

**AVALIAÇÃO MANUAL DO NÚMERO DE PLAQUETAS EM PACIENTES
ONCOLÓGICOS QUE APRESENTEM TROMBOCITOPENIA**

**MANUAL ASSESSMENT OF PLATELETS COUNTS FROM ONCOLOGIC
PATIENTS WITH THROMBOCYTOPENIA**

Matusalem Dalla Lana da Silva*

Jeanine Marie Nardin**

RESUMO

As plaquetas são responsáveis por parte do sistema de coagulação do organismo. Por esse motivo são de grande importância para o bom funcionamento do corpo como um todo. Em alguns tipos de tratamentos contra o câncer, pacientes podem desenvolver trombocitopenias graves, diminuindo sua hemostasia. O objetivo desse trabalho foi avaliar o grau de confiabilidade dos analisadores automatizados mesmo quando se trata de pacientes com níveis mínimos de contagem plaquetárias, comparando com técnicas manuais de contagens. Foi verificado que a técnica de contagem manual pelo método de Brecher apresenta-se como eficaz e segura para confirmação das contagens automatizadas de pacientes com trombocitopenia severa, auxiliando na indicação de terapias transfusionais.

Palavras – chave: Trombocitopenia, contagem de plaquetas, automação.

INTRODUÇÃO

A principal função do sangue é o transporte de células e nutrientes e para isso é necessário que este permaneça sempre em estado fluido. Contudo, quando ocorrem lesões vasculares, parte do sangue coagula para evitar a perda sanguínea pela parede do vaso lesionado, e logo após a cicatrização, ocorre a remoção deste tampão hemostático, em um conjunto de mecanismos denominado fibrinólise (GREER *et al*¹).

*Acadêmico do 8º período do Curso de Graduação em Biomedicina das Faculdades Integradas do Brasil - Unibrasil.

Filiação: Marco Antonio da Silva – Evana Dalla Lana da Silva

**Orientadora, Farmacêutica das Faculdades Integradas do Brasil – Unibrasil.

O mecanismo hemostático tem várias funções dentre as quais se destacam: manter a fluidez do sangue; formar o tampão hemostático para estancar sangramentos e favorecer a retirada desse tampão após a cicatrização concluída. A hemostasia normal depende de uma interação íntima entre seus mecanismos, um pequeno excesso tanto de um quanto de outro lado pode desencadear em processos hemorrágicos ou trombóticos (JURK & KEHREL ²).

A hemostasia primária reúne componentes do endotélio vascular e plaquetas. As células endoteliais quando não lesionadas tem uma superfície antitrombótica que inibe a coagulação do sangue dentro da luz dos vasos. Porém quando esse endotélio é lesado passam a liberar citocinas com propriedades trombóticas, favorecendo e auxiliando no processo de coagulação no local da lesão (JURK & KEHREL ²).

As plaquetas têm como principal objetivo, dentro da hemostasia, a formação do tampão hemostático como resposta à lesão vascular. No local da lesão ocorre a adesão, que liga a plaqueta ao endotélio e após a agregação que faz a interação plaqueta-plaqueta (GREER *et al*¹).

As plaquetas são provenientes da medula óssea por fragmentação dos megacariócitos, sendo a trombopoetina o principal regulador de sua produção. A contagem normal de plaquetas em uma pessoa saudável é de 150.000 a 400.000cels/ μ L. Até um terço das plaquetas em circulação no organismo pode ser retida no baço, e este percentual pode aumentar em indivíduos com quadro de esplenomegalia. Assim, a avaliação dos níveis plaquetários de qualquer indivíduo é essencial para a avaliação do estado hemostático do mesmo (LEWIS ³).

A trombocitopenia ou plaquetopenia, caracterizada pela redução do número de plaquetas no sangue, é uma situação comum em alguns tipos de pacientes oncológicos em decorrência da natureza do tratamento quimioterápico. Quando a quantidade de plaquetas no sangue é inferior a 150.000cels/ μ L, diz-se que o indivíduo está trombocitopênico. A Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia indica em pacientes trombocitopênicos a transfusão de plaquetas em casos que a contagem estiver abaixo de 10.000 cels/ μ L, ou quando estiver abaixo de 50.000 cels/ μ L antes de procedimentos invasivos.

Pacientes com trombocitopenia possuem maior tendência a apresentar fenômenos hemorrágicos e as causas mais frequentes de erros neste diagnóstico incluem a coagulação da amostra, agregação plaquetária e o satelitismo (GREER *et al*¹). O satelitismo pode levar a uma pseudotrombocitopenia que representa um grave problema clínico podendo levar tanto a diagnósticos errados como a condutas terapêuticas desnecessárias, incluindo transfusões plaquetárias e em alguns casos a esplenectomia, e que se torna ainda de maior gravidade se tratando de pacientes oncológicos (BRAESTER⁴).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a necessidade de uma confirmação manual por câmara de Neubauer das contagens de plaquetas em pacientes oncológicos considerados trombocitopênicos em análises automatizadas.

METODOLOGIA

Este trabalho trata-se de uma pesquisa quantitativa da avaliação do número de plaquetas de pacientes oncológicos sob tratamento quimioterápico em um hospital oncológico, situado no município de Curitiba, Paraná. Trata-se de uma pesquisa de campo, com a avaliação e contagem manual das plaquetas de pacientes que apresentaram trombocitopenia no contador automatizado do serviço de análises clínicas da instituição. As contagens manuais das células foram realizadas nos laboratórios das Faculdades Integradas do Brasil (Unibrasil), tendo como período de realização março a outubro de 2010.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Paranaense de Combate ao Câncer (CEP-LPCC). Após aprovação do projeto pelo CEP-LPCC foram incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico de trombocitopenia grave (contagens inferiores à 50.000 cels/ μ L) durante o mês de julho de 2010, que realizaram hemogramas no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do hospital selecionado e que aceitaram participar do estudo.

De acordo com os dados do LAC, cerca de 2 pacientes/dia apresentam trombocitopenia grave, totalizando cerca de 60 pacientes/mês. Foram analisados neste estudo amostras de 50 pacientes (nível de confiança de 95%).

O sangue periférico foi obtido conforme rotina da instituição por punção venosa e transferido para frascos estéreis contendo EDTA-K₃ como anticoagulante. As amostras de sangue periférico foram analisadas normalmente pelo LAC pelo equipamento Advia® 120 e, as amostras cujos resultados da contagem de plaquetas foram inferiores a 50.000 cels/ μ L, foram separadas para contagem manual, a análise manual foi realizada no máximo 4 horas após a coleta. Foram incluídos no estudo sujeitos de pesquisa de ambos os sexos, maiores de 18 anos, em tratamento quimioterápico no período da coleta. Também foram analisadas amostras de indivíduos cuja a contagem de plaquetas estava dentro dos valores normais, como controle.

O material de análise foi obtido após consentimento do paciente; aproximadamente 1 mL de material foi necessário para este estudo. Essas alíquotas eram parte integrante de amostras obtidas de pacientes que fossem encaminhados ao serviço de Oncologia do HEG para tratamento, e que, após conhecimento do estudo, consentiram, de forma livre e espontânea, com seu uso em pesquisa.

Previamente à contagem manual das plaquetas com o sangue dos pacientes trombocitopênicos, foi realizada a padronização e seleção do método direto de microscopia óptica que melhor apresentou resultados quanto a contagem de plaquetas. Foram avaliados os métodos de Rees-Ecker (REES & ECKER⁵) e o de Brecher (BRECHER & CRONKITE⁶). Para tal, foram utilizadas amostras de sangue utilizadas na rotina das aulas práticas de hematologia dos laboratórios das Unibrasil, doadas neste estudo pelos próprios autores e colaboradores do trabalho.

A técnica de Rees-Ecker utiliza 3,8 g de citrato de sódio, 0,2 mL de formalina 38%, 0,1 g de azul de cresil brilhante em 120 mL com água destilada como diluente, para este estudo foi preparada uma diluição 1/200 de sangue total no diluente de Rees-Ecker. Uma vez preparada a diluição a amostra foi agitada durante 15 minutos para total homogeneização da mesma. Em seguida foi preenchida a câmara de Neubauer Improved, deixando-a em câmara úmida por 20 minutos. Após este

procedimento pode-se levar a câmara até o microscópio óptico e realizar a contagem de plaquetas com aumento de 400x, na região central de câmara, totalizando um volume total de contagem de 1 mm^3 , o número encontrado nesta contagem é multiplicado por 2000 nos casos de diluição 1/200, encontrando-se assim o número de plaquetas por μL de sangue. Neste método as plaquetas coram-se em azul e são refringentes.

Para a técnica de Brecher utiliza-se 1,0g de oxalato de amônia, 2 gotas de azul de metileno a 1% em 100 mL de água destilada como diluente. Foi realizada uma diluição também de 1/200 da amostra com o líquido diluidor, em seguida foi preenchida a câmara de Neubauer Improved e após 3 minutos foi realizada a contagem das plaquetas, observando novamente a parte central da câmara, com aumento de 400x. Nessa técnica o número de plaquetas contadas também foi multiplicado por 2000 afim de chegar ao número de plaquetas por μL de sangue.

As técnicas foram comparadas quanto ao tempo de preparo da amostra, facilidade de leitura, interferentes de análise, visualização das plaquetas. A técnica que apresentou melhor desempenho foi selecionada para contagem das células dos pacientes.

Após a padronização da técnica, foram realizadas as contagens com as amostras dos pacientes. Conforme estabelecido com o LAC do HEG, durante o mês de outubro de 2010 as amostras de pacientes de que atendessem aos critérios de inclusão, independente da doença de base, foram separadas e encaminhadas à equipe do estudo.

Após a autorização concedida pelo paciente, a amostra foi analisada no laboratório de hematologia da Unibrasil. Para análise dessas amostras, foi realizado o método direto de microscopia óptica que melhor apresentou resultados durante a fase de otimização da técnica.

Uma vez com os resultados da contagem manual de plaquetas, foi observado se existia uma concordância entre o resultado obtido através da contagem manual e o resultado obtido pelo sistema automatizado do analisador hematológico.

A análise estatística dos resultados foi baseada em cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação. Para a padronização da técnica foi utilizado o teste

t de Student e o teste de Tukey para comparação entre os métodos. Os cálculos foram realizados utilizando-se o software StatPlus, para Mac, e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

O tempo de preparo da técnica de Rees-Ecker, da coleta até o início da contagem em microscópio óptico, durou em média 40 minutos. Para a técnica de Brecher, o tempo de preparo até a observação em microscópio óptico é de cerca de 20 minutos. Percebeu-se algumas interferências na técnica tratando-se da câmara de Neubauer Improved em si, que pela intensidade de uso nas aulas práticas já se apresenta um pouco desgastada, mostrando ao microscópio pequenas irregularidades e deformidades que se assemelham as plaquetas quando em refração.

Para a verificação de qual das técnicas seria a ideal para a análise das amostras dos pacientes trombocitopênicos, levando em consideração o tempo de preparo, a facilidade de leitura, interferentes de análise e a visualização das plaquetas, foram realizadas contagens manuais em triplicatas pelas duas técnicas, com amostras provenientes dos colaboradores do projeto, tendo como controle o analisador hematológico automatizado Advia® 120. A média das triplicatas dos resultados das três amostras analisadas e suas respectivas análises estatísticas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Comparação das técnicas de contagens manuais e automatizada de plaquetas: Rees-Ecker x Brecher x Automatizada

Cadernos da Escola de Saúde

Amostra	Automatizado (cels/ μ L)	Rees-Ecker (cels/ μ L)	Teste t <i>p</i>	Brecher (cels/ μ L)	Teste t <i>p</i>
H	268.000	401.333	0,0017	330.000	0,0871
I	261.500	295.333	0,1010	250.667	0,5014
J	189.000	228.000	0,1175	189.333	0,9782

* $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

Analisando todas as contagens, seus resultados, facilidade no preparo e o tempo necessário para cada umas das técnicas, a técnica de Brecher foi a de melhor utilização para a contagem de plaquetas, sendo esta técnica escolhida para observação e contagem das amostras dos pacientes. Tal técnica foi a que apresentou menor variância em relação à técnica automatizada.

Quando realizada a contagem das amostras dos pacientes trombocitopênicos pelo método manual de Brecher, foi verificado um coeficiente de variação de 10,8% ($n = 50$) entre as triplicatas.

Para a comparação entre os métodos manuais e automatizado, as amostras dos pacientes foram analisadas em dois grupos de acordo com os valores obtidos na contagem por automação:

Grupo 1: todos os pacientes com contagens de plaquetas abaixo 50.000 cels/ μ L (trombocitopenia grave).

Grupo 2: pacientes com contagens crítica de plaquetas, valores abaixo de 20.000 cels/ μ L (trombocitopenia severa).

As figuras 1 e 2 mostram a distribuição das contagens de plaquetas obtidas pelos métodos automatizado e manual em 50 amostras com trombocitopenia grave e em 11 amostras com trombocitopenia severa, respectivamente.

Figura 1. Distribuição das contagens de plaquetas pelo método manual e automatizado de pacientes com trombocitopenia grave

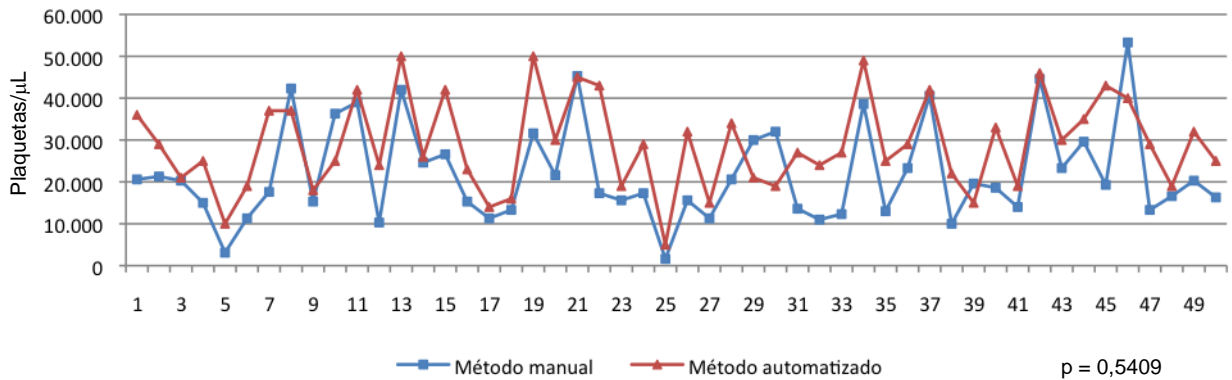
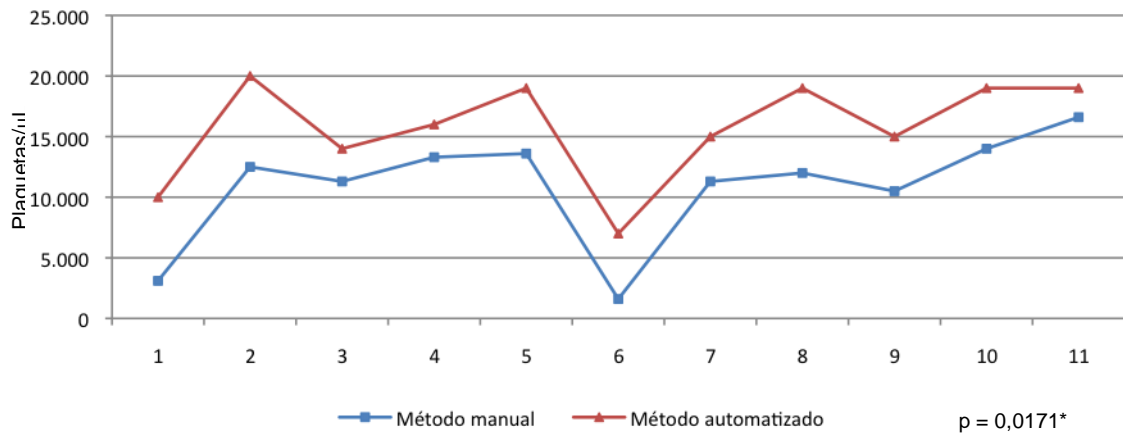


Figura 2. Distribuição das contagens de plaquetas pelo método manual e automatizado de pacientes com trombocitopenia severa



DISCUSSÃO

A avaliação do número de plaquetas nos mais variados pacientes é de grande importância para sua clínica. Diversas patologias podem ser detectadas ou descartadas a partir desta referência, principalmente um baixo número de plaquetas pode trazer graves consequências ao doente, como hemorragias, derrames, edemas, entre outras (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO ⁷).

Existem vários motivos que podem levar a medula óssea a diminuir a produção de plaquetas, como exemplo uso de drogas e fármacos, leucemia, carcinomas, carência de ácido fólico ou vitamina B12, infecções, alcoolismo e por fim doenças congênitas (ADURA & DOUGLAS ⁸).

Rotineiramente em laboratórios de grande porte, e atualmente até nos laboratórios menores esta análise é feita por equipamentos automatizados, que utilizam o princípio da impedância e de sinais ópticos na contagem de plaquetas. Porém em algumas situações a avaliação manual das plaquetas é de grande importância para o diagnóstico correto (BORGES & SIQUEIRA ⁹).

Contudo é importante lembrar que diversos fatores podem levar a contagem erradas quando se trata de contagem manual de plaquetas. A própria montagem da câmara de Neubauer pode ser uma fonte de erro, pois a maneira como se monta pode ter variações alterando o volume de amostra dentro da câmara e assim modificando a contagem (OLIVEIRA *et al* ¹⁰).

Nas contagens realizadas com o diluente de Rees-Ecker, notou-se uma certa dificuldade quanto a técnica, tendo em vista que a coloração apresentou grande quantidade de artefatos (sujidades) mesmo após o líquido diluidor ser filtrado em filtro de 5µm, além de não corar apenas as plaquetas. Outro fator complicador é o número de eritrócitos que aparecem no campo, que podem atrapalhar no momento da contagem.

Na técnica com o líquido diluidor de Brecher pode-se observar melhor as plaquetas, tendo em vista que não havia tantas sujidades (artefatos) como na outra

técnica citada e também pelo fato de o corante corar apenas as plaquetas da amostra, o que facilitou a contagem, já que o diluente lisa os eritrócitos, que passam a não interferir na contagem.

A diluição da amostra também é um aspecto relevante durante a contagem, pois caso ocorra uma diluição errada, para mais ou para menos a contagem estará integralmente comprometida pois a relação número de células/microlitro de sangue estará alterada. Portanto, a calibração das pipetas utilizadas, assim como o uso de ponteiros limpas e novas para o controle da qualidade do experimento devem ser levados em conta em toda diluição realizada para que o resultado não seja comprometido.

Como ocorreu na padronização da técnica a presença de sujidades ou partículas que venham a se assemelhar com plaquetas tanto em sua forma quanto tamanho, podendo levar o responsável pela contagem a contá-las como plaquetas alterando o resultado final, e tendo em vista que ao término da contagem o número encontrado é multiplicado pelo fator de correção, apenas algumas partículas contadas indevidamente já levam a grandes alterações no resultado final.

Por motivos como estes, a técnica de Brecher foi a mais conveniente para diluir as amostras, e como mostra a tabela 1, foi a técnica que mais se aproximou dos resultados esperados, e não apresentava tantas sujidades e artefatos como o líquido de Rees-Ecker apresentou.

O tempo decorrido entre a coleta do sangue do paciente até a análise microscópica é outro fator que deve ser considerado, uma vez que o sangue quando entra em contato com o EDTA, mesmo sendo este o anticoagulante de escolha na maioria das vezes, pode perder sua fisiologia normal, podendo ocorrer alterações plaquetárias como agregações e dependendo do tempo até uma coagulação parcial da amostra. Tais fatos influenciam a contagem de plaquetas, tanto para as contagens automatizadas como para as contagens manuais em câmara de Neubauer.

Quando consideramos a automação da contagem de plaquetas pelos analisadores hematológicos, verifica-se que este é um método de ampla precisão, superior inclusive à contagem manual realizada com microscopia óptica. Embora seja mais precisa mesmo em laboratórios de grande porte é de suma importância a realização da contagem manual em pacientes com doenças que afetam as plaquetas, não apenas para conferência, mas para se realizar um controle de qualidade do sistema automatizado. O que se observa na prática é que as contagens manuais de plaquetas ainda são amplamente utilizadas por laboratórios de pequeno porte (COMAR *et al*¹¹).

Os analisadores hematológicos utilizam-se mais comumente das tecnologias de impedância e sinais ópticos na contagem automatizada de plaquetas. Em qualquer analisador automático, todas as partículas que estiverem dentro dos limites e tamanhos pré-estabelecidos serão consideradas plaquetas, daí a principal fonte de erro em contagens automatizadas (OLIVEIRA *et al*¹²). Em pacientes onde ocorrem coagulação parcial da amostra podem apresentar resultados falsamente diminuídos o que também pode ocorrer em casos de amostras com plaquetas gigantes (COMAR & SILVA¹³). Mesmo em analisadores hematológicos de última geração que proporcionam uma grande exatidão quanto a sua contagem de plaquetas, existem situações que podem levar a contagens equívocas, principalmente tratando-se de valores abaixo de 10.000 cels/ μ L (MALOK *et al*¹⁴).

Neste trabalho foi observado que quando analisamos amostras de pacientes com trombocitopenia severa uma confirmação manual das contagens de plaquetas pode se fazer necessária. A análise estatística mostrou que não há diferença significativa dos valores das contagens pelo método automatizado e manual para amostras trombocitopênicas graves ($p = 0,5409$), mostrando que a contagem de plaquetas pelo método manual em câmara de Neubauer é uma técnica simples e segura para contagens de plaquetas. Contudo, quando tratamos de pacientes com trombocitopenia severa, próximos aos valores que fazem do paciente um candidato a terapia transfusional plaquetaria, verificamos que as contagens automatizadas são ligeiramente superiores às contagens manuais ($p = 0,0171$), reafirmando a

necessidade da confirmação destas manualmente, afim de evitar que um paciente em condições críticas deixe de ser tratado.

A diferença apresentada entre os resultados do analisador automatizado e a contagem manual por câmara de Neubauer, demonstra a importância em realizar o método manual para conferência, principalmente em pacientes que apresentem uma trombocitopenia grave, tendo em vista que o limiar entre indicar ou não uma transfusão é pequeno e que muitas vezes é diferente entre as metodologias, como exemplo, em um paciente a contagem pelo analisador hematológico não indicaria a transfusão, já pela contagem manual seria -indicado (OLIVEIRA *et al*¹²).

A transfusão de concentrado de plaquetas depende primeiramente da clínica que o paciente apresenta. O exame sanguíneo com a respectiva contagem de plaquetas serve para verificar a necessidade do tratamento e se é necessário transfusões. Segundo a ANVISA é recomendado a transfusão quando as contagens se encontram abaixo de 10.000 plaquetas/ μ l, (RDC nº 129, de 24 de maio de 2004 – ANVISA) também no serviço de Oncologia Clínica do Hospital Erasto Gaetner a recomendação de transfusão é para contagens abaixo de 10.000 plaquetas/ μ l, segundo a equipe clínica local.

Portanto, quando a contagem automatizada se encontra próximo ao número recomendado para transfusões a contagem manual pode ser de suma importância para a confirmação do número encontrado pelo equipamento.

CONCLUSÃO

As contagens manuais de plaquetas em câmara de Neubauer, pelo método de Brecher, para pacientes com trombocitopenia severa, parece ser uma técnica acuradas e capaz de auxiliar a confirmação da necessidade de tratamentos transfusionais em pacientes com risco de sangramento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – GREER, J.P. & et al. – Wintrobe's Clinical Hematology. 12 ed. London, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, 3232p.
- 2 – JURK, K. & KEHREL, B.E. – Platelets: physiology and biochemistry. *Semin. Thromb. Hemost.*, 31(4): 381-392, 2005.
- 3 – LEWIS, S.M.; BAIN, B.J. & BATES, I. - Hematologia prática de Dacie e Lewis. 9 ed. Porto Alegre, Artmed, 2005, 571 p.
- 4 – BRAESTER, A. - Pseudothrombocytopenia as a pitfall in the treatment of essential thrombocythemia. *Eur J Haematol.*, 70: 251-252, 2003.
- 5 – REES, H.M. & ECKER, E.E. - An improved method of counting blood platelets. *J. Amer. Med. Ass.*, 80(9): 621-622, 1923.
- 6 – BRECHER, G. & CRONKITE, E.P. – Morphology and enumeration of human blood platelets. *J. Appl. Physiol.*, 3: 365-377, 1950.
- 7 – DUSSE, L.M.S. VIEIRA, L.M.; & CARVALHO, M.G. - Pseudotrombocitopenia. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 40(5): 321-324, 2004.
- 8 – ADURA, M.; DOUGLAS, C.R. - Patofisiologia geral das plaquetas. In. DOUGLAS, C.R. - Patofisiologia Geral Mecanismos da doença. São Paulo, Guanabara Koogan, 2000, pt. 59. p. 1234-1259.
- 9 – BORGES, L. F. & SIQUEIRA, L.O. - Validação de tecnologia 5diff do analisador hematológico Sysmex XS-1000i para laboratório de pequeno/médio porte. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 31(4): 247-251, 2009.
- 10 - OLIVEIRA, R.A.G. & et al. - A absoluta recomendação de se usar o método direto de contagem de plaquetas em câmara de Neubauer em pacientes intensamente plaquetopênicos. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 39(2): 139-141, 2003.
- 11 – COMAR, S.R. & et al. - Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. *Rev. Brás. Hematol. Hemoter.*, 31(6): 431-436, 2009.
- 12 - OLIVEIRA, R.A.G. & et al. - Is automated platelet counting still a problem in thrombocytopenic blood?. *São Paulo Med. J/ Rev. Paul. Med.*, 121(1): 19-23, 2003.

Cadernos da Escola de Saúde

13 – COMAR, S.R. & SILVA, P.H. - Determinação laboratorial e aplicação clínica dos parâmetros de volume plaquetário. Rev. Bras. Anal. Clín., 41: 257-259, 2009.

14 – MALOK, M. & et al. - Comparison of two platelet count estimation methodologies for peripheral blood smears. Clin Lab Sci., 20:154-60, 2007.