



Academia de Ciência e Tecnologia

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA CLÍNICA E LABORATORIAL

Severo Rosa Franco Neto

PSEUDOTROMBOCITOPENIA

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2017



CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM HEMATOLOGIA CLÍNICA E LABORATORIAL

Severo Rosa Franco Neto

PSEUDOTROMBOCITOPENIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência para obtenção do Diploma de Pós Graduação no Curso de Hematologia Clínica e Laboratorial, da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do rio Preto.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2017

Agradecimentos

À Deus, pois proporcionou tudo o que tenho em minha vida, por ter me dado forças a realização dessa vitória.

Aos meus pais pelo apoio, amor incondicional, por sempre acreditarem em mim e pela presença em todos os momentos de minha vida, devido a eles esse trabalho pode ser realizado.

À todos os amigos e familiares que estiveram em todos os momentos de minha vida me apoiando.

Enfim, obrigado a todos.

Severo Rosa Franco Neto

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

RESUMO

As plaquetas circulam no sangue e são fundamentais para formação dos trombos, verdadeiros tampões que cessam o sangramento. Elas são produzidas na medula óssea a partir da célula tronco hematopoiética. Por isso a plaquetopenia pode causar fenômenos hemorrágicos. O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) pode atuar como ponte de ligação de anticorpos, acarretando agregação plaquetária com diminuição do número de plaqueta (pseudotrombocitopenia) e satelitismo plaquetário (plaquetas agregadas ao redor de neutrófilos), causando falsas leucopenia e trombocitopenia. A pseudotrombocitopenia EDTA-dependente é atribuída a autoanticorpos que, *in vitro*, reconhecem antígenos modificados ou expostos pela ação do EDTA e baixa temperatura na membrana plaquetária. Objetivos: este estudo têm como objetivo analisar e descrever de forma crítica dados da literatura a respeito dos efeitos do uso do EDTA em interpretações de exames de hemograma e as formas de prevenir com que o fenômeno da pseudotrombocitopenia não aconteça. Metodologia: foi realizada uma busca bibliográfica nas bases de dados eletrônicas: Scientific Electronic Library On- Line (SIELO), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE) e Pub Med, referente a literatura publicada na década de 2000 a 2013. Resultados: 6 artigos, 01 informe técnico, considerados relevantes para a fundamentação da pesquisa. Conclusão: Vários são as formas de prevenção da pseudotrombocitopenia, podendo ser pré e pós analíticos, sendo que o exame fidedigno evita tratamentos medicamentoso e transfusões desnecessários.

Palavras-chave: Plaquetas, Trombocitopenia, pseudotrombocitopenia e EDTA.

ABSTRACT

Platelets circulate in the blood and are essential for the formation of thrombi, caps true to cease the bleeding. They are produced in the bone marrow from haematopoietic stem cell. So can cause thrombocytopenia hemorrágicos. O phenomena EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) can act as antibody binding bridge, causing platelet aggregation decreased number of platelets (pseudothrombocytopenia) and platelet satellitism (aggregated around neutrophils platelets) causing false leukopenia and thrombocytopenia. The EDTA-pseudothrombocytopenia dependent is attributed to autoantibodies in vitro recognize antigens modified or exposed by the action of EDTA and low temperature on membrane plaquetária. **Objetivos:** This study aim to analyze and describe critically the literature on the effects the use of EDTA in interpretations of tests: CBC and ways to prevent the phenomenon of pseudothrombocytopenia not happen. **Methodology:** A literature search was performed in electronic databases: Scientific Electronic Library On-Line (SciELO), Literature Latin American and Caribbean Health Sciences (LILACS), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE) and Pub Med, referring to published literature in the 2000s to 2013. **Resultados:** 6 articles, 01 technical report, considered relevant to the foundation of the research. **Conclusion:** There are several ways to prevent pseudothrombocytopenia and can be pre and post analytical, reliable exam being that the drug treatments and avoiding unnecessary transfusions.

Keywords: Platelets, Thrombocytopenia, pseudothrombocytopenia and EDTA.

Lista de abreviatura e siglas

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
GpIIb/IIIa	Glicoproteína IIb/IIIa
PTT	Púrpura Trombocitopênica Trombótica
SMD	Síndromes mielodisplásicas
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DMP	Doenças Mieloproliferativas
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPM	Volume Plaquetário Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
3. RESULTADOS	14
4. CONCLUSÃO	16
5. REFERÊNCIAS	17

1. Introdução

As plaquetas circulam no sangue e são fundamentais para formação dos trombos, verdadeiros tampões que cessam o sangramento. Elas são produzidas na medula óssea a partir da célula tronco hematopoiética. Por isso a plaquetopenia pode causar fenômenos hemorrágicos. A contagem aceitável é em torno de 145.000 a 450.000 plaquetas/mm³ (Failace RR, Fernandes FB, Failace, 2009).

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid) é o anticoagulante usado para a obtenção de sangue total para realização do hemograma, porque reduz a agregação plaquetária e mantém a morfologia e integridade das células sanguíneas. Ele tem ação bacteriostática; atua como quelante, ligando-se fortemente ao cálcio iônico do plasma (íons bivalentes de cálcio), bloqueando a agregação plaquetária e a cascata de coagulação; está disponível na forma de sais dissódico, dipotássico e tripotássico. O EDTA pode atuar como ligação entre os anticorpos, causando agregação plaquetária com redução do número de plaqueta (pseudotrombocitopenia) e satelitismo plaquetário (plaquetas agregadas ao redor de neutrófilos), ocasionando falsas leucopenias e trombocitopenias (Martinho MSC et al, 2012).

A pseudotrombocitopenia por EDTA-dependente se atribui a autoanticorpos que, *in vitro*, reconhecem antígenos modificados ou expostos pela ação do EDTA e baixa temperatura na membrana plaquetária (Santos PCJL et al, 2013). A hipótese mais provável é que a ligação ocorra no complexo da glicoproteína IIb/IIIa (GpIIb/IIIa). As aglutininas podem ser do tipo imunoglobulina M, G ou A (IgM, IgG ou IgA), e reagem mais fortemente à temperatura ambiente ou ao frio. A pseudotrombocitopenia foi observada em diversos processos autoimunes, sepse, hepatite C, toxemia da gravidez, púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) e síndromes mielodisplásicas (SMD). A pseudotrombocitopenia, além do EDTA, foi também observada com outros coagulantes, como citrato, oxalato e heparina (Martinho MSC et al, 2012).

Primeiramente, o fenômeno foi reconhecido por Gowland et al. 1969 e Watkins e Shulman 1970, que descreve um fator de soro que causou a aglutinação das plaquetas *in vitro* na presença de EDTA e temperaturas abaixo de 37 ° C (Gowland et al ,1969, - apud Morales Moreno et al,2001) .A descoberta deste

fenômeno precocemente é de extrema importância, pois a falta de reconhecimento desta falsa contagem de plaquetas pode causar realização de mais testes, diagnósticos equivocados e corticoterapia prologando, tratamentos de suspensão e até mesmo uma mudança de vida, por medo de sangramento (Berkman N, Michaeli Y, ou R, Eldor 1991; apud Morales Moreno et al, 2001).

Desta forma este trabalho têm como objetivo analisar e descrever de forma crítica dados da literatura a respeito dos efeitos do uso do EDTA em interpretações de exames de hemograma e as formas de prevenir o acontecimento deste fenômeno.

2. Revisão de Literatura

As plaquetas são derivadas de megacariócitos, que são derivados de células-tronco influenciados por fatores de crescimento e uma trombopoietina específica (Puyo CA, 2001).

A pseudotrombocitopenia consiste na contagem baixa de plaquetas em amostras de sangue colhidas em etilenedinitrilotetraacetato (EDTA). Essa diminuição é conseqüente à aglutinação das plaquetas ou, mais raramente, à formação de rosetas de plaquetas em torno dos neutrófilos, um fenômeno referido como *satelitismo plaquetário*. A aglutinação das plaquetas pode resultar na formação de grumos de tamanho similar aos dos leucócitos, e o contador automático é incapaz de distinguir tais grumos, reconhecendo-os como leucócitos e fornecendo contagem falsamente elevada ou pseudoleucocitose (Dusse LMS, *et al*, 2004).

Fatores pré-analíticos podem interferem no resultado da amostra, como os frascos de coleta (que são de uso único, devem ter seu interior estéril), volume e quantidade de anticoagulante proporcional ao volume de sangue a ser aspirado. Os tubos podem ser de vidros ou plásticos, esses últimos têm maior tendência nos laboratórios, há diferentes tamanhos de tubos (varia de 2 a 5ml de aspiração), que viabiliza a coleta em crianças, recém-nascidos, adultos e idosos. A quantidade de anticoagulante em cada tubo também é fator de relevância na qualidade da amostra (Martinho MSC *et al*, 2012).

Em tubo plástico com EDTA a contagem de plaquetas é melhor realizada, pois praticamente não há ativação da cascata de coagulação, o tubo de vidro e a agitação causam a agregação plaquetária, as coletas em tubo de plástico é mais recomendada pela biossegurança, além de evitar quebras e contaminação no ambiente de trabalho (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, 2010).

Deve ser realizada a homogeneização adequada, ou seja, de 8 a 10 vezes lentamente, sem a presença de coágulos e o exame deve entrar no setor analítico em até 4 horas (Failace RR, Fernandes FB, Failace R, 2009).

Amostras com coágulo, volume inferior ao desejado, ausência de identificação ou identificação inadequada são causas de rejeição da amostra (Lewis SM, Bain BJ, 2006). Em coletas com pequeno volume de sangue, a quantidade de EDTA fica excessiva, tornando o meio hipertônico, podendo reduzir o tamanho dos eritrócitos, aumentar a CHCM, degenerar os leucócitos, diminuir o VCM, inchar e desintegrar as plaquetas e aumentar (por impedância) ou diminuir (por método óptico) o volume plaquetário médio (VPM) (Martinho MSC et al, 2012).

Há no Brasil um tubo/seringa com tampa lilás, utilizados em casos de trombocitopenia, mas é recomendado que realize a leitura do exame o mais breve possível para não haver a possibilidade de formação dos agregados (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003).

Considerando a freqüência estimada, a pseudotrombocitopenia representa um problema clínico de grande importância, uma vez que pode resultar em diagnóstico errôneo, solicitação desnecessária de exames laboratoriais e conduta terapêutica totalmente inadequada, incluindo a transfusão de plaquetas e, até mesmo, a esplenectomia. Vale ressaltar que, de modo geral, os indivíduos em que se detecta pseudotrombocitopenia não têm história clínica de sangramento e marcadores auto-imunes. O tempo de sangria está normal e o volume plaquetário médio (VPM) não é alterado, o que confirma que a diminuição das plaquetas encontrada é, inquestionavelmente, induzida *in vitro* (Dusse LMS, et al, 2004).

A natureza fisiopatológica da pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA é, ainda, incerta. No entanto, tem sido proposto que auto-anticorpos presentes no plasma reconhecem e se ligam a um epitopo da glicoproteína IIb (GPIIb), integrante do complexo GPIIb/IIIa da superfície plaquetária, promovendo a aglutinação das plaquetas. Esse epitopo somente é exposto na presença de EDTA. A fisiopatologia da produção de tais anticorpos é desconhecida e a presença desses no plasma é flutuante, podendo alternar períodos em que se detecta ou não uma pseudotrombocitopenia (Dusse LMS, et al, 2004).

Utilizando a técnica de imunofluorescência foi possível identificar várias classes de anticorpos ligados ao epitopo da GPIIb/IIIa, em casos de pseudotrombocitopenia induzida pelo EDTA, como imunoglobulina da classe G (IgG) (subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), imunoglobulina da classe M (IgM) e imunoglobulina da classe A (IgA). Esses anticorpos reagem melhor em temperaturas

inferiores à temperatura ambiente. A ligação anticorpo-GPIIb/IIIa foi detectada na presença de vários sais do EDTA (Na_2EDTA , K_2EDTA , K_3EDTA e MgEDTA) e do etileno glycol bis β -aminoetil éter (K_2EGTA). Plaquetas de indivíduos portadores da trombastenia de Glanzmann não reagem com esses anticorpos. A trombastenia de Glanzmann é uma doença hemorrágica hereditária, associada a mutações dos genes responsáveis pela síntese da GPIIb e GPIIIa, o que leva a um comprometimento da agregação plaquetária. Tal observação confirma o envolvimento da GPIIb/IIIa na aglutinação induzida pelo EDTA (Dusse LMS, *et al*, 2004).

Para evitar a pseudotrombocitopenia por EDTA, deve-se analisar a amostra para o hemograma imediatamente após a coleta, não dando tempo para formação dos agregados plaquetários (Santos PCJL *et al*, 2013).

O satelitismo plaquetário foi observado em monócitos basófilos, linfócitos e neutrófilos. Para tentar liberar as plaquetas agregadas, pode-se aquecer a amostra a 37°C , por dez minutos, homogeneizá-la por um minuto e realizar novamente a contagem de plaquetas e o esfregaço (Santos PCJL *et al*, 2013). O uso de *vórtex*, por três minutos, em amostras com pseudotrombocitopenia pode desagregar as plaquetas em 43,6% dos casos. Se mesmo assim o problema não for solucionado, solicitar a coleta de nova amostra em tubo contendo citrato de sódio 3,2% e, a partir dessa amostra, aquecida a 37°C , preparar e corar um novo esfregaço para verificar se a agregação ainda continua e verificar a contagem de plaquetas no analisador hematológico. Se o esfregaço com citrato liberar as plaquetas, pode-se corrigir a contagem e estimar o valor em EDTA, multiplicando essa contagem por um fator de correção de 1,2 (decorrente o volume de 0,5 mL de citrato a 3,2% (1/9) existente no tubo tampa azul que dilui a amostra) (Martinho MSC *et al*, 2012).

A coleta de sangue venoso com heparina ou fluoreto de sódio pode também ser realizado para testar a desagregação plaquetária. Nos casos de intensa trombocitose (DMP) pelo excesso de plaquetas na lâmina, pode ocorrer a falsa impressão de que as plaquetas estão agregadas (Failace RR, Fernandes FB, 2009).

Diversos pesquisadores afirmam que o fenômeno da aglutinação *in vitro* das plaquetas ocorre somente na presença de EDTA. Assim, amostras obtidas em citrato de sódio, heparina ou oxalato de sódio forneceriam a contagem correta. No entanto,

há quem afirme que esses anticoagulantes também são responsáveis por induzir aglutinação, e a contagem correta somente poderia ser estimada utilizando-se amostras sem anticoagulantes (Dusse LMS, *et al*, 2003).

3. Resultados

O padrão-ouro para a conferência da pseudotrombocitopenia e satelitismo plaquetário é a distensão sanguínea corado. É preciso constatar a presença de agregados plaquetários isolados e agrupados nas diversas regiões da lâmina (Failace RR, Fernandes FB, Failace, 2009).

As pseudotrombocitopenias representam aproximadamente 49% de trombocitopenia em amostras analisadas em analisadores de hematologia. Destes, 72% deve-se a diâmina ácido tetra-acético agregação de etileno (EDTA), que é recomendado pelo Conselho Internacional para Padronização em Hematologia (ICSH) anticoagulante para a realização de hematologia (Garcia Suarez J, et al, 1991).

Segundo Puyo CA (2001) a plaquetopenia é a causa mais comum de sangramento anormal e costuma ser o resultado de quatro fatores, que podem atuar em conjunto ou isoladamente: plaquetopenia, déficit na produção de plaqueta, destruição aumentada e distribuição anormal. E para Morales M et al, (2001) a pseudotrombocitopenia é prevalente em mulheres, possuindo 65 % dos casos.

A adição de algumas substâncias ao anticoagulante tem sido utilizada como artifício para prevenir a aglutinação das plaquetas. Dessa forma, foi relatado que a suplementação do EDTA com kanamicina evitou a aglutinação plaquetária. A combinação de citrato de sódio e paraformaldeído também serviu como forma de prevenção (Dusse LMS, et al, 2003).

O uso de aminoglicosídeos (canamicina) previamente à coleta da amostra no tubo com EDTA impede a alteração da contagem de plaquetas. No contexto anestésico é de pouca utilidade manter tubos prontos com canamicina, sendo que o indicado seria enviar para análise amostras com citrato quando se suspeita de pseudotrombocitopenia (Goodnough LT, 2003).

A pseudotrombocitopenia acontece em presença de outros coagulantes também como a heparina e o citrato, porém foi observado que se a leitura do exame acontece rapidamente em coleta realizada em tubo de EDTA, as chances de acontecerem falsos resultados são mínimos (Santos PCJL et al, 2013).

A rápida identificação de pacientes com pseudoplaquetopenia reverte-se em diminuição dos riscos de transmissão de doenças infectocontagiosas, por evitar a transfusão desnecessária de unidades de plaquetas, além de evitar medicalização desnecessária; além disso o resultado dos exames devem ser guiados a terapêutica do paciente, pois todos os exames têm uma margem de erros (Goodnough LT, 2003).

4. Conclusão

O conhecimento dos dados clínicos do paciente é de grande importância para se evitar a liberação de resultados incorretos. Quando há suspeita de pseudotrombocitopenia, o diagnóstico pode ser confirmado fazendo-se a contagem de plaquetas, imediatamente após a coleta do sangue em EDTA, e repetindo-se após uma ou quatro horas, quando é verificada uma queda gradual dos resultados obtidos.

Com tudo, as maneiras adequadas de armazenamento, transporte, coletas, temperaturas, não suspensão de medicamentos, alterações brusca na dieta, uso de anticoagulantes e técnicas e processamento adequado das amostras são fatores influenciáveis e modificáveis e que podem facilmente através de orientações e capacitações dos profissionais serem realizados de formas adequadas, reduzindo as chances de erro no resultado dos hemogramas.

Referências

1. Berkman N, Michaeli Y, ou R, Eldor A: dependentes de EDTA pseudotrombocitopenia: um estudo clínico de 18 pacientes e revisão da literatura. Am J Hema. 1991; 36:195-201.
2. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG, Pseudotrombocitopenia. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. Vol 40, n5, Rio de Janeiro, Oct 2004.
3. Failace RR, Fernandes FB, Failace R. Hemograma. Manual de interpretação. 5º ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
4. Garcia Suarez J, Merino JL, Rodríguez M, Velazco A, Moreno MC: pseudotrombocitopenia: incidência, causas e métodos de detecção. Sangue. Junho de 1991; 36 (3) :197-200
5. Goodnough LT — Risks of blood transfusion. Crit Care Med, 2003;31:S678-S86
6. Gowland E, et al , 1969, apud Morales M , A Moreno , M Mejia e Y Bustamante . Pseudotrombocitopenia EDTA-dependente: Papel da clínica e detecção laboratorial correta contagem de plaquetas. Revista da Faculdade de Medicina v.24 n.1 Caracas mar. 2001.
7. Lewis SM, Bain BJ. Hematologia prática. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
8. Martinho MSC et al. Hematologia em laboratório clínico. São Paulo: Sarvier, 2012(9).
9. Meira C, Oliveira D. Qualidade em laboratório clínico. São Paulo: Sarvier, 2012.
10. Morales M, A Moreno, M Mejia e Y Bustamante. Pseudotrombocitopenia EDTA-dependente: Papel da clínica e detecção laboratorial correta contagem de plaquetas. Revista da Faculdade de Medicina v.24 n.1 Caracas mar. 2001.
11. Puyo CA — Thrombocytopenia. Int Anesthesiol Clin, 2001; 39: 17-34.
12. Santos PCJL et al. Hematologia: Métodos e interpretação. São Paulo: Roca, 2013.
13. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Gestão da Fase Pré-Analítica. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro (Brasil); 2010.

14. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. 2. Ed. Barueri: Manole, 2010.
15. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Gestão da Fase Pré-Analítica. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro (Brasil); 2010. (11)