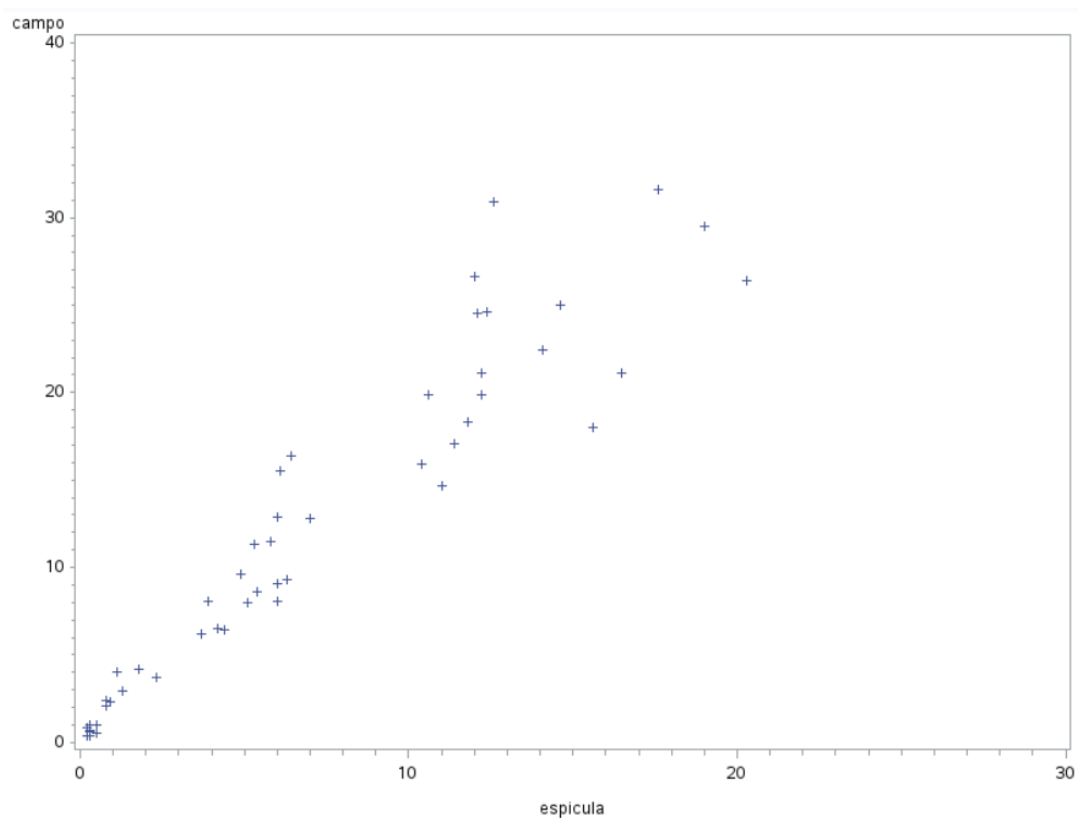


Figura 12. Correlação ($r=0,946$) entre as contagens de megacariócitos por diferentes técnicas (por campo e por espículas).

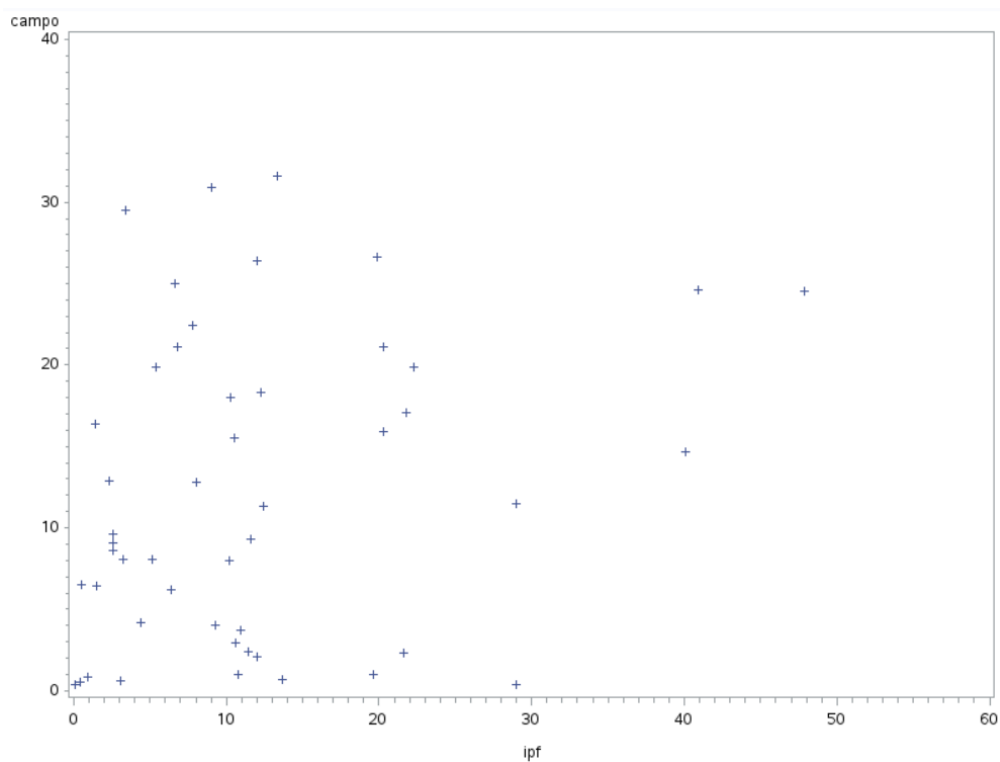


Figura 13. Correlação ($r=0,26$) entre as contagens de megacariócitos por campo e IPF (%).

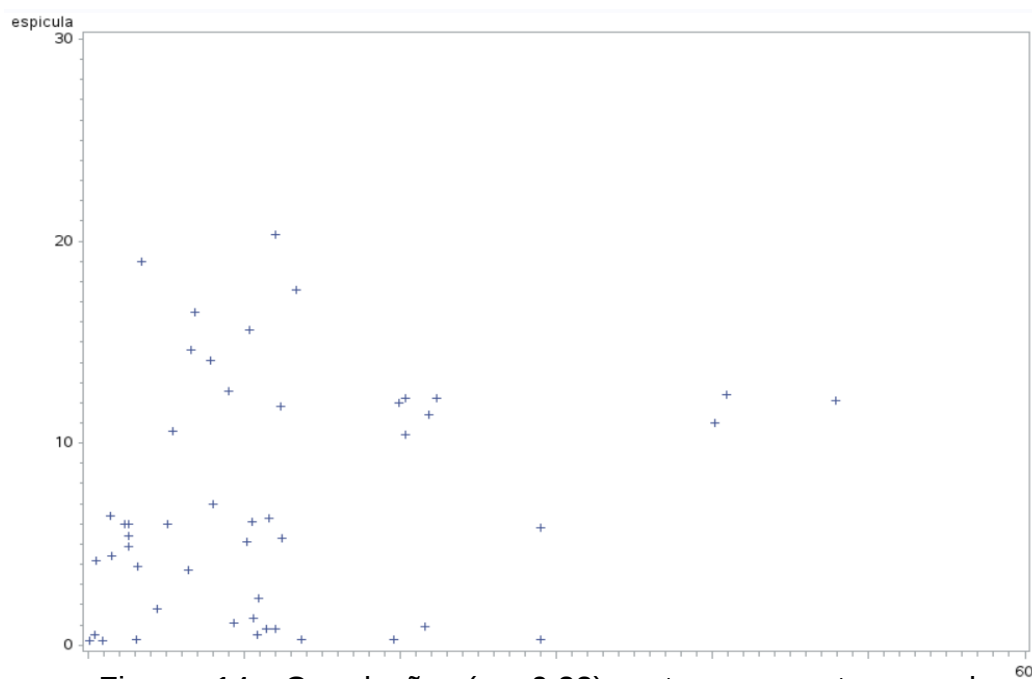


Figura 14. Correlação ($r= 0,22$) entre as contagens de megacariócitos por espícula e IPF (%).

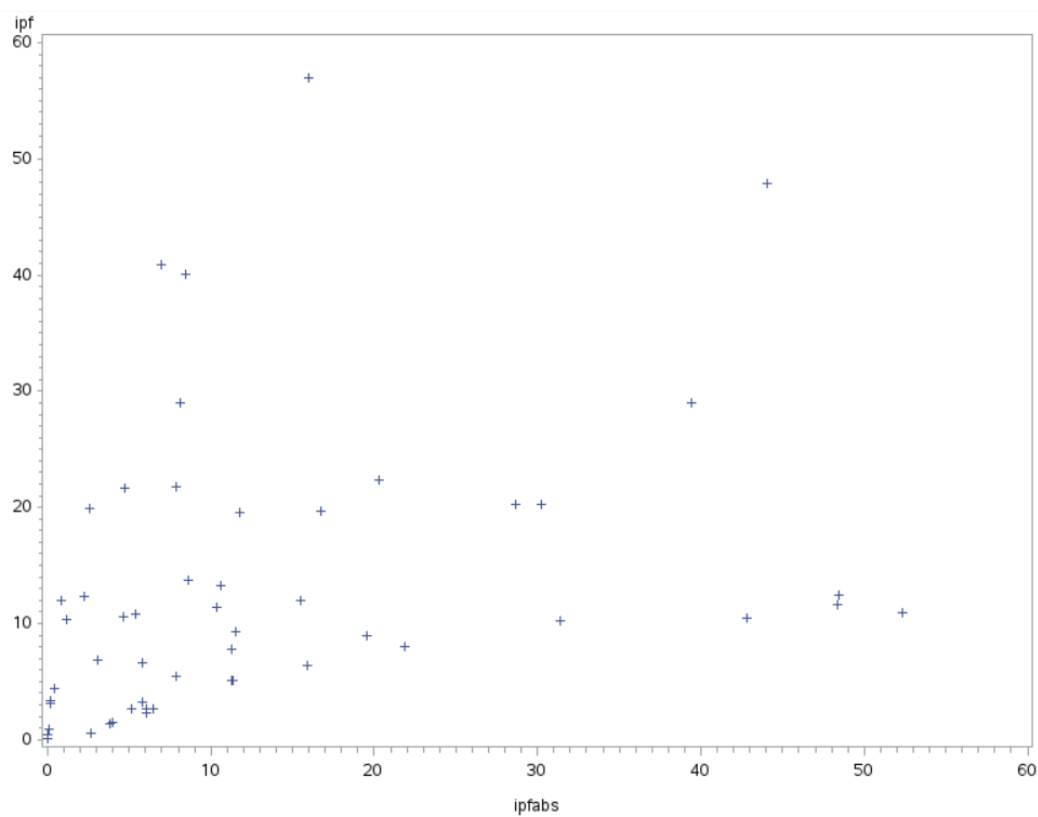


Figura 15. Correlação ($r= 0,75$) entre IPF (%) e IPF (#).

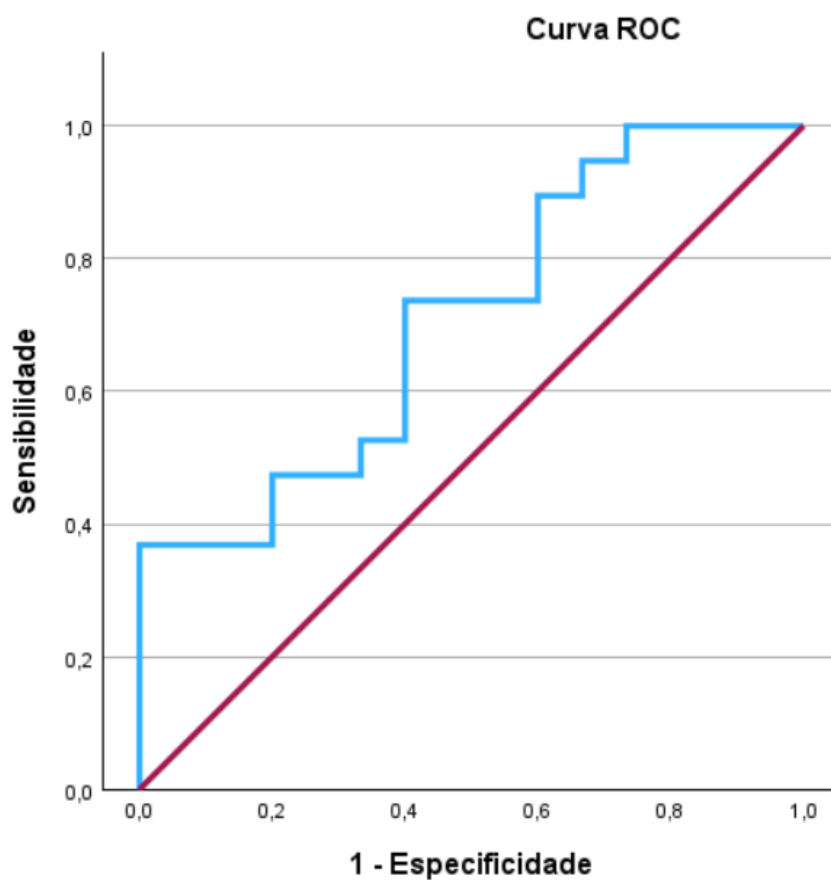


Figura 16. Curva ROC de IPF absoluto utilizando os valores dos 2 grupos trombocitopênicos demonstrando uma área sobre a curva de 0,709, $p=0,019$ com valor geral do modelo de 0,53 e um ponto de corte de 15.700/mm³.

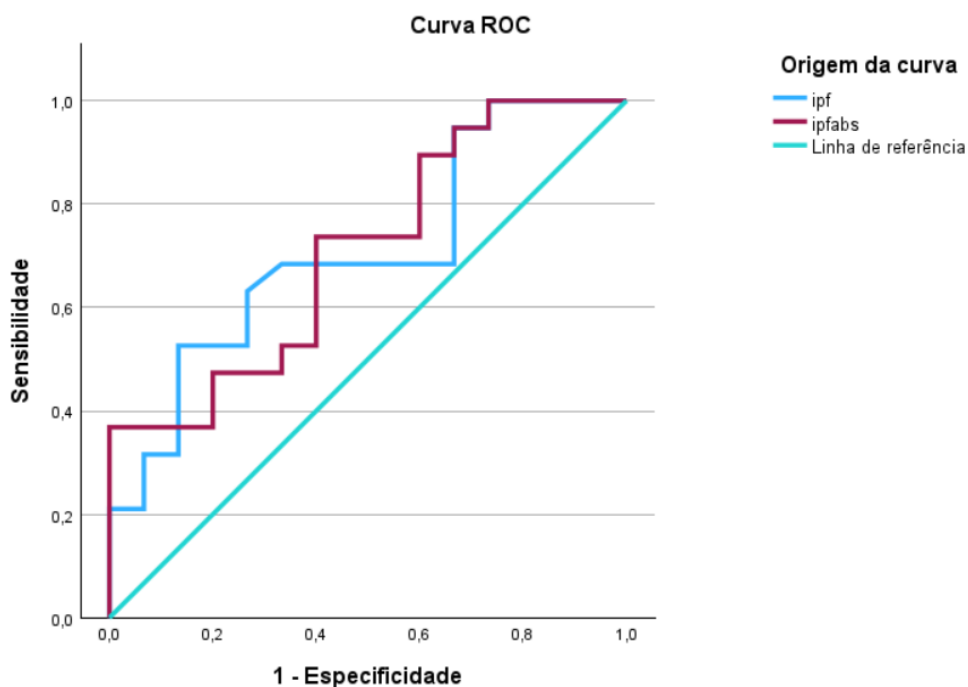


Figura 17. Curvas ROCs IPF absoluto (linha vermelha) e IPF (%) (linha azul) utilizando os valores dos 2 grupos trombocitopênicos demonstrando para IPF (#) uma área sobre a curva de 0,709, $p=0,019$ com valor geral do modelo de 0,53 e um ponto de corte de 15.700/mm³ e para IPF (%) de 0,703, $p=0,022$ com valor geral do modelo de 0,53 e um ponto de corte de 19,5%.

6. DISCUSSÃO

A trombocitopenia imunomediada é o distúrbio de hemostasia primária adquirido mais comum em cães. Sua taxa de mortalidade é de cerca de 10 a 30%. Por ser potencialmente fatal e utilizar de imunossupressão massiva, o diagnóstico rápido e preciso desta doença é fundamental. Entretanto, seu diagnóstico é realizado por meio de exclusão e apenas recentemente foram sugeridos critérios diagnósticos definitivos (LEVINE, *et al.*, 2024).

A avaliação da trombopoiese por meio do mielograma é uma das ferramentas que pode auxiliar no direcionamento diagnóstico de TIM. Porém, a obtenção de medula óssea é uma metodologia invasiva, muitas vezes contraindicada dependendo da condição clínica do paciente e possui um tempo de análise mais longo.

6.1 Celularidade da medula óssea

Os resultados encontrados de celularidade entre os animais sem alterações na contagem plaquetária e produção da série megacariocítica foi semelhante ao que encontramos em literatura (HARVEY, 2012, STACY E HARVEY, 2017). A celularidade da medula óssea apenas é útil para avaliação quando a amostra é representativa (presença de espículas na amostra) e lâminas de elevada quantidade são preparadas (STACY e HARVEY, 2017). Além disso, ocasionalmente, a celularidade e consequentemente a contagem de células trombopoieticas podem ser diferentes entre cães clinicamente saudáveis, além da ampla faixa etária dos grupos e possíveis diferenças entre diferentes raças e gêneros (GRINDEM, *et al.* 2002) também podem justificar um maior desvio padrão. **6.2 Diferentes técnicas de quantificação de megacariócitos na medula óssea**

Há diferença entre os grupos nas diferentes técnicas de quantificação de megacariócitos ($p < 0,001$) resultado este esperado corroborando com o trabalho de MYKLONAKYS, (2005) que realizou diferentes técnicas de confecção de lâminas contagem de megacacariócitos. O grau de correlação entre as técnicas é elevado ($r = 0,94$) e significativo ($p < 0,001$) em todos os grupos amostrados. SILVA *et al.*, (2012) também encontraram resultados de correlação elevados ($r = 0,90$) entre as técnicas. O presente trabalho realizou a contagem de 20 a 25 campos conforme preconizado por diversos autores para obtenção de CV em torno de 20% (MISCHKE *et al*, 2002, HARVEY, 2012, STACY e HARVEY 2017) e os CVs dos grupos I e II foram de 35%/campo, 23%/espícula e 22,5%/campo, 21,2%/espícula respectivamente. Entretanto, no grupo III os CVs foram elevados, sendo de 76,50%/campo e 71,5%/espícula. Amostras hipocelulares tendem a apresentar-se com menor número espículas, tamanho variável de espículas e distribuição heterogênea das células, podem dificultar a padronização da contagem e quantificação, o que poderia justificar a variabilidade de valores de referência na rotina e o elevado CV, principalmente entre os animais trombocitopênicos com hipoplasia megacariocítica. Os demais grupos apresentaram CVs semelhantes ao descrito em ambas as metodologias. A contagem de 100 campos reduziria o CV para 10% em pacientes com a série megacariocítica normoplásica (MISCHKE, *et al*, 2002). Porém, além das

questões citadas anteriormente, o tempo de análise seria bastante elevado. Para avaliação de 20 – 25 campos um profissional experiente leva cerca de 15 minutos, para avaliação de 100 campos o tempo se aproximaria de 60 minutos, o que pode inviabilizar a investigação em laboratórios com grande rotina.

6.3 Contagem de plaquetas e megacariócitos Além da contagem

automatizada, as contagens plaquetárias e a presença de agregados foram confirmadas com a revisão do esfregaço sanguíneo. Uma boa parte dos pacientes trombocitopênicos na contagem automatizada, não tem sua contagem confirmada na avaliação do esfregaço pela presença de agregados plaquetários demonstrando a necessidade de revisão das lâminas antes da liberação do hemograma (COMMANZI, 2004). O laudo liberado apenas com a contagem plaquetária obtida por automação deve ser evitado, por possíveis resultados subestimados, levando a diagnósticos e condutas terapêuticas equivocadas. O grau de trombocitopenia pode ser variável e dependente das causas de trombocitopenia do paciente, além de presença de comorbidades e outras condições correlacionadas existindo sobreposição dos valores encontrados mesmo com diferentes causas base (DIRCKS, *et al*, 2009). Trombocitopenias imunomediadas apresentam a contagem plaquetária intensamente diminuída, bem como hipoplasias medulares acentuadas também podem levar a trombocitopenias acentuadas (STOCKHAM E SCOTT, 2011; NELSON E COUTO, 2023). Sendo assim a avaliação da medula óssea por biopsia continua sendo o padrão ouro para avaliação da atividade megacariocítica (OLLERS *et al*, 2016). Como esperado as contagens plaquetárias foram diferentes nos animais entre os grupos I e II e I e III. Entretanto, não houve diferença entre os grupos II e III, ou seja, não houve diferença entre a intensidade da trombocitopenia entre os grupos com hiperplasia megacariocítica e diagnóstico presumido de TIM e cães com hipoplasia megacariocítica. Não houve correlação ($p>0,05$) entre contagem plaquetária e a contagem de megacariócitos tanto por campo quanto por espículas.

6.4 Fração de plaquetas imaturas e megacariócitos

O parâmetro IPF é utilizado na medicina pela sua utilidade para diagnóstico, avaliação prognóstica e monitoramento em diversas condições. Entretanto, a aplicação em medicina veterinária ainda é pouco conhecida, mas há evidências recentes de que o IPF pode ser um marcador para taxa de trombopoiese em cães (OLLERS, 2016; BUTARELLO, 2020; JORNET-RIUS, 2023). A contagem automatizada da fração de plaquetas imaturas é altamente

padronizável e reprodutível podendo ser vantajosa para o diagnóstico rápido de TIM. Comparada a citometria de fluxo tradicional, é altamente eficiente e menos dispendiosa e pode ser realizada durante a rotina de processamento do hemograma (IBRAHIM, *et al.*, 2016). O valor da mediana encontrado de IPF (#) 11,3 mil/ μ L é semelhante ao encontrado por PEREZ-ECIJA *et al.*, (2024) de 11,0 mil/ μ L. Os valores de IPF (%) 0,23 – 13,7% e IPF (#) 1,9 – 38,3 mil/ μ L para animais saudáveis foram próximos aos encontrados por JORNET-RIUS, (2023) que obtiveram um IPF (%): 1,24 -10,42% e IPF (#): 1,68-25,56 mil/ μ L e PEREZ-ECIJA *et al.*, 2024 com IPF (%): 0,5 – 8%, e IPF (#): 1,9 – 26,8 mil/ μ L, porém com intervalos mais amplos, pois nos dois trabalhos o número de animais avaliados foi consideravelmente maior, o que diminui o poder de alguns pacientes influenciarem a média do que no presente estudo.

A maior parte dos laboratórios de pesquisa quantifica as plaquetas imaturas (plaquetas reticuladas - PR) por meio da técnica de coloração e detecção utilizando *Tiazole Orange* (TO) e citometria de fluxo. (BUTARELLO, 2020).

A correlação entre plaquetas reticuladas coradas por TO e a determinação automatizada do IPF é variável e depende da magnitude da trombocitopenia. O coeficiente de correlação global entre pacientes saudáveis não trombocitopênicos e trombocitopênicos por diversas causas foi de 0,27 entre as duas metodologias IBRAHIM, *et al.*, (2016). Entretanto, para pacientes trombocitopênicos a correlação é maior ($r=0,63$) enquanto em indivíduos não trombocitopênicos a correlação é fraca ($r=0,29$). Uma correlação moderada a baixa em pacientes trombocitopênicos ($r = 0,478$, $p=0,029$) também foi descrita por HILLE, *et al.*, 2019.

Um método alternativo, mais recente utiliza a coloração de RNA por meio do corante SYTO 13, que possui maior estabilidade e correlação satisfatória ($r = 0,668$, $p < 0,001$) com os analisadores Sysmex (HILLE, *at al.*, 2019).

A falta de correlação entre as duas metodologias pode estar relacionada aos diferentes tempos de incubação das amostras em cada técnica. O *Tiazole Orange* tem maior afinidade ao DNA do que RNA e se liga inespecificamente aos grânulos densos das plaquetas. Já a polimetina e oxazina utilizadas na por analisadores automatizados melhora a afinidade ao RNA. Por fim, a contaminação da amostra com outros tipos celulares como leucócitos, no plasma

rico em plaquetas que podem conter grande quantidade de mRNA no seu citosol e a presença de grânulos densos e mitocôndrias, podem gerar marcações inespecíficas. (IBRAHIM, *et al.*, 2016, BURATELLO, 2020).

No presente trabalho, a determinação do IPF (%) conseguiu diferenciar os animais normocitopênicos dos trombocitopênicos com hiperplasia megacariocítica e diagnóstico presumido de TIM, enquanto o IPF (#) conseguiu diferenciar os pacientes normocitopênicos dos com trombocitopenia por hipoplasia megacariocítica.

SILVA, *et al.*, (2012), utilizou a contagem de plaquetas reticuladas coradas com TO e observou diferença na PR% entre o grupo controle e trombocitopênicos com a série megacariocítica normoplásica ou hiperplásica e entre o grupo controle e trombocitopênicos com hipoplasia megacariocítica, mas não entre os dois grupos de animais trombocitopênicos. Quando avaliada a contagem absoluta de PR, também não se observa diferença entre os grupos com trombocitopenia, apenas entre o grupo controle e trombocitopênicos com a série megacariocítica normoplásica ou hiperplásica (SILVA, 2012).

No presente trabalho, cinco animais com hiperplasia megacariocítica não apresentaram valores elevados de IPF% (1,3, 3,4, 5,4, 6,6 e 6,8%). A presença de uma ampla sobreposição da contagem de plaquetas imaturas, tanto por citometria de fluxo, quanto de forma automatizada, entre pacientes humanos com TIM e hipoplasia medular acentuada pode ser observada por SILVA, (2012) e CYBULSKA, *et al.*, (2017). Entre as hipóteses, uma aceleração da liberação de plaquetas imaturas pode ser causada em qualquer estado trombocitopênico. Essa observação evidencia que nem sempre animais considerados com hipoplasia de megacariócitos na citologia de medula óssea estariam realmente com a produção de plaquetas diminuída, salvo casos de hipoplasia intensa (SILVA, 2012) ou ainda, que possa existir um componente imunomediado (trombopoiese ineficaz) direcionado a destruição de plaquetas imaturas, assim como existe destruição direcionada aos reticulócitos para as hemácias (BROOKS e LEVINE, 2019).

Quanto aos valores absolutos de IPF, houve apenas diferença estatística entre os animais saudáveis e os trombocitopênicos por hipoplasia megacariocítica. Os valores absolutos de plaquetas reticuladas por vezes dentro dos valores de referência durante o curso da trombocitopenia imunomediada

primária e secundária, pode ser explicado devido ao baixo número de plaquetas em muitos animais (WILKERSON, *et al.*, 2001).

Apesar da sobreposição de valores presentes nos grupos trombocitopênicos com hiperplasia megacariocítica e hipoplasia megacariocítica, a tentativa de discriminação de um valor de IPF (#) que auxilie a diferenciação entre ambas as condições é possível, assim como é realizada a estratificação da contagem absoluta de reticulócitos para avaliar a eficiência da resposta medular frente a uma trombocitopenia.

Considerando os dados obtidos, realizamos a curva ROC (figura 17) para analisar a utilização clínica da determinação do IPF (#) para diferenciação dos pacientes com trombocitopenia e diagnóstico presumido de TIM e trombocitopenia por hipoplasia megacariocítica (Grupos II e III). O poder explanatório para diferenciação entre as causas de trombocitopenia foi moderado (AUC 0,709) com ponto de corte de 15.700/ μ L plaquetas imaturas. Para a IPF (%) para diferenciação dos pacientes com trombocitopenia e diagnóstico presumido de TIM e trombocitopenia por hipoplasia megacariocítica (Grupos II e III), o poder explanatório para diferenciação entre as causas de trombocitopenia foi moderado (AUC 0,707) com ponto de corte de 19,65% de plaquetas imaturas. Em pacientes humanos foi obtido AUC de 0,71 comparando grupos de pacientes humanos com TIM e trombocitopenia por acentuada hipoplasia megacariocítica (CYBULSKA, *et al.*, 2017). Em contraste, em pacientes caninos foi encontrado poder explanatório elevado (AUC 0,982) e ponto de corte de 6,90% para cães com trombocitopenia por hipoplasia megacariocítica (PEREZ-ECIJA, *et al.*, 2024). Neste segundo trabalho, o número maior de pacientes analisados pode justificar o maior AUC e menor ponto de corte para as duas condições.

Há uma correlação negativa entre IPF (%) e contagem plaquetária nos três grupos avaliados. Em humanos também observaram correlações inversas em pacientes não trombocitopênicos (CYBULSKA, *et al.*, 2017). Esta condição pode ser explicada pelo tempo de maturação das plaquetas imaturas (PIs), semelhante ao que acontece aos reticulócitos para eritropoiese em que formas mais imaturas de reticulócitos são libertadas na circulação na anemia e, portanto, o tempo dos reticulócitos para perderem o seu retículo, o seu “tempo de vida na fase de reticulócitos” é aumentado. Uma mudança semelhante para maior

quantidade de Pls frente a trombocitopenia grave também foi demonstrada, indicando que a correlação inversa entre contagens de plaquetas e plaquetas imaturas pode ser em parte explicada por um “retardo maturativo das plaquetas imaturas” (ANGINEUX, *et al.*, 2016). Em segundo lugar, a TIM é uma doença não só de destruição plaquetária, mas também de megacariocitopoiese comprometida, com contribuição variável de ambos os componentes para o grau de trombocitopenia (LEVINE e BROOKS, 2019).

Dado que os fatores descritos acima podem estar presentes em graus variáveis, isso pode explicar parcialmente por que estimativas divergentes do valor preditivo das medições de PLT imaturas são relatadas na literatura (CYBULSKA, *et al.*, 2017).

Os analisadores XN - Sysmex são mais úteis para a separação de pacientes humanos com TIM dos com hipoplasia megacariocítica (SAKURAGI, *et al.*, 2015). No entanto, a sobreposição de medições de Pls em pacientes com TIM e hipoplasia megacariocítica é um fenômeno biológico e não pode ser completamente superado por procedimentos técnicos aprimorados.

6.5 Volume plaquetário médio e IPFO VPM, que avalia o volume plaquetário médio é expresso em fentolitros (fL), é obtido pelos equipamentos hematológicos por impedância. Como existem variações entre equipamentos, cada laboratório deveria ter o seu valor de referência, geralmente entre 8 e 12 fL. O VPM deve ser interpretado de forma associada a contagem plaquetária (MAY, *et al.*, 2019).

VPM é um parâmetro que pode auxiliar na avaliação do esfregaço sanguíneo, havendo correlação entre este valor e a quantidade de megacariócitos na medula em humanos (BACCINI, *et al.*, 2009). Um maior VPM geralmente indica maior quantidade de plaquetas jovens circulantes (LEVINE E BROOKS, 2019). Por outro lado, em pacientes com trombocitopenia resultante de hipoplasia medular, o VPM e a quantidade megacariócitos são substancialmente mais baixos do que em pessoas saudáveis ou os pacientes acima mencionados (BACCINI, *et al.* 2019 e ITTERMANN *et al.*, 2019). Não houve diferença significativa do VPM entre os três grupos ($p=0,1422$), de forma semelhante ao observado em cães por JORNET-RIUS *et al.* (2023) e PEREZ-ECIJA, *et al.* (2024). Como este parâmetro é obtido por meio de impedância, sua validade é negativamente afetada por baixas contagens plaquetárias, presença

de esferócitos, esquizócitos, micrócitos ou outras partículas com volume semelhante às plaquetas, os quais o equipamento não consegue diferenciar (XU, *et al.*, 2013). Portanto, em cães este parâmetro não se apresenta confiável e deve ser evitado como critério para avaliação de resposta da trombopoiese no hemograma.

Embora as plaquetas imaturas costumem ser maiores do que as maduras, a correlação entre VPM e IPF (%) e IPF (#) foi baixa a negativa e não significativa ($r=0,04$, $p=0,86$ e $r=-0,23$, $p=0,34$ respectivamente), pois a técnica de obtenção do parâmetro IPF se baseia na emissão de sinais fluorescentes e não apenas pelo tamanho (volume) celular. Resultados semelhantes foram encontrados em humanos utilizando equipamentos da série XE Sysmex® e Mindray®, que também não encontraram correlação linear entre VPM e IPF% (BUTARELLO, *et al.*, 2020).

6.6 Trombocitopenia imunomediada e IPFA trombocitopenia imunomediada é uma doença heterogênea tanto em humanos quanto em animais (LEVINE e BROOKS, 2019). Seu diagnóstico ainda continua sendo o de exclusão sem um teste “padrão ouro” (PROVAN, 2010; PEREZ-ECIJA, *et al.* (2024).

Na medicina e na medicina veterinária com o consenso de diagnóstico de TIM, considera-se TIM primária aqueles pacientes com contagem plaquetária inferior a $100.000/\mu\text{L}$ e ausência de outras causas que podem ser associadas a trombocitopenia. Esta ainda deve ser diferenciada da TIM secundária que pode ser causada por agentes infecciosos, medicamentos e neoplasias e ainda considerar variáveis biológicas, pré-analíticas e analíticas que influenciam na contagem de plaquetas (DIRCKS, *et al.*, 2009 e LEVINE, *et al.*, 2024). O IPF% e a contagem de plaquetas reticuladas são descritos na medicina como ferramentas para diferenciação entre trombocitopenias imunomediadas e por outras causas (SAKURAGI, 2015). No presente trabalho, não foi possível demonstrar diferenças significativas entre os parâmetros IPF (%) e IPF (#) entre pacientes trombocitopênicos com hiperplasia megacariocítica e do diagnóstico presumido de TIM dos trombocitopênicos por outras causas com hipoplasia megacariocítica, resultados que corroboram aos encontrado por SILVA, *et al.*, (2012) que também não observaram diferenças significativas entre contagem de

plaquetas reticuladas absolutas e relativas entre cães trombocitopênicos com medula normo/hiperplásica e pacientes com hipoplasia megacariocítica. No geral, a utilidade de frações de plaquetas imaturas/plaquetas reticuladas como ferramenta de diagnóstico parece baixa tanto em pessoas quanto em cães (LEVINE e BROOKS, 2019; LEVINE, *et al.*, 2024).

7 CONCLUSÃO

As metodologias de contagem de megacariócitos por campo e por espículas podem ser igualmente utilizadas para a contagem de megacariócitos. O principal desafio continua sendo a obtenção de amostras representativas com quantidade suficiente de espículas. Não foi possível determinar relação entre a contagem plaquetária e o grau de produção de megacariócitos na medula óssea, bem como entre a produção de megacariócitos e um aumento no VPM dos animais. O parâmetro IPF (%) diferenciou animais saudáveis daqueles com hiperplasia megacariocítica e diagnóstico presumido de TIM, apesar de não diferenciar trombocitopenias por hiperplasia megacariocítica ou hipoplasia da série. Já o IPF (#) diferenciou animais saudáveis daqueles com hipoplasia megacariocítica.

Corroborando com o consenso de diagnóstico de TIM de 2024 o IPF não deve ser um parâmetro utilizado isoladamente para o diagnóstico de TIM em cães.

8. REFERÊNCIAS

- ANGÉNIEUX, C.; MAÎTRE, B.; ECKLY, A.; LANZA, F.; GACHET, C.; DE LA SALLE, H. Time-Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging and Its Correlation with Translation Activity. **PLoS ONE**. v.11, n.11, 2016.
- BACCINI, V.; GENEVIÈVE, F.; JACQMIN, H.; CHATELAIN, B. GIRARD, B.; WUILLEME, S.; VEDRENNE, A.; GUIHENEUF, E.; TOUSSAINT-HACQUARD, M.; EVERAERE, F.; SOULARD, M.; LESESVE, J. F.; BARDET, V. Platelet Counting: Ugly Traps and Good Advice. Proposals from the French-speaking Cellular Hematology Group (GFHC). **Journal of Clinical Medicine**. v, 808, p, 9, 2020.
- BACHMAN, D.E.; FORMAN, M.A.; HOSTUTLER, R.A.; CORN, S.; LIN, J; KOCIBA, G.J. Prospective diagnostic accuracy evaluation and clinical utilization of a modified assay for platelet-associated immunoglobulin in thrombocytopenic and nonthrombocytopenic dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 44, n. 3, p. 355-368, .2015.BROOKS, M.B.; HARR, K.E.; SEELIG, D.M. WARDROP, K.J.; WEISS, D.J. Schalm's Veterinary Hematology, 7ed Willey Blackwell, 2022, 4121p.
- BUTTARELLO, M.; MEZZAPELLE, G.; FREGUGLIA, F.; PLEBANI, M. Reticulated platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations. **International Journal of Laboratory Hematology**. v.42, p.363–370, 2020. CYBULSKA, A.; MEINTKER, L.; RINGWALD, J.; KRAUSE, S. W. Measurements of immature platelets with haematology analysers are of limited value to separate immune thrombocytopenia from bone marrow failure. **British Journal of Haematology**. v.177, n.4, p. 612–619, 2017.
- COMAZZI S.; PIERALISI, C.; BERTAZZOLO, W. Haematological and biochemical abnormalities in canine blood: frequency and associations in 1022 samples. **Journal of Small Animal Practice**. v.45, n.7, p.343-349, 2004.
- CORTESE, L.; CHRISORPERSON, P.W; PELAGALLI, A Platelet Function and Therapeutic Applications in Dogs: Current Status and Future Prospects – Review. **Animals (Basel)**, v.10. n.2, 2020.

CREMER, M. The immature platelets fraction (IPF) in neonates. **Diagnostic Perspective**. v.1, p. 36 – 42, 2011.

DALE, G.L.; FRIEZE, P.; HYNES, L.A.; BURSTEIN, S.A. Demonstration that thiazole-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. **Blood**. V.85, n.7, p. 1822–1825, 1995.

DAVENPORT, P.; LORENZ, V.; LIU, Z.; FELDMAN, H.A.; CANAS, J.; NOLTON, E.; BADUR, C.A.; THI-DO, T.M.; SOLA-WISNER, M. Development of gates to measure the immature platelet fraction in C57BL/6J mice using the Sysmex XN-V series multispecies hematology analyzer. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.33, n.5, p. 1-7, 2021.

DIRCKS, B.H.; SCHUBERTH, H.J.; MISCHKE, R. Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004–2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.235, n.8, p.960-966, 2009.

DONATO, H. Neonatal thrombocytopenia: A review. I. Definitions, differential diagnosis, causes, immune thrombocytopenia. **Archivos Argentinos de Pediatría**. 2021.

GOODARD, A.; LEISEWITZ, A.L.; KRISTENSEN, A.T.; SCHOEMAN, J.P. Platelet indices in dogs with *Babesia rossi* infection. **Veterinary Clinical Pathology**. v.44, n.4, p. 493 – 497, 2015.

GREBERT, M; GRANAT, F.; BRAUN, J.P.; LEROY, Q.; BOURGÈS-ABELLA, N.; TRUMEL, C. Validation of the Sysmex XN-V hematology analyzer for canine specimens. **Veterinary Clinical Pathology**. v.50, n.2, p.184-197, 2021.

GRINDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.32, p. 1313–1374, 2002.

HARVEY, J, W. **Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas**. 1ed. St Louis: Elsevier, 2012, 360p.

HARRISON, P.; GOODALL, A.H. "Message in the platelet"—more than just vestigial mRNA! **Platelets**.v.19, n.6, p. 395 – 404, 2008.

HILLE, L.; CEDERQVIST, M.; HROMEK, J.; STRATZ, C.; TRENK, D.; NUHRENBURG, T.G.; Evaluation of an alternative staining method using SYTO 13 to determine reticulated platelets. **Thrombosis and Haemostasis**. v.119, p.779-785, 2019.

IBRAHIM, H.; NADIPALLI, S.; USMANI, S.; DELAO, T.; GREEN, L.; KLEIMAN, N. S. Detection and quantification of circulating immature platelets: agreement between flow cytometric and automated detection. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**. v.42, n.1, p.77–83, 2016.

INGRAM, M.; COOPERSMITH, A. Reticulated platelets following acute blood loss. **British Journal of Haematology**, n.17, v.3, p. 225-229, 1969. 1969.

ITTERMANN, T.; FEIG, M.A.; PETERSMANN, A.; RADKE, D.; GREINACHER, A.; VÖLZKE, H.; THIELE, T. Mean platelet volume is more important than age for defining reference intervals of platelet counts. **PLoS ONE**. v.14, n.3, 2019.

JELKMANN, W. The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v.13, p. 791 – 801, 2001.

JEON, K.; KIM, M.; LEE, J.; LEE, J.S.; KIM, H.S.; KANG, H.J.; LEE, Y.K. Immature platelet fraction: A useful marker for identifying the cause of thrombocytopenia and predicting platelet recovery. **Medicine**. v.99, n.7, 2020.

JEON, M.J.; YU, E.S.; KANG, K.W.; LEE, B.H.; PARK, Y.; LEE, S.R.; SUNG, H.J.; YOON, S.Y.; CHOI, C.W.; KIM, B.S.; KIM, D.S. Immature platelet fraction

based diagnostic predictive scoring model for immune thrombocytopenia. **The Korean Journal of Internal Medicine.** v.35, p.4, p. 970 – 978, 2020.

JERICÓ, M.M., NETO, J.P.A.; KOGIKA, M.M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos.** 1ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015, 5544p.

JORNET-RIUS, O, MESALLES-NARANJO M, PASTOR J. Performance of the Sysmex XN-V hematology analyzer in determining the immature platelet fraction in dogs: A preliminary study and reference values. **Veterinary Clinical Pathology.** v. 52, n. 3, p. 433 – 442, 2023.

KAJIHARA, M., OKAZAKI, Y, KATO, S, KUWANA, M. Evaluation of platelet kinetics in patient with liver cirrhosis: similarity to idiopathic thrombocytopenia purpura. **Journal of gastroenterology and hepatology.** v 22, p 112-118, 2007.

KAUSHANSKY, K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. **Blood.** v.111, n.3, p. 981-986, 2008.

LEVINE D.N.; BROOKS, M.B. Immune thrombocytopenia (ITP): Pathophysiology update and diagnostic dilemmas. **Veterinary Clinical Pathology.** v.48, n.1,17– 28, 2019.

LEVINE, D.N.; KIDD, L.; GARDEN, O.A.; BROOKS, M.B.; GOGGS, R.; KOHN, B.; MACKIN, A.J.; ELDERMIRE, E.R.B.; CHANG, Y.M.; ALLEN, J.; CHRISTOPHERSON, P.W.; GLANEMANN, B.; MARUYAMA, H.; NASKOU, M.C.; NIELSEN, L.N.; SHROPSHIRE, S.; VIAL, A.K.; BIRKENHEUER, A.J.; FORMAN, M.A.; HANZLICEK, A.S.; LAGNER, K.F.; LASHNITS, E.; LUNN, K.F.; MAKIELSKI, K.M., ROURA, X.; SPADA, E. ACVIM consensus statement on the diagnosis of imune thrombocytopenia in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine,** 2024.

LUCIDI, C.A.; REZENDE, C.L.E.; JUTKOWITZ, L.A.; SCOTT, M.A. Histologic and cytologic bone marrow findings in dogs with suspected precursor-targeted

immune-mediated anemia and associated phagocytosis of erythroid precursors. **Veterinary Clinical Pathology**. p. 1-15, 2017.

MAY, J.E.; MARQUES, M.B.; REDDY, V.V.B; GANGARAJU, R. Three neglected numbers in the CBC: The RDW, MPV, and nRBC Count. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. v.83, n. 3, p.167 – 172, 2019.

MEINTKER, L.; KRAUSE, S.W. Reticulated platelets – clinical application and future perspectives, **Journal of Laboratory Medicine**. n.44, v.5, 9. 241 – 253, 2020.

MISCHKE, R; BUSSE, L. Reference values for the bone marrow aspirates in adult dogs. **Journal veterinary medicine**; v 49, p 499-502, 2002.

MISCHKE, R.; BUSSE, L.; BARTELS, D.; GLASER, S.; REIENBROCK, L. Quantification of Thrombopoietic Activity in Bone Marrow Aspirates of Dogs. **The Veterinary Journal**. v. 164, p. 269 – 274, 2002

MYLONAKIS, M E, DAY, M J, LEONTIDES, L S, PETANIDES, T, FARMAKI, R, ATHANASIOU, L. Type of smear may influence thrombopoietic cell counts in the bone marrow of clinically healthy dogs. **Veterinary clinical pathology**; v 34, p. 358-361, 2005.

NEEL, J.A.; BIRKENHEUER, A.J.; GRINDEM, C.B. Thrombocytopenia. In **Kirk's Current Veterinary Therapy XV**. St. Louis: Elsevier Saunders: St. Louis, 2010, p. 280–285.

NELSON, R.W.; COUTO, G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 6ed. Rio de Janeiro: Gen Guanabara Koogan, 2023, 1560p.

OLLERS, D. E.; BAUER, N.; GINDER, M.; JOHANNES, S.; PERNECKER, I., MORITZ, A. Optimized gating and reference ranges of reticulated platelets in dogs for the Sysmex XT-2000iV. **BMC Veterinary Research**. n.12, v.148, 2016.

OSEI-BIMPONG, A. The effect of storage on the clinical utility of the immature platelet fraction. **Hematology**. v.14, n.2, p.118-121, 2009.

PANKRAZ, A.; BAUER, N.; MORITZ, A. Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000lv automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 38, n.1, p. 30-38, 2009.

PEREZ-ECIJA, A.; MARTINEZ, C.; FERNANDEZ-CASTAÑER, J.; MENDOZA, F.J. Utility of immature platelet fraction in the Sysmex XN-1000V for the differential diagnosis of central and peripheral thrombocytopenia in dogs and cats. **Journal of veterinary internal medicine**. p.1-8, 2024.

PROVAN, D.; STASI, R.; NEWLAND, A.C.; BLANCHETTE, V.S; BOLTON-MAGGS, P.; BUSSEL, J.B.; CHONG, B.H; CINES, D.B.; GERNSHEIMER, T.B; GODEAU, B.; GRAINGER, J.; GREER, I.; HUNT, B.J; IMBACH, P.A.; LYONS, G.; MCMILLAN, R.; RODEGHIRO, F.; SANZ, M.A.; TARANTINO, M.; WATSON, S.; YOUNG, J.; KUTER, D.J. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. **Blood**. v.115, n.2, p.168-186, 2010.

RASKIN, R.; MESSICK, J.B. Bone Marrow Cytologic and Histologic Biopsies: Indications, Technique, and Evaluation. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. n.42, p. 23 – 42, 2012.

REBAR, A.H.; MACWILLIAMS, P.S.; FELDMAN, B.F.; METZGER, F.L.; POLLOCK, R.V.H.; ROCHE, J. **Guia de hematologia para cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2003.

SAKURAGI, M.; HAYASHI, S.; MARUYAMA, M. *et al*. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. **The Japanese Society of Hematology**. v.101, n.5, p. 369-375, 2015.

SCHWARTZ, D.; SHARKEY, P.J.; ARMSTRONG, P.J.; KNUDSON, C. KELLEY, J. Platelet Volume and Plateletcrit in Dogs with Presumed Primary Immune-Mediated Thrombocytopenia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.28, n.5. p.1575–1579, 2014.

SILVA, L.F.N.; GOLIM, M.A.; TAKAHIRA, R.K. Measurement of thrombopoietic activity through the quantification of megakaryocytes in bone marrow cytology and reticulated platelets. **Research in Veterinary Science**. v. 93, n. 1, p. 313 – 317, 2012.

SINGH M.K.; LAMB W.A. Idiopathic thrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. **Australian Veterinary Journal**.v. 83, p. 700 – 703, 2005.

SMITH, R. THOMAS, J.S. Quantitation of Reticulated Platelets in Healthy Dogs and in Nonthrombocytopenic Dogs with Clinical Disease. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 31, n.1. p. 26 – 32, 2002.

STACY, N. I; HARVEY, J.W. Bone Marrow Aspirate Evaluation. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v.7, p.31 -52, 2017.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 729p.

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ed. Barueri: Gen, 2014, 668p.

WEISS, D.J.; TOWNSEND, E. Evaluation of Reticulated Platelets in Dogs. **Comparative Haematology International**. v.8, n.1, p 166-170, 1999.

WILKERSON, M.J.; SHUMAN, W.; SWIST, S.; HARKIN, K.; MEINKOTH, J.; KOCAN, A.A. Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in dogs with immune-mediated thrombocytopenia. **Veterinary Clinical Pathology**. v.30, n.3, p. 141-149, 2001.

XU, R.L.; ZHENG, Z.J.; MA, Y.J.; HU, Y.P.; ZHUANG, S.H. Platelet volume indices have low diagnostic efficiency for predicting bone marrow failure in thrombocytopenic patients. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v.5, n.1, p. 209-214, 2013.

ZACHARY, J. F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 7ed. Elsevier, 202, 1528p.

ZMIGRODZKA, M.; GUZERA, M.; WINNICKA, A. Evaluation of reticulated platelets in dogs with breed-related thrombocytopenia. **Polish Journal of Veteterinary Sciences**. v. 17, n. 1, p. 137 – 142, 2014.

Anexo 1

Resultados individuais dos pacientes por grupo:

Paciente	Mk/Campo	Mk/Espícula	GRUPO I – Normoplasia megacariocítica				Celularidade Medular (%)
			Contagem Plaquetária (mil/μL)	IPF (%)	IPF(#)	VPM (fL)	
Ruby	11,5	5,8	217	29	39440	12,7	65
Woody	8,6	5,4	234	2,6	6084	10,8	45
Lola	8,1	6	222	5,1	11322	9,2	40
Coca	6,4	4,4	267	1,5	4005	8,5	40
Django			221	5,1	11271	10,9	35
Samantha	6,2	3,7	249	6,4	15936	11,4	35
Brenda	9,1	6	198	2,6	5148	10,8	65
Demetria	3,7	2,3	480	10,9	52320	14,1	55
Scooby	12,9	6	263	2,3	6049	10,9	50
Mel	6,5	4,2	524	0,5	2620	8,1	60
Pipa	16,4	6,4	271	1,4	3794	10,7	60
Max	8,1	3,9	180	3,2	5760	10,4	50
Bob	15,5	6,1	408	10,5	6500	3,5	50
Thor	8	5,1	308	10,2	42840	1,4	50
Nina	9,6	4,9	250	2,6	31416	10,6	50
Lola	11,3	5,3	391	5,5	48484	12,4	30
Rita	12,8	7	273	1,1	21840	8	60
Brisa	9,3	63	417	11,6	48372	7,9	60

GRUPO II – Hiperplasia Megacariocítica							
Paciente	Mk/Campo	Mk/Espícula	Contagem Plaquetária (mil/μL)	IPF (%)	IPF(#)	VPM (fL)	Celularidade Medular (%)
Quinho			28	57	15960	7,5	50
Mel			85	19,7	16745	11,6	60
Fred	14,7	11	21	40,1	8421	12	90
Tuca	19,9	12,2	91	22,3	20293	13,2	40
Shot	26,6	12	13	19,9	2587	7,7	80
Matilda	15,9	10,4	149	20,3	30247	13,4	40
Maria Juana	21,1	12,2	141	20,3	28623	13,4	45
Ricota	19,9	10,6	146	5,4	7884	11,6	60
Bolinha	24,6	12,4	17	40,9	6953	9,2	65
Puf	24,5	12,1	92	47,9	44068	12,7	90
Zuba	17,1	11,4	36	21,8	7848	12,7	65
Toby	25	14,6	88	6,6	5808	10,7	60
Whisky	22,4	14,1	144	7,8	11232	12,2	60
Benji	30,9	12,6	136	9	19530	8,2	50
Cacau	21,1	16,5	45	6,8	3060	11,4	60
Half	29,5	19	6	3,4	204	8,6	80
Siena	31,6	17,6	80	13,3	10640	12,6	70
Stuart	18,3	11,8	18	17,2	3096	12,3	85
Theo	26,4	20,3	7	1,3	91	12	60
Julio	18	15,6	11	10,4	1144	10,3	80

GRUPO III – Hipoplasia Megacariocítica

Paciente	Mk/Campo	Mk/Espícula	Contagem		IPF(%)	IPF(#)	VPM (fL)	Celularidade Medular (%)
			Plaquetária	(mil/μL)				
Luna	2,9	1,3	44	10,6	4664	11,6	45	
Scooby	0,8	0,2	8	0,9	72	8,4	25	
Duquesa	2,3	0,9	22	21,6	4752	12,2	95	
Cido	1	0,5	50	10,8	5.400	10,3	60	
Miley	0,4	0,3	28	29	8120	11,5	85	
Whisky	4	1,1	124	9,3	11532	12,4	60	
Koda	4,2	1,8	10	4,4	44	11,8	40	
Don	2,4	0,8	91	11,4	10374	11,5	50	
Mia	1	0,3	60	19,6	11760	12,5	70	
Tauros	0,5	0,5	8	0,4	32	12,3	15	
Cacau	0,4	0,2	10	0,1	1	8,9	15	
Bella	2,1	0,8	129	3,4	4386	12	50	
Aloha	0,6	0,3	6	3,1	186	8,4	15	
Billie	0,7	0,3	63	13,7	8631	11,3	30	

NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO

O Artigo Científico será enviado para a revista “Veterinary Clinical Pathology”.

Veterinary Clinical Pathology (VCP) is the leading international journal in veterinary and comparative laboratory medicine. As such, VCP urges manuscripts to be written using the highest standards. VCP will accept for publication review: scientific review articles; experimental and clinical research; special reports on clinical laboratory practice, policy, and education; novel case reports; and editorials and letters that pertain to our scope and mission.

The mission of *Veterinary Clinical Pathology (VCP)* is to provide a forum to communicate and discuss new developments that advance the laboratory diagnosis of animal diseases.

VCP welcomes the submission of original manuscripts involving acid-base and electrolytes; biomarkers of disease; blood-banking and transfusion medicine; clinical chemistry; coagulation, platelets, and hemostasis; cytopathology, including effusions and body fluids; experimental and pathophysiologic studies that emphasize clinical pathology; genetic blood and biochemical disorders; hematopathology, including blood cells, hemoparasites, iron metabolism, bone marrow, and hematopoietic neoplasia; hormonal analysis and endocrine disease; infectious diseases of blood and bone marrow; inflammation and inflammatory mediators; instrumentation and diagnostics, including point-of-care testing, assay validation, method comparison, and molecular diagnostics; lipids and lipoproteins; quality assurance and laboratory statistics; telepathology and digital imaging; and toxicologic clinical pathology.

2. Author Agreements

Manuscripts will be considered that have not been published elsewhere (except in abstract form) and are not concurrently under review by any other publication. Authorship implies substantial contribution and approval of the manuscript by each author. VCP adheres to guidelines for authorship established by the International Committee of Medical Journal Editors (www.icmje.org).

If a paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

3. Reporting Requirements and Recommendations

Studies that report validation or comparison of methods, establish reference intervals and tests of diagnostic accuracy must adhere to the guidelines listed below. In addition, to reporting studies for which specimen analysis is central, full descriptions of specimen handling and laboratory methods are required, which include: (1) type of specimen analyzed, (2) time from collection to analysis, (3) storage conditions, (4) name and generation of commercial assays, and (5) performance characteristics (imprecision of the assay, reportable range, reference intervals used) of assays.

3.2 Reference and Interval Studies

VCP requires adherence to ASVCP and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. In addition to the references below, the **Quality Assurance and Standards Committee** has put together a detailed check list

with the procedural steps and Excel spreadsheets for entering population and reference interval (RI) data needed for RI studies published in VCP. These spreadsheets will assist authors with data tabulation of reference populations using different sample sizes. [See 4.1.D](#) for the new Reference Interval article category with a checklist and spreadsheets.

3.3 Studies of Diagnostic Accuracy

VCP requires adherence to STARD guidelines in most cases.

3.4 Animal Care and Use: Investigations involving research animals must be done using the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (<http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf>) or equivalent guidelines.

3.5 Study Approval Registration

Authors must confirm the registration of laboratory animal study approval and/or ethics committee consent to perform animal studies.

Authors will be required to enter the ID or protocol number, the exact designation of the authorizing agency, and the date of approval upon submission. And, instances of written consent forms (by pet owners) are required.

3.6 Owner Informed consent

For any studies involving animal tissues belonging to private owners, authors must obtain written informed consent from the respective owners.

3.7 Appropriate Use of Terminology

For guidelines on use of proper terminology, see: Braun JP. Communicating with precision in veterinary clinical pathology: definitions, units, and nomenclature [editorial]. *Vet Clin Pathol.* 2009;38:416-417.

Data Not Shown

The statement "data not shown" in describing unpublished results is generally considered unacceptable. Author-generated data should either be provided as supplementary data or the claim and reference to the data should be removed. When data from a non-author source is mentioned, the term "unpublished observation(s)" or "personal communication" can be inserted and written permission from the source should be submitted with the manuscript.

3.8 Quality Assurance Guidelines

VCP strongly recommends that authors adhere to the principles outlined in the ASVCP QALS Committee guidelines that are freely available on the [VCP website](#).

4. Manuscript Review, Editing, and Publication

For each manuscript review, 2-3 anonymous peer reviewers and a Section Editor will evaluate each manuscript.

Authors are asked to respond to reviewer suggestions within 60 days.

Revised manuscripts may be re-reviewed, sometimes by new reviewers.

Upon acceptance, manuscripts will undergo editorial review, and authors may be asked to respond to additional editorial and reviewer comments.

Copyediting is performed using the *AMA* style guide.

Proofs will be sent to the author for final approval.

Articles will be published online on the journal's Early View page prior to print publication.

Article Formatting (See specifics about Article Categories below)

All articles should comply with standard formatting

Title Page: The first page of the manuscript should include the following information:

1. The Full title of the article
2. A short running header title of 50 characters or less, including spaces.
3. The authors' first and last names and middle initials, and the name of the institution(s) of the authors at the time the work was done should be included.
4. The corresponding author's institution and e-mail addresses should be placed under "Correspondence" at the end of the title page.

Abstract: The abstract is limited to 250 words and should be written in complete sentences and structured using the following headings: Background, Objectives, Methods, Results, and Conclusions except for *Case Reports* and *What Is Your Diagnosis?* articles. Please see specifications below under articles categories.

Keywords: Identify 3-6 key words that do not duplicate words in the title of the article and place them in alphabetical order after the Abstract.

- Use terms from the medical subject headings (MeSH) list of Index Medicus at <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>; if suitable MeSH terms are not yet available for recently introduced items, current terms may be used.
- The type of animal, the organ system studied, and the methods should always be listed.

Introduction: The Introduction should provide sufficient background information to justify the rationale for the study and why it is important, state the hypothesis or research question, state the objective(s) or specific aims of the study, and cite only relevant literature. Ideally, introductions should be about 3-5 paragraphs in length.

Materials and Methods: Methods should include, as appropriate, a description of study design, experimental animals, analytical methods, and statistical analysis.

Products (eg, instruments, reagents, stains, drugs) should be referred to by their generic or chemical names, followed by the model or trade name, and the name and location of the manufacturer in parentheses.

Use of metric or SI units is strongly encouraged. When describing centrifugation, provide *g*force and not rpm. Statistical analysis must be described completely. A few useful references are: .

Results

Report results in logical order and in parallel with the Methods (for every method, there should be a result).

Tables and figures should be referred to in parentheses at the end of a sentence referring to the results.

Data in tables and figures should not be duplicated in the text. Results should not repeat the rationale for the methods used.

Discussion

The discussion should begin with the most important findings related to the hypothesis and study objectives.

Summarize results succinctly and discuss them in the context of other studies.

Include limitations of the study.

Only discuss topics relevant to the results.

Avoid repetition of specific results and introduction of new methods or results.

Acknowledgments

Funding, grant support, or provision of supplies used in the study and individuals providing other forms of assistance (e.g., statistical review, manuscript preparation, technical assistance) may be acknowledged.

When individuals are acknowledged, provide their affiliations.

References

References should be limited to pertinent literature and formatted according to American Medical Association (AMA) guidelines, as shown in the examples below and in recent issues of *VCP*. If using referencing programs, the output style is JAMA.

Article titles in languages other than English should include an English translation in brackets.

Non-peer-reviewed references (e.g., abstracts, book chapters, proceedings) should be kept to a minimum; the most recent edition of a textbook should be cited if it contains the pertinent information.

- References should be listed and numbered in the order in which they first appear in the text and should be identified in the text by superscript Arabic numbers.
- Journal abbreviations should be those used in Index Medicus.

- References with more than 6 authors should list the first 3 authors followed by et al.
- To cite references in Wiley, go to the article face page and click on tools, from there click on export citation.
- Reference formatting examples are shown below:

Pitorri F, Dell'Orco M, Carmichael N, Barker EN, Hollywood M, Tasker S. Use of real-time quantitative PCR to document successful treatment of *Mycoplasma haemocanis* infection with doxycycline in a dog. *Vet Clin Pathol*. 2012;41:493-496.

Paolo Silvestrini P, Piviani M, Alberola J, et al. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with leishmaniasis: correlation with age and clinicopathologic abnormalities. *Vet Clin Pathol*. 2012;41:468-574.

Books and chapters in books:

- Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2nd ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2008:3-51.
- Young DS, Bermes EW. Specimen collection and processing: sources of biological variation. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1999:184-190.

Abstracts, letters, and editorials:

- Gelain ME, Rossi G, Paltrinieri S. Use of Sysmex XT-2000iV hematology analyzer to identify hematopoietic neoplasms in dogs [abstract]. *Vet Clin Pathol*. 2007;36:385-386.

Proceedings

- Cebra CK. Biochemical abnormalities in blood and forestomach fluid from llamas with gastrointestinal disease. *Proceedings of the 15th Annual ACVIM Forum*. Lake Buena Vista, FL, May 22-25, 1997:447-448.

URLs

- ASVCP: Coagulation Sampling Guidelines for Venipuncturists. Brooks MB, ed. 2009. Available at: <http://www.asvcp.org/pubs/pdf/CoagSampleGuide.pdf>. Accessed August 16, 2011.

Reference to unpublished work

- Authors citing papers in press, personal communications, or other unpublished work must submit a copy of the unpublished manuscript or a letter from the individuals concerned, confirming the work and giving permission for the citation.

Tables

- Tables should be included in the manuscript file after the references and before figure captions.
- Tables should be double-spaced and contain no vertical lines.
- Tables should be numbered consecutively with Arabic numbers and have a brief descriptive title.
- Tables should be self-explanatory without reference to the text.
- Acronyms and abbreviations should be defined below the table.
- Decimal points should be indicated by a period (.) and not a comma.

Figure Captions

- list of figure captions should follow the references in the main document and should not be included in the figure file itself.
- Captions should be double-spaced, numbered consecutively with Arabic numbers, and should stand alone.
- Include a brief description of the image, graph, or diagram, beginning with identification of the specimen (e.g., Fine-needle aspirate of a cutaneous mass on the pinna) or graph/plot (e.g., Passing-Bablok plot of...) depicted.
- Define abbreviations, symbols, parts of a plot (e.g., box and whisker plot) in the caption.
- Decimal points in the figures should be indicated by a period (.) and not a comma.
- Indicate the stain or chromogen used.
- For magnification, indicate the objective lens used (e.g., x10 objective) or provide internal scale bars.
- Captions for unknown images in What Is Your Diagnosis? articles should include only the source of the image, stain, and magnification, without a description.

Images

- Each figure or image should be uploaded as a separate file.
- There is no charge for color figures.
- All images MUST be at or above the [intended display size](#), with the following image resolutions: Line Art 800 dpi, Combination (Line Art + Halftone) 600 dpi, Halftone 300 dpi. See the [Image quality specifications chart](#) for details. Image file must be cropped as close to the actual image as possible.

Image Screening

- *Veterinary Ophthalmology* utilises Wiley's Image Screening service. All figures submitted with manuscripts will undergo an integrity check to identify any inappropriately edited or manipulated images. In case of any doubt, raw data will be requested from the authors. Manuscripts will only proceed on the condition that all files comply with the integrity checks. If any file does not comply with our integrity checks, the journal reserves the right to reject your manuscript, or, alternatively, you may be contacted to resolve any concerns raised by these checks.

Article Categories

A. Original Articles - Peer-reviewed, prospective or retrospective research investigations that include:

1. A structured abstract, introduction, materials and methods, results, and discussion.
2. Manuscripts are limited to 5000 words not including the title page, abstract, tables, figures/figure captions, and references, which are limited to a maximum of 40 references.

B. Brief Communications - Peer-reviewed research investigations that include:

1. A structured abstract with few or no separate sections.
2. Manuscripts are limited to 2500 words not including the title page, abstract, tables, figures/figure captions, and references, which are limited to a maximum of 15 references.

C. Technical Reports - Peer-reviewed reports similar in format and length to Original Research.

D. Reference Intervals – Peer-reviewed manuscripts reporting on reference intervals (RIs) of any veterinary species. The following information is to be used as a guide to design and publish high-quality RI manuscripts.

1. A checklist is provided by the ASVCP Quality Assurance and Laboratory Standards Committee. This checklist should be used to set up and organize RI studies for manuscript writing. You can download the checklist [here](#):

2. Spreadsheet templates should be used to enter data and decide on what type of statistical methods to use. They should also be used to decide on how to present data in tables depending on the number of samples acquired. There is a basic template for most authors and an extended template for authors that are interested in further characterizing the veterinary population using additional statistical analyses.

4.1 Supporting Information

- Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article/.
- Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files.
- Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included.
- It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format.

4.2 Manuscript Requirements

- Manuscripts must be submitted as a Word or rtf file and should be written in US English (see section 6.2 below)
- Double-spaced, including the abstract, references, tables and figure legends
- Pages and line numbers should be numbered consecutively, starting with the title page and continuing through the end of the text. Numbers should use decimal points (.) instead of commas.
- There should be no information within the manuscript text that would identify either the author, the institution, or country of origin, as review will be a double-anonymous peer review.
- Authors should refer to a recent issue of the journal for general style and format.
- A helpful resource on scientific writing, *Writing for Publication in Veterinary Medicine*, is found [here](#)
- Abbreviations should be kept to a minimum. All nonstandard abbreviations should be defined the first time they are used in the text. The following abbreviations should never be spelled out: ANOVA, ATP, CBC, DNA, EDTA, ELISA, IgA, IgE, IgG, IgM, NADH, NADPH, PCR, RBC, RNA, WBC, and H&E
- The Title Page should be submitted as a separate file.

4.5 Online-only publication

Veterinary Clinical Pathology is published in an online-only in an effort to reduce the environmental impact caused by the production and distribution of printed journal copies and allows the journal to invest in further digital development. Published articles continue to be disseminated through the journal's broad network of indexing services, including ISI, MEDLINE, and Scopus. Articles are also discoverable through popular search engines such as Google. All color images will be reproduced digitally and published free of charge.

4.6 Errata

Corrections to published articles should be made by issuing an Erratum. Please contact the editorial office at vetclinpathjournal@gmail.com with the circumstances and text of your proposed Erratum.

Basic format for errata:

When this article¹ was published in the journal, [explain error here]. [If needed, state:] The correct text is:

[Correct text]

References

- [Citation for the article with the erratum]
- [Any other necessary citations continue here]

Example of an Erratum:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vcp.12580>

5. Online Submission of Manuscripts

VCP uses ScholarOne Manuscripts for the submission of manuscripts. Please go to the journal's site at <http://mc.manuscriptcentral.com/vcp> and click on 'new

user' to establish an account. Once logged in, follow instructions for submitting your manuscript, figure files, and cover letter. Using your user ID and password, you may enter the Author Center at any time to follow the review process.

6. Other Information

6.1 Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Wiley-Blackwell's Author Services. Please register to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> to register.

6.2 Resources for Authors

Writing in English

Submitted manuscripts must be written in English (US spelling). Authors whose native language is not English are advised to seek assistance in manuscript preparation from someone fluent in written English and knowledgeable about scientific writing. The European Association of Science Editors (EASE) provides guidelines in multiple languages to improve scientific communication in English: EASE Guidelines for Authors and Translators of Scientific Articles to be Published in English, <http://www.ease.org.uk/publications/author-guidelines>. In addition, professional services (for a fee) are available at <http://wileyeditingservices.com/en/>. Use of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Article Preparation Support

[Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Article Promotion Support

[Wiley Editing Services](#) offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

A Resource for Scientific Writing and Publishing in Veterinary Medicine

Also available from the journal website is a publication by Mary Christopher and Karen Young on [Writing for Publication in Veterinary Medicine](#) which provides a fount of information from how to select a journal to publish your research in to how to write succinctly and with purpose in veterinary and scientific publications.

6.3 Authenticity Check

VCP published by Wiley-Blackwell is a member of CrossCheck, a service offered by CrossRef and powered by iThenticate software. iThenticate is a plagiarism screening service that verifies the originality of content submitted before publication. iThenticate checks submissions against millions of published research papers and billions of web materials. Authors can also use iThenticate to screen their work before submission by visiting www.ithenticate.com.

6.4 Publication Ethics

VCP is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE), <http://publicationethics.org>.

6.5 ORCID

VCP requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD (<http://orcid.org>) when submitting a manuscript.

6.6 Reviewers: Double-anonymous peer review

VCP uses double-anonymous review. Reviewers do not know who authors are, and authors do not know who reviewers are.

1. Author information should only be on the Title Page and not in the manuscript.
2. Author affiliations and any identifying information, such as author initials, should be omitted from the manuscript
3. When self-citing, for instance, instead of writing "as previously performed in our laboratory," write "as previously performed."
4. Funding sources must not be acknowledged in manuscript
5. File naming should avoid author identification
6. Responsibility for ensuring that manuscripts are adequately anonymized rests entirely with the authors and not with the Journal.
7. All information will be added at article acceptance.

ARTIGO CIENTÍFICO

USE OF IMMATURE PLATELET FRACTION (IPF) AND BONE MARROW MEGAKARYOCYTE COUNT IN THE DIAGNOSIS OF DOGS WITH THROMBOCYTOPENIA.

SOUZA, KATIANE LOHN¹; TAKAHIRA, REGINA KIOMI¹.

¹ Departamento de Clínica veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Unesp-Botucatu, Botucatu-São Paulo, Brasil.

Correspondence: Regina Kiomi Takahira. Departamento de Clínica veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Unesp-Botucatu, Rua Professor, R. Dr. Valter Maurício Corrêa, S/N - Jardim São José, Botucatu - SP, 18618-681 Botucatu-São Paulo, Brasil.
regina.takahira@unesp.br

1 **ABSTRACT**

2 Background: Megakaryocyte count in the bone marrow is indicated to evaluate
3 thrombopoiesis in response to immune-mediated thrombocytopenia (IMT).
4 However, there are difficulties in relation to sample collection, quality and
5 standardization of megakaryocyte counts. Immature Platelet Fraction (IPF)
6 evaluates the fraction of imature platelets in peripheral blood and is a tool that
7 can predict the bone marrow response to thrombocytopenia in a non-invasive
8 way.

9 Objective: The aim of this paper was to compare the different techniques for
10 counting megakaryocytes in bone marrow and their correlation with the IPF
11 parameter to validate it as a routine hematological tool for diagnosing dogs with
12 IMT.

13 Methods: 18 healthy dogs without hematological and bone marrow changes were
14 evaluated, 20 animals with thrombocytopenia ($<150,000/\mu\text{L}$) with megakaryocytic
15 hyperplasia and presumed diagnosis of IMT and 14 animals with
16 thrombocytopenia and megakaryocytic hypoplasia. Blood was collected to
17 perform the CBC count and determine the IPF parameter and bone marrow
18 collection to quantify megakaryocytes using two techniques and correlation with
19 the IPF parameter.

20 Results: The correlation between the two megakaryocyte counting techniques
21 was high ($p<0.001$). There is a significative difference ($p<0.0028$) in the relative
22 IPF only between normal animals and those with megakaryocytic hyperplasia.
23 For the absolute IPF, there was a significative difference only between the healthy
24 group and the group with megakaryocytic hypoplasia ($p=0.014$). There was no

correlation between absolute and relative IPF and medullary megakaryocytes. The lack of correlation does not allow us to establish relationships between IPF counts and the increase in the number of megakaryocytes.

Keywords: Dogs, Hematology, Primary Hemostasis, Reticulated platelets,

1. INTRODUCTION

Thrombocytopenia in dogs is one of the most frequent hematological abnormality in laboratory routine. The mechanisms of medullary response to thrombocytopenia can be classified into three main groups: thrombocytopenia with increased thrombopoiesis; thrombocytopenia with normal or decreased thrombopoiesis; thrombocytopenia due to abnormal platelet sequestration¹.

Immune-mediated thrombocytopenia (ITP) is one of the most common causes of thrombocytopenia and can originate from primary or secondary inflammatory, neoplastic, or drug-related processes, among others.

The diagnosis of ITP is generally made by the association of findings from the complete blood count, combined with bone marrow aspiration, which may show hyperplasia of the megakaryocytic series, or hypoplasia when destruction is directed towards megakaryocytes. Other tests are also necessary to exclude other causes of thrombocytopenia or to define an underlying cause (infectious or inflammatory) when ITP is secondary².

Bone marrow cytology is indicated in cases of persistent peripheral cytopenias without a defined extramedullary cause. In cases of patients suspected of having ITP, bone marrow aspiration is a diagnostic tool that can assist in its diagnosis when there is megakaryocytes hyperplasia and exclusion of other peripheral thrombocytopenia causes

49 For the evaluation of thrombopoiesis, quantitative and morphological analysis of
50 megakaryocytes is performed. However, this evaluation is very subjective and
51 has many variations according to the method of slide preparation and the
52 experience of the professional³.

53 There are non-invasive methods that attempt to indirectly evaluate
54 thrombopoiesis. One of them is the quantification of reticulated platelets in
55 peripheral blood. These are newly released young platelets into circulation. The
56 percentage of reticulated platelets can be used as a non-invasive test to predict
57 and monitor thrombopoiesis in dogs instead of evaluating megakaryocytopoiesis,
58 which is a subjective, slow methodology that requires a qualified professional^{4,5}.
59 The quantification of reticulated platelets can be performed by flow cytometry of
60 peripheral blood stained with Thiazole Orange or automatically by means of
61 hematological counters based on flow cytometry.

62 The Immature Platelet Fraction (IPF) parameter is a second way to quantify
63 reticulated platelets in peripheral blood using automated hematological counters
64 in a simple, fast manner, without the need for additional care in collection and
65 storage, and without the need for prior sample processing. The objective of this
66 study is to evaluate the Immature Platelet Fraction (IPF) as a non-invasive
67 method to assess thrombopoiesis in dogs, comparing different methods of
68 megakaryocyte counting. Besides using this parameter as a tool in the diagnosis
69 of immune-mediated thrombocytopenia in dogs.

70 2. MATERIAL AND METHODS

71 2.1 Ethics Committee

72 This study was approved by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA) of
73 FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, Brazil under number 0338/2023.

74 2.2 Sampling Design

75 Fifty-two adult dogs, both males and females of all breeds, with no age limit, were
76 included in this study. These dogs were referred for bone marrow cytology
77 evaluation as part of the routine procedures at commercial veterinary laboratory,
78 PROVET Veterinary Diagnostic Laboratory located in São Paulo, SP. Patient
79 selection involved reviewing CBC results, bone marrow cytology, abdominal
80 ultrasound, and PCR or rapid assay (ELISA or immunochromatographic) for
81 infectious diseases (*Ehrlichia* sp., *Babesia* sp., *Anaplasma* sp., *Leishmania* sp.,
82 *Rickettsia* sp., *Hepatozoon* sp.) whenever available. All samples were collected
83 and tests were performed at the same diagnostic center. Anamnesis data were
84 also collected from the patient's caregivers at the time of admission and sample
85 collection.

86 The dogs were divided into three groups as follows: Group I comprised 18 dogs
87 with no hematological abnormalities in the CBC, bone marrow cytology, and other
88 laboratory and imaging exams when available; Group II comprised 20 animals
89 with a history of thrombocytopenia ($<150,000/\mu\text{L}$), bone marrow megacaryocytic
90 hyperplasia and clinical and laboratory diagnosis of immune-mediated
91 thrombocytopenia based on hemogram correlation, exclusion of causes such as
92 blood loss, splenic sequestration, and infectious causes. Group III comprised 14
93 animals with thrombocytopenia ($<150,000/\mu\text{L}$) due to megakaryocytic hypoplasia
94 from possible infectious, neoplastic, or other causes.

95 The diagnostic consensus for immune-mediated thrombocytopenia² that
96 stipulated a cutoff point of $100,000$ platelets/ μL was published after data
97 collection.

98 2.3 Patient Exclusion Criteria

99 Patients meeting the aforementioned laboratory criteria but with hemogram
100 and/or myelogram samples collected outside the laboratory were excluded from
101 the experiment. Animals undergoing treatment with corticosteroids,
102 immunosuppressants, or immunomodulators at the time of sample collection
103 were also excluded, as were Group I patients showing any positive molecular or
104 immunological test during historical evaluation or myelogram analysis and those
105 with a history of prior treatment within the last 30 days. Animals showing platelet
106 aggregates in the blood smear evaluation were also excluded.

107 2.4 Blood sampling

108 Two milliliters of peripheral blood sample were collected for CBC counts upon
109 patient admission to the diagnostic center, prior to anesthesia, preferably from
110 the jugular or cephalic vein. The sample was collected in a tube containing 7.5%
111 EDTA K3 anticoagulant (Vacuette®, Greiner Bio One International GmbH, São
112 Paulo) for hemogram and immature platelet fraction (IPF). Samples were kept at
113 room temperature and processed within 6 hours of sampling.

114 2.5 Bone Marrow sampling

115 Patients were anesthetized according to the inhalation anesthesia protocol
116 defined by the anesthesiologist veterinarian at the diagnostic center for bone
117 marrow aspiration.

118 Bone marrow samples were preferably obtained from the iliac crest or proximal
119 humerus using an Illinois-type needle (Unit® São Paulo, Brazil) attached to a 10
120 mL polystyrene syringe (BD®, São Paulo). The syringe was pre-prepared with 3
121 drops of 3% EDTA solution diluted in sterile saline. Approximately 2 mL of bone
122 marrow was aspirated. The collected material was deposited in a glass Petri dish,
123 and spicules were captured using a capillary tube. Slides were prepared

124 immediately after collection using squash techniques. The remaining material
125 was stored in a non-anticoagulated tube and refrigerated if additional slide
126 preparation or sample forwarding for molecular biology tests was necessary.

127 2.6 Laboratory Analyses

128 2.6.1 CBC and bone marrow cytology

129 The CBC was performed using a flow cytometry and impedance hematological
130 analyzer Sysmex® XN-V (XN-1000V; Sysmex Corporation, Kobe, Japan), with a
131 fluorescent platelet channel (PLT-F), activated for the determination of relative
132 (IPF%) and absolute (IPF#) immature platelet fraction (IPF). The data obtained
133 by the laser semiconductor generated a two-dimensional scatterplot. Cellular
134 morphology, differential count, and platelet evaluation (estimation and presence
135 of platelet aggregates) were confirmed through blood smear stained with Diff
136 Quick (Panótico rápido, Laborclin®).

137 The bone marrow cytology was performed by evaluating slides stained using an
138 automatic stainer (SlideInk II® - Vyttra Diagnósticos, Bragança Paulista, SP) with
139 a staining kit based on Wright, Giemsa, and Leishman stains from Colorgram
140 (Vyttra Diagnósticos, Bragança Paulista, SP) by at least two experienced
141 observers. The evaluation of the megakaryocytic series was conducted using two
142 methodologies. In the first method, megakaryocytes were quantified by averaging
143 the number of cells per 10 medium-sized spicules, which occupy approximately
144 1/3 of the 100x field of view of the Nikon E200 microscope (Tokyo, Japan), and
145 in the second method, by averaging the number of cells per 100x field (10x
146 objective) by counting 20 to 25 fields in an attempt to achieve a coefficient of
147 variation of 20%^{6,7}. Normocellular megakaryopoiesis was considered when 3 to
148 10 megakaryocytes were observed per spicule, hypoplastic megakaryopoiesis

149 when fewer than 3 megakaryocytes were observed per spicule, and hyperplastic
150 megakaryopoiesis when more than 10 megakaryocytes were observed per
151 spicule⁷. Regarding the field assessment, animals were considered normocellular
152 if they had approximately 5 to 15 megakaryocytes per 100x field, hypoplastic if
153 fewer than 5 megakaryocytes were observed per field, and hyperplastic if more
154 than 15 megakaryocytes were observed per field⁶.

155 2.7 Statistical Analysis

156 The data were analyzed using the statistical software SAS® Studio. The
157 normality of the data was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Non-
158 parametric data were evaluated using the Wilcoxon test, and analysis of variance
159 (ANOVA) was employed for parametric data. Results with *p-values* < 0.05 were
160 considered significant. The Pearson's correlation was performed To determine
161 the clinical use of absolute and relative IPF and possible cutoff points with
162 associated sensitivity and specificity at all levels, the data were assigned and
163 plotted on ROC (Receiver Operating Characteristic) curves, and the area under
164 the curve (AUC) was calculated using SAS® Studio and IBM SPSS Statistics®
165 programs.

166 3. RESULTS

167 There was a significant difference ($p < 0.001$) in megakaryocyte counts between
168 groups using both counting methods (per field and per spicule). The coefficient
169 of variation between megakaryocyte counts per field and per spicule among the
170 groups were as follows: for group I, 35% per field and 23% per spicule; for group
171 II, 22.5% per field and 21.2% per spicule; and for group III, 76.5% per field and
172 71.5% per spicule. The statistics for each group are summarized in Table 1.

173 Pearson's correlation was performed between the parameters megakaryocytes
174 per field, megakaryocytes per spicule, platelet count, IPF and MPV dogs (Table
175 2).

176 4. DISCUSSION

177 Immune-mediated thrombocytopenia is the most common acquired primary
178 hemostatic disorder in dogs. Its mortality rate is approximately 10 to 30%. Due to
179 its potentially fatal nature and the use of massive immunosuppression, rapid and
180 accurate diagnosis of this disease is crucial. However, its diagnosis is mainly
181 exclusion-based, and only recently have definitive diagnostic criteria been
182 suggested².

183 The evaluation of thrombopoiesis through bone marrow aspiration is one of the
184 tools that can assist in the diagnostic approach to immune-mediated
185 thrombocytopenia (IMT). However, obtaining bone marrow is an invasive
186 methodology, often contraindicated depending on the patient's clinical condition,
187 and it has a longer analysis time.

188 The quantification of the megakaryocytic series was the gold standard for defining
189 the groups. The evaluation of the megakaryocytic series and the determination
190 of the IPF parameter in peripheral blood in dogs were performed on patients who
191 did not present thrombocytopenia or megakaryocytic production alterations and
192 on thrombocytopenic animals. The latter were divided into two groups according
193 to the quantification of the megakaryocytic series: megakaryocytic hyperplasia
194 with a presumptive diagnosis of IMT and megakaryocytic hypoplasia due to
195 various causes.

196 4.1 Bone Marrow Cellularity

197 The cellularity results among animals without alterations in platelet count and
198 megakaryocytic production were similar to those found in the literature ^{7,8}. Bone
199 marrow cellularity is only useful for evaluation when the sample is representative
200 (presence of spicules in the sample), and slides of high quantity are prepared ⁸.
201 Additionally, occasionally, cellularity and consequently the count of
202 thrombopoietic cells may differ among clinically healthy dogs, besides the wide
203 age range of the groups and possible differences between different breeds and
204 genders ⁹ may also justify a higher standard deviation.

205 4.2 Different Techniques for Megakaryocyte Quantification in Bone Marrow

206 There was a difference between the groups in the different techniques for
207 megakaryocyte quantification ($p < 0.001$), a result expected, corroborating with
208 literature³. The degree of correlation between the techniques is high ($r = 0.94$) and
209 significant ($p < 0.001$) in all sampled groups. Similar study with reticulated platelet
210 also found high correlation results ($r = 0.90$) between the techniques¹³.

211 This study performed the counting of 20 to 25 fields as recommended by several
212 authors ^{3,7,8} and the CVs of groups I and II were 35%/field, 23%/spicule, and
213 22.5%/field, 21.2%/spicule, respectively. However, in group III, the CVs were
214 elevated, being 76.50%/field and 71.5%/spicule. Hypocellular samples tend to be
215 less cellular, with fewer spicules, variable spicule sizes, and heterogeneous cell
216 distribution, which can make standardization of the count difficult, and this
217 quantification could justify the variability of reference values in routine and the
218 high CV, mainly among thrombocytopenic animals with megakaryocytic
219 hypoplasia. The other groups showed CVs similar to those described in both
220 methodologies. Counting 100 fields would reduce the CV to 10% in patients with
221 normoplastic megakaryocytic series. However, besides the issues mentioned

earlier, the analysis time would be quite high; for the evaluation of 20 - 25 fields, an experienced professional takes about 15 minutes, for the evaluation of 100 fields, the time would approach 60 minutes³, which may render the investigation unfeasible in laboratories with high routine.

4.3 Platelet and Megakaryocyte Counts

In addition to automated counting, platelet counts and the presence of aggregates were confirmed by reviewing blood smears. A significant number of patients who were thrombocytopenic in automated counting did not have their count confirmed on smear evaluation due to the presence of platelet aggregates, demonstrating the need for smear review before releasing the complete blood count¹¹. The report released solely based on automated platelet count should be avoided due to possible underestimated results, leading to incorrect diagnoses and therapeutic approaches.

The degree of thrombocytopenia can be variable and dependent on the patient's causes of thrombocytopenia, as well as the presence of comorbidities and other correlated conditions, with overlap of values even with different underlying causes ¹². Immune-mediated thrombocytopenias present intensely decreased platelet counts, as do marked medullary hypoplasias, which can also lead to marked thrombocytopenias ¹³. Thus, bone marrow evaluation by biopsy remains the gold standard for assessing megakaryocytic activity ⁵.

As expected, platelet counts differed among animals between groups I and II and I and III. However, there was no difference between groups II and III, meaning there was no difference in the intensity of thrombocytopenia between groups with megakaryocytic hyperplasia and a presumptive diagnosis of IMT and dogs with megakaryocytic hypoplasia, contrary to previous indications. There was no

247 correlation ($p>0.05$) between platelet count and megakaryocyte count either per
248 field or per spicule.

249 4.4 Fraction of immature platelets and megakaryocytes

250 The IPF parameter is used in medicine for its utility in diagnosis, prognostic
251 evaluation, and monitoring in various conditions. However, its application in
252 veterinary medicine is still relatively unknown, but there is recent evidence that
253 IPF may be a marker for thrombopoiesis rate in dogs ^{5,14,15}. Automated immature
254 platelet fraction counting is highly standardizable and reproducible, which can be
255 advantageous for the rapid diagnosis of thrombocytopenia with immune-
256 mediated hemolytic anemia (IMT). Compared to traditional flow cytometry, it is
257 highly efficient and less costly and can be performed during routine CBC
258 processing ¹⁶.

259 The median IPF (#) value found $11.3 \times 10^3/\mu\text{L}$ is similar to veterinary literature of
260 $11.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ ¹⁷.

261 The IPF (%) values found 0.23 – 13.7% and IPF (#) 1.9 – $38.3 \times 10^3/\mu\text{L}$ for healthy
262 animals. Values of IPF (%): 1.24 -10.42% and IPF (#): 1.68-25.56 $\times 10^3/\mu\text{L}$ ¹⁵, and
263 IPF (%): 0.5 – 8%, and IPF (#): 1.9 – $26.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ ¹⁷ were found previously. In both
264 studies the number of animals evaluated was considerably larger, which
265 decreases the power of some patients to influence the mean than in the present
266 study, what could explain our wider intervals.

267 Most research laboratories quantify immature platelets (reticulated platelets - PR)
268 using staining and detection techniques using Thiazole Orange (TO) and flow
269 cytometry ¹⁴. The correlation between TO-stained reticulated platelets and
270 automated IPF determination is variable and depends on the magnitude of
271 thrombocytopenia. The overall correlation coefficient (between healthy non-

thrombocytopenic patients and thrombocytopenic patients due to various causes) of 0.27 between the two methodologies ¹⁶. However, for thrombocytopenic patients, the correlation is higher ($r = 0.63$) while in non-thrombocytopenic individuals the correlation is weak ($r = 0.29$). A moderate to low correlation was found in thrombocytopenic patients ($r = 0.478$, $p = 0.029$) ¹⁸. A more recent alternative method uses RNA staining using the SYTO 13 dye, which has greater stability and satisfactory correlation ($r = 0.668$, $p < 0.001$) with Sysmex analyzers ¹⁸. The lack of correlation between the two methodologies may be related to the different incubation times of the samples in each technique. Thiazole Orange has a higher affinity for DNA than RNA and binds nonspecifically to the dense granules of platelets. On the other hand polymetina and oxazine used in automated analyzers improves RNA affinity. Finally, sample contamination with other cell types such as leukocytes, in platelet-rich plasma that may contain a large amount of mRNA in its cytosol and the presence of dense granules and mitochondria, can generate nonspecific markings ^{14,16}.

In the present study, the determination of IPF (%) was able to differentiate normocytopenic animals from those with thrombocytopenia due to megakaryocytic hyperplasia and presumed diagnosis of IMT, while IPF (#) was able to differentiate normocytopenic patients from those with thrombocytopenia due to megakaryocytic hypoplasia. There are difference in PR%, stained by TO between the control group and thrombocytopenic with normoplastic or hyperplastic megakaryocytic series and between the control group and thrombocytopenic with megakaryocytic hypoplasia, but not between the two groups of thrombocytopenic animals.¹⁰. When evaluating the absolute count of PR, there was also no difference between the groups with thrombocytopenia,

only between the control group and thrombocytopenic with normoplastic or hyperplastic megakaryocytic series. In our study, five animals with megakaryocytic hyperplasia did not present elevated IPF% values (1.3, 3.4, 5.4, 6.6, and 6.8%). There is a wide overlap of immature platelet counts, both by flow cytometry and automated, between human patients with TIM and marked medullary hypoplasia. Among the hypotheses presented, the authors claim that an acceleration of immature platelet release can be caused in any thrombocytopenic state ^{10, 19}. This observation suggests that animals considered with megakaryocyte hypoplasia in bone marrow cytology may not really have decreased platelet production, except in cases of intense hypoplasia ¹⁰, or that there may be an immune-mediated component (ineffective thrombopoiesis) directed to the destruction of immature platelets, just as there is destruction directed to reticulocytes for erythrocytes ²⁰.

Regarding the absolute values of IPF, there was only significant difference between healthy animals and thrombocytopenic due to megakaryocytic hypoplasia. Absolute reticulated platelet values sometimes within reference values during the course of primary and secondary immune-mediated thrombocytopenia, can be explained due to the low number of platelets in many animals ²¹.

Despite the overlap of values present in thrombocytopenic groups with megakaryocytic hyperplasia and megakaryocytic hypoplasia, the attempt to discriminate an IPF (#) value that assists in differentiation between both conditions is possible, just as the stratification of the absolute reticulocyte count is performed to evaluate the efficiency of the medullary response to thrombocytopenia.

322 Considering the obtained data, we performed the ROC curve (Figure 1) to
323 analyze the clinical use of IPF determination (#) for differentiation of patients with
324 thrombocytopenia and presumed diagnosis of TIM and thrombocytopenia due to
325 megakaryocytic hypoplasia (Groups II and III). The explanatory power for
326 differentiation between the causes of thrombocytopenia was moderate (AUC
327 0.709) with a cutoff of 15,700/ μ L immature platelets.

328 For IPF (%) to differentiate patients with thrombocytopenia and presumed
329 diagnosis of IMT and thrombocytopenia due to megakaryocytic hypoplasia
330 (Groups II and III), the explanatory power for differentiation between the causes
331 of thrombocytopenia was moderate (AUC 0.707) with a cutoff of 19.65%
332 immature platelets. In human patients with IMT and thrombocytopenia due to
333 marked megakaryocytic hypoplasia were obtained an AUC of 0.71¹⁹. In contrast,
334 a high explanatory power (AUC 0.982) and cutoff of 6.90 was found in dogs with
335 thrombocytopenia due to megakaryocytic hypoplasia¹⁷. In this second study, the
336 larger number of patients analyzed may justify the higher AUC and lower cutoff
337 for the two conditions.

338 A negative correlation was observed between IPF (%) and platelet count in the
339 three evaluated groups. Inverse correlation is also observed in non-
340 thrombocytopenic human patients¹⁹. This condition can be explained by
341 maturation time of immature platelets (IPs), similar to what happens to
342 reticulocytes for erythropoiesis, where more immature forms of reticulocytes are
343 released into the circulation in anemia and, therefore, the time for reticulocytes to
344 lose their reticulum, their "reticulocyte lifespan" is increased. A similar shift to a
345 greater amount of IPs in severe thrombocytopenia was also demonstrated,
346 indicating that the inverse correlation between platelet counts and immature

platelets may be partly explained by a "maturation delay of immature platelets"²². Secondly, TIM is a disease not only of platelet destruction but also of compromised megakaryocytopoiesis, with a variable contribution of both components to the degree of thrombocytopenia²⁰. Since the factors described above may be present in varying degrees, this may partially explain why divergent estimates of the predictive value of immature PLT measurements are reported in the literature¹⁹. Sysmex XN analyzers are more useful for separating human patients with IMT from those with megakaryocytic hypoplasia²³. However, we assume that the overlap of IP measurements in patients with IMT and megakaryocytic hypoplasia is a biological phenomenon and cannot be completely overcome by enhanced technical procedures.

4.5 Mean Platelet Volume and IPF

MPV, which assesses mean platelet volume, is expressed in femtoliters (fL) and is obtained by hematologic equipment by impedance. As there are variations between equipment, each laboratory should have its reference value, generally between 8 to 12 fL. MPV should be interpreted in association with platelet count²⁴.

MPV is a parameter that can assist in the evaluation of blood smears, with a correlation between the value and the quantity of megakaryocytes in the marrow in humans²⁵. A higher MPV generally indicates a higher quantity of circulating young platelets²⁰. On the other hand, in patients with thrombocytopenia resulting from medullary hypoplasia, MPV and megakaryocyte quantity are substantially lower than in healthy individuals or the aforementioned patients^{25, 26}.

Similarily observed in other studies in dogs^{15, 17} there was no significant difference in MPV between the three groups ($p = 0.1422$). Since this parameter is obtained

372 through impedance, its validity is negatively affected by low platelet counts,
373 presence of spherocytes, schistocytes, microcytes, or other particles with volume
374 similar to platelets, which the equipment cannot differentiate ²⁷. Therefore, in
375 dogs, this parameter is not reliable and should be avoided as a criterion for
376 evaluating thrombopoiesis response in the hemogram.

377 Although immature platelets tend to be larger than mature ones, the correlation
378 between MPV and IPF (%) and IPF (#) was low to negative and not significant (r
379 = 0.04, p = 0.86 and r = -0.23, p = 0.34 respectively), as the technique for
380 obtaining the IPF parameter is based on the emission of fluorescent signals and
381 not only on the size (volume) of the cell. Similar results were found in humans
382 using Sysmex® XE series and Mindray® equipment, which also did not find a
383 linear correlation between MPV and IPF% ¹⁴.

384 4.6 Immune-mediated thrombocytopenia and IPF

385 Immune-mediated thrombocytopenia is a heterogeneous disease in both humans
386 and animals ²⁰. Its diagnosis still remains by exclusion without a "gold standard"
387 test ^{17, 28}.

388 In medicine and veterinary medicine with the consensus of diagnosis of TIM,
389 primary TIM is considered those patients with platelet count below 100,000/ μ L
390 and absence of other causes that may be associated with thrombocytopenia. This
391 should still be differentiated from secondary IMT that can be caused by infectious
392 agents, drugs, and neoplasms and still consider biological, pre-analytical, and
393 analytical variables that influence platelet count ^{12, 20}.

394 IPF% and reticulated platelet count are described in medicine as tools for
395 differentiation between immune-mediated thrombocytopenias and other causes
396 ²³.

397 In the present study, it was not possible to demonstrate significant differences
398 between the IPF (%) and IPF (#) parameters among thrombocytopenic patients
399 with megakaryocytic hyperplasia and presumed diagnosis of TIM and
400 thrombocytopenic patients due to other causes with megakaryocytic hypoplasia.
401 Similarly, there are not significant differences between absolute and relative
402 reticulated platelet counts between thrombocytopenic dogs with
403 normo/hyperplastic marrow and patients with megakaryocytic hypoplasia ¹⁰.
404 Overall, the utility of immature platelet/reticulated platelet fractions as a
405 diagnostic tool seems low in both humans and dogs ^{2, 20}.

406 5. CONCLUSION

407 The methodologies of megakaryocyte counting per field and per spicules can be
408 equally used for megakaryocyte counting. The main challenge remains obtaining
409 representative samples with sufficient spicules.

410 It was not possible to determine a relationship between platelet count and the
411 degree of megakaryocyte production in the bone marrow, as well as between
412 megakaryocyte production and an increase in MPV in the animals.

413 The IPF (%) parameter differentiated healthy animals from those with
414 megakaryocytic hyperplasia and presumed diagnosis of TIM, although it did not
415 differentiate thrombocytopenias due to megakaryocytic hyperplasia or hypoplasia
416 of the series. On the other hand, the IPF (#) differentiated healthy animals from
417 those with megakaryocytic hypoplasia. Consistent with the 2024 TIM diagnostic
418 consensus, this should not be a parameter used alone for the diagnosis of TIM in
419 dogs.

420 REFERENCES

- 421 1. Pankraz A, Bauer N, Moritz A. Comparison of flow cytometry with the
 422 Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated
 423 platelets in dogs. *Vet Clin Pathol*. 2009;38(1):30-38. doi:10.1111/j.1939-
 424 165X.2008.00086.x.
- 425 2. LeVine DN, Kidd L, Garden OA, et al. ACVIM consensus statement on the
 426 diagnosis of immune thrombocytopenia in dogs and cats. *J Vet Intern Med*.
 427 2024;1-24. doi:10.1111/jvim.16996
- 428 3. Mylonakis ME, Day MJ, Leontides LS, et al. Type of smear may influence
 429 thrombopoietic cell counts in the bone marrow of clinically healthy
 430 dogs. *Vet Clin Pathol*. 2005;34(4):358-361. doi:10.1111/j.1939-
 431 165x.2005.tb00061.x
- 432 4. Weiss, D.J., Townsend, E. Evaluation of reticulated platelets in dogs.
 433 *Comparative Haematology International*. 1998;(8):166–170.
 434 <https://doi.org/10.1007/BF02642508>
- 435 5. Oellers DE, Bauer N, Ginder M, Johannes S, Pernecker I, Moritz A.
 436 Optimized gating and reference ranges of reticulated platelets in dogs for
 437 the Sysmex XT-2000iV. *BMC Vet Res*. 2016;12(1):148.
 438 doi:10.1186/s12917-016-0779-4
- 439 6. Mischke R, Busse L. Reference values for the bone marrow aspirates in
 440 adult dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2002;49(10):499-502.
 441 doi:10.1046/j.1439-0442.2002.00491.x
- 442 7. Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*.
 443 1st ed. SL: Elsevier; 2012.
- 444 8. Stacy NI, Harvey JW. Bone Marrow Aspirate Evaluation. *Vet Clin North*
 445 *Am Small Anim Pract*. 2017;47(1):31-52. doi:10.1016/j.cvsm.2016.07.003

- 446 9. Grindem CB, Neel JA, Juopperi TA. Cytology of bone marrow. *Vet Clin*
447 *North Am Small Anim Pract.* 2002;32(6):1313-vi. doi:10.1016/s0195-
448 5616(02)00052-9
- 449 10. Silva LF, Golim MA, Takahira RK. Measurement of thrombopoietic activity
450 through the quantification of megakaryocytes in bone marrow cytology and
451 reticulated platelets. *Res Vet Sci.* 2012;93(1):313-317.
452 doi:10.1016/j.rvsc.2011.07.005
- 453 11. Comazzi S, Pieralisi C, Bertazzolo W. Haematological and biochemical
454 abnormalities in canine blood: frequency and associations in 1022
455 samples. *J Small Anim Pract.* 2004;45(7):343-349. doi:10.1111/j.1748-
456 5827.2004.tb00246.x
- 457 12. Dircks BH, Schuberth HJ, Mischke R. Underlying diseases and
458 clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without
459 platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83
460 cases (2004-2006). *J Am Vet Med Assoc.* 2009;235(8):960-966.
461 doi:10.2460/javma.235.8.960
- 462 13. Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology.*
463 2nd ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell; 2008:3-51.
- 464 14. Buttarello M, Mezzapelle G, Freguglia F, Plebani M. Reticulated platelets
465 and immature platelet fraction: Clinical applications and method
466 limitations. *Int J Lab Hematol.* 2020;42(4):363-370. doi:10.1111/ijlh.13177
- 467 15. Jornet-Rius O, Mesalles-Naranjo M, Pastor J. Performance of the Sysmex
468 XN-V hematology analyzer in determining the immature platelet fraction in
469 dogs: A preliminary study and reference values. *Vet Clin Pathol.*
470 2023;52(3):433-442. doi:10.1111/vcp.13241

- 471 16. Ibrahim H, Nadipalli S, Usmani S, DeLao T, Green L, Kleiman NS.
 472 Detection and quantification of circulating immature platelets: agreement
 473 between flow cytometric and automated detection. *J Thromb*
 474 *Thrombolysis*. 2016;42(1):77-83. doi:10.1007/s11239-016-1338-3
- 475 17. Perez-Ecija A, Martinez C, Fernandez-Castañer J, Mendoza FJ. Utility of
 476 immature platelet fraction in the Sysmex XN-1000V for the differential
 477 diagnosis of central and peripheral thrombocytopenia in dogs and cats. *J*
 478 *Vet Intern Med*. 2024;38(3):1512-1519. doi:10.1111/jvim.17074
- 479 18. Hille L, Cederqvist M, Hromek J, Stratz C, Trenk D, Nührenberg TG.
 480 Evaluation of an Alternative Staining Method Using SYTO 13 to Determine
 481 Reticulated Platelets. *Thromb Haemost*. 2019;119(5):779-785.
 482 doi:10.1055/s-0039-1681101
- 483 19. Cybulska A, Meintker L, Ringwald J, Krause SW. Measurements of
 484 immature platelets with haematology analysers are of limited value to
 485 separate immune thrombocytopenia from bone marrow failure. *Br J*
 486 *Haematol*. 2017;177(4):612-619. doi:10.1111/bjh.14628
- 487 20. LeVine DN, Brooks MB. Immune thrombocytopenia (ITP):
 488 Pathophysiology update and diagnostic dilemmas. *Vet Clin Pathol*.
 489 2019;48 Suppl 1:17-28. doi:10.1111/vcp.12774
- 490 21. Wilkerson MJ, Shuman W, Swist S, Harkin K, Meinkoth J, Kocan AA.
 491 Platelet size, platelet surface-associated IgG, and reticulated platelets in
 492 dogs with immune-mediated thrombocytopenia. *Vet Clin Pathol*.
 493 2001;30(3):141-149. doi:10.1111/j.1939-165x.2001.tb00423.x
- 494 22. Angénieux C, Maître B, Eckly A, Lanza F, Gachet C, de la Salle H. Time-
 495 Dependent Decay of mRNA and Ribosomal RNA during Platelet Aging

- 496 and Its Correlation with Translation Activity. *PLoS One*. 2016;11(1).
 497 doi:10.1371/journal.pone.0148064
- 498 23. Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, et al. Clinical significance of IPF%
 499 or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia
 500 from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol*.
 501 2015;101(4):369-375. doi:10.1007/s12185-015-1741-0
- 502 24. May JE, Marques MB, Reddy VVB, Gangaraju R. Three neglected
 503 numbers in the CBC: The RDW, MPV, and NRBC count. *Cleve Clin J Med*.
 504 2019;86(3):167-172. doi:10.3949/ccjm.86a.18072
- 505 25. Baccini V, Geneviève F, Jacqmin H, et al. Platelet Counting: Ugly Traps
 506 and Good Advice. Proposals from the French-Speaking Cellular
 507 Hematology Group (GFHC). *J Clin Med*. 2020;9(3):808.
 508 doi:10.3390/jcm9030808
- 509 26. Ittermann T, Feig MA, Petersmann A, et al. Mean platelet volume is more
 510 important than age for defining reference intervals of platelet counts. *PLoS*
 511 *One*. 2019;14(3):e0213658. doi:10.1371/journal.pone.0213658
- 512 27. Xu RL, Zheng ZJ, Ma YJ, Hu YP, Zhuang SH. Platelet volume indices have
 513 low diagnostic efficiency for predicting bone marrow failure in
 514 thrombocytopenic patients. *Exp Ther Med*. 2013;5(1):209-214.
 515 doi:10.3892/etm.2012.799
- 516 28. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on
 517 the investigation and management of primary immune thrombocytopenia.
 518 *Blood*. 2010;115(2):168-186. doi:10.1182/blood-2009-06-225565
- 519 Table 1. Statistics (mean, standard deviation and *p-value*) between groups of
 520 dogs, according to the cellularity of the megakaryocytic series.

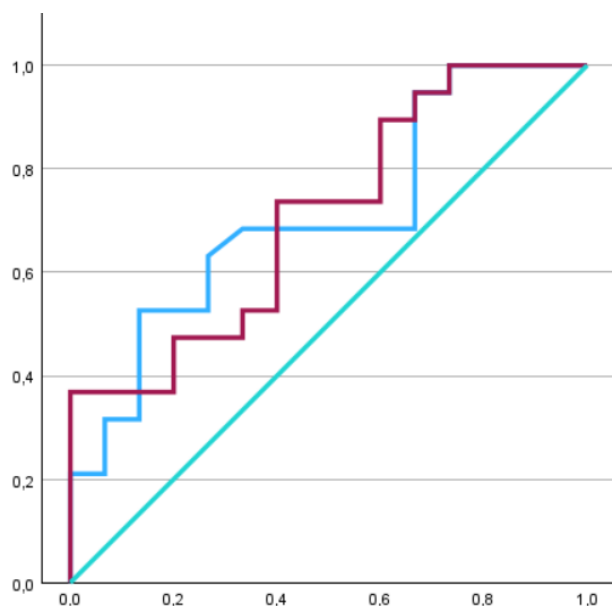
Parameters	Group I (median $\pm$ SD)	Group II (median $\pm$ SD)	Group III (median $\pm$ SD)	Reference Values*	p-value
Megakaryocytes per field	9.64 $\pm$ 3.38 ^a	22.63 $\pm$ 5.07 ^b	1.66 $\pm$ 1.32 ^c	<15	<0.001
Megakaryocytes per spicule	5.22 $\pm$ 1.20 ^a	13.68 $\pm$ 2.95 ^b	0.66 $\pm$ 0.47 ^c	3 - 10	<0.001
Platelet count (10 ³ /μL)	294 $\pm$ 106.58 ^a	71.75 $\pm$ 61.52 ^b	46.64 $\pm$ 42.49 ^b	179 – 550	<0.001
IPF (%)	6.99 $\pm$ 6.76 ^{a,c}	19.85 $\pm$ 15.16 ^b	10.49 $\pm$ 8.58 ^{a,b,c}	0 – 5.8	0.0026
IPF (10 ³ /μL)	20.17 $\pm$ 18.27 ^a	12.21 $\pm$ 11.6 ^{a,b}	5.81 $\pm$ 5.25 ^b	1.9 – 26.8	0.0133
MPV (fL)	8.8 $\pm$ 3.68 ^a	10.88 $\pm$ 3.24 ^a	10.46 $\pm$ 2.49 ^a	10 – 12	0.1320
Celullarity(%)	50.0 $\pm$ 10.71 ^{a,c}	64.5 $\pm$ 15.55 ^b	46.7 $\pm$ 25.61 ^c	25 - 75	0.090

Letters matching in the same row indicate no significant difference between the groups ($p > 0.05$). Different letters in the same row indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the groups.

Table 2. Pearson correlation coefficients between megakaryocyte quantification methods, platelet counts and platelet parameters in dogs.

	Mk/Field	Mk/Spicule	Platelet Count (10 ³ /μL)	IPF (%)	IPF (#) (10 ³ /μL)	MPV (fL)
Mk/Field	1	0.946 ($p < 0.01$)	-0.092 ($p = 0.52$)	0.26 ($p = 0.06$)	0.6 ($p = 0.63$)	<0.01 ($p = 0.92$)
Mk/Spicule		1	-0.16 ($p = 0.25$)	0.22 ($p = 0.11$)	-0.01 ($p = 0.94$)	<0.01 ($p = 0.98$)
Platelet Count (10³/μL)			1	-0.30 ($p = 0.026$)	0.572 ($p < 0.0001$)	-0.27 ($p = 0.05$)
IPF (%)				1	0.32 ($p = 0.02$)	0.12 ($p = 0.36$)
IPF (#) (10³/μL)					1	-0.11 ($p = 0.40$)
MPV (fL)						1

Mk= Megacaryocyte



528

529 Figure 1. ROC curves for absolute IPF (red line) and IPF (%) (blue line) using
 530 values from the 2 thrombocytopenic groups demonstrate an area under the curve
 531 of 0.709, $p=0.019$ for IPF (#) with an overall model value of 0.53 and a cutoff
 532 value of 15.700/ μL , and for IPF (%) of 0.703, $p=0.022$ with an overall model value
 533 of 0.53 and a cutoff value of 19.5%. x axys relates to specifity and y axys refers
 534 to sensibility.