

# **CORANTES E ANTICOAGULANTES HEMATOLÓGICOS**

Cristiano Brasileiro Carvalho

## **Introdução**

Na hematologia os corantes para esfregaços sanguíneos, também chamados de pancrômicos, são uma mistura de corantes neutras, dependentes do pH da solução corante que, em condições apropriadas, coram as emácias, as plaquetas e os componentes nucleares e citoplasmáticos dos leucócitos com predominância de tons vermelhos (quando ácidos) e azulados diversos (quando básicos). A coloração das células diferencia em detalhes as estruturas nucleares e citoplasmáticas, permitindo a avaliação do tamanho das células, a relação núcleo/citoplasma, a forma do núcleo, a presença de nucléolos, o padrão da cromatina e a coloração do citoplasma, a presença de granulações, vacúolos e outras alterações morfológicas.

A anticoagulação é a inibição terapêutica controlada da coagulação do sangue por meio de medicamentos apropriados (isto é, anticoagulantes). Alguns anticoagulantes se prestam melhor à hematologia pelas suas propriedades conservadoras da morfologia celular e dos componentes do plasma, especialmente os fatores da coagulação.

## **Objetivos**

No trabalho será adentrado aos assuntos que se referem a corantes usados em hematologia. Em nível de esclarecimento vamos lembrar aqui um pouco do significado de hematologia, que nos remete ao ramo das Análises Clínicas que irá estudar o sangue e os elementos figurados do sangue como as hemácias os leucócitos e plaquetas. O consequente estudo da hematologia nos levará aos elementos propostos neste trabalho que são os anticoagulantes, substâncias essas que evitam com que o sangue coagule e retardam sua deteriorização. Como sabemos existem diversos anticoagulantes de uso laboratorial, mas somente alguns devem ser utilizados na hematologia. São escolhidos pelas suas propriedades que são conservadoras da morfologia celular e também dos componentes de plasma.

## **Tipos de Anticoagulantes**

Algumas substâncias podem impedir a coagulação do sangue após a sua retirada do interior dos vasos sanguíneos, embora não tenham essa propriedade quando administradas aos indivíduos. Essas substâncias são chamadas de anticoagulantes "in vitro". Esses anticoagulantes são utilizados pelos hemocentros, e laboratórios para impedir a coagulação do sangue coletado nas bolsas plásticas, para as transfusões. São compostos químicos conhecidos como agentes quelantes, ou seja, agentes que retiram o cálcio do sangue, mediante reação química. Os agentes quelantes mais comuns são o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e menos comum, ACD (mistura de ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose), oCPD (citrato, fosfato e dextrose) e o CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrose e adenina). As substâncias ou misturas quelantes, reagem com o cálcio ionizado do sangue formando sais fixos de cálcio. Este mecanismo impede a ação do cálcio (Fator IV) na conversão da protrombina em trombina, nas reações da vida comum da coagulação e, desse modo, a cascata da coagulação não se completa. Esta é, praticamente, a única aplicação dos anticoagulantes "in vitro". As substâncias que quando administradas aos indivíduos impedem a formação de coágulos no interior do sistema circulatório, são os anticoagulantes "in vivo". Estes anticoagulantes são os mais importantes na prevenção e no tratamento das trombozes e embolias. São a heparina e os compostos cumarínicos. A heparina é administrada por via venosa e promove um efeito imediato, cuja duração oscila entre quatro e seis horas. Os cumarínicos são administrados por via oral. Seu efeito é lento; surge após 48 a 72 horas e desaparece após 3 a 4 dias.

### **EDTA**

O EDTA é anticoagulante mais utilizado na hematologia, sendo então utilizado para contagens de células sanguíneas. É semelhante aos oxalatos para a determinação do hematócrito, e superior a eles para os estudos morfológicos, porque os artefatos aparecem mais lentamente e só após uma espera prolongada. Extensões aceitáveis podem ser preparadas após 2 a 3 horas após a coleta do sangue, se estiver refrigerado. Ele impede a agregação de plaquetas e é o anticoagulante de eleição para a contagem de plaquetas. O EDTA é considerado

atualmente o anticoagulante de escolha em hematologia. Existe no comércio o EDTA de sódio e o EDTA de potássio, sendo utilizado o EDTA de sódio por ser mais barato. O EDTA de potássio apresenta como vantagem perante o de sódio o fato de ser mais solúvel. Atua como anticoagulante quelando o cálcio, inibindo assim a cascata da coagulação. Deve se observar a proporção do sangue/anticoagulante, pois o excesso de EDTA altera a morfologia dos hemácias dificultando assim seu estudo.

## **Heparina**

A heparina não afeta o volume corpuscular nem o hematócrito. É o melhor anticoagulante para impedir a hemólise e para os testes de Fragilidade Osmótica. Não é satisfatório para as contagens de leucócitos e de plaquetas, devido a aglutinação das células. As extensões coradas apresentam fundo azulado pelas colorações rotineiras, dificultando seu estudo. Não altera a morfologia e tamanho celular, estando indicado para os teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos.

A heparina interfere nas etapas finais da cascata da coagulação, impedindo conversão da protrombina (fator II) em trombina, que, por sua vez, promove a conversão do fibrinogênio (fator I) em fibrina, originando o coágulo. A trombina (fator II ativado), por ação enzimática, converte o fibrinogênio em fibrina, além de ativar os co-fatores V e VIII, o que acentua a velocidade da formação do coágulo de fibrina, através as vias intrínseca e comum da coagulação. A ação enzimática da trombina é impedida por uma glicoproteína do plasma, a antitrombina III. A heparina se une à antitrombina III, tornando a sua molécula muito mais ativa em relação à inibição da trombina, o que impede a conversão do fibrinogênio. A trombina também é responsável pela ativação co-fatores V e VIII da coagulação. A antitrombina III é um inibidor dos produtos ativados dos fatores IX, X, XI e XII e, por estes mecanismos, a heparina também impede a ação desses fatores, nos mecanismos da coagulação.

**ACD (ácido cítrico-citrato de sódio-dextrose), CPD (ácido cítrico-citrato de sódio-fosfato-dextrose) e CPDA1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina)**

Antes da II Guerra Mundial o sangue era conservado em uma solução de citrato de sódio e dextrose, permanecendo os eritrócitos viáveis somente por uma

semana devido à falta de purinas e energia. A autoclavação dessas duas substâncias juntas ocasionava um processo de caramelização. Devido a essa alteração passou-se a se acidificar as soluções de citrato e dextrose com ácido cítrico para evitar a ocorrência desse processo desenvolvendo-se assim a primeira solução conservante efetiva, o ACD, descrito em 1943. Esse anticoagulante permitia o armazenamento por 21 dias.

O CPD é a solução de ACD com adição de bi fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{P}_0_4\text{H}_2\text{O}$ ). O fosfato, além de ser substrato para formação do 2,3-DPG, atua como um tampão ligando-se aos íons  $\text{H}^+$  produzidos durante a glicólise e impedindo a queda do pH que é o principal fator relacionado com a degradação do 2,3-DPG. Conseqüentemente tem-se uma menor taxa de hemólise e uma maior viabilidade celular.

As soluções ACD e CPD permitem o armazenamento do sangue durante 21 dias. Devido à acidez do pH dessas soluções, o nível de 2,3-DPG é muito baixo após 15 dias de armazenamento.

Dentre os três anticoagulantes citados nesse tópico, o CPDA-1 é o anticoagulante mais utilizado, tendo propriedades preservativas de hemácias melhores que o ACD. Com a diminuição do ATP e conseqüentemente do 2,3-DPG, devido ao elevado consumo celular durante a estocagem, essa solução é adicionada de adenina e tem o acréscimo de 24% de dextrose. A adição de adenina prevê um aumento de adenilato que servirá de substrato, combinando-se com a fosforibose-pirofostato (PRPP), para nova síntese de ATP conforme as reações.

### **Oxalato De Potássio E Oxalato De Amónio**

São usados em conjunto na maioria das determinações hematológicas. Permitem pequena perda de água pela célula com discretas modificações da morfologia.

Não afeta o volume corpuscular médio e pode ser utilizada para determinações de hemoglobina, hematócrito e contagens eritrócitos e leucócitos. A sua utilização para fazer extensões de sangue está limitada aos dois primeiros minutos devido a intensidade de alterações dos leucócitos tais como vacúolos citoplasmáticos, fagocitose de cristais de oxalatos e lobulação nuclear irregular. Não

serve para contagens de plaquetas porque permite a formação de agregados plaquetários.

### **Citrato De Sódio**

É utilizado para os estudos da coagulação sanguínea. O citrato de sódio atua como anticoagulante quelando o cálcio. É assim utilizado pois o seu efeito é facilmente reversível com a adição de  $\text{Ca}^{+2}$ . A concentração do citrato de sódio deve ser entre 105 e 109 mmol tamponado uma razão de 1 parte de anticoagulante citrato de sódio e 9 partes de sangue.

### **Uso do tubo com Anticoagulante Correto**

É fundamental para preservação da amostra e a correta determinação do analito, de acordo com o especificado em cada exame. Vários analitos têm concentrações no plasma e no soro diferentes. Quando vários tubos são usados durante uma única punção, tubos sem aditivos devem ser utilizados primeiro, para que se evite contaminação. Os anticoagulantes são diferenciados pela cor da tampa do tubo:

Rolhas | Anticoagulante |

Roxa | EDTA |

Amarela | Gel separador com ativador do coagulo |

Vermelha | Siliconizado sem anticoagulante |

Verde | Heparina sódica |

Cinza | Fluoreto de sódio+EDTA |

Azul | Citrato de sódio |

### **Preservação de Amostra Biológica**

A amostra deve ser preservada desde o momento da coleta até o momento em que será analisada. Plasma ou soro devem ser separados das células o mais rápido possível. Se o soro não pode ser analisado no momento, ele deve ser mantido refrigerado ou congelado. As amostras devem ser centrifugadas tampadas para se reduzir evaporação e aerolização. O tempo requerido para o transporte de

amostras biológicas, a partir do momento da coleta até a sua execução, pode variar de minutos até dias, desde que estas estejam bem conservadas, devendo-se consultar cada exame.

## **Colorações usuais em hematologia**

### **Romanowsky**

#### **Métodos de coloração**

##### **1.PRINCÍPIO**

Romanowsky idealizou um método em que uma solução de corantes poderia corar estruturas. Misturas dos corantes eosina e azul de metileno são preparadas segundo proposição de vários autores: Leishman, May-Grunwald, Giemsa, Wright e outros (que dão os respectivos nomes aos corantes, segundo Leishman, Giemsa, etc...). Estes corantes são dissolvidos em álcool (em geral metanol). Na solução envelhecida, o azul de metileno se oxida em gradações diferentes, originando diversos "azules" de metileno. Teremos então uma solução alcoólica de um complexo eosinato de azul e "azules" de metileno.

##### **2.FASES DA COLORAÇÃO**

**Fixação:** a preparação a ser corada deverá ser previamente fixada. O fixador rotineiro mais usado em hematologia é o metanol, que deve ser aplicado sobre a lâmina por 01 a 03 minutos. O corante, preparado em solução alcoólica, quando aplicado sobre a lâmina (nesse período de tempo) realiza esta etapa que é a de fixação.

**Coloração:** adicionando-se água de coloração (água tamponada, pH=7,0 ou água destilada, recentemente fervida) sobre o corante, ionizam-se os sais contidos na solução. **Lavagem:** após a coloração, as lâminas são lavadas sob jato de água corrente e em seguida secas ao ar.

##### **3. NOMENCLATURA USUAL**

Quando uma estrutura se cora, revelando a mesma cor do corante, diz-se que é uma coloração ortocromática; quando a estrutura toma uma cor diferente daquela do corante, diz-se que é uma coloração metacromática; estruturas celulares que tem afinidade pelo azul de metileno são chamadas basófilas, corando-se em azul; as que

tem afinidade pelos azules são chamadas azurófilas, corando-se em púrpura (metacromasia); as que tem afinidade pela eosina são chamadas acidófilas, corando-se em rosa e as que tem afinidade pela mistura são chamadas neutrófilas, corando-se em salmão.

### **Método De May- Grunwald-Giemsa**

O corante de May-Grunwald (1902) é uma mistura de eosina e azul demetileno (não oxidados), que quimicamente se transforma em eosinato de azul de metileno.

- Fixação: sobre a lâmina, colocar um número de gotas do Corante de MayGrunwald e aguardar alguns minutos (tempo padronizado).-Coloração (1): acrescentar um igual número de gotas de água de coloração, homogeneizar e aguardar alguns minutos (tempo padronização)- Coloração (2): desprezar o corante anteriormente colocado sobre a lâmina e, sem lavá-la, acrescentar uma solução do Corante de Giemsa, recentemente preparado (3 gotas de corante para cada 2 ml de água de coloração). Aguardar de 20 a 30 minutos. Lavar sob jato de água corrente. Secar ao ar.

### **Wright**

#### **Princípio:**

Os corantes empregados habitualmente em técnica hematológica, pertencem ao grupo dos corantes sintéticos, derivados da hulha, as anilinas, solubilizadas no estado de sais.

Esta coloração de Wright baseia-se no princípio de coloração estabelecida por Romanowsky, que misturou a eosina + azul de metileno, resultando: azul de metileno (azul I e II), violeta de metileno (grânulos basófilos), e azul de metileno. Quando se adiciona água, provocamos a dissociação eletrolítica, ativando estes corantes.

#### Técnica de coloração

- 1) Preparar os esfregaços sanguíneos
- 2) Secar a temperatura ambiente
- 3) Cobrir o esfregaço com o corante Wright por 1-2 minutos

- 4) Acrescentar 20 gotas de água destilada tamponada e deixar por 3-5 minutos
- 5) Lavar com água destilada tamponada
- 6) Secar na posição vertical

### **Azul De Cresil Brilhante**

Os reticulócitos são hemácias imaturas não-nucleadas que contém restos de RNA e no seu interior permanecem no sangue periférico durante 24 a 48 horas enquanto maturam (viram hemácias propriamente ditas). Elas geralmente se apresentam como hemácias maiores que as maduras. Neste teste, os reticulócitos em uma amostra de sangue total são contados e expressos em porcentagem da contagem total de hemácias. Recomenda-se contar em torno de 1.000 hemácias e destas o total de reticulócitos. A partir de então, se obtém a porcentagem de reticulócitos. Em razão do método manual de contagem de reticulócito utilizar somente uma pequena amostra, os valores podem ser imprecisos e devem ser comparados com a contagem de hemácias ou hematócrito. O corante mais usado é o azul-de-cresil brilhante, usado em soluções diversas nas numerosas variações técnicas. Nesse método a coloração se dá pelo fato de o azul de cresil brilhante ter alta afinidade pelo RNA (mensageiro e ribossomal) presente nos reticulócitos. O corante se mostra capaz de corar filamentos e grânulos de RNA e com isto permitir a diferenciação e contagem dos reticulócitos, ficando com coloração azulada ou vermelho violáceo.

### **Conclusão**

Os anticoagulantes e corantes auxiliam a identificação de doenças de origem primária ou secundária de características agudas ou crônicas. São utilizados também para acompanhar a evolução de uma variedade de doenças e para monitorar os efeitos colaterais decorrentes do uso de medicamentos. A avaliação eritrocitária pode identificar processos anêmicos, policitêmicos, alterações de forma e tamanho das hemácias. A avaliação leucocitária pode identificar processos inflamatórios, infecciosos, alérgicos, parasitários e leucêmicos. Pode também indicar



a presença de elementos anormais e de atipias linfocitárias. A avaliação plaquetária identifica processos de trombocitopenias adquiridas ou hereditárias e trombocitoses.

## **BIBLIOGRAFIA**

FAILACE, Renato. Hemograma : Manual de Interpretação. Ed. Artmed

ZAGO, Marco Antônio. Hemotologia Fundamentos e Prática.Ed. Atheneu

SARAIVA, J.C.P; OTTA, M.I. .Preservação do sangue e componentes. Ed. Atheneu

NAOUM, P.C; NAOUM; F.A. Hematologia Laboratorial. Eritrócitos. 2º Ed. Ed. Act

[www.goldanalisa.com.br](http://www.goldanalisa.com.br)

[www.renylab.com.br](http://www.renylab.com.br)

[www.labtest.com.br](http://www.labtest.com.br)

[www.bioclin.com.br](http://www.bioclin.com.br)

[www.biotechnica.com.br](http://www.biotechnica.com.br)

[www.doles.com.br](http://www.doles.com.br)

[www.newprou.com.br](http://www.newprou.com.br)