

Instituto Politécnico de Coimbra



Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública



Instituto Politécnico
de Coimbra

**DIFICULDADE NA QUANTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO AUTOMÁTICA
DE LEUCÓCITOS EM DOENTES COM β -TALASSÉMIA INTERMÉDIA.
RELAÇÃO GENÓTIPO / FENÓTIPO**

Flávia Catarina Gonçalves Pinto

Coimbra

2013



Instituto Politécnico de Coimbra

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de
Coimbra

Departamento de Análises Clínicas e Saúde
Pública



DIFICULDADE NA QUANTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO AUTOMÁTICA DE LEUCÓCITOS EM DOENTES COM β -TALASSÉMIA INTERMÉDIA. RELAÇÃO GENÓTIPO / FENÓTIPO

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 Professora Doutora Maria Letícia Ribeiro, Professora Adjunta Convidada da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e coorientação do Mestre Rogério Barreira, Professor Equiparado a Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Agradecimentos

Agradeço à Doutora Maria Letícia Ribeiro, Diretora do Serviço de Hematologia HG/HP do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra-E.P.E., a permissão e o incentivo para desenvolver este estudo, assim como pela importante e indispensável orientação científica.

Agradeço, em especial, ao Mestre Rogério Barreira, pela oportunidade que me deu de adquirir novos conhecimentos através dos seus ensinamentos, pelo incentivo e apoio na realização deste estudo.

Agradeço a todas as pessoas que trabalham na Unidade Laboratorial de Hematologia do Hospital Geral do CHUC-EPE, pelo apoio e disponibilidade.

Finalmente, agradeço aos meus pais, irmãs, e aos meus amigos pela ajuda, pelo apoio e pela paciência demonstrada em mais uma etapa.

Júri

Prof. António José dos Santos Gabriel,
Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Prof. Doutora Margarida Maria de Carvalho Lima,
Professora Auxiliar Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto.

Prof. Doutora Maria Letícia Ribeiro,
Professora Adjunta Convidada da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Mestre Rogério F. de C. Barreira,
Professor Assistente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra.

Resumo

Introdução: A quantificação e a diferenciação leucocitária em diferentes contadores hematológicos automáticos apresentam artefatos devido à presença de células (eritroblastos, eritrócitos com corpos de Howell-Jolly, drepanócitos e células em alvo) com resistência osmótica aumentada. Esta dificuldade em obter contagens fiáveis coloca muitas vezes problemas no diagnóstico e seguimento destes doentes. A hemoglobina (Hb) do adulto, Hb A, é composta por 2 cadeias globínicas α e 2 β . As hemoglobinopatias resultam de mutações nos genes das cadeias globínicas que levam à síntese de cadeias anormais ou à ausência ou diminuição de produção dessas mesmas cadeias. As β - Talassémias são caracterizadas por uma redução (β^+) ou ausência (β^0) de síntese de cadeias β – globínicas, em consequência, na maioria das vezes, de mutações pontuais. A homozigotia ou heterozigotia composta para mutações β^+ dá origem à β -Talassemia Intermédia (β -TI).

Objetivos: Encontrar uma metodologia fiável para a contagem e diferenciação de leucócitos em doentes com β -TI. Criar um algoritmo para a correção dos parâmetros. Relacionar o genótipo com as maiores ou menores alterações na contagem diferencial leucocitária.

Material e Métodos: 21 amostras de doentes com β -TI do Serviço de Hematologia-HG/HP do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, colhidas entre Setembro de 2011 e Setembro de 2012. As amostras foram divididas em Grupo I, 14 amostras: homozigotia c.92+6T>C(IVSI-6) e homozigotia -90C>T; Grupo II, 7 amostras: heterozigotia [c.317delT (CD106 -T)]; dupla heterozigotia c.46delT(CD15 -T)+ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e dupla heterozigotia c.92+1G>A (IVSI-1)+ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Estudo realizado em analisador hematológico automatizado CELL-DYN SAPPHIRE™, com metodologia FCS e método de correção manual. Análise estatística por teste t student para amostras emparelhadas.

Resultados: Avaliação comparativa dos resultados: metodologia automática vs FCS (p<0.0001; t=5,077); automática vs manual (p<0,0001; t=4,943); FCS vs manual (p=0,0002; t=4,604).

Discussão/Conclusão: A correção das contagens no programa FCS demonstrou eficácia na eliminação de interferentes que inflacionam a contagem de leucócitos. A partir desta metodologia foi criado um algoritmo para ser utilizado no processamento deste tipo de amostras.

Verificou-se ainda que as amostras do Grupo I, com homozigotia [c.92+6T>C (IVSI-6) e homozigotia -90C>T], apresentaram maiores alterações na contagem diferencial leucocitária, o que deverá estar relacionado com o seu fenótipo mais severo.

Palavras-chave

Hemoglobinopatias; β -TI; Analisadores Hematológicos; Mutações

Abstract

Introduction: The leukocyte differentiation and quantification performed by different automated hematological analyzers, presents some challenges whenever there are red blood cells (erythroblasts, sickle cells, erythrocytes with Howell-Jolly bodies and target cells) with increased osmotic resistance. This difficulty in obtaining reliable counts often indicate problems in diagnosis and management of these patients. The Hb is composed of two types of globin chains, the α and β . Hemoglobinopathies are characterized by genetic defects in the globin chains due to existing modifications in the genes responsible for sequencing and structure of each type of polypeptide chain, as well as those responsible for the synthesis of balanced chains α and β . The β -Thalassemias are characterized by reduced (β^+) or absent (β^0) synthesis of β -globin chains, largely due to point mutations. The homozygosity or compound heterozygosity for mutations (β^+), gives rise to β -Thalassemia Intermedia (β -TI).

Objectives: To find an effective methodology for obtaining reliable counts and differentiation of leukocytes in patients with β -TI. Create an algorithm for the correction of parameters. Relate genotype with major or minor changes in leukocyte differential counting.

Material and Methods: 21 samples of patients with β -TI of the Hematology Unit-HG/HP of Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, collected between September 2011 and September 2012. They were divided in Group I, 14 samples: homozygosity c.92+6T>C (IVSI-6) and homozygosity -90C>T; Group II, 7 samples: heterozygosity [c.317delT (CD106 -T)]; double heterozygosity c.46delT (CD15 -T)+ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ and double heterozygosity c.92+1G>A (IVSI-1)+ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. Automated hematology counts on CELL-DYN SAPPHIRE™, in the FCS software and method of manual correction. Statistical analysis by Student's t test for paired samples.

Results: We compared the methodologies, automatic vs. FCS ($p < 0.0001$, $t = 5,077$); Automatic vs Manual ($p < 0.0001$, $t = 4,943$); Manual vs. FCS ($p = 0.0002$; $t = 4,604$)

Discussion/Conclusion: The correction made in the FCS program has demonstrated effectiveness in removing that influence in the leukocytes count. From this methodology was created an algorithm to be properly used in processing such samples. It was also found that samples of the Group I, with homozygosity [c.92+6T>C (IVSI-6) and homozygosity -90C>T] showed greater changes in the leukocyte differential count, which should be related to their more severe phenotype.

Keywords

Hemoglobinopathies; β -TI; Automatic Hematological Counters; Mutations.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE GRÁFICOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hematopoiese	1
1.2 O Eritrócito.....	2
1.2.1 Eritropoiese.....	2
1.2.2 Morfologias Anormais do Eritrócito.....	3
1.2.3 O Eritrócito e a Hb.....	4
1.3 Hemoglobinopatias.....	5
1.3.1 Hemoglobinas Variantes	6
1.3.2 Talassemias.....	6
1.3.2.1 α - Talassémias.....	7
1.3.2.2 β - Talassemias.....	8
1.3.3 Terapêutica com Quelantes de Ferro	10
1.3.4 Alterações Genéticas	11
1.4 Dificuldade na Contagem Automática de Leucócitos, usando diferentes Analisadores Hematológicos, em Doentes com β - TI	12
1.5 Objetivos	14
1.5.1 Objetivos específicos	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 População	16
2.2 Material Biológico	16
2.3 Analisador Hematológico.....	16
2.3.1 Princípio MAPSS [®] (<i>multi-angle polarized scatter separation</i>)	17
2.3.2 Princípio MAPSS [®] - Gráficos FL3-DNA	18
2.4 FCS Express 4	18
2.5 Correção do Valor dos Leucócitos pelo Método Manual	18
2.6 Determinação do Haplótipo do Cluster do gene β - Globínico (HBB) e sua Sequenciação.....	19
2.7 Controlo de Qualidade	19
2.8 Análise Estatística	19
3. RESULTADOS.....	20
4. DISCUSSÃO	23

5. CONCLUSÃO	25
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formação dos componentes sanguíneos.	2
Figura 2: Esfregaço de SP de um doente com β -Talassémia Intermédia, corado pela técnica de May-Grünwald Giemsa, com uma ampliação de 500x.	4
Figura 3: Esquema de uma molécula de Hb.	5
Figura 4: esfregaço de SP de um doente com Drepanocitose, corado pela técnica de May-Grünwald Giemsa, com uma ampliação de 500x.	6
Figura 5: Localização do gene α globínico no braço curto do cromossoma 16.	7
Figura 6~: Esfregaços de SP de doentes com Hb H, corados pela técnica de May-Grünwald Giemsa e pela coloração Supravital, com uma ampliação de 500x.....	8
Figura 7: Locus do gene β globínico no braço curto do cromossoma 11.....	8
Figura 8: Esfregaços de SP de doentes β -TI corados pela técnica de May-Grünwald Giemsa, com uma ampliação de 500x.	10
Figura 9: Parâmetros hematológicos de uma amostra de um doente com β - TI usando o analisador CELL-DYN SAPPHIRE™.	12
Figura 10: Parâmetros hematológicos de uma amostra de um doente com β - TI usando o analisador PENTRA DX 120.	13
Figura 11: Parâmetros hematológicos de uma amostra de um doente com β - TI usando o analisador Sysmex XT-1800i.	13
Figura 12: Parâmetros hematológicos de uma amostra normal e de um doente com β - TI, no programa FCS.	14
Figura 13: Citograma MAPSS de tamanho versus complexidade.	17
Figura 14: Diferenciação de células por tamanho (O Size) e fluorescência de DNA (FL3-DNA).....	18
Inexplicavelmente, observou-se uma contagem aumentada de neutrófilos num dos analisadores, Sysmex XT-1800i (Figura 15).	24
Figura 16: Algoritmo de correção do nº de leucócitos.	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagem de leucócitos por metodologias: Automática, FCS e Correção Manual.	20
Tabela 2: Teste t de Student para os resultados entre as diferentes metodologias utilizadas na contagem de leucócitos.	21

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Contagem de "Leucócitos", por metodologia automática (A), manual (M) e FCS vs Grupo I e Grupo II.	21
Gráfico 2: Contagem de Linfócitos por metodologia automática e FCS vs Grupo I e Grupo II.	22
Gráfico 3: Contagem de Neutrófilos por metodologia automática e FCS vs Grupo I e Grupo II.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS

Hb – Hemoglobina

CFU - Unidade Formadora de Colónias

EPO – Eritropoietina

β-TI - β- Talassémia Intermédia

SP – Sangue Periférico

EDTA_{K3} - Ácido etilenodiaminatetracético tripotássico

MAPSS® (*Multiple Angle Polarized Scatter®*) - Separação Gráfica Polarizada Multi-Ângulo

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA - Ácido Ribonucleico

mRNA - RNA mensageiro

VGM – Volume Globular Médio

HGM – Hemoglobina Globular Média

NRBC (Nucleated Red Blood Cells) – Eritroblastos

PI - Iodeto de Propídio

CBC-R (Cell Blood Count - Resistant) - Hemograma com lise prolongada para eritrócitos mais resistentes.

IVS - *Intervening Sequenc*

1. INTRODUÇÃO

Nas amostras de doentes com β - Talassémia Intermédia (β - TI) ou algumas outras patologias hematológicas a quantificação e a diferenciação leucocitária em diferentes contadores hematológicos automáticos apresentam alterações devido à presença de células eritróides (eritroblastos, drepanócitos e células em alvo) com uma resistência aumentada à lise pelos reagentes usados nos analisadores hematológicos. O hemograma nestas condições pode apresentar uma leucocitose sugestiva da existência de um processo infeccioso ou uma pseudo linfocitose sugestiva de doença linfoproliferativa.

1.1 Hematopoiese

A hematopoiese compreende a formação de todos os componentes do sangue a partir da célula mãe hematopoiética, ou célula estaminal, ocorrendo na medula óssea e incluindo processos de proliferação, diferenciação e maturação.(1)

Esta célula estaminal é pluripotente, dando origem a todas as outras células estaminais hematopoiéticas, precursoras de todas as células sanguíneas. (1)(2)

As células estaminais têm como função manter e repor todo o tipo de células sanguíneas na medula óssea, capazes de responder às necessidades dos tecidos periféricos.(3)

A transição das células estaminais na medula óssea para as células sanguíneas, dá-se em três fases: células pluripotentes, células progenitoras e células precursoras, caracterizadas pela aquisição de características morfológicas, nucleares e citoplasmáticas, que vão distinguir cada linhagem de células.(1)

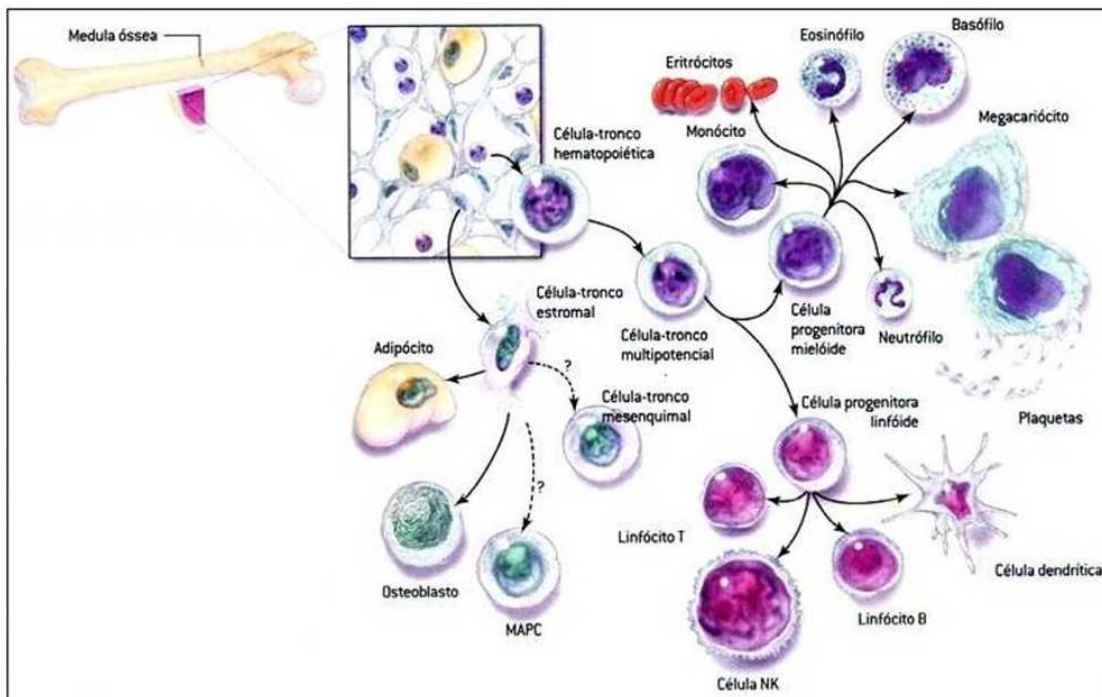


Figura 1: Formação dos componentes sanguíneos.

A partir da célula mãe-hematopoiética há a formação das células sanguíneas, incluindo os processos de proliferação, diferenciação e maturação. Adaptado: biologiacecilia.blogspot.pt/2009/03/hematopoesse.html

1.2 O Eritrócito

O eritrócito circula no sistema sanguíneo carregado de hemoglobina (Hb), tendo como grande função a oxigenação de todos os tecidos do corpo humano e a remoção do anidrido carbónico. Têm uma capacidade média de vida de 120 dias.(2)

Os eritrócitos têm a capacidade de se deformar para poderem atravessar capilares de pequeno diâmetro. As principais razões desta deformabilidade são a flexibilidade da sua membrana, a arquitetura da célula e a viscosidade citoplasmática. A flexibilidade é devida à estrutura altamente organizada da membrana, constituída por uma bicamada lipídica, uma rede de espectrinas e proteínas transmembranares que ligam estas 2 estruturas e permitem as trocas iónicas.(4)

1.2.1 Eritropoiese

A eritropoiese designa o processo de formação dos eritrócitos. Esta ocorre na medula óssea num período de cinco dias.

Este processo consiste na formação dos eritrócitos, a partir da célula progenitora mielóide, que se diferencia em dois tipos de CFU (unidade formadora de colónias): a granulócítica-monócítica e a eritróide-megacariocítica, dando esta última origem à série eritróide. Neste período, existem sucessivas modificações morfológicas, que começam no proeritroblasto.(1)(2)

O proeritroblasto é uma célula grande com um núcleo redondo com cromatina condensada, os nucléolos podem estar presentes mas são difíceis de visualizar e o citoplasma apresenta uma cor azulada. O eritroblasto basófilo tem dimensões mais pequenas, apresenta um núcleo redondo com cromatina de aparência cristalina, o citoplasma é azul, devido à presença de Hb e de ácido ribonucleico (RNA). O eritroblasto policromático apresenta um citoplasma maior, de cor mais avermelhada devido ao aumento da concentração de Hb e os nucléolos já não são visíveis. O eritroblasto ortocromático apresenta um núcleo com cor preta-azulada, que vai ser expulso ainda na medula óssea e é fagocitado por macrófagos, dando origem ao reticulócito, com uma cor cinzenta devido à presença de ribossomas. Os reticulócitos são libertados para o sangue periférico (SP) onde vão fazer a sua maturação no baço, dando origem aos eritrócitos maduros. Os eritrócitos têm forma bicôncava e cor vermelha forte devido à grande concentração de Hb. Não apresentam organelos intracelulares tais como mitocôndrias, complexo de Golgi e lisossomas.(1)(2)

Para que esta linhagem se desenvolva, ou seja, para que haja eritropoiese, existe uma citoquina que é essencial para este processo, designada de eritropoietina (EPO).(3)(5)

No entanto, a eritropoiese não é totalmente eficiente porque cerca de 10-15% dos eritroblastos morrem dentro da medula. Isto é designado de eritropoiese ineficaz que está bastante aumentada em várias anemias crónicas.(6)

1.2.2 Morfologias Anormais do Eritrócito

Os eritrócitos têm um diâmetro de aproximadamente 7,5 μm , a Hb ocupa a parte periférica, deixando uma área de cerca de 30 a 45% de palidez no centro. Os eritrócitos com um tamanho e um conteúdo de Hb dentro dos parâmetros normais, são denominados eritrócitos normocíticos e normocrómicos, respetivamente. Quando apresentam um volume superior ao considerado normal, são designados de macrócitos, se o volume for inferior são micrócitos. A heterogeneidade de volume é designada de anisocitose. A heterogeneidade na forma dos eritrócitos é designada de poiquilocitose e

na coloração por dimorfismo. Estas alterações, que podem ser observadas num exame de SP, podem apontar para um tipo de doença específica.(7)

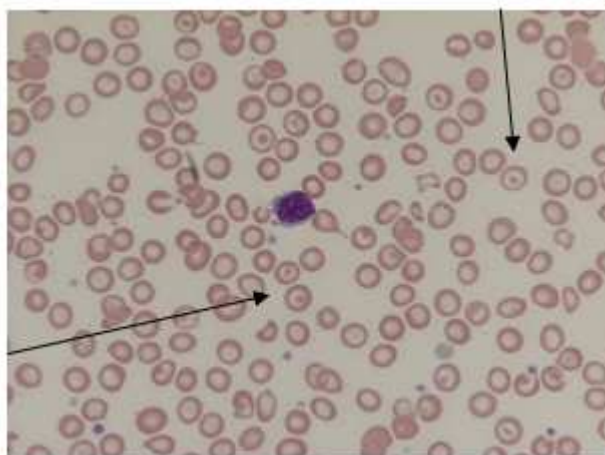


Figura 2: Esfregaço de SP de um doente com β -Talassémia Intermédia, corado pela técnica de May-Grünwald Giemsa, com uma ampliação de 500x.

As setas indicam uma morfologia anormal do eritrócito, em que existe um disco central de Hb rodeado por uma palidez - células em alvo. (Imagem obtida pela autora no Serviço de Hematologia)

1.2.3 O Eritrócito e a Hb

A Hb é uma metaloproteína de estrutura quaternária presente nos eritrócitos, que permite o transporte de oxigénio no sistema circulatório. Esta é composta por 4 subunidades: 2 tipos de cadeias globínicas: cadeias α compostas por 141 aminoácidos e cadeias β com 146 aminoácidos. Cada molécula de hemoglobina contém 4 grupos heme, compostos por um anel de protoporfirina e átomos de ferro, no estado ferroso, para que o oxigénio se possa ligar.(2)

As primeiras Hbs a serem sintetizadas são as Hbs Gower I e II (α_2, ϵ_2) e a Hb Portland ($\gamma_2\delta_2$), ainda na fase embrionária. Na vida fetal a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) é a Hb predominante e mantém-se até ao nascimento. As cadeias β começam a ser sintetizadas no final da gestação, quando a síntese de cadeias γ começa a diminuir. A Hb F vai diminuindo durante os primeiros meses de vida e no adulto é apenas 1 a 2%. A Hb A ($\alpha_2\beta_2$) é a Hb predominante na vida adulta. A Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) existe apenas em pequenas concentrações (<3,5%).(2)(8)

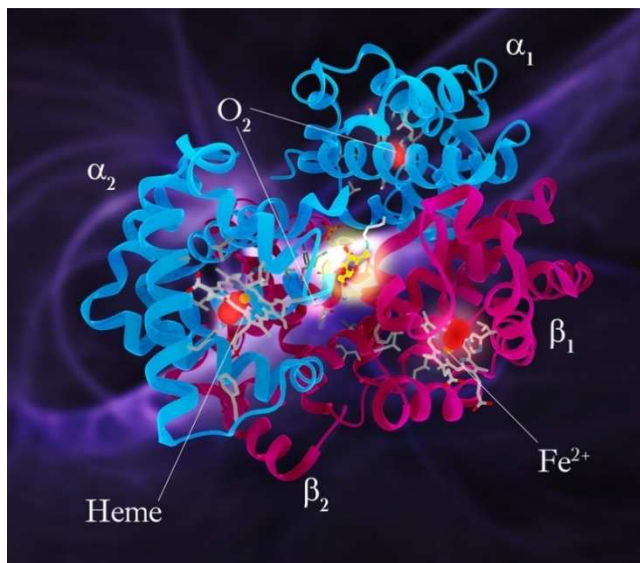


Figura 3: Esquema de uma molécula de Hb.

Metaloproteína constituída por 4 subunidades, 2 cadeias α - globínicas e 2 cadeias β - globínicas e um grupo heme, sendo este grupo responsável pela ligação e transporte de oxigênio e CO_2 . Adaptado de <http://3dciencia.com/blog/?p=545>.

1.3 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias resultam de mutações nos genes das cadeias globínicas que levam à síntese de cadeias polipeptídicas anormais ou à ausência ou diminuição de produção dessas mesmas cadeias. (9)

São as doenças monogénicas mais frequentes em todo o mundo. Em Portugal, na população autóctone, existe uma maior prevalência de hemoglobinopatias no sul do país enquanto que na zona Metropolitana de Lisboa é mais frequente a Hb S. Segundo um estudo efetuado no Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, a prevalência de hemoglobinopatias na população residente na região Centro é de cerca de 2.2%. Estima-se que em Portugal existam 25 doentes com β - Talassémia *Major* e um número superior com de β - Talassémia Intermédia (β -TI). Nas últimas décadas houve uma diminuição do nº de casos com fenótipo mais severo devido a uma mais cuidadosa identificação de casais em risco, e ao diagnóstico pré-natal.(10)

1.3.1 Hemoglobinas Variantes

A substituição de um nucleótido num dos genes das cadeias globínicas de que resulte a síntese de uma cadeia polipeptídica anormal dá origem a uma Hb com características anormais, que é denominada variante de Hb.(9)(11) A variante de Hb mais frequente é a hemoglobina S (HbS), que resulta de uma mutação *missense* no gene β , que leva à substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 (β 6 Glu-Val). Esta alteração em homocigotia dá origem à Drepanocitose. A Hb S em condições de hipóxia polimeriza, induzindo a rigidez e a deformação da membrana e o eritrócito ganha a forma de “foice”, falciformação. (12) A hemoglobina D (HbD) resulta da substituição do aminoácido glutamina pelo ácido glutâmico no codão 121 do gene β -globínico; na hemoglobina E (HbE), uma variante de Hb comum na Ásia, há substituição do aminoácido glutamina, pelo aminoácido lisina no codão 26 do gene β -globínico;(13) na hemoglobina C (HbC) também há substituição no codão 6 da cadeia globínica β , mas a substituição é do ácido glutâmico para o aminoácido lisina.(12)(14)

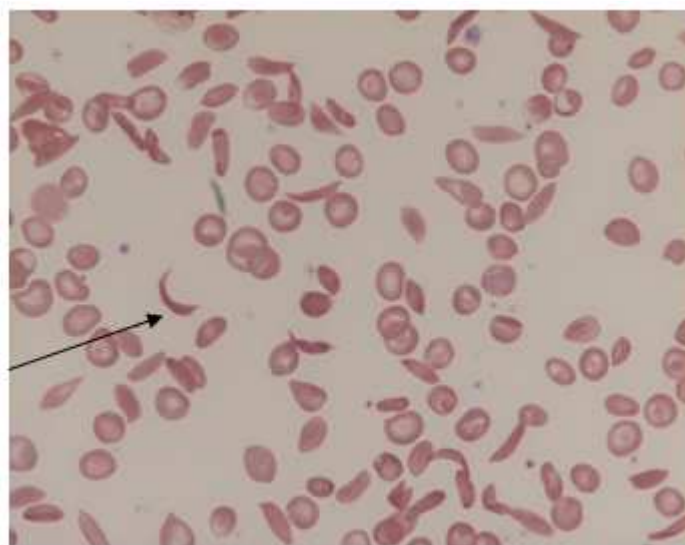


Figura 4: sfregaço de SP de um doente com Drepanocitose, corado pela técnica de May-Grünwald Giemsa, com uma ampliação de 500x.

Os eritrócitos indicados pela seta são drepanócitos. (Imagem obtida pela autora no Serviço de Hematologia)

1.3.2 Talassemias

As Talassemias são um grupo heterogéneo de doenças hereditárias em que mutações nos genes das cadeias globínicas dão origem a uma diminuição ou ausência de síntese das respetivas cadeias polipeptídicas. (10)(12)(15)

A homozigotia ou heterozigotia composta para mutações nos genes α ou β , estão associadas a fenótipos mais severos.

As formas clinicamente relevantes são as β - Talassémias e as α - Talassémias. No entanto, os fenótipos graves de α - Talassémias não são comuns entre a população portuguesa. (16)(17)

1.3.2.1 α - Talassémias

Quando a mutação atinge a síntese de cadeias α globínicas verifica-se uma diminuição do conteúdo destas nos eritrócitos, resultando num aumento das cadeias β globínicas livres.

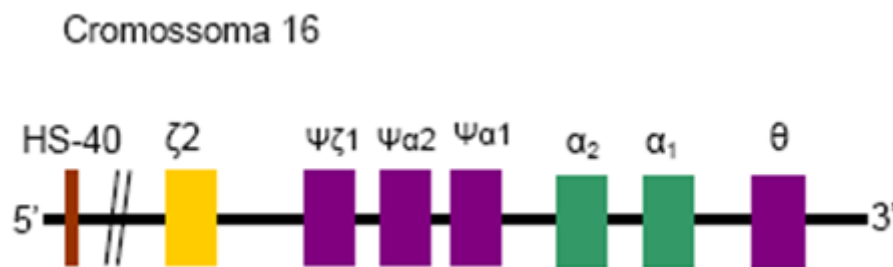


Figura 5: Localização do gene α globínico no braço curto do cromossoma 16.

Os genes que codificam cadeias do tipo α -globínico encontram-se no cromossoma 16. Estes genes estão sob o controlo de uma sequência reguladora, HS-40. A partir do gene da α -globina, por duplicação, surgem os genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Os pseudogenes (ψ) são homólogos aos genes, porém não são funcionais.

Adaptado de: Brown, 2007.

Como no ser humano existem 2 genes α no cromossoma 16 e apenas 1 genes β no cromossoma 11, os fenótipos severos de α - Talassémia são mais raros do que os da β - Talassémia. A α - Talassémia é devida, mais frequentemente, a deleções nos genes responsáveis pela formação de cadeias α , sendo as mais comuns, as deleções $-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$. (18)

Existem 4 genótipos de α - Talassémia, de acordo com o número de genes afetado: $(-\alpha/\alpha)$, $(--/\alpha\alpha$ ou $-\alpha/-\alpha)$, Doença da Hemoglobina H $(--/-\alpha)$ e Hidropsia fetal $(--/--)$. (10)

As cadeias globínicas β em excesso formam tetrâmeros β_4 que dão origem à Hb H, ou tetrâmeros γ_4 que origina Hb de Bart's. A Hb H pode ser detetada numa coloração supravital sob a forma de inclusões nos eritrócitos. (17)

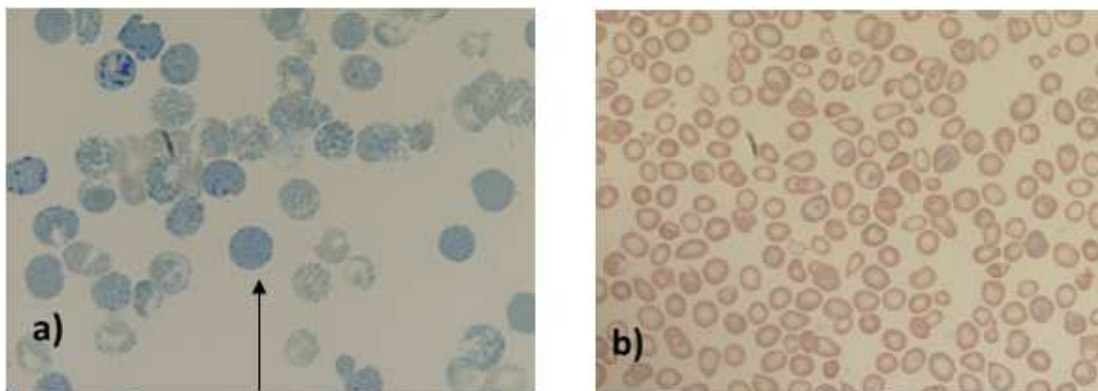


Figura 6--: Esfregaços de SP de doentes com Hb H, corados pela técnica de May-Grünwald Giemsa e pela coloração Supravital, com uma ampliação de 500x.

6a) Esfregaço de sangue eriférico de um doente com HbH corado com coloração supravital em que se observam as inclusões de Hb H nos eritrócitos.

6b) Esfregaço do sangue periférico de um doente com Hb H, com uma coloração de May-Grünwald Giemsa, com anisocitose, presença de micrócitos, hipocromia acentuada e poiquilocitose com destaque de esquizócitos. (Imagens cedidas gentilmente pelo Serviço de Hematologia)

1.3.2.2 β - Talassemias

Nas β -Talassemias existe uma redução (β^+) ou ausência (β^0) de síntese de cadeias β globínicas.(19)(20)

Na maioria dos casos resulta de mutações pontuais no gene das cadeias β . Estão descritas mais de 800 mutações (Human Hemoglobin Variant (HbVar) database). (18)(19)(20)

A fisiopatologia resulta da redução ou ausência de síntese de cadeias β e do excesso relativo de cadeias α , que precipitam no eritrócito, lesando a membrana e agravando o fenótipo. (21)

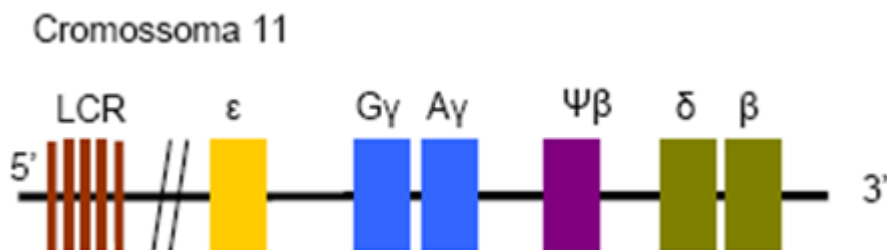


Figura 7: Locus do gene β globínico no braço curto do cromossoma 11.

Genes que codificam cadeias do tipo β – globínico, no cromossoma 11. Existe uma sequência reguladora, a LCR (Locus Control Region), que regula a transcrição dos genes épsilon (ϵ), gamma glicina (γ G), gamma adenina (γ A), delta (δ) e beta (β). Adaptado de: Brown, 2007.

Existem 3 tipos de β - Talassémia:

β - Talassémia *Minor*:

- Resulta de uma heterozigotia para mutações no gene β . Os portadores não têm doença, e são diagnosticados pela presença de anemia ligeira com VGM e HGM diminuídos e Hb A₂ > 3,5%.(22)

β - Talassémia *Major*:

- Também conhecida como Anemia de Cooley, resulta de uma homozigotia ou uma heterozigotia composta para mutações nos genes β , com muito pouca ou nenhuma cadeia β globínica a ser sintetizada, resultando numa anemia grave que se manifesta nos primeiros meses de vida, quando diminui a síntese de Hb F. A sobrevivência destes doentes depende de transfusões regulares de concentrado de eritrócitos, que lhes causam sobrecarga de ferro, necessitando de fazer quelação. (23)

β - Talassémia *Intermédia*:

- Resulta de uma homozigotia ou heterozigotia para mutações β^+ , apresenta aumento do baço, níveis de Hb entre 7-10 g/dl, anisopoiquilocitose acentuada. Existe um grande risco de sobrecarga de ferro devido à eritropoiese ineficaz.(18)(24)

A β -TI, quando comparada com a *Major*, tem um quadro clínico menos grave porque ainda são sintetizadas algumas cadeias β . A co-herança de fatores que estão associados ao aumento da produção de cadeias gamma (γ) melhora o fenótipo porque estas se ligam às cadeias α , formando a Hb F, e reduzindo assim o número de cadeias α livres que são muito lesivas para os eritrócitos.

A co-herança de α - Talassémia contribui também para reduzir o número de cadeias α em excesso, (18)(24) e pelo contrário, a co-herança de uma triplicação dos genes das cadeias α ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) agrava o fenótipo.

A dupla heterozigotia para mutações β^0 e triplicação de genes α ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) está associada a um quadro clínico de β -TI moderada. (25)(26)

- A heterozigotia para mutações β^0 no 3º exão do gene β também pode estar associadas a um quadro de β -TI, porque é sintetizado um mRNA longo e instável e/ou um polipeptídeo que não forma um tetrâmero com as cadeias α , e vão saturar os mecanismos proteolíticos da célula e causar eritropoiese ineficaz. (27)(28)

Em Portugal o fenótipo severo mais frequente é a β -TI, que tem genótipos heterogéneos associados a diferentes severidades.(10)

A esplenetomia é muitas vezes necessária no decorrer desta doença, frequentemente porque se desencadeia hiperesplenismo que agrava a anemia e causa trombocitopenia e neutropenia.(29)

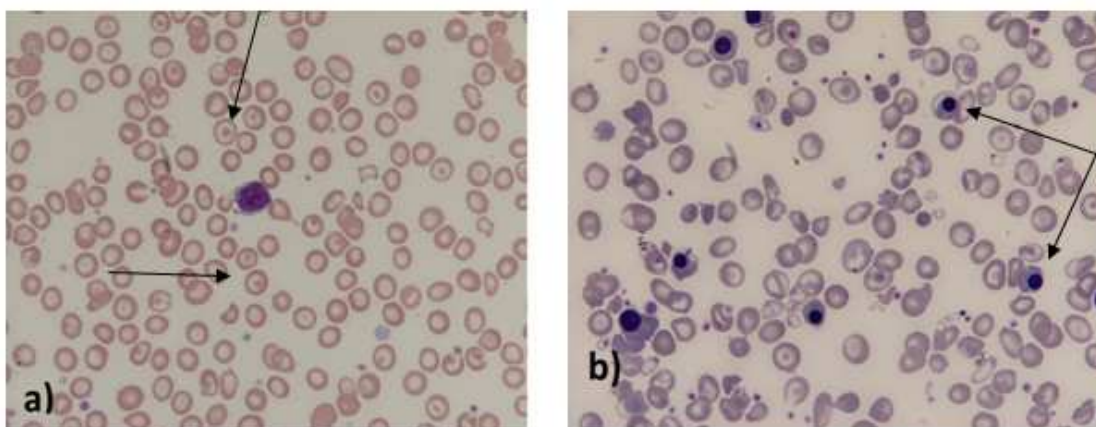


Figura 8: Esfregaços de SP de doentes β -TI corados pela técnica de May-Grünwald Giemsa, com uma ampliação de 500x.

8a) Esfregaço de um doente com β -Talassémia Intermédia moderada, Podem observar-se eritrócitos microcíticos e hipocrómicos e algumas células em alvo indicadas pelas setas.

8b) Esfregaço de β -Talassémia Intermédia de grande severidade, em que sobressai a presença de numerosos eritroblastos ortocromáticos. (Imagem obtida pela autora no Serviço de Hematologia).

1.3.3 Terapêutica com Quelantes de Ferro

O uso de quelantes de ferro melhorou de forma muito significativa a sobrevida e a qualidade de vida dos doentes com formas graves de β - Talassémia.(30)

O objetivo desta terapia é manter os níveis normais de ferro no organismo. Como a Hb nos eritrócitos é uma proteína rica em ferro, as transfusões regulares vão levar a um aumento de ferro no organismo que vai danificar muitos órgãos, nomeadamente o fígado, e o coração.

A quelação parental é a principal forma de terapia nestes doentes. A desferrioxamina (Desferal®) tem sido muito útil, revertendo a toxicidade e prolongando a expectativa de vida. No entanto, é necessário que esta droga seja infundida subcutaneamente durante 8 a 10 horas por dia, o que é muito desconfortável para os doentes.

A Deferiprone (L1) foi o primeiro quelante a ser utilizado por via oral. Sendo administrada por via oral, aumenta a adesão ao tratamento. No entanto, é uma substância tóxica que pode causar neutropenia e mesmo agranulocitose, necessitando de um controlo regular (10-10 dias) dos parâmetros hematológicos.(30)(31)

1.3.4 Alterações Genéticas

Como já referido anteriormente, as α - Talassémias são, principalmente, devidas a deleções genéticas, enquanto as β - Talassémias são causadas por mutações pontuais.

Mais de 800 mutações nos genes β (Human Hemoglobin Variant (HbVar) database) foram descritas até agora, sendo esta doença um importante exemplo de heterogeneidade alélica.

Estas alterações genéticas são identificadas por técnicas de biologia molecular, em especial pela sequenciação nucleotídica.

As diferentes mutações são divididas em vários grupos, conforme o local onde ocorrem e o tipo de alteração que provocam no processamento do RNA:

- **Mutações transcricionais:** estas mutações localizam-se na região promotora do gene β - globínico, sendo a maioria delas mutações pontuais na região *TATA Box* e nas duas sequências CACACC nas posições -90 e -105 em relação ao *CAP Site*.(32) Estas mutações nas regiões promotoras reduzem a taxa de transcrição do gene, no entanto, ocorre alguma síntese de cadeias β -globina, são mutações β^+ .(33)

- **Mutações que alteram o RNA *Splicing*:** estas mutações podem ocorrer nas *Splice Junctions*, nos *Introns*, *Exons* e *Criptic Splice Sites*. As ligações entre *Exons* e *Introns*, *Intervening Sequence (IVS)*, são marcadas por dinucleotídeos GT a 5', "local dador" e AG a 3 "local receptor". Mudanças numa única destas bases impedem o RNA *Splicing* normal, resultando numa ausência de síntese de cadeias normais - mutações β^0 . Existem mutações β^+ que envolvem a substituição de um nucleótido nas sequências adjacentes aos locais de *splicing*. Um exemplo desta substituição é a troca de uma timina por uma citosina na posição 6, frequente na população mediterrânica, inclusive na portuguesa. Existem também mutações que vão criar novos locais de *splicing* que também afetam o normal processamento do RNA. A substituição de uma guanina por adenina na posição 110 da IVS-1, também é uma das mutações mais comuns na região mediterrânea. (10) (32)

- Mutações que alteram a tradução do RNA mensageiro :

- Mutações Nonsense: substituições de bases que dão lugar a um codão de terminação prematuro. Um exemplo desta mutação ocorre no codão 39 e é muito comum na região mediterrânea; uma outra ocorre no codão 15 (TGG-TGA) e é comum na região centro.

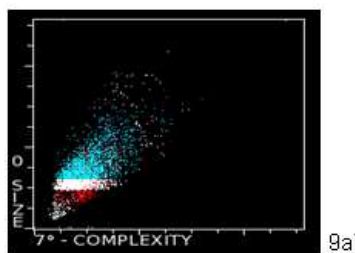
- Mutações Frameshift: inserção ou deleção de nucleótidos que fazem com que seja alterada a sequência de leitura do mRNA e seja produzida uma cadeia polipeptídica anormal. Em geral dá origem a um codão de terminação precoce. (10) (32)

1.4 Dificuldade na Contagem Automática de Leucócitos, usando diferentes Analisadores Hematológicos, em Doentes com β - TI

Nas β -TI há uma eritropoiese ineficaz, responsável pelo desenvolvimento da anemia. (24)(25)

Esta deseritropoiese vai fazer com que inúmeras células imaturas, os eritroblastos, sejam enviadas para a corrente sanguínea. Estas células, assim como outros eritrócitos com características anormais, quando passadas pelos analisadores hematológicos vão ser contadas como células nucleadas, ou seja como leucócitos, dando um nº muito elevado e que não corresponde ao valor real dos mesmos.

	10 ⁹ /L	%
WBC	211*	100,0
NEU	0,00*	0,00*
LYM	204*	96,5*
MONO	5,52*	2,61*
EOS	0,382*	0,181*
BASO	1,46*	0,690*



	10 ⁹ /L	%
WBC	18,2*	100,0
NEU	5,43*	29,8*
LYM	11,8*	64,7*
MONO	0,789*	4,33*
EOS	0,215*	1,18*
BASO	0,00*	0,00*

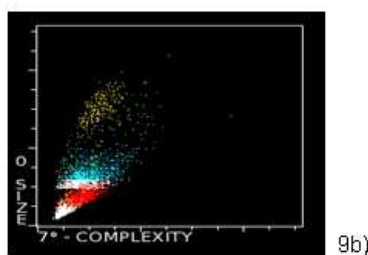


Figura 9: Parâmetros hematológicos de uma amostra de um doente com β - TI usando o analisador CELL-DYN SAPPHERE™.

DIFICULDADE NA QUANTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO AUTOMÁTICA DE LEUCÓCITOS EM DOENTES COM β -TALASSÊMIA INTERMÉDIA. RELAÇÃO GENÓTIPO / FENÓTIPO

9 a) a metodologia utilizada foi a contagem normal (CBC). A azul observam-se os linfócitos, a amarelo os neutrófilos, a vermelho os eritroblastos e a branco células resistentes à lise. Na respectiva tabela nota-se um valor de Leucócitos muito aumentado, linfocitose acentuada e ausência de neutrófilos. Não houve contagem e diferenciação leucocitária fiável.

9 b) metodologia (CBC+rRBC) para amostras com eritroblastos e outras células mais resistentes à lise. Nota-se correção na contagem leucocitária e diferenciação das células sanguíneas, observando-se neste caso diferenciação de neutrófilos (a amarelo).

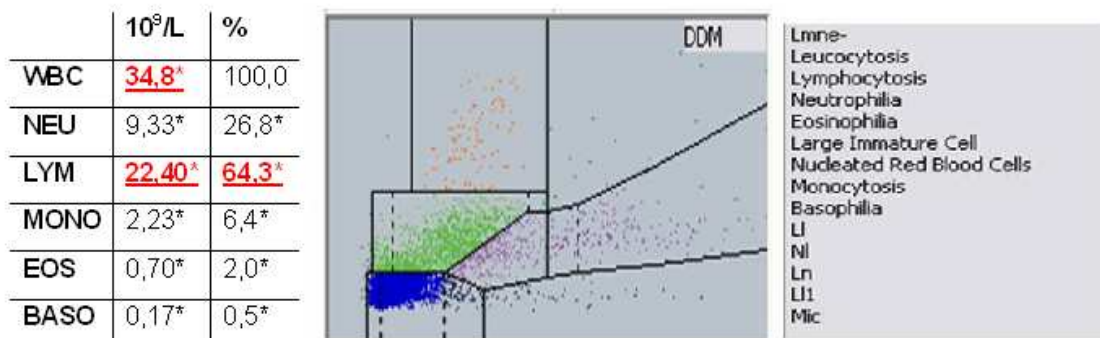


Figura 10: Parâmetros hematológicos de uma amostra de um doente com β - TI usando o analisador PENTRA DX 120.

A metodologia utilizada foi CBC. Na tabela observa-se o valor dos leucócitos elevado, marcando erro na contagem, sem diferencial leucocitário fiável. A azul identificam-se os linfócitos, a roxo os monócitos, a verde os neutrófilos e a laranja os eosinófilos. Observam-se as “flags” que indicam a existência de várias alterações na contagem e diferencial de leucócitos.

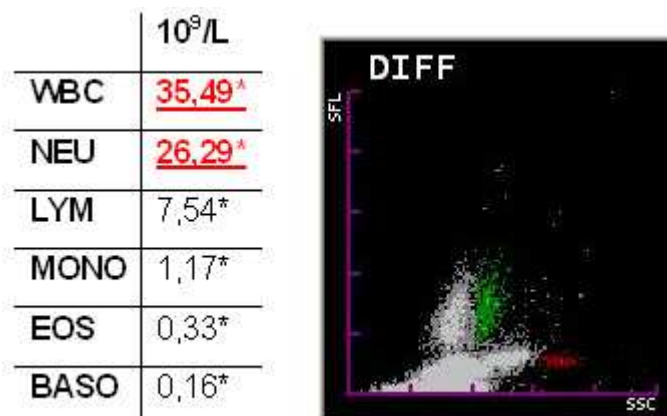


Figura 11: Parâmetros hematológicos de uma amostra de um doente com β - TI usando o analisador Sysmex XT-1800i.

A metodologia utilizada foi CBC normal. Na tabela observa-se um valor de leucócitos muito elevado, com neutrofilia acentuada. Não existe diferenciação leucocitária fiável.

DIFICULDADE NA QUANTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO AUTOMÁTICA DE LEUCÓCITOS EM DOENTES COM β -TALASSÊMIA INTERMÉDIA. RELAÇÃO GENÓTIPO / FENÓTIPO

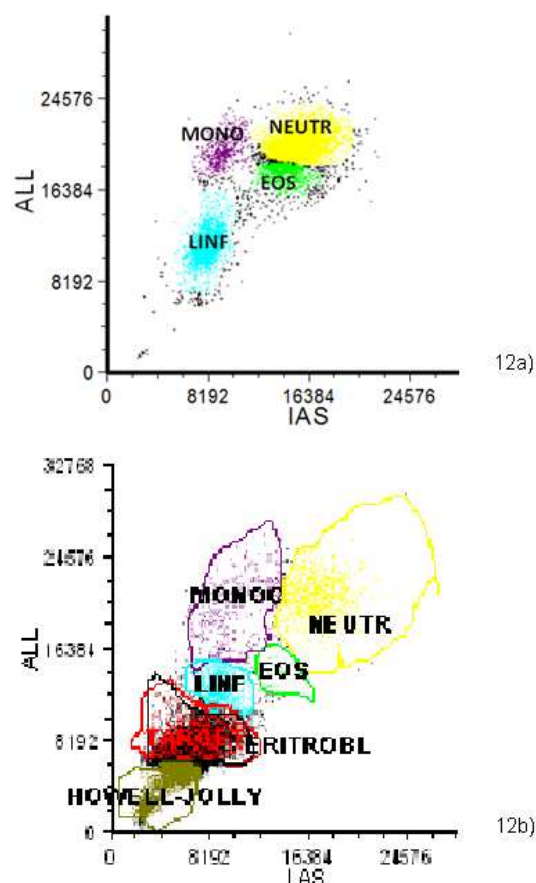


Figura 12: Parâmetros hematológicos de uma amostra normal e de um doente com β - TI, no programa FCS.

12 a) Diferencial leucocitário de uma amostra normal, com os neutrófilos a amarelo, os eosinófilos a verde, os linfócitos a azul e os monócitos a roxo.

12 b) Diferencial leucocitário de uma amostra de um doente com β - TI, com as células interferentes (os eritroblastos, as células em alvo e os eritrócitos com corpos de Howell-Jolly) a não permitirem a correta contagem leucocitária.

1.5 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi encontrar uma metodologia fiável para contagem e diferenciação automática de leucócitos em doentes com β - TI.

1.5.1 Objetivos específicos

- Criar um algoritmo para efetuar a correção do número de leucócitos em amostras com (eritroblastos/100 leucócitos) >10.

DIFICULDADE NA QUANTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO AUTOMÁTICA DE LEUCÓCITOS EM DOENTES COM β -TALASSÊMIA INTERMÉDIA. RELAÇÃO GENÓTIPO / FENÓTIPO

- Relacionar genótipo das β - TI com as maiores ou menores alterações na contagem diferencial leucocitária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 População

Para a realização deste estudo foram utilizadas 21 amostras de doentes com β -TI, do Serviço de Hematologia-HG/HP do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no período compreendido entre Setembro de 2011 a Setembro de 2012. Estes doentes são de ambos os sexos e várias idades.

Dos 21 doentes, 12 eram do sexo feminino (57%) e 9 do sexo masculino (43%).

Estas amostras foram divididas em dois grupos:

- Grupo I: homozigotia c.92+6T>C (IVSI-6) e homozigotia -90C>T - 14 amostras;
- Grupo II: heterozigotia [c.317delT (CD106 -T); dupla heterozigotia c.46delT (CD15 -T) + $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e dupla heterozigotia c.92+1G>A (IVSI-1) + $\alpha\alpha/\alpha\alpha$] - 7 amostras.

Os procedimentos efetuados, encontram-se de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia, assegurando o consentimento informado, máxima proteção dos doentes, confidencialidade dos dados obtidos, assim como boas práticas laboratoriais.

2.2 Material Biológico

A componente laboratorial deste estudo foi executada no Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. As amostras de SP foram colhidas em tubos de ácido etilenodiaminatetracético tripotássico (EDTA_{K3}).

2.3 Analisador Hematológico

Os analisadores hematológicos são os principais equipamentos de um laboratório de hematologia, tendo a capacidade de fazer a contagem de células sanguíneas de uma maneira exata e precisa.

O CELL-DYN SAPPHERE™ é um analisador hematológico automatizado, projetado para a contagem e caracterização das células sanguíneas. Este aparelho é adequado às necessidades de um laboratório de hematologia. Incorpora ensaios monoclonais, oferece uma coloração fluorescente e uma análise óptica de plaquetas.

Este aparelho utiliza citometria de fluxo óptica/fluorescência em combinação com impedância elétrica aplicando a metodologia MAPSS[®] (*multi-angle polarized scatter separation*), pela junção da informação obtida pela dispersão de luz por um laser em quatro ângulos diferentes e da medição de fluorescência a diferentes comprimentos de onda, em que cada evento de célula nucleada é classificada numa das cinco subpopulações de leucócitos ou como glóbulos vermelhos nucleados (NRBC). A metodologia utilizada para o processamento das amostras foi a *CBC Resistant (R)*, no qual o aparelho prolonga a exposição dos eritrócitos ao reagente de lise, útil quando existem glóbulos vermelhos com uma relativa resistência à lise e que dificultam a análise diferencial.(34)

2.3.1 Princípio MAPSS[®] (*multi-angle polarized scatter separation*)

O citograma MAPSS mostra grupos individualizados de células caracterizados por diferentes cores, após análise de célula a célula.

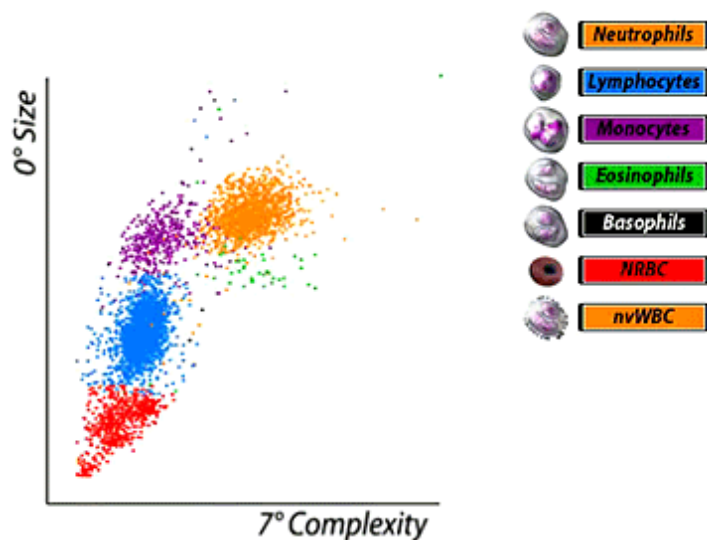


Figura 13: Citograma MAPSS de tamanho versus complexidade.

Apresenta grupos individualizados de células caracterizados por diferentes cores, após análise célula a célula. Assim as células de menor tamanho e menor complexidade, aparecem no canto inferior esquerdo do gráfico com a cor vermelha, correspondendo aos eritroblastos (NRBC); a população azul corresponde aos linfócitos; a branca corresponde aos basófilos; a verde aos eosinófilos; a laranja aos neutrófilos e a violeta aos monócitos. (imagem retirada do manual do CELL-DYN SAPPHIRE).

2.3.2 Princípio MAPSS® - Gráficos FL3-DNA

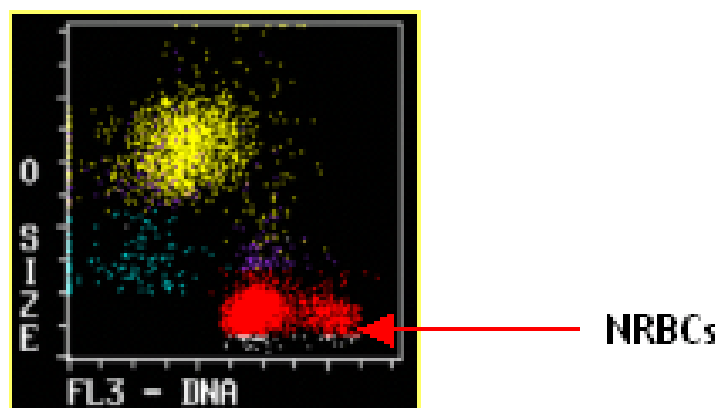


Figura 14: Diferenciação de células por tamanho (0 Size) e fluorescência de DNA (FL3-DNA).

Utilizando uma fluorescência vermelha, marcação com Iodeto de Propídio (PI), cada amostra é analisada para a presença de NRBCs, que são enumeradas como uma subpopulação de células nucleadas únicas. As células a azul são linfócitos enquanto as células de cor amarela são neutrófilos. As células a violeta e as amarelas desviadas para a direita são células destruídas ou mortas. (imagem retirada do manual do CELL-DYN SAPPHIRE)

2.4 FCS Express 4

O FCS Express 4 é um avançado *software* de citometria de fluxo, que permite a análise de dados avançada e consequente apresentação com exportação direta para PowerPoint (PPT), PDF, Excel, Word e do Microsoft Office, incluindo a utilização de gráficos de cor, sobreposições ilimitadas, estatísticas ampliadas e relatórios personalizados.

2.5 Correção do Valor dos Leucócitos pelo Método Manual

Os eritrócitos mais resistentes aos agentes lisantes utilizados nos analisadores automáticos, como é o caso das células em alvo e os eritroblastos, afetam a contagem do número total de leucócitos e seu diferencial. Para esta correção do valor real de leucócitos é utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Valor corrigido de leucócitos} = \frac{100 \times \text{leucócitos do analisador}}{100 + [\text{eritroblastos}/100 \text{ leucócitos (analisador)}]^*}$$

Em que, * **[eritroblastos/100 leucócitos (analisador)]**, é dado automaticamente pelo analisador automático no parâmetro NR/W (nº de eritroblastos por cada 100 leucócitos).

A partir do valor de leucócitos corrigido, pode calcular-se o diferencial leucocitário. Esta correção é feita em amostras em que o número de eritroblastos é $>10/100$.(35)

2.6 Determinação do Haplótipo do Cluster do gene β - Globínico (*HBB*) e sua Sequenciação

As informações das alterações moleculares das amostras em estudo foram fornecidas por um médico Hematologista não tendo sido necessário efectuar qualquer metodologia para o efeito.

2.7 Controlo de Qualidade

O controlo de Qualidade Interno foi efectuado diariamente, de acordo com o manual de procedimentos do fabricante. O controlo de Qualidade Externo UKNEQAS- (*United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for General Haematology*) foi efectuado mensalmente.

2.8 Análise Estatística

Utilização dos programas GraphPad Prism® 5 for Windows e *StatView 5.0*, aplicando os testes : t de Student para amostras emparelhadas, teste do χ^2 e teste de Correlação de Pearson.

3. RESULTADOS

Foram efetuadas as contagens de leucócitos utilizando o analisador hematológico CELL-DYN SAPHIRE™ (modo automático), utilizando também o programa FCS e fazendo a correção deste valor pelo método manual, usando a fórmula descrita por Rodak.

Tabela 1: Contagem de leucócitos por metodologias: Automática, FCS e Correção Manual.

<i>n = 21</i>	<i>Leucócitos x10⁹ L</i>		
Amostras	Automática	FCS	Manual
1	26,3	10,09	12,95
2	38,4	11,41	23,28
3	27,6	4,31	11,3
4	4,46	4,46	4,46
5	42,9	17,28	33,88
6	41,7	10,34	25,93
7	50,8	15,83	37,62
8	11,8	1,51	4,37
9	22,5	6,01	16,91
10	3,61	3,61	3,61
11	47,5	7,75	23,97
12	6,00	1,09	5,41
13	50,7	14,81	30,01
14	40,1	9,76	23,91
15	4,30	4,30	4,30
16	7,05	7,05	7,05
17	13,2	1,31	3,44
18	27,9	5,59	17,54
19	7,86	7,86	7,86
20	5,37	5,37	5,37
21	3,36	3,36	3,36
Média	23,02	7,29	14,60
Máximo	50,80	17,28	37,62
Mínimo	3,36	1,09	3,36

Comparadas as metodologias automática (A), FCS e correção manual (M), com a utilização do teste *t de Student* para amostras emparelhadas, obtiveram-se diferenças estatísticas significativas entre todas elas, verificando-se a maior diferença entre a metodologia A/FCS o $t=5,077$ (Tabela 2).

Tabela 2: Teste t de Student para os resultados entre as diferentes metodologias utilizadas na contagem de leucócitos.

	p^*	t
A/FCS	< 0,0001	5,077
A/M	< 0,0001	4,943
FCS/M	= 0,0002	4,604

* $p < 0,05$ estatisticamente significativo

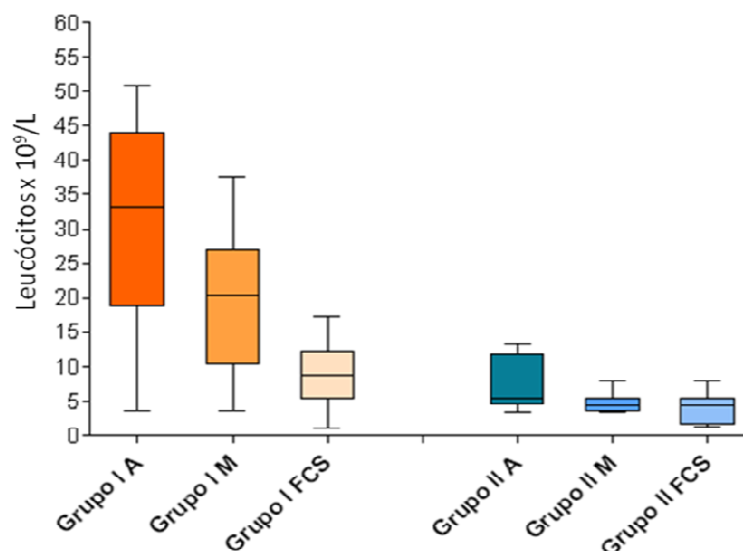


Gráfico 1: Contagem de "Leucócitos", por metodologia automática (A), manual (M) e FCS vs Grupo I e Grupo II.

Número dos Leucócitos nas amostras de doentes com β -TI. (**Mínimo=Min, Máximo=Max, Mediana=Med**)

Grupo I: $n=14$, (A) Min.:3,61, Max.:50,80, Med.: 33,15; (M) Min.: 3,61, Max.: 37,62, Med.: 20,41; (FCS) Min.: 1,09, Max.: 17,28, Med.: 8,75.

Grupo II: $n=7$, (A) Min.: 3,36, Max.: 13,20, Med.: 5,37; (M) Min.:3,36, Max.:7,86, Med.: 4,37; (FCS) Min.: 1,31, Max.:7,86, Med.: 4,30.

DIFICULDADE NA QUANTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO AUTOMÁTICA DE LEUCÓCITOS EM DOENTES COM β -TALASSÊMIA INTERMÉDIA. RELAÇÃO GENÓTIPO / FENÓTIPO

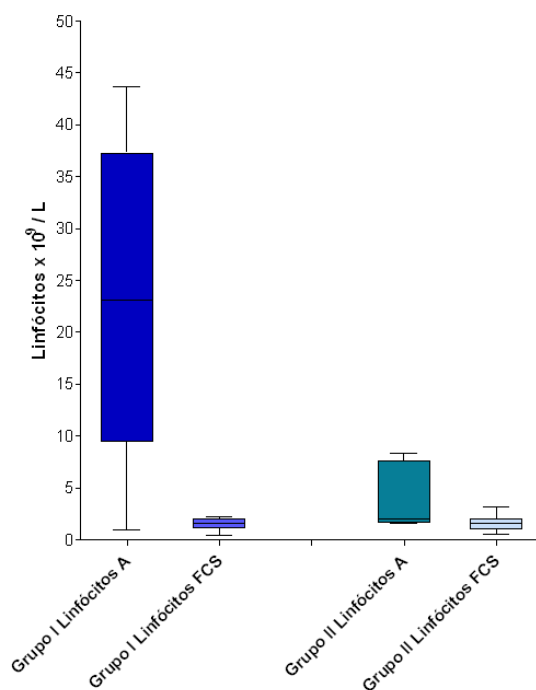


Gráfico 2: Contagem de Linfócitos por metodologia automática e FCS vs Grupo I e Grupo II.

Número de Linfócitos nas amostras dos doentes com β TI .

Grupo I: n= 14, (A)Min.: 0.95, Max.: 43.70, Med.: 23.15; (FCS) Min.: 0.44, Max.: 2.25, Med.: 1.55.

Grupo II: n=7, (A) Min.: 1.53, Max.: 8.31, Med.: 2.03; (FCS) Min.: 0.51, Max.: 3.14, Med.: 1.63.

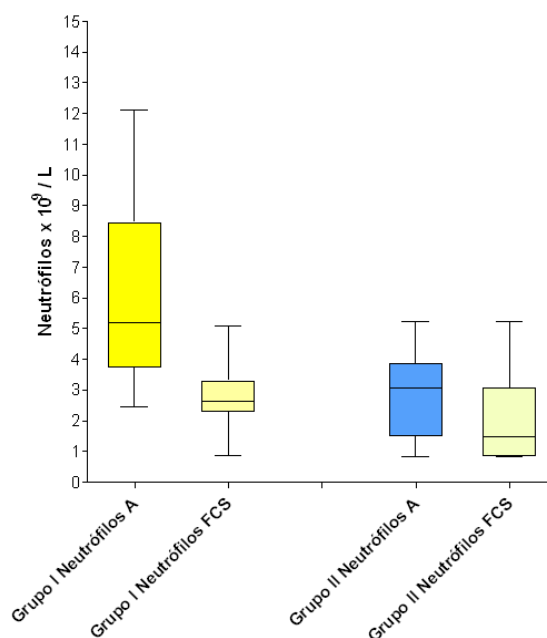


Gráfico 3: Contagem de Neutrófilos por metodologia automática e FCS vs Grupo I e Grupo II.

Número de Neutrófilos nas amostras dos doentes com β TI - Grupo I.

Grupo I: n=14, (A)Min.: 2.44, Max.: 12.10, Med.: 5.18; (FCS) Min.: 0.86, Max.: 5.10, Med.: 2.62.

Grupo II: n=7, (A) Min.: 0.81, Max.: 5.230, Med.: 3.07; (FCS) Min.: 0.81, Max.: 5.23, Med.: 1.47.

4. DISCUSSÃO

A quantificação e a diferenciação leucocitária nos analisadores hematológicos, em certas patologias, é de muito difícil execução e geralmente os valores estão bastante aumentados.

Foram utilizadas três metodologias na contagem dos leucócitos em amostras de doentes com β -TI (Tabela 1) e comparados os valores obtidos (Tabela 2). Para tal utilizou-se o teste t de Student para amostras emparelhadas, verificando-se diferenças estatisticamente significativas, $p < 0,0001$, sendo a maior diferença ($t=5,077$) observada na comparação entre as metodologias automática e FCS.

Rodak, 1995, (35), criou uma fórmula para a correção da contagem de leucócitos nas situações em que o número de eritroblastos contados por cada 100 leucócitos fosse superior a 10. Esta fórmula baseava-se em contagens manuais de eritroblastos em esfregaços de sangue periférico. Nas β -TI além dos eritroblastos, existem outros interferentes (eritroblastos, células em alvo e eritrócitos com corpos de Howell-Jolly). Por este motivo tornou-se necessário fazer uma modificação da fórmula de Rodak (35). Os novos contadores hematológicos automáticos já nos fornecem o valor dos eritroblastos por 100 leucócitos (NR/W) pelo que foi preciso eliminar apenas a contagem dos outros interferentes. Para o efeito recorreu-se então ao programa FCS (Fig.12), que permite diferenciar os linfócitos, dos neutrófilos, dos basófilos e dos eosinófilos, separando nitidamente estes dos referidos interferentes. A obtenção destes resultados, será depois, utilizada na criação de um algoritmo para correção da contagem de leucócitos em situações de β -TI e provavelmente de outras patologias (Objetivo principal deste estudo). Nas amostras do Grupo I, constituído por doentes com homozigotia ou heterozigotia composta com um genótipo de [c.92+6T>C (IVSI-6); -90C>T], de acordo com Douglas R. Higgs (15) em que refere existir acentuada deseritropoiese e hemólise, porque são doentes esplenetomizados, com hiperplasia medular, aumentando a anisopoiquilocitose, sendo as células imaturas como os eritroblastos e as células com inclusões (corpos de Howell-Jolly) enviadas para o sangue periférico, contaminando assim as contagens. Motivo que justifica ser a metodologia automática a que apresentou valores mais elevados de “leucócitos” quando comparada com as outras duas metodologias usadas (Gráfico 1). Observa-se melhor correção pela metodologia FCS quando comparados os valores de Leucócitos com a metodologia manual.

A diminuição no valor dos leucócitos no Grupo II, pela metodologia FCS, também existiu, sendo, no entanto menos acentuada (Gráfico 1) devido ao melhor fenótipo apresentado pelas amostras deste grupo.

Em relação à contagem dos linfócitos nos grupos I e II optou-se por relacionar apenas as metodologias A e FCS, pelos motivos atrás referidos, ou seja haver melhor correção pela metodologia FCS. A metodologia utilizada para o processamento das amostras foi a *CBC Resistant (R)* que prolonga a exposição dos eritrócitos ao reagente de lise, útil quando existem glóbulos vermelhos com uma relativa resistência osmótica dificultando a análise diferencial. Cell-Dyn Sapphire™ Operator's Manual. ABBOTT DIAGNOSTICS, 2009. (34)

Os linfócitos encontram-se muito aumentados no Grupo I verificando-se significativa diminuição quando executada a correção no FCS (Gráfico 4). Segundo Rodak (35), esta diferença existe porque na metodologia automática, as células interferentes são contadas como pequenos linfócitos.

Tal como aconteceu com a contagem dos leucócitos (Gráfico 1) verificou-se também uma diminuição dos valores, linfócitos no Grupo II (Gráfico 5), menos acentuada.

Inexplicavelmente, observou-se uma contagem aumentada de neutrófilos num dos analisadores, Sysmex XT-1800i (Figura 15).

Em relação ao resultado da contagem dos neutrófilos (Gráfico3), estão aumentados, para o Grupo I, não se verificando, como expectável, uma diferença tão acentuada como no caso dos linfócitos.

Os doentes com β -TI são sujeitos a terapêutica com quelantes de ferro, *deferiprone* e *deferoxamine* (31). Estes fármacos apresentam como efeito secundário neutropenia, pelo que a contagem correta do número de neutrófilos neste tipo de amostras é essencial, citando Alan R. Cohen et al (31), para uma boa adequação terapêutica.

5. CONCLUSÃO

As amostras de sangue de doentes com β -TI podem apresentar alterações no hemograma, geralmente em relação à contagem e diferenciação leucocitária, tornando-se pertinente a correção destas anomalias com vista à elucidação da situação clínica e posterior ação terapêutica.

Para o efeito foram estudadas várias metodologias verificando-se que a correção efetuada no programa FCS tem maior eficácia na eliminação de interferentes, tais como células em alvo, eritrócitos com inclusões (corpos de Howell-Jolly) e eritroblastos. A partir desta metodologia foi criado um algoritmo (figura 15) para ser utilizado no processamento deste tipo de amostras. Poderá ser alargado o seu uso a outro tipo de patologias em que se verifiquem os mesmos pressupostos, outras hemoglobinopatias esplenetomizadas e enzimopatias tipo défice de Piruvato Cinase severa e défice de Pirimidina 5' Nucleotidase.

Verificou-se ainda que as amostras componentes do Grupo I, com genótipo de [c.92+6T>C (IVSI-6) ou -90C>T] apresentaram maiores alterações na contagem diferencial leucocitária visto apresentarem fenótipo mais severo e a maioria pertencerem a doentes esplenetomizados.

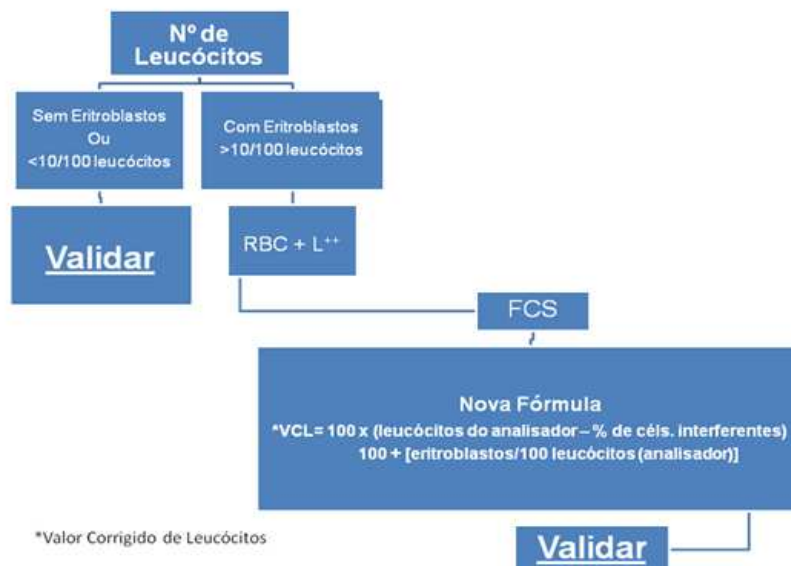


Figura 16: Algoritmo de correção do nº de leucócitos.

Para casos em que as amostras processadas nos analisadores automáticos apresentem número significativo de células da série eritroide resistentes à lise normal, (contagem de eritroblastos superior a 10 por cada 100 leucócitos).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diggs L., Bell A., Sturm D. The morphology of human blood cells. ABBOTT DIAGNOSTICS; 2003. p. 121.
2. Ciesla B. Hematology in practice. F. A. DAVIS COMPANY- Philadelphia; 2007. p. 348.
3. Granick J.L., Simon S.I., Borjesson D.L. Hematopoietic stem and progenitor cells as effectors in innate immunity. Bone marrow research. 2012 Jan;2012:165107.
4. Serroukh Y., Djebara S., Lelubre C., Zouaoui B.K., Biston P., Piagnerelli M. Alterations of the Erythrocyte Membrane during Sepsis. Critical care research and practice. 2012 Jan;2012:702956.
5. Alnaeeli M., Wang L., Piknova B., Rogers H., Li X., Noguchi C.T. Erythropoietin in brain development and beyond. Anatomy research international. 2012 Jan;2012:953264.
6. Hoffbrand A.V., P.A.H. Moss and IEP-. Essential Hematology. 5th ed. Clinical and Laboratory Haematology. 2002. p. 195–195.
7. Walker H., Hall W., Hurst J., Lynch E. Peripheral Blood Smear. 1990;
8. Tkachuk D., Hirschmann J. Genetic heterogeneity of β - thalassemia in populations of the Iberian peninsula.Hemoglobin. 1st ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2006;329.
9. Guvenc B., Canataroglu A., Unsal C. β -Thalassemia mutations and hemoglobinopathies in Adana, Turkey: results from a single center study. 2012;8(3):414.
10. Ribeiro, L., Gonçalves, P., Cunha, E., Bento, C., Almeida, H., Pereira, J., Martín-Nuñez, G. & Tamagnini GP. Genetic heterogeneity of β - thalassemia in populations of the Iberian peninsula.Hemoglobin. Hemoglobin. 1997;21:261–9.
11. Efremov G. Thalassemias and other hemoglobinopathies in Former Yugoslavia. 2008;1:11–26.
12. Arora N., Daley G.Q. Pluripotent stem cells in research and treatment of hemoglobinopathies. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2012 Apr;2(4):a011841.
13. Moiz B., Hashmi M.R., Nasir A., Rashid A., Moatter T. Hemoglobin E syndromes in Pakistani population. BMC blood disorders. BioMed Central Ltd; 2012 Jan;12(1):3.
14. Ghansah A., Rockett K., Clark T.G., Wilson M.D., Koram K., Oduro A.R., et al. Haplotype analyses of haemoglobin C and haemoglobin S and the dynamics of the

- evolutionary response to malaria in Kassena-Nankana District of Ghana. PloS one. 2012 Jan;7(4):e34565.
15. Higgs D.R. Ham-Wasserman Lecture Gene Regulation in Hematopoiesis: New Lessons from Thalassemia. 2004;(Mcv):1–13.
 16. Lyrakos G.N., Vini D., Aslani H., Drosou-Servou M. Psychometric properties of the Specific Thalassemia Quality of Life Instrument for adults. Patient preference and adherence. 2012 Jan;6:477–97.
 17. Caocci G., Efficace F., Ciotti F., Roncarolo M.G., Vacca A., Piras E., et al. BMC blood disorders. 2012 Jan;12:6.
 18. Fucharoen S., Winichagoon P. Haemoglobinopathies in southeast Asia. The Indian journal of medical research. 2011. p. 498–506.
 19. Galanello R., Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet journal of rare diseases. 2010 Jan;5:11.
 20. Cao A., Moi P., Galanello R. Recent advances in β -thalassemias. Pediatric reports. 2011 Jun 16;3(2):e17.
 21. Constanço M.C, Rocha P., Bento C., Ribeiro L. HMS. Talassémia β -Heterozigótica. Acta Med Port. 2011;633–6.
 22. Simin Sadeghi-Bojd, Mohammad Hashemi M.N., Shikhani S. Kidney Function Tests in Children with Beta-Thalassemia Minor in Zahedan, Southeast of Iran. 2011;4–6.
 23. Baldini M. Thalassemia major: the present and the future. North American journal of medical sciences. 2012 Mar;4(3):145–6.
 24. Musallam K.M., Taher A.T., Rachmilewitz E. β -Thalassemia Intermedia: A Clinical Perspective. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2012 Jul;2(7):a013482.
 25. Taher A., Isma'eel H., Cappellini M.D. Thalassemia intermedia: revisited. Blood cells, molecules & diseases. 2006;37(1):12–20.
 26. Liu Y.T., Old J.M., Miles K., Fisher C., Weatherall D.J, Clegg J.B. Rapid detection of alpha-thalassaemia deletions and alpha-globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. British journal of haematology. 2000 Feb;108(2):295–9.
 27. Bain B.J. Hemoglobinopathy Diagnosis. 2nd ed. Blackwell Publishing Ltd; 2004.
 28. Kazazian H.H., Dowling C.E., Hurwitz R.L., Coleman M., Stopeck A., Adams J.G. Dominant thalassemia-like phenotypes associated with mutations in exon 3 of the beta-globin gene. Blood. 1992 Jun 1;79(11):3014–8.
 29. Hoffman R., Edward J. Benz, Bruce Furie SJS. Hematology – Basic principles and practice. 2008. p. 2560.

30. Al. ON et. Long-term safety and effectiveness of iron-chelation therapy with deferiprone for thalassemia major. *New Engl J Med.* 1998;417–23.
31. Cohen A.R, Galanello R., Pennell D.J., Cunningham M.J., Vichinsky E. Thalassemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology.* American Society of Hematology. Education Program. 2004 Jan;14–34.
32. Olivieri N.F. The β -Thalasseмииs. *New England J Med.* 1999;341:99–109.
33. Huishman H.J, Carver M.F.H BE (ed). *Syllabus of Thalassemia Mutations.* Atlanta, The Sickle Cell Anemia Foundation. 1997;
34. *Cell-Dyn Sapphire™ Operator's Manual.* ABBOTT DIAGNOSTICS; 2009.
35. Rodak. The Presence of Circulating NRBC's. *Diagnostics Hematology.* 1995;132.