



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



**Instituto Politécnico
de Coimbra**

**CONTAGEM AUTOMÁTICA DE PLAQUETAS: AÇÃO DE UM
AMINOGLICOSÍDEO NA PSEUDOTROMBOCITOPENIA INDUZIDA
PELO ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO TRIPOTÁSSICO**

PATRÍCIA ALEXANDRA DA SILVA FERREIRA

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Instituto Politécnico
de Coimbra

CONTAGEM AUTOMÁTICA DE PLAQUETAS: AÇÃO DE UM AMINOGLICOSÍDEO NA PSEUDOTROMBOCITOPENIA INDUZIDA PELO ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRACÉTICO TRIPOTÁSSICO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Letícia Ribeiro, Professora Adjunta Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e co-orientação do Mestre Rogério Filipe de Cerqueira Barreira, Professor Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Maria Letícia Ribeiro por me ter permitido realizar este trabalho no Serviço de Hematologia do Hospital Geral, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, bem como por toda a disponibilidade, empenho, esforço e dedicação na correção desta tese de dissertação.

Agradeço ao Mestre Rogério Cerqueira Barreira pela orientação dada, pela revisão, e por todo o apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Ana Teresa Simões por se ter demonstrado sempre disponível, bem como por todos os comentários e sugestões dadas na revisão do trabalho.

Agradeço à Nádía Osório pela sua disponibilidade, sugestões, revisão do trabalho e pelo enorme apoio e compreensão. Agradeço ainda toda a Amizade demonstrada durante este percurso.

Agradeço aos meus pais e restante família pela motivação, apoio e compreensão incondicional durante todo o percurso.

Júri

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública António José dos Santos
Gabriel

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutora Maria do Céu Rodrigues Monteiro

Professora da Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário

Doutora Maria Letícia Ribeiro

Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Mestre Rogério Filipe de Cerqueira Barreira

Professor Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Resumo

Introdução: A pseudotrombocitopenia dependente de EDTA (EDTA-PTCP) consiste numa falsa diminuição na contagem de plaquetas (PLT), em amostras de sangue colhidas em EDTA, devido a aglutinação plaquetar. Estudos publicados referem que a aglutinação plaquetar na presença de EDTA se pode evitar e dissociar com a adição de um aminoglicosídeo.

Objetivos: 1) avaliar a eficácia do aminoglicosídeo gentamicina (Gent) na dissociação de aglutinados plaquetares em amostras de sangue total colhidas em EDTA; 2) verificar se existem alterações nos outros parâmetros hematológicos e na morfologia do sangue periférico, após adição de Gent; 3) detetar o envolvimento das frações GPIIb ou GPIIIa do complexo GPIIb/IIIa no mecanismo de formação dos aglutinados plaquetares induzidos pelo EDTA.

Material e Métodos: 145 amostras de sangue periférico em EDTA-K₃ e com trombocitopenia, processadas no CELL-DYN Sapphire™. De acordo com padrão gráfico característico em Mono-Poly I, amostras reprocessadas após adição de 20 µL de Gent, com a mesma metodologia. Esfregaços de sangue periférico (ESP) corados por May-Grünwald-Giemsa. 13 amostras processadas com contagem imunológica de PLT (CD61), antes e após Gent. Comparação dos valores dos diferentes parâmetros antes e após adição de Gent: Teste *t-student* emparelhado, significado estatístico: $p < 0,05$.

Resultados: 138 amostras com diferença estatisticamente significativa na contagem de PLT antes e após Gent, com desaparecimento do padrão inicial em Mono-Poly I: 97 EDTA-PTCP ($p < 0,0001$) e 41 trombocitopenias reais ($p < 0,0001$). Sete amostras sem aumento na contagem de PLT ($p = 0,15$) com Gent, nem alteração em Mono-Poly I, sugerindo presença de microcoágulos, confirmados em ESP. Principais parâmetros hematológicos sem diferenças significativas ($p > 0,05$), após adição de Gent, com exceção do VPM ($p < 0,0001$) e Ptc ($p < 0,0001$). Morfologia do sangue periférico sem alterações. As treze amostras processadas com CD61 antes de Gent tinham um número de PLT superior ao obtido na contagem ótica antes de Gent.

Conclusões: A adição de Gent às amostras em EDTA induz uma rápida dissociação dos aglutinados, sem causar alterações morfológicas nem dos principais parâmetros hematológicos. Apenas a GPIIb parece estar envolvida no mecanismo de formação dos aglutinados plaquetares. O uso de Gent revelou-se muito útil, rápido e com baixo custo nas EDTA-PTCP, permitindo rentabilizar a tecnologia existente, com grande benefício para o doente.

Palavras-chave

EDTA-PTCP, aglutinados plaquetares, plaquetas, Mono-Poly I, aminoglicosídeo, CD61

Abstract

Introduction: EDTA-induced pseudothrombocytopenia (EDTA-PTCP) is a spuriously low platelet count, in blood samples anticoagulated with EDTA, caused by platelet agglutination. It was reported that platelet agglutination in the presence of EDTA can be prevented and dissociated by the addition of an aminoglycoside.

Objectives: 1) to evaluate the effect of the aminoglycoside gentamicin (Gent) in dissociation of platelet agglutinates in blood samples, anticoagulated with EDTA; 2) verify if there are any changes in the other hematological parameters, as well as in peripheral blood morphology, after addition of Gent; 3) to detect the involvement of GPIIb or GPIIIa fractions of GPIIb/IIIa complex in the mechanism of platelet agglutinates formation.

Material and Methods: 145 peripheral blood samples in EDTA-K₃ and with thrombocytopenia, processed in CELL-DYN Sapphire™. Accordingly to a typical graphic pattern in Mono-Poly I, samples reprocessed, with the same methodology after addition of 20 µL of Gent. Peripheral blood smears (ESP) stained by May-Grünwald-Giemsa. 13 samples processed with immunologic platelet count (CD61), before and after addition of Gent. Comparasion of the different parameters values before and after addition of Gent: Student paired *t* test, statistically significant: $p < 0,05$.

Results: 138 samples with statistically significant difference in platelet count before and after Gent, with disappearance of the initial pattern on Mono-Poly I: 97 EDTA-PTCP ($p < 0,0001$) and 41 real thrombocytopenias ($p < 0,0001$). Seven samples without increase in platelet count ($p = 0,15$) with Gent, neither change in Mono-Poly I, suggesting the presence of platelet clumps, confirmed in ESP. Principals hematological parameters without significant differences ($p = 0,2096$), after addition of Gent, except VPM ($p < 0,0001$) and Ptc ($p < 0,0001$). No changes in peripheral blood morphology. The thirteen samples processed with CD61 before Gent had a superior platelet number obtained in the optical count before Gent.

Conclusions: The addition of Gent to the blood samples anticoagulated with EDTA induces a fast dissociation of agglutinates, without causing morphologic changes or in the principals hematological parameters. Only GPIIb appears to be involved in the mechanism of platelet agglutinates formation. The use of Gent proved to be very useful, fast and with low cost in EDTA-PTCP, allowing an optimized use of the existing technology, with great benefit for the patient.

Keywords

EDTA-PTCP, platelet agglutinated, platelets, Mono-Poly I, aminoglicosyde, CD61

ÍNDICE

| | |
|--|------------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | III |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | IV |
| LISTA DE ABREVIATURAS | V |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Plaqueta..... | 1 |
| 1.1.1. Estrutura plaquetar | 1 |
| 1.1.2. Função Plaquetar | 3 |
| 1.1.3. Produção de plaquetas | 3 |
| 1.2. Trombocitopenia..... | 5 |
| 1.3. Pseudotrombocitopenia | 6 |
| 1.3.1. Pseudotrombocitopenia dependente de EDTA | 6 |
| 1.3.1.1. Incidência | 8 |
| 1.3.1.2. Diagnóstico e avaliação do número real de plaquetas | 9 |
| 1.3.1.2.1. Aminoglicosídeo | 10 |
| 1.4. CELL-DYN Sapphire™ | 11 |
| 1.4.1. Impedância elétrica..... | 12 |
| 1.4.2. Citometria de Fluxo..... | 13 |
| 1.4.2.1. Dispersão ótica..... | 13 |
| 1.4.2.2. Contagem de plaquetas pelo método imunológico (CD61) | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 17 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 3.1. População em estudo | 18 |
| 3.2. Seleção de amostras | 18 |
| 3.3. Efeito da adição de Gentamicina na contagem de células sanguíneas (Hemograma)..... | 19 |
| 3.4. Efeito da adição de Gentamicina na morfologia das células do sangue periférico | 19 |
| 3.5. Contagem de plaquetas pelo método imunológico..... | 20 |
| 3.6. Controle de Qualidade..... | 20 |
| 3.7. Organização de dados..... | 20 |
| 3.8. Análise Estatística | 20 |
| 4. RESULTADOS | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Efeito da adição de Gentamicina na contagem de células sanguíneas (Hemograma)..... | 21 |
| 4.2. Efeito da adição de Gentamicina na morfologia das células do sangue periférico..... | 25 |
| 4.3. Contagem de plaquetas pelo método imunológico | 26 |
| 5. DISCUSSÃO | 28 |
| 6. CONCLUSÃO | 31 |
| 7. BIBLIOGRAFIA | 32 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Imagem microscópica de um esfregaço de sangue periférico evidenciando as plaquetas..... | 1 |
| Figura 2 - Diagrama esquemático da estrutura da plaqueta..... | 2 |
| Figura 3 - Visão geral dos eventos ocorridos durante a produção de plaquetas, desde o megacariócito (A) até à libertação de plaquetas (B)..... | 4 |
| Figura 4 - Imagem microscópica de um esfregaço de sangue periférico evidenciando satelitismo plaquetar..... | 8 |
| Figura 5 - Estrutura química do aminoglicosídeo-aminociclitol gentamicina..... | 11 |
| Figura 6 - Esquema representativo da metodologia de impedância elétrica..... | 12 |
| Figura 7 - Representação gráfica da contagem de plaquetas por impedância elétrica.... | 13 |
| Figura 8 - Esquema representativo da metodologia ótica..... | 14 |
| Figura 9 - Representação gráfica da contagem de plaquetas por metodologia ótica..... | 15 |
| Figura 10 - Representação gráfica da contagem de plaquetas pelo método imunológico..... | 16 |
| Figura 11 - Padrão obtido no gráfico Mono-Poly I..... | 18 |
| Figura 12 - Padrão do gráfico Mono Poly I das amostras controlo..... | 19 |
| Figura 13 - Padrão do gráfico Mono Poly após a adição de Gentamicina às amostras com EDTA-PTCP..... | 21 |
| Figura 14 - Imagem microscópica de um ESP antes (a) e após (b) a adição de Gent..... | 25 |
| Figura 15 - Comparação entre a contagem de plaquetas por CD61 e por ótica nas amostras de sangue total antes e após a adição de Gent..... | 26 |
| Figura 16 - Comparação entre a contagem de plaquetas por CD61 e por ótica nas amostras amostras controlo..... | 27 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Causas de trombocitopenia..... | 5 |
| Tabela 2 - Classificação dos aminoglicosídeos-aminociclitóis..... | 11 |
| Tabela 3 - Número de PLT obtido nas amostras e nos controlos, antes e após a adição de Gent, e respetivo significado estatístico..... | 22 |
| Tabela 4 - Análise estatística dos resultados obtidos nos diferentes parâmetros hematológicos, antes e após a adição de Gent..... | 23 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| ADP | Adenosina difosfato |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| CBC | <i>Cell Blood Count</i> |
| CHGM | Concentração de Hemoglobina Globular Média |
| CID | Coagulação Intravascular Disseminada |
| DP | Desvio Padrão |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| EDTA-K3 | Ácido etilenodiaminotetracético tripotássico |
| EDTA-PTCP | Pseudotrombocitopenia dependente de EDTA |
| ESP | Esfregaços de sangue periférico |
| FV | Factor V |
| Gent | Gentamicina |
| GP | Glicoproteínas |
| gsd | <i>Geometric Standard Difference</i> |
| Hb | Hemoglobina |
| HELLP | <i>Hemolysis Elevated Liver Enzymes Low Platelet Count</i> |
| HGM | Hemoglobina Globular Média |
| Htc | Hematócrito |
| IgA | Imunoglobulina da classe A |
| IgG | Imunoglobulina da classe G |
| IgM | Imunoglobulina da classe M |
| Mono-Poly I | Gráfico Mononucleares-Polimorfonucleares |
| PDW | Platelet Distribution Width |
| PF4 | Factor Plaquetar 4 |
| PLT | Plaquetas |
| PLTo | Contagem de plaquetas por metodologia óptica |
| Ptc | Plaquetócrito |
| PTCP | Pseudotrombocitopenia |
| PTI | Púrpura trombocitopénica Idiopática |
| PTT-SHU | Púrpura Trombocitopénica Trombótica - Síndrome Hemolítico-Urémico |
| RBC | <i>Red Blood Cell</i> |

| | |
|------------|-------------------------------------|
| RDW | <i>Red Blood Distribution Width</i> |
| TG | Trombastenia de Glanzmann |
| VGM | Volume Globular Médio |
| VHA | Vírus da hepatite A |
| VIH | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| VPM | Volume Plaquetar Médio |
| vWF | Factor de von Willebrand |
| WBC | <i>White Blood Cell</i> |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plaqueta

Em 1882, o patologista italiano Giulio Bizzozero reconheceu as plaquetas (PLT) como uma estrutura celular diferente das outras células sanguíneas e o seu envolvimento no mecanismo da coagulação sanguínea *in vivo* (1,2).

As plaquetas são pequenas células discóides e anucleadas, com um diâmetro de 1,5 - 3,5 μm e um volume plaquetar médio de 7 - 11 fL (3-5).

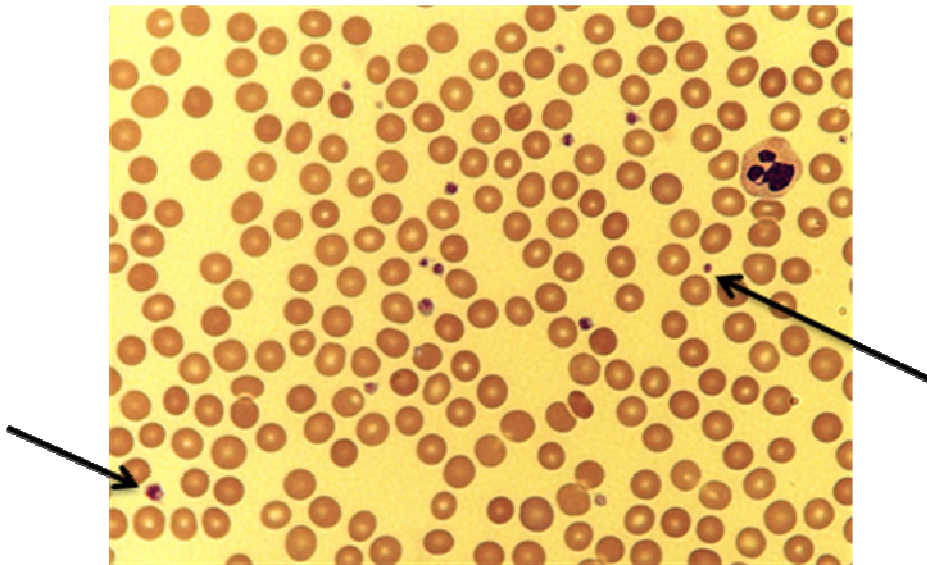


Figura 1 - Imagem microscópica de um esfregaço de sangue periférico evidenciando as plaquetas. O sangue periférico é constituído por plasma e por uma suspensão de células (plaquetas, glóbulos vermelhos e glóbulos brancos). As plaquetas são pequenas células com um diâmetro de 1,5 - 3,5 μm . (May-Grünwald-Giemsa, x500)

1.1.1. Estrutura plaquetar

A estrutura da plaqueta é complexa, sendo constituída por quatro zonas: a zona periférica, a zona sol-gel, a zona dos organelos e o sistema membranar (1,5).

A zona periférica engloba a membrana plasmática e o sistema canalicular aberto (1,6). A membrana plasmática incorpora na sua bicamada lipídica várias glicoproteínas (GP) e lipídios e está envolvida em vários eventos extra e intra plaquetares, tais como permeabilidade, adesão, ativação/secreção e agregação plaquetares (1,5-7). A membrana plasmática plaquetar possui invaginações que compõem o sistema canalicular aberto, o qual aumenta a superfície membranar proporcionando mais locais para a

libertação de grânulos intracelulares e, também funciona como canal de troca de moléculas entre o plasma e a plaqueta (3,5,7).

A zona sol-gel é formada pelo citoesqueleto, o qual pode mudar diretamente a forma da plaqueta, enviar extensões extracelulares, captar e, de seguida, expulsar grânulos secretores (1,4,5).

A zona dos organelos contém três tipos de grânulos plaquetares: os grânulos α , os grânulos densos e os lisossomas (1,3–6). Os grânulos α são os mais numerosos, cerca de 80 por plaqueta, e contêm uma rica diversidade de proteínas e recetores membranares (albumina, fibrinogénio, factor de von Willebrand (vWF), factor V (FV), fibronectina, factor plaquetar 4 (PF4), β -tromboglobulina) que suportam muitos processos na hemostase (3,7). Os grânulos densos são menos numerosos, cerca de 7 por plaqueta, e contêm elevados níveis de pequenas moléculas (adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina, iões de cálcio (Ca^{2+})) que ajudam na ativação plaquetar e medeiam a vasoconstrição (3,6). O papel dos lisossomas é pouco claro, mas há autores que sugerem que as enzimas lisossomais libertadas a partir de plaquetas activadas podem participar na degradação do trombo hemostático (5,6).

O sistema membranar é composto pelo sistema tubular denso, (1) que regula o transporte de cálcio intracelular através da ligação, captação e libertação seletivas dos catiões bivalentes após a ativação plaquetar (5). Este canal é também o local de síntese de prostaglandina nas plaquetas (1,5).

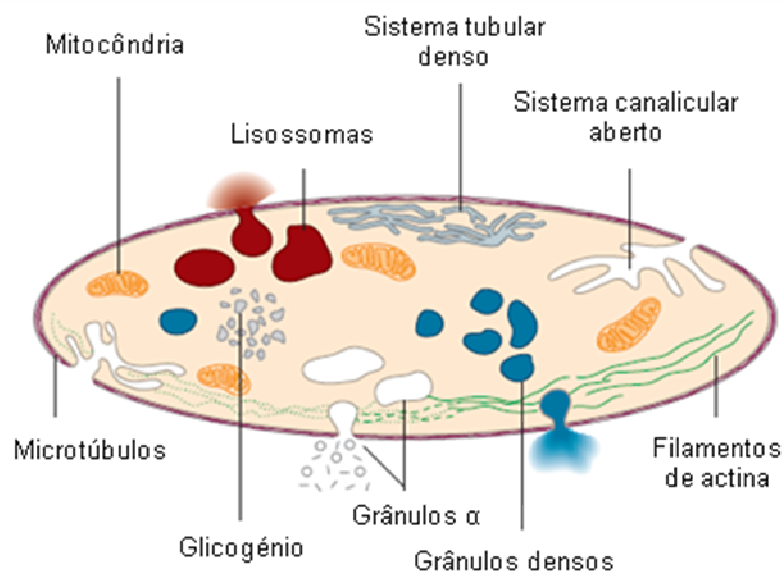


Figura 2 - Diagrama esquemático da estrutura da plaqueta. A plaqueta é estruturalmente composta por: membrana plasmática (sistema canalicular aberto), citoesqueleto (microtúbulos, filamentos de actina), organelos (mitocôndria), três tipos de grânulos (α , densos e lisossomas) e sistema tubular denso. (adaptado de Hoffbrand A, 2005)

1.1.2. Função Plaquetar

As plaquetas desempenham um papel determinante na hemostase e nos processos trombóticos. Perante um dano vascular com exposição da matriz do subendotélio, as plaquetas, que normalmente circulam como células isoladas, deslocam-se até ao local da lesão onde irão promover a rápida formação de coágulo e a consequente oclusão do local lesionado (3,8).

As principais fases da função plaquetar são adesão, ativação com alteração da forma da plaqueta e agregação (4). Logo após a lesão vascular, as plaquetas aderem ao colagénio exposto através da GPIb/IX/V que se liga ao vWF. Esta etapa facilita a interação das plaquetas com o colagénio e o início da fase de ativação. Posteriormente, gera-se trombina, que também é um forte indutor da ativação plaquetar. Uma vez ativadas, as plaquetas tornam-se esféricas e emitem grandes pseudópodes que aumentam a interação entre as plaquetas adjacentes. As plaquetas ativadas libertam para o meio extracelular compostos solúveis como ADP, tromboxano A₂, serotonina, epinefrina, etc, que vão atuar como agonistas de outras plaquetas induzindo o recrutamento e a agregação que leva ao crescimento do trombo. O que medeia a agregação plaquetar é a ligação do fibrinogénio secretado pelos grânulos plaquetares, bem como o fibrinogénio plasmático, ao complexo GPIIb/IIIa.

Os eventos de vasoconstrição, adesão, ativação, secreção e agregação plaquetária são denominados hemostase primária (4,7–9).

1.1.3. Produção de plaquetas

As plaquetas são pequenos fragmentos do citoplasma dos megacariócitos, sendo sintetizadas na medula óssea. O megacariócito é produzido a partir de um processo de diferenciação da célula estaminal hematopoiética (megacariopoiese) e tem como seu precursor o megacarioblasto. Os megacariócitos são uma das maiores células do organismo e caracterizam-se por conterem um grande núcleo. O núcleo do megacariócito sofre um processo designado de endomitose, o qual envolve replicação nuclear sem divisão celular. O megacariócito também sofre uma maturação citoplasmática significativa, com o desenvolvimento de grânulos e organelos. Durante este processo, há formação de uma rede de microtubulos a partir do centrossoma, a qual se irá deslocar para o córtex da célula. Consequentemente, começa a formação de proplaquetas (precursores das plaquetas) com o desenvolvimento de pseudópodes citoplasmáticos

que se vão ramificando com o passar do tempo. Todo o citoplasma do megacariócito é convertido numa massa de proplaquetas. As proplaquetas são, então, libertadas a partir da célula. Por fim, ocorre a libertação das plaquetas das extremidades das proplaquetas. Este processo de fragmentação do citoplasma do megacariócito é conhecido por trombopoiese. Cada megacariócito gera cerca de 2000-3000 plaquetas (Figura 3).

A trombopoietina é o principal regulador da megacariopoiese e da trombopoiese. Esta hormona é maioritariamente produzida no rim, mas também no fígado e no baço. As plaquetas, os megacariócitos e os seus precursores têm recetores de trombopoietina (c-Mpl) na sua superfície (1,3,7,10–14).

Não há reserva de plaquetas na medula óssea: 80% das plaquetas encontram-se em circulação e as restantes 20% encontram-se no baço (1). Na circulação humana, as plaquetas têm uma semi-vida de 7-10 dias (1,2,7) e a sua contagem normal varia entre $150 - 400 \times 10^9/L$ (3,4).

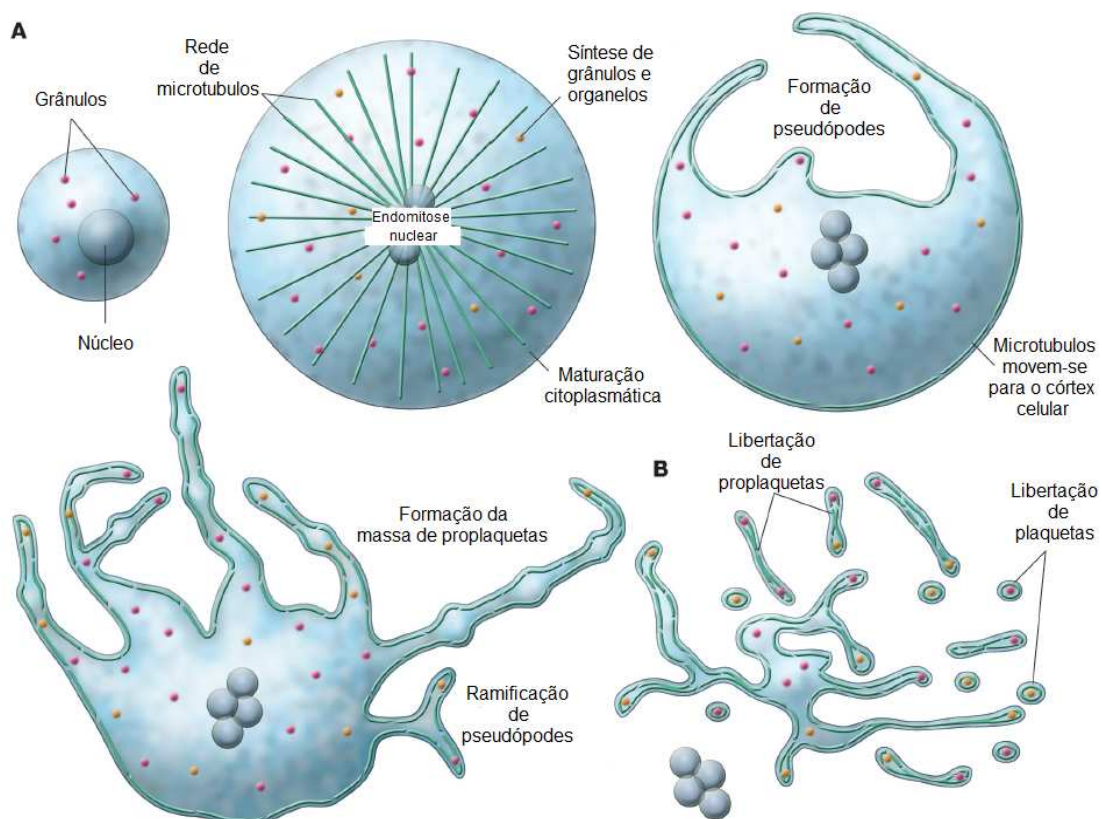


Figura 3 - Visão geral dos eventos ocorridos durante a produção de plaquetas, desde o megacariócito (A) até à libertação de plaquetas (B). Inicialmente, o megacariócito sofre endomitose nuclear, síntese de organelos, maturação e expansão citoplasmática. De seguida, ocorre o desenvolvimento de pseudópodes acompanhado da formação de uma massa de proplaquetas. Por fim, sucede-se a libertação de plaquetas. (adaptado de Patel *et al*, 2005)

1.2. Trombocitopenia

Quando o número de plaquetas no sangue periférico é inferior a $150 \times 10^9/L$ existe trombocitopenia, (4,10) sendo uma das mais frequentes causas de hemorragia (1,3,5,10).

A trombocitopenia pode ser o resultado de quatro processos: baixa produção de plaquetas na medula óssea, elevada destruição plaquetar, distribuição anormal das plaquetas no organismo e artefactos que causam uma falsa trombocitopenia (pseudotrombocitopenia) (5,15,16).

Tabela 1 - Causas de trombocitopenia.

| |
|--|
| <p>Baixa produção plaquetar</p> <p>Infecções: VIH, hepatite C, parvovírus, varicela, rubéola, malária</p> <p>Terapia mielossupressora: quimioterapia, radioterapia</p> <p>Défice de vitamina B12 e/ou ácido fólico</p> <p>Álcool</p> <p>Aplasia medular</p> |
| <p>Elevada destruição plaquetar</p> <p>Drogas: heparina, ácido valpróico, quinina</p> <p>PTI</p> <p>PTT-SHU</p> <p>HELLP</p> <p>CID</p> |
| <p>Distribuição plaquetar anormal</p> <p>Hiperesplenismo</p> |
| <p>Pseudotrombocitopenia</p> <p>Presença de microcoágulos, aglutinação plaquetar ou satelitismo plaquetar induzidos pelo EDTA, plaquetas gigantes</p> |

VIH: Vírus da Imunodeficiência Humana; **PTI:** Púrpura Trombocitopénica Idiopática; **PTT-SHU:** Púrpura Trombocitopénica Trombótica - Síndrome Hemolítico-Urémico; **HELLP:** *Hemolysis Elevated Liver Enzymes Low Platelet Count*; **CID:** Coagulação Intravascular Disseminada.

1.3. Pseudotrombocitopenia

A pseudotrombocitopenia (PTCP) consiste numa falsa diminuição na contagem de plaquetas por analisadores hematológicos automatizados, em amostras de sangue colhidas em ácido etilendiaminotetracético (EDTA) ou outros anticoagulantes (5).

Em 2000, Cohen *et al* fizeram um estudo em que avaliaram 60 casos consecutivos de trombocitopenias na hematologia clínica, obtidos ao longo de dois anos, a partir do qual concluíram que a PTCP era a segunda maior causa de trombocitopenias, tendo uma incidência de 17% (17).

1.3.1. Pseudotrombocitopenia dependente de EDTA

O EDTA é um anticoagulante usado na colheita de amostras de sangue para a realização de hemograma, uma vez que preserva a morfologia das células sanguíneas e previne a agregação plaquetar (18–20). No entanto, este composto orgânico está associado com um fenômeno *in vitro* designado de pseudotrombocitopenia dependente de EDTA (EDTA-PTCP), que se caracteriza por uma falsa redução na contagem do número de plaquetas em analisadores automáticos (21–24).

A PTCP deve-se mais frequentemente à presença de microcoágulos, como consequência de uma colheita difícil ou má homogeneização do sangue com o anticoagulante (4). Contudo, também pode ser consequência de aglutinação plaquetar (21–24) ou, mais raramente, de satelitismo plaquetar induzidos pelo EDTA (25,26).

Em 1969, Gowland *et al* descreveram pela primeira vez a presença de um anticorpo antiplaquetar no plasma de doentes com sarcoma histiocítico, o qual apenas reagia com as plaquetas, provocando aglutinação plaquetar, na presença de EDTA (21). O termo pseudotrombocitopenia apenas foi usado para descrever este fenômeno, em 1973, por Schreiner e Bell (22).

Segundo vários autores foram identificadas várias classes de anticorpos antiplaquetares, tais como a imunoglobulina de classe G (IgG), de classe M (IgM) (23) e de classe A (IgA) (27,28). Estas aglutininas podem atuar isoladamente ou combinadas entre si (IgG e IgM ou IgG e IgA). A maioria dos casos de EDTA-PTCP são causados por IgG.

Muitos dos anticorpos reagem preferencialmente à temperatura ambiente ou a temperaturas baixas, no entanto alguns deles são independentes da temperatura ou reagem melhor a 37°C (27,29). A fisiopatologia da produção de tais anticorpos é, ainda,

desconhecida (30). No entanto, Bizzaro *et al* mencionaram que os anticorpos antiplaquetares estavam associados a anticorpos anti-cardiolipina na maioria dos seus doentes com EDTA-PTCP. O que lhes permitiu colocar a hipótese de que as subpopulações de anticorpos (autoanticorpos que ocorrem naturalmente) direcionados contra fosfolípidos carregados negativamente poderiam ligar antígenos da membrana da plaqueta modificados na presença de EDTA, e talvez serem os responsáveis pela origem da PTCP (31).

A presença destes autoanticorpos no plasma não é constante, assim sendo, é possível que a EDTA-PTCP seja detetável nuns períodos e noutros não (30).

Em 1982, Pegels *et al* observaram que os anticorpos dependentes de EDTA tinham a capacidade de reagir com as plaquetas de indivíduos saudáveis, independentemente do grupo sanguíneo, mas não tinham a mesma capacidade quando em contacto com plaquetas de doentes com Trombastenia de Glanzmann (TG) (24). A TG é um síndrome hemorrágico autossómico recessivo raro e deve-se a uma anomalia quantitativa e/ou qualitativa da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (também conhecida como GPIIb/IIIa), o que causa defeitos a nível da agregação plaquetar (3,6,32,33). Perante estes dados, Pegels *et al* sugeriram que a GPIIb/IIIa poderia estar envolvida na aglutinação plaquetar dependente de EDTA (24).

Esta hipótese veio contrariar a sugestão exposta por Onder *et al*, de que os anticorpos antiplaquetares reagem contra o próprio anticoagulante (23).

A GPIIb/IIIa é um membro da família das integrinas, sendo específica das plaquetas e da sua célula precursora, o megacariócito. Esta GP é das mais abundantes no nosso organismo. Estruturalmente, a GPIIb/IIIa é um heterodímero das GPIIb e IIIa, as quais estão associadas entre si por uma ligação não covalente. As integrinas αIIb e β3 são formadas por um grande domínio extracelular e um domínio citoplasmático muito pequeno. Estas características estruturais permitem que o recetor participe na transmissão bidirecional dos sinais entre ambas as faces da membrana (5,8).

A GPIIb/IIIa tem um papel crucial na hemostase, sendo dependente da presença de Ca^{2+} . Quando as plaquetas estão ativadas, esta glicoproteína sofre alterações conformacionais e torna-se um recetor com alta afinidade para o fibrinogénio, bem como para o vWF, o que irá conduzir à agregação plaquetar (6,8,27).

Casonato *et al* descreveram que a aglutinação plaquetar, ao contrário da clássica agregação plaquetar, não parece necessitar de fibrinogénio solúvel para se ligar à GPIIb/IIIa, e assim desenvolver a EDTA-PCTP (27).

Alguns investigadores conseguiram também identificar um anticorpo frio (IgM) que reconhecia e reagia diretamente contra um epítopo localizado na fração GPIIb causando EDTA-PTCP (20,27,29,34).

Alguns autores colocam a hipótese de que a quelação de Ca^{2+} pelo EDTA talvez cause modificações na GPIIb/IIIa ou exposição de um epítopo (criptoantigénio) localizado nesse complexo proteico. Contudo, a patofisiologia da EDTA-PTCP permanece pouco clara (19,35).

O satelitismo plaquetar é um fenómeno raro em que as plaquetas aderem na superfície dos neutrófilos, e ocasionalmente de outras células. O número de plaquetas envolvidas neste processo é variável. O mecanismo que desencadeia o satelitismo plaquetar ainda não está completamente esclarecido. Nos últimos anos, tem sido especulado que os autoanticorpos antiplaquetares reagem contra um criptoantigénio comum ao complexo GPIIb/IIIa das plaquetas e ao receptor FcγIII (CD16) dos neutrófilos, na presença do EDTA (25,26,30,35,36).

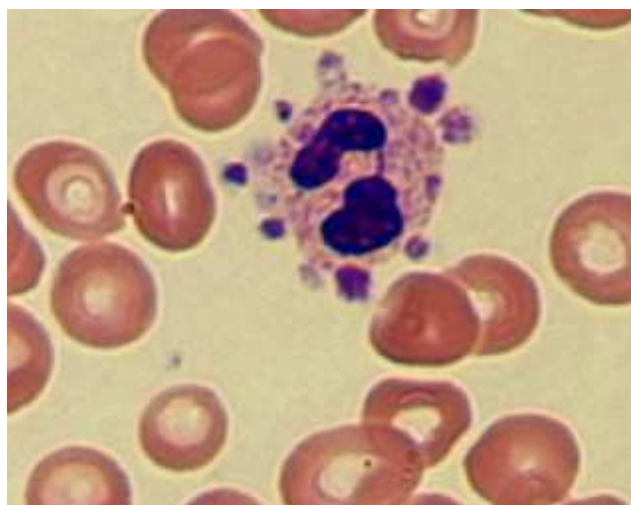


Figura 4 - Imagem microscópica de um esfregaço de sangue periférico evidenciando satelitismo plaquetar. As plaquetas encontram-se aderidas à superfície dos neutrófilos, causando uma falsa diminuição na contagem automática de plaquetas. (May-Grünwald-Giemsa, x500)

1.3.1.1. Incidência

A EDTA-PTCP pode ocorrer em indivíduos saudáveis e em doentes com um grupo heterogéneo de patologias (18,19,23,29,37). Embora, alguns autores coloquem a hipótese de haver uma relação possível com doenças autoimunes, neoplásicas,

cardiovasculares, doenças crônicas do fígado, bem como infecções virais ou sépsis (38,39).

Recentemente, Choe et al investigaram a existência de uma forte associação entre a EDTA-PTCP e as infecções virais, nomeadamente do vírus da hepatite A (VHA). Tendo concluído que os anticorpos responsáveis por desencadear a EDTA-PTCP seriam os anticorpos anti-VHA (IgM) presentes na fase aguda da infecção. Este facto reforçaria a teoria, já anteriormente descrita, de que os anticorpos antiplaquetares não têm uma presença constante no plasma dos doentes. Contudo, estes autores consideraram que aquele estudo não seria suficiente para estabelecer uma relação causal entre a EDTA-PTCP e as infecções virais (40).

Até à data não se verificou nenhuma correlação com a idade ou sexo dos doentes (39,41).

Segundo os estudos, a incidência da EDTA-PTCP varia entre os 0.07 a 0.2% na população em geral e, por sua vez, nos doentes hospitalizados varia entre os 0.1 e 0.2% (19,29,35,36).

Tendo em conta a frequência com que se realiza um hemograma, a EDTA-PTCP pode ser encontrada muito facilmente (37).

1.3.1.2. Diagnóstico e avaliação do número real de plaquetas

A EDTA-PTCP representa um problema clínico de extrema importância, uma vez que a falta de reconhecimento desta condição pode resultar em diagnósticos errados, solicitação desnecessária de exames laboratoriais e uma conduta terapêutica inadequada (transusão de plaquetas, execução de medulograma, esplenectomia, cancelamento de cirurgias, entre outras) em doentes com um valor de plaquetas dentro do intervalo de normalidade (19,20,29,30,42,43).

Assim sendo, perante um novo caso de trombocitopenia com ausência de disfunção plaquetar ou diátese hemorrágica (27,30,39,44), a primeira etapa consiste em diferenciar uma verdadeira trombocitopenia de uma pseudotrombocitopenia. Uma avaliação microscópica cuidadosa do esfregaço de sangue periférico é imprescindível para a caracterização da EDTA-PTCP, uma vez que é possível observar grumos de plaquetas (aglutinados plaquetares) (20,30).

Inicialmente, alguns autores descreveram que a colheita de sangue total com outro anticoagulante (citrato de sódio ou heparina) permitia uma contagem de plaquetas mais precisa. No entanto, Ohnuma *et al* viriam a documentar, mais tarde, que o uso de

heparina ou citrato como anticoagulante, por vezes, também causava uma falsa diminuição do número de plaquetas (15). Porém a aglutinação plaquetar dependente de EDTA continua a ser a causa mais frequente de pseudotrombocitopenia (44).

Sakurai *et al* desenvolveram uma técnica para diagnóstico de EDTA-PTCP e avaliação da contagem de plaquetas nestes doentes (19). Essa técnica consistia em adicionar um aminoglicosídeo (canamicina, amicacina, gentamicina, ...) às amostras de doentes com EDTA-PTCP antes ou após a colheita, tendo por objetivo a prevenção ou dissociação dos aglutinados plaquetares (19,42,44).

1.3.1.2.1. Aminoglicosídeo

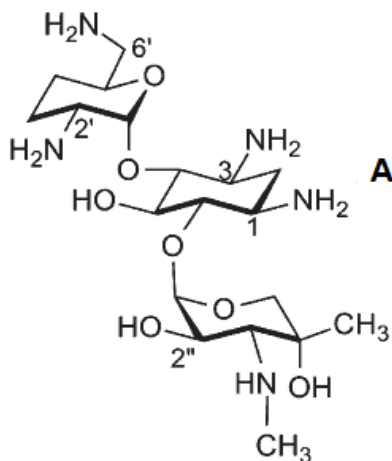
Os aminoglicosídeos formam um grupo de antibióticos muito utilizados no tratamento das sépsis graves provocadas por bacilos gram-negativos (45–47) e cocos gram-positivos (47,48).

Os aminoglicosídeos constituem um grupo bastante heterogéneo quanto à sua composição química, propriedades antibacterianas e propriedades farmacológicas (47).

Quimicamente, os aminoglicosídeos são constituídos por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligações glicosídicas a um álcool cíclico hexagonal com grupos amina (aminociclitol), que habitualmente se encontra numa posição central, daí que a sua designação mais correta seja aminoglicosídeos-aminociclitóis (Figura 5, Tabela 2).

Estes antibióticos podem obter-se por processos naturais, à custa de culturas do *Gén. Streptomyces* (estreptomina, neomicina, canamicina e amicacina) e do *Gén. Micronospora* (gentamicina, sisomicina e netilmicina), sendo alguns deles obtidos por síntese química à custa dos produtos naturais, com a introdução de novos radicais (47).

Os aminoglicosídeos são altamente solúveis em água, estáveis num pH entre 6 a 8 e possuem uma estrutura polar catiónica (47,49). Assim sendo, a sua atividade antimicrobiana é inibida por um pH ácido e por catiões bivalentes (45).



Gentamicina

Figura 5 - Estrutura química do aminoglicosídeo-aminociclitol gentamicina. A 2-deoxiestreptamina (A) é o aminociclitol que constitui o antibiótico gentamicina (disubstituído em 4 e 6-OH). (adaptado de Toth *et al*, 2010)

Tabela 2 - Classificação dos aminoglicosídeos-aminociclítóis.

| Aminociclitol | Classificação | |
|---------------------|--------------------|---|
| Estreptidina | Estreptomina | |
| Estreptamina | Espectinomina | |
| 2-Deoxiestreptamina | Disubstituídos 4,5 | Família Neomicina (Neomicina B, Paromomicina) |
| | Disubstituídos 4,6 | Família Canamicina (Canamicina, Amicacina, Tobramicina) |
| | | Família Gentamicina (Gentamicina, Sisomicina, Netilmicina) |

1.4. CELL-DYN Sapphire™

O CELL-DYN Sapphire™ é um analisador automático multi-paramétrico que tem por base várias metodologias, tais como: espectrofotometria de absorção, impedância elétrica e citometria de fluxo. Este analisador foi projetado para fazer contagem e classificação das células hematológicas.

Na contagem automática das plaquetas as metodologias usadas são a impedância elétrica e a citometria de fluxo (50).

1.4.1. Impedância elétrica

A contagem automática por impedância elétrica consiste na passagem de células previamente diluídas por um pequeno orifício. O diluente utilizado funciona como uma solução eletrolítica através da qual é mantida uma corrente elétrica constante entre dois eletrodos (positivo e negativo).

As células, quando passam pelo orifício, impedem a passagem de corrente. Consequentemente, a voltagem necessária para manter a corrente elétrica constante é maior, o que gera um impulso elétrico. Quando a voltagem regressa à normalidade, significa que acabou de passar uma célula.

O número de células é determinado a partir da contagem dos impulsos elétricos. Por sua vez, o volume de cada célula pode ser determinado pela amplitude do impulso elétrico correspondente (50,51).

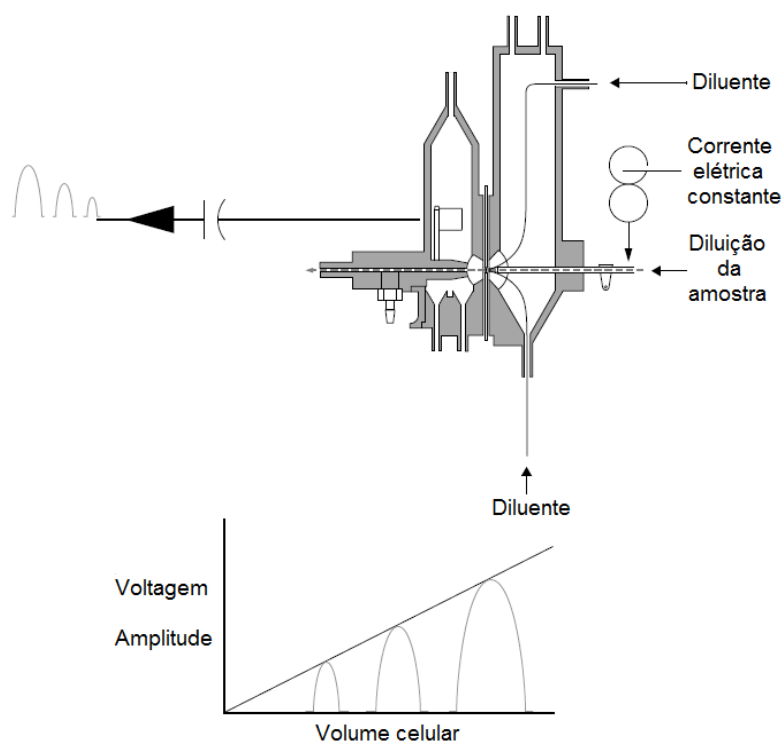


Figura 6 - Esquema representativo da metodologia de impedância elétrica. A amostra previamente diluída encontra-se numa câmara que possui um eletrodo interno negativo, e as células vão migrar para uma câmara adjacente, que contém um eletrodo interno positivo. Ao passarem através de um orifício é gerado um impulso elétrico. O número de impulsos elétricos indica a quantidade de células, a sua amplitude é proporcional ao volume celular. (adaptado de Abbott Diagnostics, 2009)

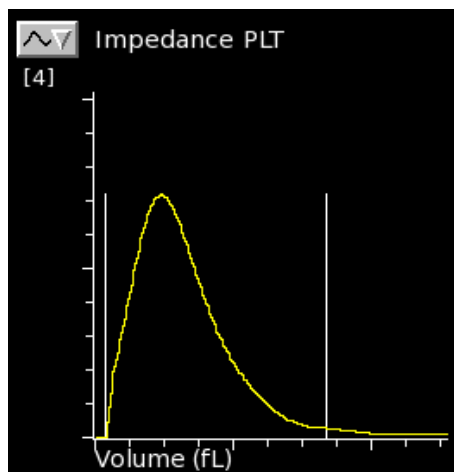


Figura 7 - Representação gráfica da contagem de plaquetas por impedância elétrica. O eixo das ordenadas representa o número de plaquetas e o eixo das abcissas representa o volume (em fL).

1.4.2. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é um processo de contagem e medição das características celulares. As células são levadas por um fluxo de fluido e passam individualmente pelo centro da zona de detecção. Sendo, nesta zona, medidas as características físicas e químicas das células.

O CELL-DYN Sapphire™ usa uma tecnologia da citometria de fluxo para medir os parâmetros hematológicos: a dispersão ótica/fluorescência (50).

A contagem das plaquetas pode ser realizada por dispersão ótica e método imunológico (CD61) (50,51).

1.4.2.1. Dispersão ótica

Nas contagens de células utilizando a metodologia ótica, estas passam individualmente frente a um laser de cor azul e comprimento de onda de 488nm. O laser, ao incidir na célula, é desviado em diferentes ângulos criando, assim, vários feixes luminosos que são captados pelos subsistemas de detecção. De seguida, os vários ângulos são convertidos em sinais elétricos que irão ser analisados pelo computador, o qual avalia as propriedades e características celulares capazes de distinguir as células sanguíneas (50) (Figura 8).

A contagem das plaquetas por ótica baseia-se numa análise bidimensional, ou seja, a análise ótica das plaquetas tem em conta duas das suas características. Estas

características são examinadas com base no uso de dois ângulos de dispersão de luz (7° e 90° *light scatter*), permitindo assim fazer a distinção entre plaquetas e outras células sanguíneas (51) (Figura 9).

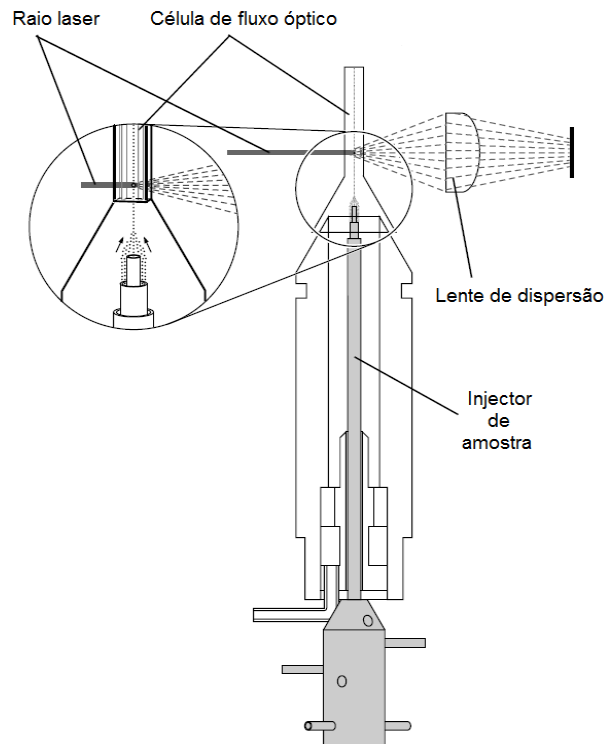


Figura 8 - Esquema representativo da metodologia ótica. As células passam individualmente em frente ao raio laser, por ação de um fluxo constante criado por um diluente. (adaptado de Abbott Diagnostics, 2009)

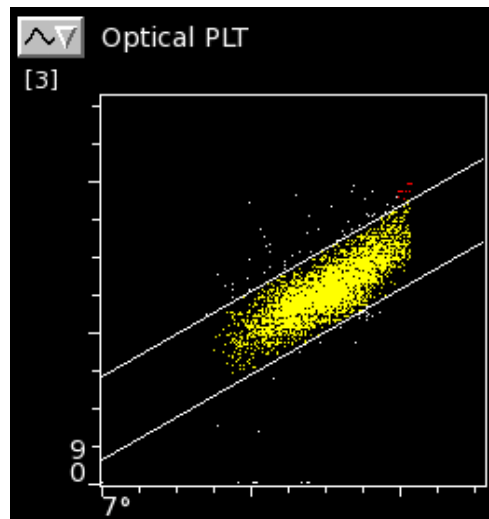


Figura 9 - Representação gráfica da contagem de plaquetas por metodologia ótica. Nesta metodologia há interseção dos ângulos de dispersão 7° (eixo das abcissas) e 90° (eixo das ordenadas), cuja correlação define uma região na qual as plaquetas se devem encontrar, representada por uma espécie de caixa inclinada e entre um limite superior e inferior. A população amarela representa as plaquetas, a população vermelha representa os eritrócitos e os pontos brancos representam “restos celulares”.

1.4.2.2. Contagem de plaquetas pelo método imunológico (CD61)

No método imunológico de contagem automática de plaquetas, estas são previamente marcadas com um anticorpo (CD61).

O anticorpo CD61 é dirigido contra a GPIIIa do complexo GPIIb/IIIa, o qual está presente em todas as plaquetas normais ativas e inativas.

Para realizar esta contagem, a amostra de sangue total é misturada com o anticorpo monoclonal (CD61) conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), de forma automatizada. Assim, as plaquetas marcadas com FITC são excitadas por uma luz laser de 488nm do CELL-DYN Sapphire™. A fluorescência e a dispersão de luz emitidas são medidas por fluorescência FL1 (530nm) e nos ângulos 7° e 90° , respetivamente, obtendo-se um gráfico de dispersão.

A análise imunológica das plaquetas permite uma contagem mais eficaz das plaquetas em doentes trombocitopénicos (50–52).

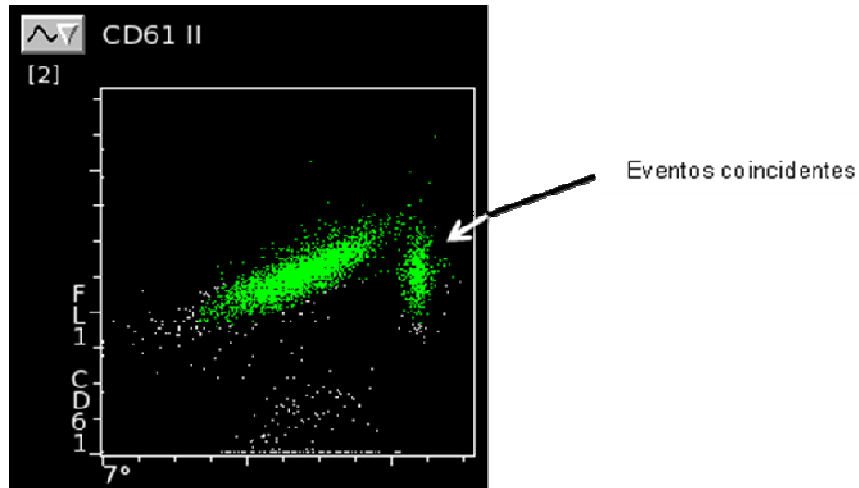


Figura 10 - Representação gráfica da contagem de plaquetas pelo método imunológico. O gráfico CD61 II permite visualizar os eventos que são positivos para o anticorpo monoclonal CD61, os quais correspondem às plaquetas (população verde). Os eventos coincidentes representam a passagem simultânea de plaquetas e RBCs através da célula de fluxo ótico.

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos: 1) avaliar a eficácia do aminoglicosídeo gentamicina (Gent) na dissociação dos aglutinados plaquetares presentes nas amostras de sangue total colhidas em EDTA; 2) verificar a existência de alterações nos outros parâmetros hematológicos e na morfologia do sangue periférico, após adição de Gent; 3) detetar o envolvimento das frações GPIIb ou GPIIIa do complexo GPIIb/IIIa no mecanismo de formação dos aglutinados plaquetares induzidos pelo EDTA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. População em estudo

Entre Setembro de 2011 e Setembro de 2012, foram estudadas anonimamente 145 amostras de sangue periférico, colhidas em ácido etilenodiaminotetracético tripotássico (EDTA-K₃). Das quais 63 eram do sexo feminino e 82 do masculino, com idades compreendidas entre os 26 a 86 anos e os 18 a 93 anos, respetivamente.

60 amostras de sangue periférico, colhidas em EDTA-K₃, foram usadas como controlo na avaliação do efeito da adição de Gent na contagem de células sanguíneas (Hemograma).

3.2. Seleção de amostras

Durante a rotina da Unidade de Hematologia Laboratorial, Serviço de Hematologia do Hospital Geral, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra - EPE, foram selecionadas amostras de sangue periférico com base na contagem de plaquetas inferior a $150 \times 10^9/L$ por metodologia ótica (PLTo) e no padrão do gráfico Mononucleares-Polimorfonucleares (Mono-Poly I) (Figura 11) do analisador automático.

As 60 amostras controlo foram selecionadas mediante dois grupos: 30 amostras com contagem de plaquetas normal ($150 - 400 \times 10^9/L$) e 30 amostras com trombocitopenia ($PLT < 150 \times 10^9/L$). Os dois grupos apresentavam o padrão do gráfico Mono-Poly I representado na Figura 12.

Todas as amostras foram processadas pela metodologia CBC do analisador hematológico CELL-DYN Sapphire™.

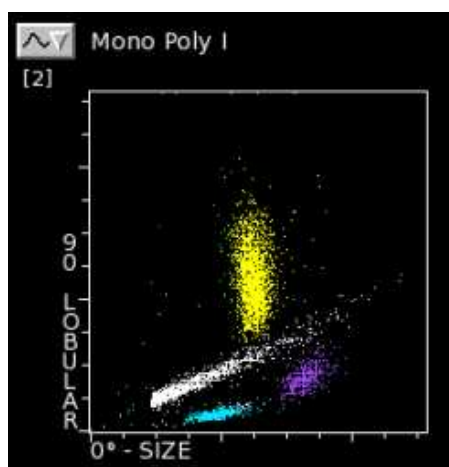


Figura 11 - Padrão obtido no gráfico Mono-Poly I. Representação gráfica da separação dos leucócitos tendo em conta o tamanho (eixo das abcissas) e a lobularidade (eixo das ordenadas). A população azul

representa os linfócitos, a lilás representa os monócitos, a amarela representa os neutrófilos, os pontos verdes representam os eosinófilos e a população branca representa os aglutinados ou agregados plaquetares presentes na amostra de sangue total.

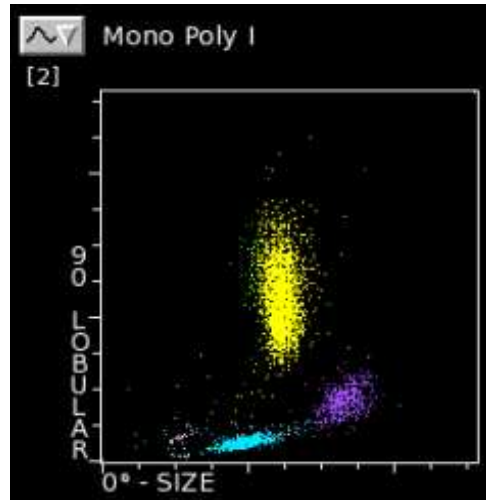


Figura 12 - Padrão do gráfico Mono Poly I das amostras controle. Neste gráfico não se observa a população branca representativa dos aglutinados ou agregados plaquetares presente no padrão do gráfico Mono Poly das amostras em estudo.

3.3. Efeito da adição de Gentamicina na contagem de células sanguíneas (Hemograma)

Às amostras previamente selecionadas foram adicionados 20µL de Gentamicina líquida com 40mg/mL. Estas foram reprocessadas no CELL-DYN Sapphire™ em tubo aberto ("*run open tube*") no modo CBC, após homogeneização manual por inversão do tubo de colheita e durante aproximadamente 10 minutos.

3.4. Efeito da adição de Gentamicina na morfologia das células do sangue periférico

Para posterior avaliação da morfologia das células hematológicas, foram realizados dois esfregaços de sangue periférico (ESP) por amostra, antes e após a adição de Gent. A técnica de coloração utilizada foi May-Grünwald-Giemsa.

3.5. Contagem de plaquetas pelo método imunológico

A contagem de plaquetas foi realizada usando o *kit* CELL-DYN ImmunoPlt (CD61) no analisador CELL-DYN Sapphire™. Apenas 13 das nossas amostras previamente selecionadas foram assim processadas, antes e após a adição de Gent.

Como controlo desta metodologia foram usados 10 dos 30 controlos com uma contagem de plaquetas normal, já previamente selecionados. Estas amostras controlo foram processadas sem adição do aminoglicosídeo.

3.6. Controlo de Qualidade

O analisador CELL-DYN Sapphire™, utilizado durante o presente estudo, foi submetido diariamente a um controlo de qualidade interno para assegurar a precisão dos resultados, bem como a um programa mensal de avaliação externa da qualidade que, por sua vez, assegura a exatidão.

Este analisador também é submetido a uma calibração, recorrendo a microesferas de látex, que nos garante a credibilidade dos padrões obtidos no gráfico Mono-Poly I.

3.7. Organização de dados

Os dados obtidos foram organizados e arquivados, de forma anónima, numa base de dados usando o software Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Office Professional Edition 2007, Microsoft Corporation Copyright© 1985-2007).

3.8. Análise Estatística

Os resultados obtidos nos diferentes parâmetros hematológicos, antes e após a adição de Gent às amostras, foram estatisticamente comparados utilizando o teste *t*-Student emparelhado. Significado estatístico quando $p < 0,05$.

Os valores de mediana, média, desvio padrão, máximo e mínimo foram calculados em todos os parâmetros hematológicos, antes e após a adição de Gent.

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego, California, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da adição de Gentamicina na contagem de células sanguíneas (Hemograma)

O efeito da adição do aminoglicosídeo na PLTo revelou-se estatisticamente significativo em 138 amostras, das quais 97 eram EDTA-PTCP ($t=14,51$; $p<0,0001$) e 41 eram verdadeiras trombocitopenias acompanhadas de EDTA-PTCP ($t=7,3$; $p<0,0001$). Para as mesmas amostras ainda se observou a alteração do padrão inicial do gráfico Mono-Poly I (Figura 13) do CELL-DYN Sapphire™.

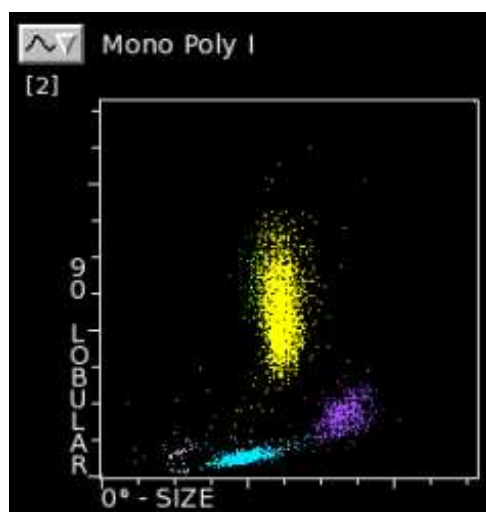


Figura 13 - Padrão do gráfico Mono Poly após a adição de Gentamicina às amostras com EDTA-PTCP. Neste gráfico pode-se observar o desaparecimento da população branca que representava os aglutinados plaquetares presentes na amostra de sangue total.

Em 7 amostras não se observou aumento do número de plaquetas na PLTo ($t=1,666$; $p=0,1468$), nem desaparecimento da população branca do padrão inicial do gráfico Mono-Poly I. (Tabela 3)

Os restantes parâmetros hematológicos analisados no hemograma não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) após a adição de Gent às nossas amostras, com exceção do volume plaquetar médio (VPM) ($t=5,462$; $p<0,0001$) e do plaquetócrito (Ptc) ($t=14,3$; $p<0,0001$). Após a adição de Gent, o valor do VPM teve tendência a diminuir e o valor de Ptc a aumentar (Tabela 4).

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no número de plaquetas por PLTo nas 30 amostras controlo com uma contagem dentro do intervalo de normalidade ($t=0,2111$; $p=0,8343$) nem nas 30 amostras controlo com trombocitopenia ($t=0,6436$; $p=0,5249$) (Tabela 3). Também os restantes parâmetros hematológicos analisados no hemograma não sofreram alterações com significado estatístico ($p>0,05$).

Tabela 3 - Efeito da adição de Gent na PLTo das amostras e dos controlos e, respetivo significado estatístico.

| GRUPOS | | ANTES DE GENT Mediana Média ± DP Mín. - Máx. ($\times 10^9/L$) | APÓS GENT Mediana Média ± DP Mín. - Máx. ($\times 10^9/L$) | VALOR DE p |
|--------------|---|--|--|------------|
| 145 amostras | EDTA-PTCP (n=97) | 109 100,1 ± 36,6 4,6 - 149,0 | 192 211,3 ± 71,5 150 - 521 | p < 0,0001 |
| | Trombocitopenia + EDTA-PTCP (n=41) | 87,1 83,6 ± 31,7 11 - 138 | 123 119,6 ± 20,1 72 - 148 | p < 0,0001 |
| | PTCP (n=7) | 64,2 74,5 ± 50,96 17,2 - 149 | 38 47,5 ± 36,9 19 - 120 | p = 0,1468 |
| Controlos | PLT 150 - 400 $\times 10^9/L$ (n=30) | 240 246,7 ± 50,7 170-379 | 240 246,5 ± 50,1 175 - 380 | p = 0,8343 |
| | PLT < 150 $\times 10^9/L$ (n=30) | 121,5 111,4 ± 27,9 31 - 143 | 118,5 110,9 ± 27,9 31 - 146 | p = 0,5249 |

DP: Desvio Padrão; **Mín.:** Mínimo; **Máx.:** Máximo.

Tabela 4 - Análise estatística dos resultados obtidos nos diferentes parâmetros hematológicos, antes e após a adição de Gent.

| PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS | ANTES DE GENT | APÓS GENT | VALOR DE p VALOR DE t |
|-----------------------------|---|---|--------------------------|
| | Mediana Média ± DP Mín. - Máx. | Mediana Média ± DP Mín. - Máx. | |
| RBC | 4,4 4,4 ± 0,6 2,7 – 5,8 (x10 ¹² /L) | 4,4 4,3 ± 0,6 2,7 – 5,8 (x10 ¹² /L) | p = 0,1355 t = 1,501 |
| Hb | 13,1 13,2 ± 1,9 8,7 – 17,9 (g/dL) | 13,3 13,2 ± 1,9 8,7 – 17,9 (g/dL) | p = 0,8975 t = 0,1290 |
| Htc | 39,5 39,6 ± 5,6 26,3 – 54,5 (%) | 39,3 39,4 ± 5,5 24,7 – 55,3 (%) | p = 0,0860 t = 1,729 |
| VGM | 90,4 91,3 ± 5,3 75,5 – 106 (fL) | 90,4 91,2 ± 5,4 75,1 – 106 (fL) | p = 0,2033 t = 1,278 |
| HGM | 30,3 30,4 ± 2,2 22,5 – 42,5 (pg) | 30,6 30,5 ± 2,2 22,8 – 38,6 (pg) | p = 0,3718 t = 0,8959 |
| CHGM | 33,3 33,3 ± 1,8 29,8 – 46,5 (g/dL) | 33,4 33,5 ± 1,6 30,1 – 38,6 (g/dL) | p = 0,2322 t = 1,200 |
| RDW | 13,8 14 ± 1,9 11,4 – 26,7 (%) | 14 14,2 ± 2,1 11,3 – 27 (%) | p = 0,0702 t = 1,824 |
| Eritroblastos | 0 0,005 ± 0,04 0 – 0,3 (x10 ⁹ /L) | 0 0,009 ± 0,05 0 – 0,3 (x10 ⁹ /L) | p = 0,3838 t = 0,8736 |

| PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS | ANTES DE GENT Mediana Média ± DP Mín. - Máx. | APÓS GENT Mediana Média ± DP Mín. - Máx. | VALOR DE p VALOR DE t |
|---------------------------------|--|--|--|
| WBC | 7,9 8,7 ± 3,5 2,9 – 22,7 (x10 ⁹ /L) | 7,9 8,8 ± 3,6 2,9 – 22,2 (x10 ⁹ /L) | p = 0,0861 t = 1,728 |
| Neutrófilos | 5,4 6,3 ± 3,6 1,5 – 20,7 (x10 ⁹ /L) | 5,3 6,3 ± 3,5 1,5 – 20,3 (x10 ⁹ /L) | p = 0,7756 t = 0,2855 |
| Linfócitos | 1,6 1,6 ± 0,8 0,1 – 4,6 (x10 ⁹ /L) | 1,6 1,7 ± 0,9 0,1 – 4,7 (x10 ⁹ /L) | p = 0,0612 t = 1,911 |
| Monócitos | 0,5 0,6 ± 0,5 0,05 – 3,8 (x10 ⁹ /L) | 0,6 0,7 ± 0,5 0,04 – 4,7 (x10 ⁹ /L) | p = 0,0638 t = 1,868 |
| Eosinófilos | 0,1 0,15 ± 0,2 0 – 1,5 (x10 ⁹ /L) | 0,1 0,17 ± 0,2 0 – 2,4 (x10 ⁹ /L) | p = 0,2707 t = 1,106 |
| Basófilos | 0,02 0,03 ± 0,03 0 – 0,2 (x10 ⁹ /L) | 0,02 0,04 ± 0,05 0 – 0,3 (x10 ⁹ /L) | p = 0,3899 t = 0,8625 |
| Ptc | 0,1 0,09 ± 0,04 0,01 – 0,2 (%) | 0,2 0,2 ± 0,06 0,02 – 0,4 (%) | p < 0,0001 t = 14,3 |
| VPM | 10,6 10,8 ± 1,6 6,6 - 18,7 (fL) | 9,8 10,1 ± 1,6 6,7 - 15,7 (fL) | p < 0,0001 t = 5,573 |

| PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS | ANTES DE GENT Mediana Média ± DP Mín. - Máx. | APÓS GENT Mediana Média ± DP Mín. - Máx. | VALOR DE p VALOR DE t |
|--------------------------|---|---|--------------------------|
| PDW | 17,4 17,8+ ± 3,3 10,1 – 33,4 (gsd) | 17,1 17,5 ± 2,1 10,2 - 26,6 (gsd) | p = 0,1641 t = 1,399 |

RBC: *Red Blood Cell*; **Hb:** Hemoglobina; **Htc:** Hematócrito; **VGM:** Volume Globular Médio; **HGM:** Hemoglobina Globular Média; **CHGM:** Concentração de Hemoglobina Globular Média; **RDW:** *Red Cell Distribution Width*; **WBC:** *White Blood Cell*; **Ptc:** Plaquetócrito; **VPM:** Volume Plaquetar Médio; **PDW:** *Platelet Distribution Width*; **DP:** Desvio Padrão; **Mín.:** Mínimo; **Máx.:** Máximo.

4.2. Efeito da adição de Gentamicina na morfologia das células do sangue periférico

No ESP realizado antes da adição de Gent, observou-se a presença de aglutinados ou agregados plaquetares formados por um número variável de plaquetas (Figura 14a). Por sua vez, durante a análise microscópica do sangue periférico suplementado com Gent não se observou a presença de aglutinados de plaquetas em 138 das nossas amostras (Figura 14b). Os agregados plaquetares apenas se mantiveram visíveis nas restantes 7 amostras.

Não se observaram alterações morfológicas nas células do sangue periférico.

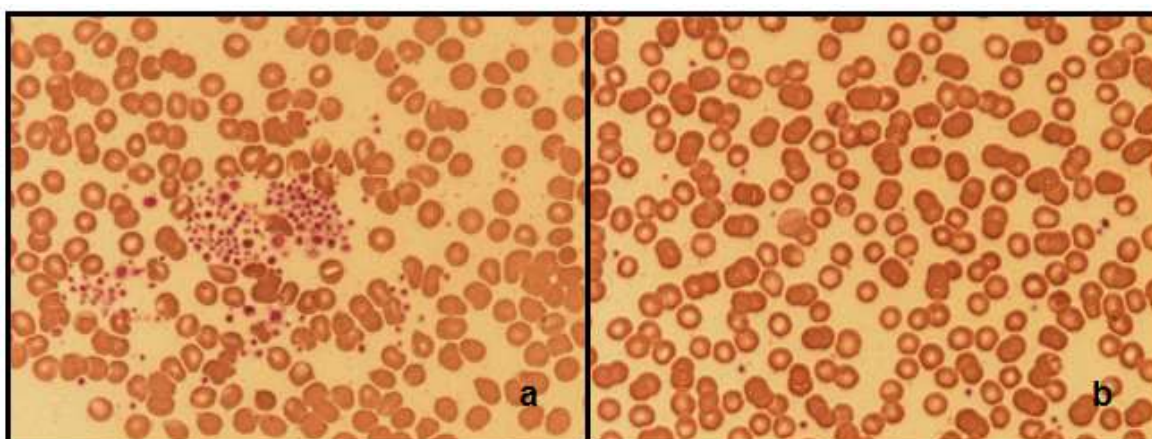


Figura 14 - Imagem microscópica de um ESP antes (a) e após (b) a adição de Gent a uma amostra de sangue anticoagulada com EDTA-K3, correspondente a um doente com EDTA-PTCP (May-Grünwald-Giemsa, x500).

4.3. Contagem de plaquetas pelo método imunológico

As 13 amostras processadas com o anticorpo monoclonal CD61, antes da adição de Gent, apresentaram uma contagem de PLT mais elevada por CD61 do que por dispersão ótica. Sendo, esta diferença estatisticamente significativa ($t=6,404$; $p<0,0001$).

Após a adição de Gent, as mesmas amostras apresentaram uma contagem de plaquetas por dispersão ótica semelhante à obtida por imunofluorescência ($t=1,734$; $p=0,1085$) e superior à obtida por CD61 antes de Gent.

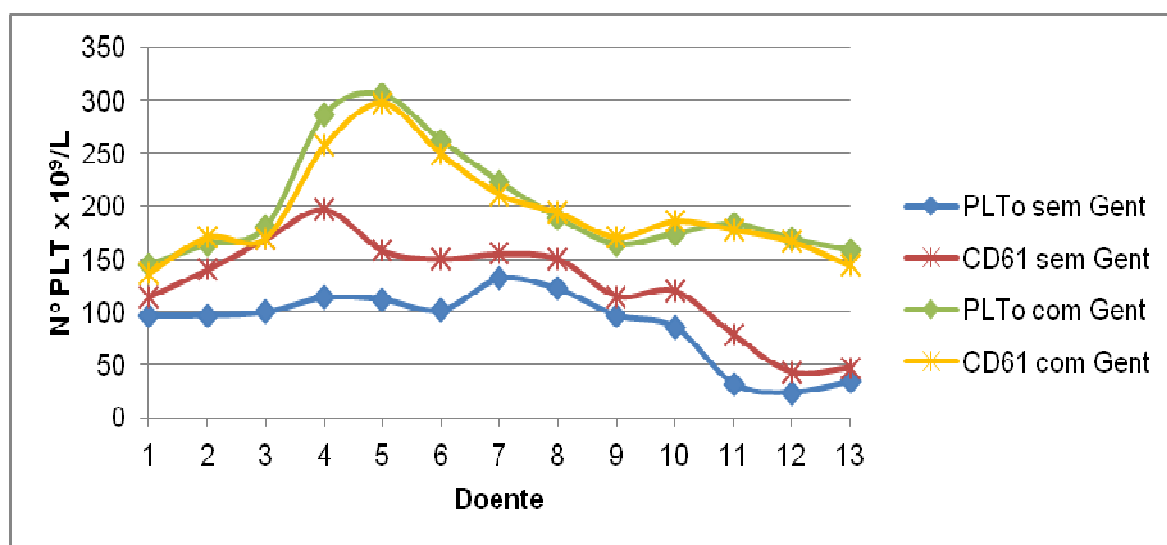


Figura 15 - Comparação entre a contagem de plaquetas por CD61 e por ótica nas amostras de sangue total antes e após a adição de Gent. Todas as amostras processadas com CD61 sem adição de Gent revelaram um número de PLT mais elevado do que o obtido na PLTo sem adição de Gent. A maioria das amostras processadas com adição do aminoglicosídeo obtiveram um número de PLT, quer por CD61 quer por dispersão ótica, superior ao obtido por CD61 antes de Gent.

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($t=1,451$; $p=0,1085$) entre a contagem de PLT por metodologia ótica e por imunofluorescência nas 10 amostras controlo.

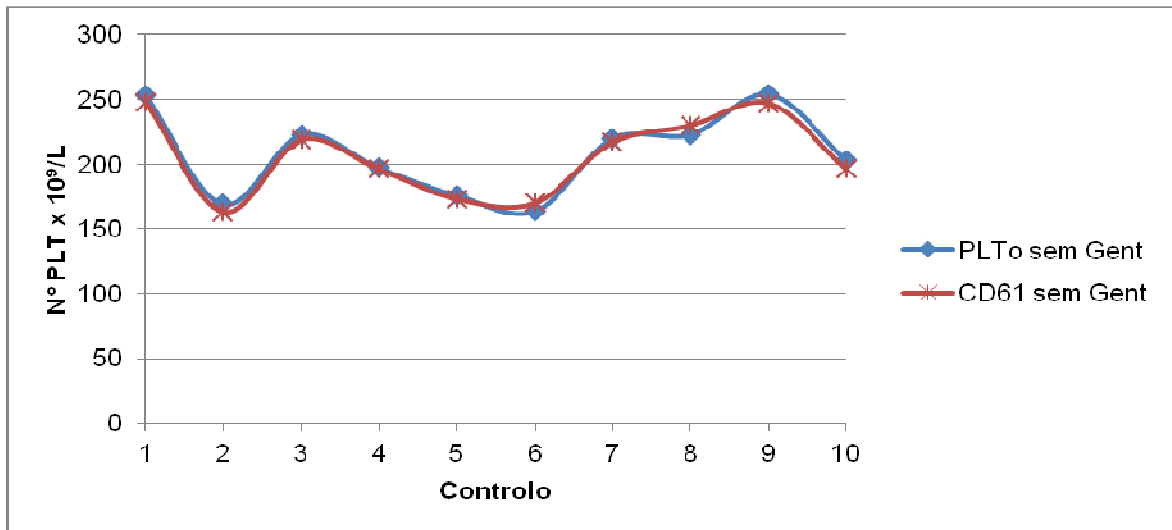


Figura 16 - Comparação entre a contagem de plaquetas por CD61 e por ótica nas amostras amostras controlo. O número de plaquetas obtido pelas duas metodologias foi praticamente igual.

5. DISCUSSÃO

A pseudotrombocitopenia dependente de EDTA representa uma incorreta diminuição na contagem de plaquetas por analisadores hematológicos automatizados, em amostras de sangue colhidas em EDTA. Esta falsa trombocitopenia é, normalmente, causada por erros humanos durante a realização das colheitas, os quais podem levar à formação de microcoágulos/agregados plaquetares. No entanto, também pode resultar de aglutinação plaquetar (21–24) ou, mais raramente, de satelitismo plaquetar (25,26).

Segundo a literatura, a aglutinação plaquetar ou o satelitismo plaquetar são promovidos pela presença de autoanticorpos (IgG, IgM ou IgA) que ocorrem naturalmente e que têm a capacidade de reagir, *in vitro*, com um epítopo localizado na fração GPIIb do complexo plaquetário GPIIb/IIIa (20,24,27,29,31,34). Uma vez que a remoção dos Ca^{2+} pelo EDTA, talvez cause modificações na GPIIb/IIIa ou exposição de um epítopo (criptoantigénio) localizado nesse complexo proteico (19,35).

Investigações anteriores verificaram que não existia correlação entre a EDTA-PTCP e a idade ou sexo do doente e, ainda, que este fenómeno poderia ocorrer em doentes com um grupo heterogéneo de patologias. Neste trabalho também não se conseguiu estabelecer uma associação entre a EDTA-PTCP e a idade ou sexo dos doentes, nem mesmo com a situação clínica (infecções, neoplasias, doenças cardiovasculares, hepáticas ou, raramente, autoimunes) que apresentavam no dia da colheita para realização de hemograma.

Durante uma contagem automática de plaquetas, os analisadores hematológicos são incapazes de contabilizar as plaquetas envolvidas nos aglomerados de plaquetas, causando contagens de plaquetas inferiores a $150 \times 10^9/L$ (18,35,36,44).

Sakurai *et al* (19) descreveram que a adição de um aminoglicosídeo às amostras de sangue colhidas em EDTA poderia dissociar a aglutinação plaquetar.

No presente estudo, o aminoglicosídeo usado foi a Gentamicina líquida com 40mg/mL. Os nossos resultados mostram que este aminoglicosídeo tem um efeito na dissociação de aglutinados plaquetares com significado estatístico, uma vez que desaglutinou os aglomerados em 95,17% dos casos. Estes dados não vão de encontro com os resultados obtidos por Zhou *et al* (29), quando realizaram um estudo para avaliação do efeito da adição de diferentes aminoglicosídeos a amostras colhidas em EDTA. No qual, concluíram que apenas a amicacina seria efectiva na dissociação dos aglutinados plaquetares, enquanto a gentamicina, apesar de ser um antibiótico homogéneo da amicacina, não teria o mesmo efeito. Estes investigadores justificaram

este resultado com as diferenças existentes na estrutura química destes dois aminoglicosídeos.

Para os 7 casos (4,83% das amostras estudadas) em que a gentamicina não conseguiu dissociar os aglomerados plaquetares, podemos sugerir a presença de PTCP causada por microcoágulos, devido a uma colheita difícil ou má homogeneização da amostra com o anticoagulante.

Os aglutinados de plaquetas são resistentes aos agentes responsáveis pela lise de eritrócitos. Perante aglomerados de plaquetas de tamanho semelhante aos dos leucócitos, talvez seja possível observar-se um falso aumento na contagem de leucócitos. Porém, o analisador não os identifica de forma definitiva como uma população de leucócitos, originando sempre um sinal de alerta (19,35,36). Perante a nossa análise estatística aos restantes índices hematológicos, podemos afirmar que não se verificou uma falsa leucocitose em nenhum dos casos estudados. Zhou *et al* (29) obtiveram os mesmos resultados quando avaliaram os diferentes índices hematológicos após adição de amicacina a amostras de sangue total colhidas em EDTA.

Com base nos dados sumarizados na Tabela 4, concluímos que a adição de Gentamicina às nossas amostras em estudo provocou alterações estatisticamente significativas no VPM e no Ptc. O VPM corresponde à média do volume das plaquetas contadas por impedância elétrica. Este parâmetro plaquetário encontra-se aumentado antes da adição de Gent devido, provavelmente, a uma contagem errónea das plaquetas, ou seja, os aglutinados plaquetares formados por 2 a 3 plaquetas terem sido contabilizados apenas como uma plaqueta gigante. O Ptc é a percentagem de volume ocupado pelas plaquetas no sangue, sendo calculado a partir da seguinte fórmula: $Ptc = PLTo \times VPM$. Assim sendo, o Ptc das nossas amostras tendeu a aumentar após a adição de Gent, uma vez que o número de plaquetas também aumentou consideravelmente.

Ao longo deste trabalho, através da observação do esfregaço de sangue periférico, fomos comparando a morfologia das células sanguíneas no antes e após a adição de gentamicina. E, foi-nos possível concluir que a adição do aminoglicosídeo às amostras de sangue não causa qualquer tipo de alterações na morfologia das células. Para além disso, também se obteve confirmação da presença de aglomerados plaquetares nas amostras à chegada ao laboratório e a sua respetiva dissociação após a adição do aminoglicosídeo.

A aglutinação plaquetar é um artefacto laboratorial que afeta todos os métodos automatizados usados na contagem de plaquetas (impedância, dispersão óptica e imunológico). Segundo a literatura, foi identificado um anticorpo frio (IgM) que tinha a

capacidade de reagir directamente contra um epítopo localizado na fração GPIIb causando EDTA-PTCP (20,27,29,34). Neste trabalho, tivemos por objetivo reforçar esta teoria recorrendo à contagem de plaquetas por método imunológico, uma vez que o anticorpo monoclonal usado é específico para a GPIIIa do complexo GPIIb/IIIa, o qual está presente em todas as plaquetas normais.

Os dados, resumidos na Figura 15, mostram que, antes da adição de Gent, o número de plaquetas obtido por CD61 é superior ao obtido na PLTo, contrariamente ao obtido nas amostras controlo (Figura 16), em que o número de plaquetas resultante de ambas as metodologias são quase sobreponíveis. Esta análise leva-nos a conjecturar que o mecanismo de formação dos aglutinados plaquetares dependentes de EDTA não envolve a fração GPIIIa do complexo plaquetar GPIIb/IIIa. Uma vez que, mesmo na presença de aglutinados plaquetares, a integrina $\beta 3$ parece estar disponível para se ligar ao anticorpo monoclonal presente na contagem de plaquetas pelo método imunológico, tendo permitido, assim, uma contagem mais verídica do número de plaquetas. No entanto, a diferença obtida entre a contagem de plaquetas por CD61 antes e após a dissociação dos aglutinados, leva-nos a especular que as integrinas $\beta 3$ presentes em algumas das plaquetas envolvidas na formação destes aglutinados fossem de difícil acesso ao CD61, provavelmente devido a uma forte aglutinação plaquetar causada por um elevado título de anticorpo anti-plaquetar no plasma do doente. Consequentemente, não terá ocorrido a ligação entre a GP e o anticorpo monoclonal e, por conseguinte, não terão sido contabilizadas algumas das plaquetas presentes nas nossas amostras.

Com esta análise comparativa da contagem de plaquetas por CD61 e por dispersão óptica antes e após a adição de Gent podemos pressupor que os nossos resultados parecem estar de acordo com a hipótese, já descrita, de que possivelmente seja a fração GPIIb a estar envolvida no mecanismo de formação dos aglutinados plaquetares que levam a uma EDTA-PTCP.

6. CONCLUSÃO

A incidência da EDTA-PTCP na rotina da Unidade de Hematologia Laboratorial, Serviço de Hematologia do Hospital Geral, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra - EPE é de 0,09%. Aproximadamente 67% (97/145) das trombocitopenias estudadas demonstraram ser pseudotrombocitopenias dependentes de EDTA. Tendo em conta a sua prevalência, esta representa um problema clínico relevante, daí o interesse em excluir o seu possível diagnóstico em doentes com uma contagem de plaquetas por metodologia óptica inferior a $150 \times 10^9/L$, durante a rotina de um laboratório de hematologia, e desenvolver um método que nos permita contabilizar o número mais preciso de plaquetas.

Com este trabalho concluímos que a suplementação de amostras de sangue periférico, colhidas em EDTA, com o aminoglicosídeo gentamicina induz uma rápida dissociação da aglutinação plaquetar, sem causar alterações morfológicas nem dos principais parâmetros hematológicos obtidos no hemograma.

Esta metodologia é muito útil, rápida e com baixo custo na EDTA-PTCP, permitindo rentabilizar a tecnologia existente, com grande benefício para o doente. Tendo, por isso, sido implementada como uma análise na rotina do nosso laboratório.

Não podendo ainda concluir, deixamos como muito provável a hipótese de apenas a fração GPIIb do complexo GPIIb/IIIa se encontrar envolvida no mecanismo de formação dos aglutinados plaquetares presentes numa amostra com EDTA-PTCP.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Ciesla B. Hematology in practice. Philadelphia: F.A. DAVIS COMPANY; 2007.
2. Comar SR, Danchura HSM, Silva PH. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(6):431–6.
3. Hoffbrand A, Lewis S, Tuddenham E. Postgraduate haematology. 5th ed. Blackwell Publishing; 2005.
4. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, Lewis SM. Dacie and Lewis Practical Haematology. 11th ed. Elsevier; 2011.
5. Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, et al. Wintrobe's Clinical Hematology. 12th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
6. Crowther MA, Abshire TC. Hemostasis and thrombosis. ASH-SAP. 2004. p. 361–407.
7. Hoffbrand A, Pettit J, Moss P. Fundamentos em Hematologia. 4th ed. Artmed; 2004.
8. SETH. I Curso de Formación Continuada - Trombosis y Hemostasia. 2007.
9. Castro HC, Leal B, Ferreira A, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(5):321–32.
10. Patel S, Hartwig J, Italiano J. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. J Clin Invest. 2005;115(12):3348–54.
11. Vanni D, Horstmann B, Benjo A. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. J Bras Patol Med Lab. 2007;43(3):181–9.
12. Kaushansky K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis. Blood. 2008 Feb 1;111(3):981–6.
13. Deutsch VR, Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. Br J Haematol. 2006 Sep;134(5):453–66.
14. Schulze H, Shivdasani R a. Mechanisms of thrombopoiesis. J Thromb Haemost. 2005 Aug;3(8):1717–24.

15. Cuker A, Cines DB. Immune Thrombocytopenia. Hematology American Society of Hematology Education Program Book. 2010. p. 377–84.
16. Cashen AF, Wildes TM. The Washington Manual: Hematology and Oncology: Subspecialty Consult The Washington Manual Subspecialty Consult Series. 2nd ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
17. Cohen A, Cycowitz Z, Mittelman M, Lewinski U, Gardyn J. The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers. *Haematologia (Budap)*. 2000;30(22):117–21.
18. Ohnuma O, Shirata Y, Miyazawa K. Use of theophylline in the investigation of pseudothrombocytopenia induced by edetic acid (EDTA-2K). *J Clin Pathol*. 1988 Aug;41(8):915–7.
19. Sakurai S, Shiojima I, Tanigawa T, Nakahara K. Aminoglycosides prevent and dissociate the aggregation of platelets in patients with EDTA-dependent pseudothrombocytopenia. *Br J Haematol*. 1997 Dec;99(4):817–23.
20. HL A, YI J, YS C, JY L, HW L, SR K, et al. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia confirmed by supplementation of kanamycin; a case report. *Korean J Intern Med*. 2002;17(1):65–8.
21. Gowland E, Kay HE, Spillman JC, Williamson JR. Agglutination of platelets by a serum factor in the presence of EDTA. *J. clin. Pathol*. 1969 Jul;22(4):460–4.
22. Shreiner DP, Bell WR. Pseudothrombocytopenia: manifestation of a new type of platelet agglutinin. *Blood*. 1973 Oct;42(4):541–9.
23. Onder O, Weinstein A, Hoyer LW. Pseudothrombocytopenia caused by platelet agglutinins that are reactive in blood anticoagulated with chelating agents. *Blood*. 1980 Aug;56(2):177–82.
24. Pegels JG, Bruynes EC, Engelfriet CP, von dem Borne a E. Pseudothrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. *Blood*. 1982 Jan;59(1):157–61.
25. Criswell K a, Breider M a, Bleavins MR. EDTA-dependent platelet phagocytosis. A cytochemical, ultrastructural, and functional characterization. *Am J Clin Pathol*. 2001 Mar;115(3):376–84.
26. Bobba RK, Doll DC. Platelet satellitism as a cause of spurious thrombocytopenia. *Blood*. 2012 May 3;119(18):4100.

27. Casonato A, Bertomoro A, Pontara E, Dannhauser D, Lazzaro a R, Girolami A. EDTA dependent pseudothrombocytopenia caused by antibodies against the cytoadhesive receptor of platelet gPIIB-IIIA. *J Clin Pathol*. 1994 Jul;47(7):625–30.
28. Imai H, Nakamoto Y, Miki K, Miyakuni T, Miura A. Pseudothrombocytopenia and IgA-related platelet agglutinin in a patient with IgA nephritis. *Nephron*. 1983;34(3):154–8.
29. Zhou X, Wu X, Deng W, Li J, Luo W. Amikacin can be added to blood to reduce the fall in platelet count. *Am J Clin Pathol*. 2011 Oct;136(4):646–52.
30. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho M das G. Pseudotrombocitopenia. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(5):321–4.
31. Bizzaro N, Brandalise M. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: association with antiplatelet and antiphospholipid antibodies. *Am J Clin Pathol*. 1995;103(1):103–7.
32. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet journal of rare diseases*. 2006 Jan;1:10.
33. Rachad M, Chaara H, Fdili FZ, Jayi S, Bouguern H, Melhouf MA. Thrombasthénie de Glanzmann et grossesse: à propos d'un cas et revue de la littérature. *The Pan African Medical Journal*. 2011;10(61).
34. Fiorin F, Steffan A, Pradella P. IgG platelet antibodies in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia bind to platelet membrane glycoprotein IIb. *Am J Clin Pathol*. 1998;110(2):178–83.
35. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Hematol*. 2007 Feb;29(1):4–20.
36. Tessier-Marteau A, Geneviève F. Anomalies et erreurs de détermination de l'hémogramme avec les automates d'hématologie cellulaire. *Ann Biol Clin*. 2010;68(4):393–407.
37. Wu W, Guo Y, Zhang L, Cui W, Li W, Zhang S. Clinical utility of automated platelet clump count in the screening for ethylene diamine tetraacetic acid-dependent pseudothrombocytopenia. *Chin Med J*. 2011;124(20):3353–7.
38. Yoshikawa T, Nakanishi K, Maruta T, Takenaka D, Hirota S, Matsumoto S, et al. Anticoagulant-induced pseudothrombocytopenia occurring after transcatheter

- arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2006 Aug;36(8):527–31.
39. Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)-Dependent Pseudothrombocytopenia: A Case Report of an Incidental but Important Finding [Internet]. *MEDICINE ON-LINE*. Disponível a partir de: <http://www.priory.com/med/Case20%Presentation.htm>
 40. Choe W, Cho Y, Chae J, Kim S. Pseudothrombocytopenia or platelet clumping as a possible cause of low platelet count in patients with viral infection: a case series from single institution focusing on hepatitis A virus infection. *Int J Lab Hematol*. 2012;1–7.
 41. Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: A clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol*. 2006;50(2):103–9.
 42. Guerra J, Lazaro R, Ioshida M, Figueiredo M, Lopes F, Bonet C, et al. Adição de Sulfato de kanamicina em amostras de pacientes com pseudotrombocitopenias induzida pelo ácido etileno diamino tetra acético (EDTA).
 43. Pena F, Pereira S. EDTA-Dependent platelet clumping in a patient with hypothyroidism. *Eastern Journal of Medicine*. 2010;15:31–3.
 44. Jeon I, Yang SW. Prevention and Dissociation of the Platelet Aggregation in a Patient with EDTA-dependent Pseudothrombocytopenia by Supplementation of Kanamycin: A Case Report. *Korean Journal of Pediatrics*. 2005;48(6):675–7.
 45. Palomino J, Pachón J. Aminoglicósidos. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2003;21(2):105–15.
 46. Souza VBD, Oliveira RFD, Ferreira A, Júnior RDA. Alterações Renais por Aminoglicosídeos. *Arquivos de Medicina*. 2008;22(4/5):131–5.
 47. Sousa J. Manual de Antibióticos Antibacterianos. 2nd ed. Fundação Fernando Pessoa; 2006. p. 323–8.
 48. Toth M, Frase H, Antunes NT, Smith C a, Vakulenko SB. Crystal structure and kinetic mechanism of aminoglycoside phosphotransferase-2"-IVa. *Protein science*. 2010 Aug;19(8):1565–76.
 49. Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2006 Dec;21(4):444–52.
 50. Cell-Dyn Sapphire Operator's Manual. Abbott Diagnostics; 2009.

51. Kendall R, Scott S, Gooch R. The Need for improved accuracy in platelet counting. 2009.
52. Reactivo CELL-DYN ImmunoPlt (CD61). Abbott Diagnostics; 2010.