

TÉCNICA DE FRACIONAMENTO CELULAR: APARELHO DE CONTAGEM PLAQUETÁRIA POR PUNÇÃO DIGITAL

Barbara Fernanda Soares da Cruz ¹

Gislainy Pereira da Silva ¹

Nathalia Paula da Silva ¹

Luana Letícia Vila Donadel ²

RESUMO

A contagem de plaquetas é uma ferramenta fundamental para avaliação clínica de pacientes diagnosticados com algumas patologias que acometem as plaquetas, como por exemplo a Púrpura Trombocitopênica Idiopática que é uma deficiência imunológica caracterizada por plaquetopenia. Devido ao fato de ser uma doença idiopática, há uma grande procura ao laboratório de análises clínicas para a realização de hemograma, com o foco direcionado ao resultado de contagem das plaquetas, sendo esse um dos protocolos de acompanhamento da evolução do paciente, mediante ao uso de medicações. Pensando nisso, iniciou-se uma busca de ideias, que seriam viáveis e possíveis para complementar neste tratamento, inovando a forma de fazer a contagem das plaquetas, podendo ser realizada em casa e de forma segura, assim facilitando o controle do tratamento, reduzindo riscos aos pacientes e também colaborando com o tempo do resultado para o especialista médico e para o próprio paciente. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma nova técnica de fracionamentocelular com ênfase em conservar as plaquetas e reduzir interferentes, que poderiam comprometer na contagem microscópica e posteriormente na contagem de um aparelho remoto que será projetado em um outro momento, onde o mesmo propõe realizar a contagem de plaquetas através de uma programação feita por um software de computador e conciliar com a técnica de fracionamento de células que foi desenvolvida nesse projeto.

Palavras chaves: **Contagem de plaquetas; inovação; quantificação ; método; trombocitopenia.**

¹ Alunas do curso de Biomedicina do UNIVAG – Centro Universitário de Várzea Grande.

² Ma. em Ciências da Saúde professora do curso de Biomedicina do UNIVAG – Centro Universitário de Várzea Grande

1. INTRODUÇÃO

Sabemos que a Púrpura trombocitopênica idiopática é uma doença autoimune hematológica que acomete especificadamente as plaquetas, onde anticorpos ocasionam a destruição das mesmas, o que gera como resultado a plaquetopenia, cujas causas podem ser primárias ou secundárias; seu diagnóstico é realizado por exclusão (ROCHA, 2020), de forma que leva a pessoa diagnosticada em fase crônica, a se submeter a tratamentos medicamentosos de uso contínuo ou até mesmo uma esplenectomia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). As chaves para o diagnóstico são a história e o exame clínico, o hemograma completo e uma análise do esfregaço de sangue periférico (GROTTO, 2009).

A contagem plaquetária menor que $150 \times 10^9 /L$, associada a manifestações clínicas exclusivamente hemorrágicas, sem outras alterações do hemograma e do coagulograma, é o achado laboratorial essencial para o diagnóstico (DELGADO, 2009). O tratamento é muito relativo, a eficácia e tempo da estabilidade da quantidade de plaquetas varia muito de uma pessoa para outra. Ademais, o tratamento consiste em medicações (intravenosa, oral e algumas injetáveis) e o acompanhamento de contagem das plaquetas através do hemograma. Entretanto existem muitas pessoas que tem difícil acesso a laboratórios para realizar um hemograma, alguns por motivo de residir a uma grande distância até mesmo em outra cidade por exemplo; e além disso a falta e/ou dificuldade de transporte também (ROCHA, A. Q. A.).

Atualmente não existem métodos remotos que possibilitam a realização da contagem em domicílio. A contagem de plaquetas por microscopia é uma ferramenta fundamental na avaliação dos pacientes com doenças que acometem as plaquetas na medida em que adiciona informações úteis àquelas obtidas pelos analisadores hematológicos, além de servir de ferramenta de controle interno da qualidade das contagens automatizadas de plaquetas (COMAR, F.R. et al, 2009). Apesar da contagem automatizada de plaquetas ser considerada exata e precisa, ela também possui um risco potencial para a contagem erroneamente baixas ou altas, devido a possibilidade de haver intercorrências como: macroplaquetas, plaquetas gigantes, agregados plaquetários e além disso o analisador hematológico não inclui na contagem as plaquetas que ficam ocultas sob ou entre hemácias.

As células também são orientadas em um fluxo laminar e interceptadas uma a uma por uma corrente elétrica (Bacall). Outro benefício para a criação e uso deste aparelho será para acompanhamento de pós-operatórios, já que esse fragmento celular participa da cascata de coagulação sendo responsável pela cicatrização e reparação tecidual, necessitando também do monitoramento de contagem plaquetária. Além disso, ao desenvolver esse aparelho amenizará riscos de hemorragias aos pacientes, devido a coleta para realizar o hemograma ser via intravenosa, causando uma perfuração que possivelmente coloca o paciente em risco, já que a coleta é feita frequentemente, e que de tal forma exigirá a atuação das plaquetas no processo de cicatrização, pois participam do complexo sistema de manutenção da hemostasia, junto com a parede vascular, os fatores de coagulação e o sistema fibrinolítico e também estão presentes nos processos de inflamação e cicatrização das feridas (STOCKHAM & SCOTT, 2011). A quantidade de sangue colhido para realizar o hemograma, é equivalente a 4 mL de sangue. Quantidade significativa para uma pessoa que possui pouca quantidade de plaquetas circulantes, fazer diariamente.

Contudo o objetivo geral e específico deste projeto é respectivamente, criar uma técnica de fracionamento celular manual, com o intuito de destacar as plaquetas para que seja possível a sua detecção com menor risco de interferentes, através da projeção de um aparelho que realizará a contagem utilizando apenas sangue capilar, melhorar o acompanhamento de tratamento/evolução de pacientes que necessitam de um monitoramento de quantidade de

plaquetas, seja ele por imunodeficiências, pós - operatórios, trombocitopenia, trombocitose e entre outros.

2. METODOLOGIA

Para o estudo foi utilizado uma amostra de sangue total de 1 integrante do projeto, sem histórico clínico de problemas relacionados a deficiência plaquetária.

O líquido de turck, é um corante utilizado na hematologia com a finalidade de evidenciar a contagem dos glóbulos brancos em câmara de Neubauer, de forma que cause hemólise. Com tudo o mesmo foi empregado ao teste de fracionamento, com o objetivo de hemolisar para diminuir interferentes e favorecer a visualização das plaquetas.

Para o teste e prova de contagem foi utilizado o método alternativo de estimativa plaquetária em lâminas pelo método de Bárbara H. O'Connor para fornecer o valor da Contagem Plaquetária Microscópica por microlitro de sangue.

2.1. TESTE DE FRACIONAMENTO - Técnica de Fracionamento Celular

Foram utilizados tubos contendo anticoagulantes, Minicollect complet K₃EDTA; BD vacutainer K₂EDTA; 9NC coagulation sodion citrate 3,2%; vacuplast collect line Citrato de sódio. Ambos os anticoagulantes com duas variações de volume para amostra, sendo de 4 ml e de 1 ml. A utilização desses anticoagulantes é para impedir a agregação plaquetária. A escolha para ser testados esses dois tipos de anticoagulantes é com intuito de selecionar o que apresentará melhor resultado no quesito de inibir a coagulação e causar menos danos e redução de quantidades das plaquetas.

O primeiro passo do procedimento foi centrifugar os tubos contendo apenas o anticoagulante a 2.500 rpm por 5 minutos para que o mesmo se deposite na parte inferior do tubo, pois a quantidade disponível no tubo fica disperso ou na parede do tubo, dessa forma para que haja uma boa homogeneização entre o anticoagulante e a amostra, usar a técnica de sedimentação por centrifugação foi a opção mais viável. Após esse processo, foi realizado a coleta de sangue total e transferido para o tubo com o anticoagulante já sedimentado. Em seguida homogeneizar o tubo, confeccionar um esfregaço e deixar secar. Com o esfregaço já seco, utilizando uma pipeta de Pasteur, cobrir a lâmina com o líquido de Turk e deixar agir por 5 minutos. Por fim, retirar o excesso do líquido apenas inclinando a lâmina para a pia e deixar a lâmina secar no sentido vertical, padronizando o lado de retirada do excesso para evitar resquícios de células, o que dificultaria a visualização e identificação das plaquetas no microscópio.

2.1. TESTE DE COLORAÇÃO - Técnica de Coloração

Para a coloração utilizou-se duas técnicas de corantes para avaliar qual apresentaria melhor visualização microscópica, nos quesitos de cores às células e detalhes nítidos como núcleos, citoplasmas e características afins. Os corantes utilizados são: Panótico e Giemsa, com o intuito de ter uma boa visualização do resultado da técnica de fracionamento, utilizada anteriormente e para a comprovação visual de que na lâmina permanecerão apenas leucócitos e plaquetas. O procedimento de corar com o panótico é o mesmo utilizado para o hemograma manual, mergulhando a lâmina nos três tubos por tempo determinado, procedendo assim: tubo 1 – 30 segundos; tubo 2 – 50 segundos e tubo 3 – 100 segundos. O método de Coloração Panótico Rápido baseia-se no princípio de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky.

Já com o Giemsa, primeiramente realizou a técnica de fixação com álcool e depois foi corado pela técnica de cobrir a lâmina utilizando uma pipeta de Pasteur ou um conta gotas, deixou agir por 5 minutos, em seguida retirou-se o excesso com água corrente e deixou secar na posição vertical. Padronizando o lado de retirada do excesso com o mesmo fundamento de evitar dificuldades na visualização microscópica.

2.1. TESTE DE PROVA DO FRACIONAMENTO

Para o fracionamento das células, foi utilizado o líquido de Turk, o procedimento consiste em cobrir a lâmina com o líquido de Turck e deixar agir por 5 minutos. Por fim, retirar o excesso do líquido apenas inclinando a lâmina para a pia de forma padronizada, deixar escorrer o excesso pelo o lado da identificação, para evitar resquícios de células e atrapalhar a visualização, em seguida deixar a lâmina secar no sentido vertical com a identificação para baixo.

O teste de prova do fracionamento foi feito para a aprovação da técnica de fracionamento realizada anteriormente, que será avaliada microscopicamente para concluir a eficácia do método realizado. O esperado é que, contenha em lâmina apenas a presença de leucócitos e plaquetas em bom estado morfológico.

2.1. TESTE DE CONTAGEM

O teste de contagem possuiu o fundamento de efetuar uma contagem manual das plaquetas através da lâmina que foi confeccionada o esfregaço do sangue total, contendo EDTA, que passou pela etapa de fracionamento das células com líquido de Turk e por fim que foi corada com kit panótico. Com auxílio do microscópio e de um contador hematológico realizar a contagem das plaquetas, a contagem consiste em um método já existente, estimativa plaquetária pelo método de Bárbara H. O'Connor, para se fazer a contagem plaquetária por este método, foram enumeradas no microscópio ótico com aumento de 1000x, plaquetas em 10 campos e, em seguida, calculou-se o valor médio por campo. Este valor foi multiplicado por 10000 (constante de multiplicação) para fornecer o valor estimado da contagem de plaquetas por microlitro.

2.2 TESTE DE PROVA DE CONTAGEM

Para a confirmação do resultado da contagem anterior realizada manualmente, foi feito um teste prova, que comprovará a eficiência do líquido de Turk na etapa de fracionamento e a conservação das plaquetas pela utilização do EDTA.

Para esse teste de prova de contagem, foi realizada novamente a contagem da mesma amostra que foi utilizada para contagem na lâmina, porém utilizando sangue venoso com a mesma quantidade aproximadamente 100 uL e a contagem de forma automatizada para a comparação de valores. Sendo assim podendo chegar a um resultado final.

Para o estudo, foi realizado testes manuais de fracionamento das células sanguíneas, utilizando técnicas, reagentes e corantes comuns de uma rotina laboratorial, com a finalidade de isolar as plaquetas das outras células.

3. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Com tudo os resultados obtidos foram que o anticoagulante que apresentou uma melhor conservação para as plaquetas foi o K_3EDTA , com concentração para até 1 ml de sangue (microtubo para coleta) em comparação com o citrato 9NC coagulation sodion citrate 3,2%, que por via apresentou menor eficiência no quesito conservação de quantidade das plaquetas. Para a visualização de características morfológicas/estrutural desses fragmentos celulares, o panótipo apresentou melhor visibilidade.

Ademais para completar o estudo, foi feito a contagem para comprovar a efetividade das técnicas desenvolvidas durante o projeto, sendo elas: teste de fracionamento onde a finalidade é que ocorra a hemólise, com objetivo de amenizar interferente manter apenas plaquetas e leucócitos que serão úteis na fase da contagem. A segunda fase é o teste de coloração, foi utilizado dois tipos de corantes o panótipo e o Giemsa para a coloração do esfregaço, com a finalidade de escolher a que mais se adequa com a estrutura das plaquetas, no teste de contagem utilizamos o equipamento de contagem hematológica que é a Sysmex XP300, e a contagem manual no microscópio com auxílio de um contador hematológico. Foi feito a contagem em duplo cego com intuito de tirar a média da contagem. O teste e prova de contagem possibilitou analisar a comparação entre às contagens manual e semi-automatizada que induziu a analisar as margens de erro para concluir e confirmar os resultados do projeto com êxito.

Obtivemos como resultado uma margem de erro de aproximadamente 10,7% em comparação a contagem feita microscópica, totalizando em 263 mil plaquetas versus, o aparelho hematológico Sysmex XP300 que cotabilizou 238 mil. Para a contagem microscópica é utilizado um cálculo, a contagem foi realizada por um método já existente de Bárbara H. O'Connor, para se fazer a contagem plaquetária por este método, foram enumeradas no microscópio ótico com aumento de 1000x, plaquetas em 10 campos e, em seguida, calculou-se o valor médio por campo. Este valor foi multiplicado por 10000 (constante de multiplicação) para fornecer o valor estimado da contagem de plaquetas por microlitros.

4. DISCUSSÃO

Para dar continuidade no projeto, em outro momento, a próxima etapa será projetar o aparelho com mecanismos específicos de maior precisão que contribuirá para realizar, a contagem plaquetária utilizando apenas a punção capilar. Para esse aparelho ter potencial de identificar apenas as plaquetas, será introduzido um método de leitura programado por um computador através de software. De maneira simples, um software pode ser entendido como qualquer programa de computador capaz de comandar o funcionamento de um sistema com base em computador, executando tarefas específicas. Segundo Stair & Reynolds (2011), o software consiste em programas que comandam a operação do computador, é uma linguagem informática onde o computador consegue interpretar o comando, através de dados fornecidos pelo software e executar as tarefas que foram planejadas especificadamente. Esses programas permitem que o computador aprimore o fluxo e o volume de processamento de informações. E em conjunto a programação do software, implementar a técnica de fracionamento de células, que foi desenvolvida durante o projeto para evitar interferentes de células, pelas suas características distintas.

O aparelho propõe solucionar esses problemas, facilitando a rotina do paciente e do profissional responsável pelo tratamento/acompanhamento, de forma segura e que colabore em manter o controle do estado clínico do paciente, poupando tempo, trazendo fácil acesso ao resultado e bem-estar a ambos. A construção de um aparelho que é capaz de fazer contagem plaquetária, sem trazer riscos ao paciente, visa proporcionar um acompanhamento seguro durante o tratamento e/ou recuperação, trazendo praticidade e confiança ao paciente e ao profissional médico. O equipamento a ser projetado se espelha no glicosímetro, aparelho que é utilizado em diabéticos para o acompanhamento do tratamento, que realiza a contagem da glicose utilizando uma gota de sangue capilar. Os glicosímetros são compostos por uma fita reagente que entra em contato com um reflectómetro que passa por reações enzimáticas, onde acontece alteração na coloração da fita que é interpretada pelo método fotométrico, que no final quantifica a glicose dessa amostra de acordo com a reflectância da reação. (NEGRATO, Carlos, 2019).

Para a leitura do equipamento utilizará apenas uma gota do sangue capilar que é perfurado com uma lanceta, sendo assim, podendo ser realizado pelo próprio paciente e/ou responsável pelo paciente, não necessitando de um profissional para efetuar. O aparelho realizará a leitura através de um método semelhante ao de impedância elétrica. Nos aparelhos hematológicos, esse é o método comumente encontrado, onde as células sanguíneas são identificadas, contadas e medidas a partir dos impulsos elétricos que geram quando são imersas em um meio condutor (solução eletrolítica).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, D. F. B. **Softwares de sistemas e de aplicações livres: benefícios e limitações no uso dessas tecnologias nos negócios**, 2014. Disponível em: <https://semanaacademica.org.br/system/files/artigos/dfba_artigo.pdf>. Acesso em 8 de julho de 2020.

BACALL, S. N. **Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos**, *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* vol.31 no.4 São Paulo July/Aug. 2009. Disponível em <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000400006> Acesso em: 17 de outubro de 2020.

COMAR, S.R., et al. **Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial**. Curitiba-PR, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbhh/a/cndbHDvv48QP7PPL4ZBRpXF/#>> . Acesso em: 06 de julho de 2021.

DELGADO, R. B. et al. **Púrpura trombocitopênica imune da criança: experiência de 12 anos em uma única instituição brasileira**. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/rbhh/2009nahead/aop0609.pdf>>. Acesso em: 17 de novembro de 2020.

FIGUEIREDO, S. A. VIANA, D. **Protocolo clínicas e diretrizes terapêuticas púrpuras trombocitopênica idiopática, ministério da saúde secretaria de atenção especializada à saúde secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos**. Disponível em:

<<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/agosto/09/PCDT-P--rpura-Trombocitop--nica-Idiop--tica.pdf>>. Acesso em: 05 de setembro de 2020.

GROTTO, H. Z. W. **O hemograma: importância para a interpretação da biópsia**, São Paulo, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbhh/a/WndYGbb6XKzMTHnKCQygXTS/?lang=pt#>> . Acesso em 02 de julho de 2021.

LABORCLIN. **Panótico teste rápido**, 2019. Disponível em: <<https://www.laborclin.com.br/panotico-rapido/>> . Acesso em 06 de julho de 2021.

NEGRATO, Carlos. **Esclarecimentos quanto à metodologia utilizada nos monitores de glicemia capilar (glicosímetros) e erros mais frequentes na prática clínica**, São Paulo, 2019. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/publico/colunas/32-dr-carlos-negrato/193-esclarecimentos-quanto-a-metodologia-utilizada-nos-monitores-de-glicemia-capilar-glicosimetros-e-erros-mais-frequentes-na-pratica-clinica>>. Acesso em 09 de novembro de 2020.

O'CONNOR, BH. **Color Atlas and Instruction Manual of Peripheral Blood Cell Morphology**. Williams & Wilkins: Pennsylvania, 1ª ed., 1984.

ROCHA, A. Q. A. **Púrpura trombocitopênica imune secundária à infecção por coronavírus sars-cov2: relato de caso**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7604212/>>, Acesso em, 17 de outubro de 2020.

STAIR, Ralph M.; REYNOLDS, George W. **Princípios de sistemas de informação. 9ª edição.** São Paulo: Cengage Learning, 2011.

STOCKHAM, S. L. & SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica**

Veterinária. Editora Guanabara Koogan, 2ª edição, Rio de Janeiro, 2011. 744 p.

THRALL, M. A. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. Editora Roca. 1ª edição, 2007. 688 p.