

# **Avaliação de parâmetros hematológicos e celulares a partir de *Buffy Coats***

**Leonel Leandro Mendes**

**Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Ciências e  
Técnicas Laboratoriais Forenses**

**Gandra, Dezembro de 2021**

**Leonel Leandro Mendes**

**Avaliação de parâmetros hematológicos e celulares a  
partir de *Buffy Coats***

**Dissertação conducente ao Grau de Mestre em Ciências e  
Técnicas Laboratoriais Forenses**

Trabalho realizado sob Orientação da

Professora Doutora Alexandra Viana da Costa e Mestre Maria Fernanda Beirão

## **Declaração de Integridade**

Eu, Leonel Leandro Mendes, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração desta tese.

Confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele).

Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

O estudante

---

Leonel Leandro Mendes

À minha mãe, Virgínia Mendes e irmão José Alberto

(em Memória)

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me ter concedido o dom da vida e sabedoria, para permitir a realização deste sonho.

À minha família, fonte de conforto, pelo apoio, força, coragem e confiança transmitidas nos momentos decisivos da minha vida, o meu muito obrigado.

À minha esposa que tudo tem feito para me confortar durante os 2 anos de formação, aos meus filhos, sem eles nenhuma das minhas conquistas seriam possíveis.

À minha orientadora, digníssima Professora Doutora Alexandra Viana da Costa e à co-orientadora Mestre Maria Fernanda Beirão que me acolheram de braços abertos e foram sempre compreensivas, pela ajuda moral, didática e sábia orientação para a realização da presente tese.

À Professora Doutora Maria dos Prazeres Gonçalves pela enorme ajuda na última fase de escrita da minha tese, transformando dados numéricos em correlações significativas. Bem-haja!

Ao Instituto Superior Politécnico de Benguela (ISPB) que apostou em mim, na pessoa do Mestre Amaro Ricardo Segunda e da Mestre Mariele Santa Rita da Silva Luís, que tudo têm feito para o crescimento do meu nível académico, do incentivo à investigação em saúde e não só, traduzidos no fortalecimento de competências gerais, mas também no aperfeiçoamento da minha personalidade.

Agradecimento ao Centro Hospitalar Universitário São João (SHUJS) na pessoa da Doutora Elsa Meireles pelo fornecimento de Buffy Coats, e pela sua colaboração e disponibilidade.

Aos Professores da CESPUIUCS pela sapiência, na transmissão de conhecimentos.

À funcionária do laboratório Paula Abreu e à Professora Fernanda, pela paciência que tiveram durante a minha pesquisa.

A todos os colegas de caminhada, pelo carinho e apoio recebido durante a convivência académica, especialmente ao Válder Tempura, que foi um elemento bastante preponderante.

E a todas as pessoas que fizeram parte das minhas experiências pessoais e que, de alguma forma, tornaram oportunidades de ensino em experiências de verdadeira aprendizagem.



## Resumo

O sangue é um tipo especial de tecido conjuntivo, associando várias funções, como o transporte de nutrientes e gases respiratórios, assim como, atuando ao nível da defesa do organismo através de células bem específicas. O sangue é uma mistura de diversas células em suspensão num líquido denominado plasma, que representa cerca de 55% da sua composição e onde as células sanguíneas, que constituem cerca de 45%, são eritrócitos ou glóbulos vermelhos, leucócitos ou glóbulos brancos e plaquetas.

A importância do sangue como elemento de vida, encontra-se igualmente no seu uso em aplicações clínicas, nomeadamente, nas transfusões, na recolha diferenciada de certos elementos sanguíneos para o tratamento específico de determinadas doenças do foro hematológico, ou ainda, na aplicação em imunoterapias.

O nosso objetivo foi o de avaliar em vários *buffy coats* de dadores saudáveis, do CHUSJ, um conjunto de parâmetros celulares de referência, nomeadamente, a contagem de eritrócitos, de reticulócitos, associado ao valor de reticulócitos corrigido (VRC) e ao índice de produção de reticulócitos (IPR), bem como, a análise da morfologia das populações eritrocitária e leucocitária. Por outro lado, optou-se por uma análise quantitativa por citometria de fluxo de sub-populações linfocitárias, TCD4+, TCD8+ e linfócitos B, avaliando os parâmetros de perda da viabilidade celular ao longo de um *timing* de 7 dias e a sua concentração percentual, de forma a explorar o grau de variabilidade/integridade e degradação dos BC num determinado período de tempo.

No nosso estudo e, no que respeita ao valor do IPR, valor mais representativo da atividade medular, verificou-se que a maioria dos dadores (84,6%) apresentou como resultado um valor de IPR  $\Rightarrow$ 3, o que denota uma resposta aumentada à solicitação do organismo à dádiva.

Da análise das populações linfocitárias foi possível constatar uma redução da viabilidade celular e da percentagem de células, ao longo do período de tempo estudado.

Palavras chave: *buffy coats*, reticulócitos, IPR, linfócitos, citometria de fluxo

## Abstract

Blood is a special type of connective tissue which associates several functions such as the transport of nutrients and respiratory gases, as well as, acting at the level of the body's defense through very specific cells.

Blood is a mixture of several cells suspended in a liquid called plasma, which represents about 55% of its composition and where blood cells, which constitute about 45%, are erythrocytes or red blood cells, leukocytes or white blood cells and platelets.

The value of blood as an element of life is also found in its use in clinical applications, namely, in transfusions, in the differentiated collection of certain blood elements for specific treatments of certain haematological diseases, or even, for application in immunotherapies.

Our objective was to evaluate in several *buffy coats*, from healthy donors from CHUSJ, a set of cellular reference parameters, namely, erythrocyte and reticulocyte count, associated with corrected reticulocyte value (VRI) and reticulocytes production index (RPI), as well as the erythrocyte and leukocyte population morphology analysis. On the other hand, we aimed for a quantitative flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations, TCD4+, TCD8+ and B lymphocytes, by assessing cell viability loss, over 7 days, and its percentual concentration, to explore the degree of variability/integrity and degradation of BC in a given period.

In our study, and concerning the RPI value, the most representative value of spinal cord activity, it was found that most donors (84.6%) presented a result of PRI value  $\Rightarrow 3$ , which denotes an increased response to the organism's request for a donation. The lymphocyte population analysis showed both a reduction in cell viability as well as in the percentage of cells over the studied time period.

Key words. *buffy coats*, reticulocytes, IPR, lymphocytes, flow cytometry

# Índice geral

|   |     |
|---|-----|
| Índice de Figuras .....   | XI  |
| Índice de Tabelas .....   | XV  |
| Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos .....   | XVI |
| INTRODUÇÃO.....   | 1   |
| 1. Sangue .....   | 1   |
| 1.1. Características gerais do sangue e seus constituintes .....                        | 2   |
| 1.1.1. Plasma.....  | 5   |
| 1.1.2. Eritrócitos .....  | 6   |
| 1.1.2.1. Alterações morfológicas do eritrócito .....                                    | 10  |
| 1.1.2.2. Eritrócitos vs reticulócitos - características e ontogenia/ função biológica.. | 22  |
| 1.1.3. Plaquetas.....   | 23  |
| 1.1.4. Leucócitos.....  | 24  |
| 1.1.4.1. Leucócitos: ontogenia e morfologia .....                                       | 26  |
| 1.1.4.2. Leucócitos não-granulocíticos .....  | 31  |
| 1.1.4.3. Ontogenia dos linfócitos B e T.....  | 32  |
| II. OBJETIVOS .....   | 37  |
| 2.1. Objetivo geral .....   | 37  |
| 2.1.1. Objetivos específicos.....   | 38  |
| 2.2. Hipóteses .....  | 39  |
| III. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 40  |



|   |    |
|---|----|
| 3.1. Reticulócitos: método de coloração e realização dos esfregaços .....                       | 41 |
| 3.1.1. Método de contagem e determinação do número de reticulócitos .....                       | 42 |
| 3.1.2. Reticulócitos corrigidos e índice de produção de reticulócitos .....                     | 43 |
| 3.2. Esfregaços sanguíneos: coloração de Wright .....   | 44 |
| 3.2.1. Determinação da fórmula leucocitária: avaliação morfológica das células sanguíneas.....  | 47 |
| 3.3. Separação e isolamento de leucócitos .....   | 48 |
| 3.3.1. Procedimento para isolamento de leucócitos totais do sangue.....                         | 48 |
| 3.3.2. Procedimento para a contagem das células e determinação da viabilidade celular .....     | 49 |
| 3.3.3. Separação/isolamento de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) .....                 | 49 |
| 3.3.4. Separação/isolamento das células mononucleares do sangue em gradiente de densidade ..... | 50 |
| 3.4. Citometria de fluxo.....   | 51 |
| 3.4.1. Procedimento para caracterização fenotípica de linfócitos .....                          | 51 |
| 3.5. Reagentes.....   | 52 |
| 3.6. Análise estatística .....  | 53 |
| IV. RESULTADOS .....  | 54 |
| V. DISCUSSÃO .....  | 69 |
| VI. CONCLUSÃO .....   | 80 |
| VII. BIBLIOGRAFIA .....   | 83 |
| ANEXOS.....   | 89 |

|   |    |
|---|----|
| Anexo 1. Contagem de reticulócitos, hemoglobina, hematócrito, valores de reticulócitos corrigidos e índice de produção de reticulócitos. .... | 89 |
| Anexo 2. Análise da população de leucócitos nos diversos <i>buffy coats</i> (BC).....   | 90 |
| Anexo 3. Análise de parâmetros reticulocitários e linfocitários em 8 <i>buffy coats</i> .   | 91 |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Hematopoiese: células-tronco em crescimento e diferenciação a partir da matriz estromal. ....  | 3  |
| Figura 2: Fases de desenvolvimento e maturação dos eritrócitos .....   | 5  |
| Figura 3: Representação esquemática do citoesqueleto da membrana do eritrócito. ....   | 8  |
| Figura 4: Ciclo vital do eritrócito .....  | 10 |
| Figura 5: Eritrócitos Crenados ou equinócitos .....  | 11 |
| Figura 6: Acantócitos (Setas indicam a morfologia dos acantócitos) .....   | 12 |
| Figura 7: Queratócitos (Setas indicam a morfologia dos queratócitos).....  | 12 |
| Figura 8: Esquizócitos de várias formas.....   | 13 |
| Figura 9: Eritrócitos falciformes ou drepanócitos .....  | 14 |
| Figura 10: Eliptócitos (A), ovalócitos (B).....  | 15 |
| Figura 11: Esferócitos.....  | 15 |
| Figura 12: Estomatócitos .....   | 16 |
| Figura 13: Células em alvo (Setas indicam a morfologia das células).....   | 16 |
| Figura 14: Eritrócitos em forma de picnócito ou “hemácia borrada”.....   | 17 |
| Figura 15: Eritrócitos macrocíticos indicados pelas setas .....  | 18 |
| Figura 16: Eritrócitos hipocrômicos indicados pelas setas.....   | 18 |
| Figura 17: (A a C) Eritrócitos hipercrômicos: eritrócitos irregularmente contraídos (seta) (A); esferoacantócitos (seta) (B); e esferócitos (seta) (C). .... | 19 |
| Figura 18: Policromasia, eritrócitos corados a róseo-azulada .....   | 20 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 19: A-Corpúsculos de <i>Howell-Jolly</i> , B-Corpúsculos de <i>Pappenheimer</i> .....   | 20 |
| Figura 20: Esfregaço de sangue periférico contendo pontuado basófilo (seta).....   | 21 |
| Figura 21: Formação de <i>rouleaux</i> eritrocitário.....  | 21 |
| Figura 22: Diferentes tipos de eritroblastos (A – Proeritroblasto, B – Eritroblasto Basófilo, C – Eritroblasto Policromático, D – Eritroblasto Ortocromático)..... | 23 |
| Figura 23: Plaquetas .....   | 24 |
| Figura 24: Processo de formação dos leucócitos granulócitos (Granulopoise).....  | 28 |
| Figura 25: A- Mieloblasto, B- Promielócito, C- Mielócito, D- Metamielócito, E- Neutrófilo em banda, F- Neutrófilo segmentado.....                                  | 28 |
| Figura 26: A-Neutrófilo, B-Eosinófilo, C-Basófilo .....  | 30 |
| Figura 27: Estádios da célula B com expressão de CD19 e CD20.....  | 34 |
| Figura 28: Estádios de desenvolvimento até à maturação das células T.....  | 36 |
| Figura 29. Esfregaços para a contagem de reticulócitos .....   | 41 |
| Figura 30. Reticulócitos indicados pelas setas .....   | 43 |
| Figura 31. Tempo de maturação dos reticulócitos em dias .....  | 44 |
| Figura 32. Procedimentos para elaboração de esfregaço sanguíneo. ....  | 45 |
| Figura 33. Material necessário para o isolamento de leucócitos (A - manho-maria, B - centrífuga).....  | 48 |
| Figura 34. Resultados da percentagem de reticulócitos de acordo com o sexo.....  | 54 |
| Figura 35. Resultados do índice de produção de reticulócitos de acordo com o sexo ...  | 55 |
| Figura 36. Resultados do IPR e percentagem de reticulócitos .....  | 56 |
| Figura 37. Resultados da percentagem de reticulócitos e IPR .....  | 57 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 38. Significado clínico do IPR (Índice de produção de reticulócitos) e percentagem de reticulócitos.....   | 58 |
| Figura 39. Resultado do IPR e do VRC.....   | 59 |
| Figura 40. Análise da viabilidade celular da população de leucócitos à data seguinte de colheita (D1) e aos dias 7 (D7) e 15 (D15) após colheita.....   | 60 |
| Figura 41. Lâmina em condição inapropriada de realização da contagem.....   | 61 |
| Figura 42. Análise da viabilidade celular da população de células mononucleares (CMN) isoladas pelo método de gradiente de densidade. A análise realizou-se ao dia 1 (D1) e após 7 dias em condição de BC aberto (D7) e após 7 dias em condição de BC fechado (D7*). A indicação (-) significa que não há análise. ....   | 63 |
| Figura 43. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+) por citometria de fluxo ao dia D1 e D7 (Dador 16). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/mL foi analisada a D1 e D7 e encontra-se indicada no canto superior direito. ....   | 64 |
| Figura 44. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+) por citometria de fluxo ao dia D1 e D7 (Dador 18). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/ml foi analisada a D1 e D7 e encontra-se indicada no canto superior direito. ....   | 64 |
| Figura 45. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+) por citometria de fluxo ao D7* (condição BC fechado) (Dador 17) (nota: BC da mesma data que dador 16). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/mL foi analisada ao D7*(em condição fechado) e encontra-se indicada no canto superior direito. .... | 65 |

Figura 46. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+)) por citometria de fluxo ao dia D7\* (condição BC fechado) (Dador 21 e Dador 22) (nota: BC da mesma data). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/mL foi analisada ao D7\*(em condição fechado) e encontra-se indicada no canto superior direito. .... 66

Figura 47. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+)) por citometria de fluxo ao dia D1 (Dador 19 e dador 23). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/mL foi analisada ao D1 e encontra-se indicada no canto superior direito..... 67

Figura 48. Gráfico comparativo da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+)) por citometria de fluxo ao dia D1 e D7 (BC condição aberto), para três amostras diferentes (Dador 16, 18 e 20). Cada amostra está representada pela sua cor, os *dados* estão organizados de forma a comparar D1 com D7 para cada população linfocitária, respetivamente, linfócitos TCD4+, linfócitosTCD8+ e linfócitos B (CD19+). A contagem do nº CMN/mL foi analisada e encontra-se indicada no canto superior direito. .... 68

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Constituintes do sangue .....   | 2  |
| Tabela 2: Valores de referência dos eletrólitos presentes no plasma humano .....                                  | 6  |
| Tabela 3: Valores de referência de glóbulos vermelhos e índices hematimétricos, segundo o sexo .....              | 8  |
| Tabela 4: Células de linhagem eritroide da medula óssea e suas características .....                              | 22 |
| Tabela 5: Valores de referência relativos aos leucócitos, número de células no sangue: variação com a idade. .... | 25 |
| Tabela 6: Características morfológicas das células de linhagem granulocítica.....                                 | 30 |
| Tabela 7. Identificação dos leucócitos sanguíneos .....   | 47 |
| Tabela 8. Teste do Qui-quadrado de Person entre os domínios IPR e sexo .....                                      | 55 |
| Tabela 9. Teste r $\hat{o}$ de Spearman entre os domínios IPR e percentagem de reticulócitos                      | 56 |
| Tabela 10. Teste r $\hat{o}$ de Spearman entre os domínios IPR e valores de reticulócitos corrigidos.....         | 59 |
| Tabela 11. Teste de Wilcoxon entre os domínios D7 - D1 e D15 – D1 .....   | 60 |
| Tabela 12. Teste r $\hat{o}$ de Spearman entre os domínios D1 e D7.....   | 62 |
| Tabela 13. Teste de Wilcoxon entre os domínios D7_16 - D1_16.....   | 63 |

## **Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos**

ATP- adenosina trifosfato

BC - *buffy coats*

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

CHUSJ - Centro Hospitalar Universitário São João

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético

EPO - eritropoietina

fL – femtolitros

G-6-PD – glucose-6-fosfato desidrogenase

IPR – índice de produção de reticulócitos

MHC - complexo major de histocompatibilidade

MO- Medula Óssea

pg - picogramas

PR – percentagem de reticulócitos

VCM – volume corpuscular médio

VRC – valor de reticulócitos corrigido

Hct - Hematócrito



## INTRODUÇÃO

### 1. Sangue

O sangue é um fluido corporal, de cor vermelha, que flui pelo sistema circulatório entre os diversos órgãos. É composto por uma parte sólida, as células, também denominadas de “elementos Figurados” que apresentam diversos tipos e, por um fluido, complexo, designado por plasma. O plasma, com uma composição variada é constituído por água e diversas proteínas, como a albumina, as globulinas e o fibrinogénio, entre outros fatores de coagulação, por hormonas, por nutrientes e eletrólitos e por gases como o oxigénio e o gás carbónico e, ainda, circulam resíduos do metabolismo celular (Arosa, 2012).

O sangue apresenta-se com uma consistência viscosa, com uma densidade de 1,060 gr/cm<sup>3</sup> o que indica que é pouco mais denso que a água, com um sabor salgado e um odor *sui generis*, um pH levemente alcalino (7,35 a 7,45) e, com uma coloração vermelho vivo, se sangue arterial e vermelho escuro se sangue venoso (Arosa, 2012).

O sangue, é composto por plasma (matriz extracelular) e por células. O plasma representa aproximadamente 55% do volume total do sangue enquanto que, as células sanguíneas, representam cerca de 45%, que, num indivíduo corresponde, aproximadamente, a 7% do seu peso corporal (Fragata, 2014). O plasma quando destituído de fibrinogénio, após a coagulação do sangue, origina o soro. Assim, o soro, não é mais do que, o plasma, destituído de fibrinogénio após a coagulação do sangue (Bernard *et al*, 1979, (Jenni Punt, Sharon Stranford, Patricia Jones, 2018).

Como representado na Tabela 1, os elementos celulares presentes no sangue incluem os eritrócitos ou glóbulos vermelhos, os leucócitos ou glóbulos brancos e as plaquetas. Os leucócitos, constituídos por cinco populações morfológicamente diferentes nomeadamente, os neutrófilos, os eosinófilos, os basófilos, os linfócitos e os monócitos, são, em circulação, as únicas células que possuem núcleo e citoplasma, uma vez que, as plaquetas, são fragmentos citoplasmáticos de células da medula óssea, os megacariócitos e, os eritrócitos, perdem o núcleo antes de entrarem em circulação (Fragata, 2014).

Tabela 1: Constituintes do sangue

| Plasma 55%   | Porção celular 45% do sangue |                                 |                               |
|--|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Água<br>Sais minerais<br>Proteínas<br>Lípidos<br>Glicose | Tipo de células              | Concentração<br>(Células/Litro) | Porcentagem aproximada<br>(%) |
|  | Eritrócitos                  | $5 \times 10^{12}$              |                               |
|  | Plaquetas                    | $3 \times 10^9$                 |                               |
|  | Leucócitos                   | $3 \times 10^9$                 |                               |
|  | Linfócitos                   |                                 | 30,0                          |
|  | T                            |                                 | 75                            |
|  | B                            |                                 | 15                            |
|  | NK                           |                                 | 10                            |
|  | Neutrófilos                  |                                 | 62                            |
|  | Monócitos                    |                                 | 5,3                           |
|  | Eosinófilos                  |                                 | 2,3                           |
|  | Basófilos                    |                                 | 0,4                           |

Adaptada de Arosa, 2012

A importância do sangue como elemento de vida, encontra-se igualmente no seu uso em aplicações clínicas, como nas transfusões de sangue, ou ainda, na recolha diferenciada de certos elementos sanguíneos para o tratamento específico de determinadas doenças do foro hematológico. Disto, é exemplo o tratamento de anemias graves originadas não só por problemas ao nível da Medula Óssea (MO) devido ao seu incorreto funcionamento, mas, também, por traumatismos, por cirurgias de grande porte ou, ainda, por distúrbios ao nível da cascata da coagulação. Neste contexto, o processo de doação de sangue por dadores voluntários revela-se num acto de elevado sentido humanitário, de enorme solidariedade e de grande entrega ao próximo (Bernard *et al*, 1979; Wim de Kort, 2010).

### 1.1. Características gerais do sangue e seus constituintes

Uma das características do sangue é manter o *turnover* de células, de forma a preservar a circulação periférica das mesmas e levar à produção de células no mesmo instante em função dos estímulos do organismo (Ferreira, 2020).

Porém, este tecido conjuntivo, dada a sua composição desempenha inúmeras funções. Nestas, poderão referir-se a defesa do organismo através dos glóbulos brancos; a coagulação sanguínea envolvendo as plaquetas e proteínas presentes no plasma,

denominados por fatores da coagulação; a distribuição de nutrientes para tecidos e órgãos; a regulação térmica e hídrica do organismo; a manutenção dos equilíbrios aquoso, ácido base e iônico; a manutenção da hemóstase (o controle da homeostase é realizado pelos mecanismos de *feedback* ou retroalimentação, que mantêm como princípio o equilíbrio das funções através de fenômenos agonistas e antagonistas (Teixeira, 2021); a manutenção do pH e, da temperatura corporal e, ainda, o transporte de gases através da hemoglobina presente nos eritrócitos (Fragoso *et al.*, 2021).

Este tecido apresenta uma característica relativamente a outros tecidos, ou seja, as suas células, não mantêm qualquer relacionamento espacial permanente entre si, mas, movimentam-se continuamente de um local para outro. (Saraiva, 2009 ; Frago *et al.*, 2021).

O processo que se encontra na origem do sangue é denominado por hematopoiese (Figura 1). Este, caracteriza-se por ser um conjunto de *eventos* que envolve três funções fisiológicas de elevada importância. São elas, a auto manutenção do *pool* indiferenciado da célula hematopoiética pluripotente, também denominada de célula-tronco ou *Stem cell*; a capacidade de, a partir das células-tronco, formarem células progenitoras que são as precursoras de linhagens celulares mielóides e linfóides e, ainda, a função de proliferação e diferenciação de células que migram para a corrente sanguínea (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Zago, 2013).

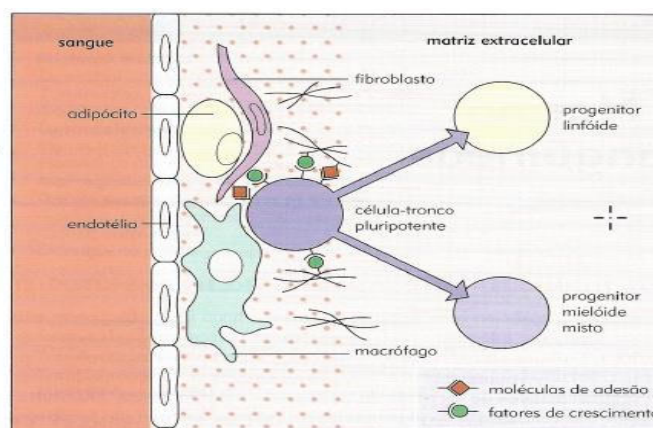


Figura 1: Hematopoiese: células-tronco em crescimento e diferenciação a partir da matriz estromal.  
Fonte: Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000

Nos seres humanos, a hematopoiese divide-se em dois períodos, um é denominado por período Embrionário e Fetal e o outro por período Pós-natal. O primeiro, tem início trinta

dias após a formação do embrião. Nesta fase, chamada primitiva, as células-tronco hematopoiéticas localizam-se no saco vitelino, e, vão transformar-se em agrupamentos sanguíneos, chamadas de *ilhas de Wolff* ou ilhotas sanguíneas, em que, as células centrais produzem os primeiros eritrócitos e as células periféricas originam o endotélio dos primeiros vasos sanguíneos. A fase definitiva ou adulta surge na quarta semana de gestação quando o nicho hematopoético passa a localizar-se na mesoderme. Ainda na vida intrauterina, a hematopoiese passa para a placenta e fígado fetal em torno da quinta semana, e, definitivamente, para a medula óssea na décima segunda semana de gestação. No período Pós-natal, depois do nascimento, a medula óssea vermelha é a principal responsável pelo processo da hematopoiese, gera cerca de bilhões de células hematológicas todos os dias, partindo das células-tronco (Robbins, 2000; Zago, 2013; Silva, 2017).

A hematopoiese tem como pré-requisito fornecer um microambiente adequado, capaz de sintetizar, não só os fatores necessários à sobrevivência e proliferação das células progenitoras, favorecendo interações entre as células de diferentes tipos, mas, também, permitir acolher as células em desenvolvimento (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Zago, 2013). Um dos fatores de crescimento, entre outros, essenciais à hematopoiese é a eritropoietina para a formação dos eritrócitos (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000).

A eritropoiese é o processo de formação de eritrócitos, que ocorre na medula óssea, pela diferenciação de células da linhagem eritrocitária (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Jelkmann, 2011; Oliveira e Aparecido, 2019).

A eritropoietina (EPO), uma hormona glicoproteica endógena é sintetizada principalmente nos rins e, em pequenas quantidades, no fígado. Tem como células-alvo os progenitores eritroides e os precursores eritrocitários do estágio dos reticulócitos, e, apresenta como principal função, a regulação da eritropoiese. Assim, a sua produção ocorre como resposta a um estado de anóxia, com falta ou diminuição acentuada de oxigênio em circulação na corrente sanguínea. Por estímulo da eritropoietina, as células progenitoras acabam por, não só, proliferarem, mas, também, se diferenciarem originando as células maduras terminais (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000).

A primeira célula que pode ser identificada como pertencente à linhagem eritroide é o proeritroblasto. Uma vez formado, o proeritroblasto divide-se por diversas vezes por

estímulo da eritropoetina, partindo para outras fases evolutivas de desenvolvimento. Estas fases traduzem-se na perda de todo o material nuclear, bem como, das organelas presentes no citoplasma, aumentando assim, a quantidade de hemoglobina presente na célula, e dando origem à fase final de eritrócito presente na corrente sanguínea, como é possível observar na Figura 2 (Guyton e E. Hall, 2005; Melo, 2014).

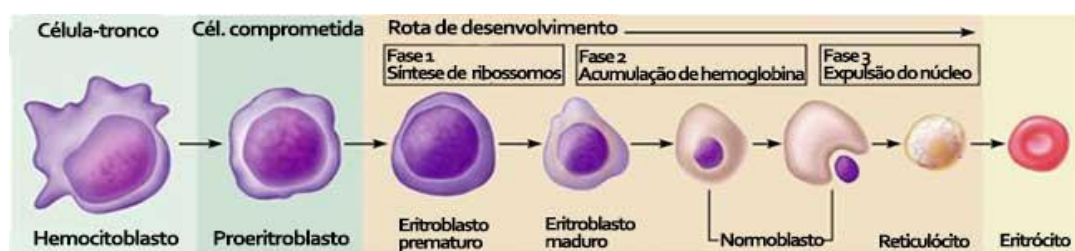


Figura 2: Fases de desenvolvimento e maturação dos eritrócitos  
Fonte: Bitencourt, 2009

### 1.1.1. Plasma

O plasma apresenta-se como um líquido, viscoso, com uma tonalidade amarelo pálido ou âmbar. É, predominantemente, constituído por água, que representa cerca de 91% do seu volume (Barbara H. Estridge, 2011). Os 9% restantes correspondem a componentes dissolvidos, como: aminoácidos, proteínas, hidratos de carbono, ácidos gordos, pigmentos, vitaminas, eletrólitos, elementos minerais e hormonas (Maria, Souza e Oliveira, 2005).

Porém, para além dos componentes já referidos, contém também fibrinogénio e outras proteínas da coagulação, as quais, são fundamentais para o desencadear da cascata da coagulação, como resposta normal a um processo de perda sanguínea, já que, no final, leva à formação do coágulo de fibrina (Maria, Souza e Oliveira, 2005; Barbara H. Estridge, 2011).

O plasma permite o livre intercâmbio de diversos dos seus componentes, principalmente, da água, com o líquido intersticial e, através dele, com o líquido intracelular, possibilitando regular a composição química das células e, assim, assegurar os elementos necessários ao seu metabolismo. (Maria, Souza and Oliveira, 2005; Barbara H. Estridge, 2011). O mesmo já não acontece com as proteínas plasmáticas, que devido às suas

dimensões não atravessam os poros dos capilares ou as membranas do endotélio, a não ser em quantidades diminutas. (Maria, Souza e Oliveira, 2005).

A concentração de iões é altamente controlada no organismo, isto pelo facto de alterações nestas concentrações poderem ocasionar um desequilíbrio osmótico ou afetar o pH sanguíneo (Paraíso, 2015).

É corrente, na prática clínica, proceder-se à determinação da concentração destes iões no fluído extracelular, principalmente no intravascular, ou seja, no plasma. Estas determinações são, normalmente, utilizadas quer para avaliar o estado de saúde/doença de um dado indivíduo, quer na monitorização de doentes, uma vez que, alterações nas suas concentrações, relativamente ao que é considerado como valores de referência (Tabela 2), permitem fazer uma avaliação criteriosa do seu estado clínico (Maria, Souza e Oliveira, 2005; Tobergte e Curtis, 2013).

Tabela 2: Valores de referência dos eletrólitos presentes no plasma humano

| Eletrólitos Normais no Plasma                |           |
|--|-----------|
| Eletrólito                                   | (mEq/L)   |
| Sódio (Na <sup>+</sup> )                     | 135 - 145 |
| Potássio (K <sup>+</sup> )                   | 3,5 - 4,5 |
| Cloreto (Cl <sup>-</sup> )                   | 85 - 115  |
| Bicarbonato (HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) | 22 - 29   |
| Cálcio (Ca <sup>2+</sup> )                   | 4,0 - 5,5 |
| Magnésio (Mg <sup>2+</sup> )                 | 1,5 - 2,5 |

Fonte: Maria, Souza e Oliveira, 2005

### 1.1.2. Eritrócitos

Os eritrócitos são células produzidas na medula óssea a partir de um precursor primitivo ou proeritroblasto. Estes, sendo células anucleadas, quando maduros, apresentam-se, de um modo geral, em forma de discos bicôncavos, com um diâmetro médio de 7,5 µm, mas, este, pode oscilar entre 7 a 8 µm. A sua composição é de cerca de 95% de hemoglobina e, apenas, 5% de enzimas, iões, água e glicose, sendo que, a sua energia é obtida na forma de adenosina trifosfato (ATP) (Melo, 2014).

A membrana do eritrócito, composta de 52% de proteínas, 40% de lipídeos e 8% de carboidratos é formada por uma bicamada fosfolipídica intercalada por pontes de colesterol, e uma quantidade ínfima de glicolipídios, criando uma barreira entre os dois compartimentos líquidos, intra e extracelulares. As trocas iônicas entre compartimentos ocorrem através de bombas, canais de troca de iões e transporte molecular, como o da glicose (Salmon C, Cartron JP, 1984; Murador e Deffune, 2007).

A membrana do eritrócito contém canais proteicos dependente da bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , bem como, da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  e independente de energia sendo permeável à água e a iões como  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{Cl}^-$ . A capacidade de transporte está dependente das condições de adaptação circulatória e da hemoglobina citosólica, bem como, de um polipéptido maior da membrana denominado de banda 3 ou proteína de troca de iões (*anion exchanger 1*, AE1). A banda 3 medeia as trocas de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  aumentando a capacidade de transporte de  $\text{CO}_2$ , garantindo o equilíbrio ácido-base e a homeostase. Esta proteína confere igualmente aos eritrócitos propriedades mecânicas e elásticas, regulando a viscosidade sanguínea. Nos estádios mais precoces da linhagem eritrocitária, os eritroblastos produzem todas as proteínas de transporte da membrana (Murador e Deffune, 2007).

Por outro lado, as perdas lipídicas são compensadas recorrendo à via lipoproteica, porque os eritrócitos não sintetizam novos lipídeos (Wajcman H, Lantz B, 1984; Murador e Deffune, 2007).

Além da proteína banda 3, nesta membrana, encontram-se mais 2 proteínas transmembranares de relevância, as glicoforinas e a espectrina. A espectrina, proteína principal do citoesqueleto é um heterodímero composto pelas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  que se combina em tetrâmeros que, por sua vez, se ligam a outros tetrâmeros de espectrina formando uma rede complexa do citoesqueleto eritrocitário (Salmon C, Cartron JP, 1984; Murador e Deffune, 2007). As glicoforinas (existem vários tipos), são sialoglicoproteínas transmembranares responsáveis pela carga elétrica negativa dos eritrócitos em função da sua constituição bioquímica em ácido siálico e carboidratos terminais (Bain, 2007). Esta carga negativa, ajuda à minimização nas interações célula-célula e a prevenir a aglutinação eritrocitária (Figura 3) (Murador e Deffune, 2007).

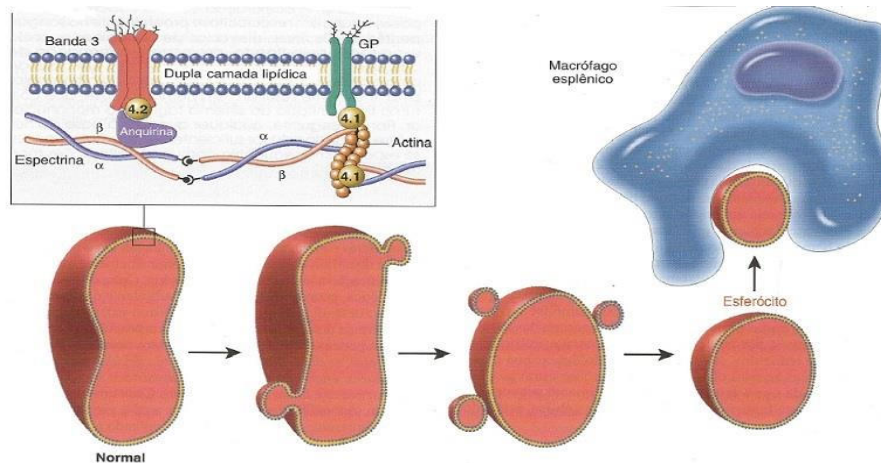


Figura 3: Representação esquemática do citoesqueleto da membrana do eritrócito.  
 Fonte: Cotran, 2000

O eritrócito apresenta características bioquímicas e celulares bem definidas. Contudo, o seu valor absoluto é bem diferente entre o sexo feminino e o masculino. Como é referido na Tabela 3, nos homens saudáveis existem cerca de 4,5 a 6,5 milhões/mm<sup>3</sup> e, nas mulheres, cerca de 3,9 a 5,6 milhões/mm<sup>3</sup>. Porém, estes valores variam quer com a idade e o sexo quer com outros fatores demográficos, como sejam, a localização geográfica e as estações do ano, entre outros (Bain, 2007).

Tabela 3: Valores de referência de glóbulos vermelhos e índices hematimétricos, segundo o sexo

| Parâmetro  | Homens      | Mulheres    | Homem/Mulher |
|--|-------------|-------------|--------------|
| Glóbulos vermelhos ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )     | 4,5 – 6,5   | 3,9 – 5,6   |              |
| Hemoglobina (g/dL)                                   | 14,0 – 17,5 | 12,3 – 15,3 |              |
| Hematócrito (%)                                      | 42 – 50     | 36 – 45     |              |
| Volume corpuscular médio (fL)                        |             |             | 80 – 99      |
| Hemoglobina corpuscular média (pg)                   |             |             | 27,5 – 33,2  |
| Concentração da hemoglobina corpuscular média (g/dL) |             |             | 33,4 – 45,5  |

Fonte: Zago, 2013

No sangue periférico, os eritrócitos constituem as células mais abundantes e a sua função consiste no transporte do oxigénio para os tecidos, mantendo a perfusão tissular adequada, e, também, no transporte do CO<sub>2</sub> dos tecidos aos pulmões. Porém, quando ao nível sanguíneo existe uma diminuição da capacidade de transporte do oxigénio, o que, é devido a uma diminuição da quantidade de eritrócitos em circulação isto, implica, uma diminuição da concentração de hemoglobina e, o resultado é o aparecimento de uma anemia. Se, pelo contrário, existe aumento na concentração dos eritrócitos, ou seja, da



massa eritrocitária total em circulação, que, geralmente, corresponde também a um aumento dos níveis de hemoglobina, então, verifica-se o aparecimento de uma policitemia ou poliglobulia (Bernard *et al*, 1979; Robbins, 2000; Zago, 2013).

O eritrócito normal, tem um tempo médio de vida aproximado de 120 dias e, morre por envelhecimento. Este acontecimento, tem como causa o facto de o eritrócito no estágio de eritrócito maduro ser uma célula anucleada, em que, é incapaz de promover a renovação das suas enzimas, então armazenadas, e, com isto, torna-se inábil para promover a síntese de novas proteínas. Assim, após este tempo são retirados da circulação sanguínea pelos macrófagos do sistema retículo endotelial do baço e, grande parte de seus componentes são absorvidos por fagocitose (Bernard *et al*, 1979; Melo, 2014).

Uma vez fagocitado, o eritrócito é decomposto nos seus constituintes. De entre estes, os mais importantes são a membrana citoplasmática e a hemoglobina. Porém, as proteínas e os fosfolípidos da membrana celular são digeridos. Neste processo de decomposição, a hemoglobina é separada em globina e grupo heme. A globina é metabolizada, dando origem a aminoácidos e o grupo heme, com a abertura do anel porfirina, também designado por protoporfirina, acaba por libertar o ferro e formar a bilirrubina (Guyton e E. Hall, 2005). Após a extração da molécula de ferro, que fica armazenada ou é reutilizada, o grupo heme é convertido em biliverdina que, após reduzida pela enzima biliverdina redutase origina a bilirrubina. Esta bilirrubina recém-formada, denominada bilirrubina não-conjugada, circula no sangue e é transportada até ao fígado ligada à albumina plasmática.

No fígado, a bilirrubina é desligada da albumina e conjugada com o ácido glicurónico para formar bilirrubina conjugada. Esta última, é solúvel em água e secretada pelos canalículos biliares menores sendo posteriormente excretada pela bile.

A bilirrubina conjugada não pode ser reabsorvida no intestino, mas as enzimas bacterianas presentes na mucosa intestinal convertem a bilirrubina em urobilinogénio fecal que é reabsorvido em torno de 10 a 15% pela circulação portal até ao fígado. A maioria deste urobilinogénio é reexcretada pela bile, e uma parte pode ser excretada pela urina. O urobilinogénio não reabsorvido no intestino é oxidado a estercobilina, pigmento responsável pela cor castanha das fezes (Bernard *et al*, 1979).

A Figura 4 representa o ciclo de vida do eritrócito desde que é produzido ao nível da MO, indicando o tempo de permanência em circulação na corrente sanguínea e o modo como é feito o seu processo de degradação no organismo.

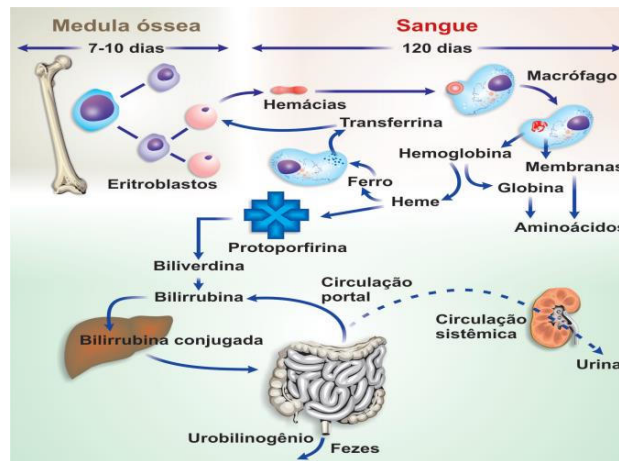


Figura 4: Ciclo vital do eritrócito  
Fonte: Zago, 2013

#### 1.1.2.1. Alterações morfológicas do eritrócito

Quando os eritrócitos são observados em esfregaços sanguíneos, ao microscópio ótico, é possível verificarem-se algumas variações na sua forma, tamanho e na própria coloração. As variações da forma e, também, da sua flexibilidade, dependem de alterações na integridade do seu citoesqueleto, o qual, se encontra ligado à membrana lipídica. Assim, o aparecimento de formas anómalas pode ser uma consequência, de, entre outras causas, não só de alterações no citoesqueleto ou na membrana do eritrócito, mas, também, de alterações na hemoglobina, como sejam, a cristalização ou a precipitação (Bain, 2007).

Num esfregaço sanguíneo, o aparecimento de eritrócitos com diferentes tipos de morfologia é designado por poiquilocitose. Esta diferença, na forma, é tanto mais acentuada quanto maior for o esgotamento da MO ou, ainda, quanto mais intensa for a anemia, ou seja, quanto maior for o grau da anemia. Contudo, a poiquilocitose, que é considerada como uma anomalia comum, frequentemente inespecífica, pode ser encontrada em diversas doenças hematológicas (Bain, 2007; Melo, 2014; Romana and Rios, 2020).

Assim, as morfologias eritrocitárias que podem ser observadas são: células espiculadas ou crenadas como equinócitos, acantócitos, queratócitos e esquizócitos; dacriócitos; drepanócitos; eliptócitos e ovalócitos; esferócitos, estomatócitos e, ainda os eritrócitos em alvo também denominados por *target cells* (Bain, 2007; Melo, 2014; Romana and Rios, 2020).

Como células espiculadas, os equinócitos (Figura 5) são eritrócitos que perderam a sua forma discóide e que se encontram cobertos, em média, com cerca de 10 a 30 projeções, irregulares e dispostas em volta da membrana. O eritrócito crenado perde a forma discóide, aumenta a sua deformabilidade e, conseqüentemente, a sua rigidez, dificultando assim a sua passagem por veias de pequenos calibres. Com isto a sua lise é facilitada. Estes eritrócitos encontram-se presentes, principalmente, nas queimaduras graves, após *bypass* cardiopulmonar, sendo que, é comum a sua presença, nos doentes com falência múltipla de órgãos incluindo, a insuficiência renal e a hepática, nos casos de uremia e, também, nas anemias hemolíticas, dum modo geral, bem como, no tratamento com heparina (Bernard et al, 1979; Hoffbrand & Pettit, 2000; Bain, 2007; Melo, 2014).

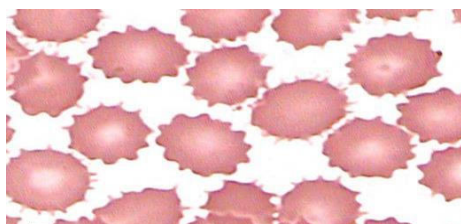


Figura 5: Eritrócitos Crenados ou equinócitos  
Fonte: Melo, 2014

Os acantócitos, como é observado na Figura 6, são eritrócitos que apresentam projeções citoplasmáticas irregulares, cerca de 2 a 20, em redor da membrana celular, denominadas de espículas, têm um tamanho variável e são em menor número do que as encontradas nos equinócitos. A sua formação está associada a um distúrbio hereditário raro denominado por abetalipoproteinemia, a qual, é devida há má absorção dos lípidos e, também, à composição da membrana do eritrócito que, é lipoproteica. Também se observam, entre outras situações clínicas, nas hepatopatias de várias etiologias associadas a quadros de cirrose e, também, na anemia hemolítica (Bain, 2007; Melo, 2014; Romana and Rios, 2020).

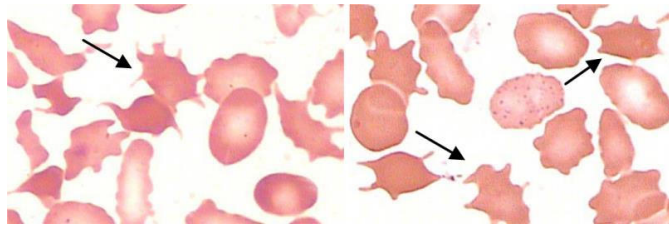


Figura 6: Acanatócitos (Setas indicam a morfologia dos acanatócitos)  
Fonte: Melo, 2014

Os queratócitos (Figura 7) apresentam-se como eritrócitos “mordidos”, tendo um ou mais pares de espículas. Estes, são originados quer por várias “mordeduras” dos macrófagos esplênicos, quer por um dano celular traumático direto. Também o seu aparecimento pode resultar da remoção de um corpo de Heinz presente no eritrócito. A presença de queratócitos num esfregaço sanguíneo está, habitualmente, associada a doentes com anemia hemolítica, com defeitos enzimáticos no eritrócito e em algumas nefropatias (Bain, 1998; Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000).

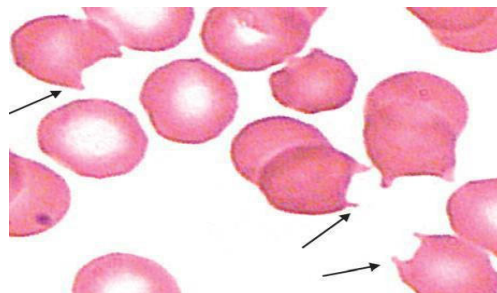


Figura 7: Queratócitos (Setas indicam a morfologia dos queratócitos)  
Fonte: Melo, 2014

Os esquizócitos são eritrócitos, cuja, morfologia é bastante variável, irregular e, geralmente, apresentam-se com um tamanho que é cerca de metade do tamanho de um eritrócito normal (Figura 8). Os esquizócitos são considerados como fragmentos dos eritrócitos e resultam, de uma fragmentação de células anormais ou, então, de lesões mecânicas, tóxicas ou ainda, da ação do calor sobre células normais (Bain, 2007).

Os defeitos na sua forma ocorrem no baço, especificamente, no sistema reticulo endotelial, e são denominados por quebras ou “mordidelas”. Os eritrócitos que contém muitos corpúsculos de Heinz, geram hemoglobinas instáveis e, os macrófagos para evitarem a lise do eritrócito vão retirando, por fagocitose, esses corpúsculos deixando o

eritrócito com a morfologia de uma célula com várias “mordidelas”, designada por esquizócito (Melo, 2014).

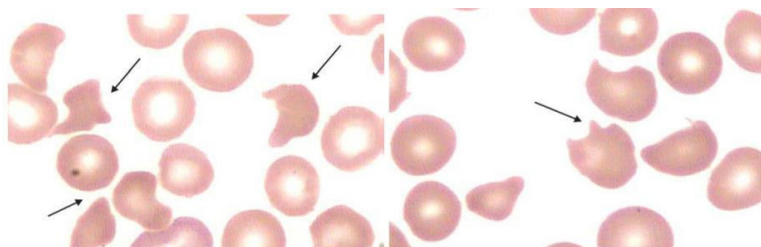


Figura 8: Esquizócitos de várias formas  
Fonte: Melo, 2014

Os dacriócitos apresentam-se como eritrócitos em forma de lágrima, em gota ou em forma de pera. Esta morfologia celular encontra-se associada a quadros de talassemia *major*, de fibrose medular, a uma diseritropoiese severa, com a medula a produzir uma quantidade insuficiente de eritrócitos e, em que, os seus precursores mielóides, apresentam anomalias morfológicas. Ainda é possível a sua visualização em esfregaços sanguíneos de doentes com anemias hemolíticas (Dacie, J. V. e Lewis, 1991; Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Bain, 2007).

Contudo, e segundo Bain (2007) *in* Células Sanguíneas, o aparecimento dos dacriócitos nos casos de anemia hemolítica de causa autoimune, bem como, nas anemias hemolíticas com corpos de Heinz é o resultado da ação dos macrófagos do baço sobre os eritrócitos anormais que promovem a remoção de partes da célula, dos corpos de Heinz ou, ainda, dos precipitados de cadeias  $\alpha$ .

Uma outra morfologia eritrocitária é o drepanócito também designado por eritrócito falciforme característico da anemia falciforme. Este eritrócito (Figura 9) apresenta-se perpendicularmente alongado, embora seja possível a sua visualização com outras formas. Todavia, a mais comum, é a forma de foice. O seu aparecimento deve-se a uma mutação *misense* no cromossomo 11, que resulta na substituição de uma base única, na posição 6 da cadeia  $\beta$  da globina, ocorrendo a substituição de uma valina por ácido glutâmico, o que leva à formação da hemoglobina S (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Siqueira *et al.*, 2009).

Os eritrócitos apresentam predomínio de hemoglobina S, a qual, tem tendência a sofrer polimerização em presença de baixas concentrações de oxigênio tendo como consequência a deformação do eritrócito, o qual, acaba por adquirir a forma de foice. Com a falcização do eritrócito, a bomba de sódio e de potássio da célula sofre alterações relacionadas com a sua função, diminuindo os níveis de potássio e de água intracelularmente e elevando, assim, os níveis da concentração de sódio. Com isto, o eritrócito torna-se mais denso e com menor permeabilidade (Siqueira *et al.*, 2009; Melo, 2014).

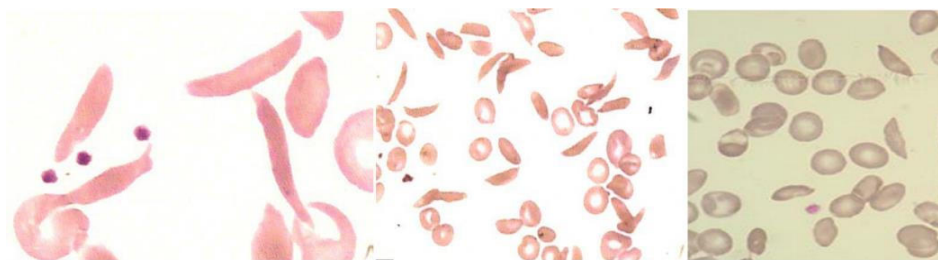


Figura 9: Eritrócitos falciformes ou drepanócitos  
Fonte: Fonte: Melo, 2014

Existem, no entanto, outras morfologias como são os casos dos eliptócitos e dos ovalócitos (Figura 10) cujos termos usados aquando da sua caracterização não têm obtido grande consenso. Segundo Bain (2007) *in* Células Sanguíneas, o eritrócito é considerado um eliptócito quando o eixo maior ultrapassa o dobro do eixo menor e o eritrócito é designado como um ovalócito, quando o eixo maior é inferior ao dobro do eixo menor.

Nestes eritrócitos a característica da sua morfologia está associada a inúmeros defeitos nas proteínas de membrana, principalmente, na espectrina ou na banda 4.1, ambas com um papel muito importante no citoesqueleto dos eritrócitos (Murador e Deffune, 2007). Estes eritrócitos caracterizam-se por perderem a elasticidade normal e, ao passarem num vaso sanguíneo de pequeno calibre, sofrem deformação, não voltando mais ao seu formato normal. O aumento considerável de eliptócitos ou de ovalócitos sugere a presença de uma anomalia hereditária. Contudo, um número inferior a 10% é visto em algumas patologias tais como, nas talassemias, nas anemias megaloblásticas, na anemia por deficiência de ferro, na mielofibrose e, também, por vezes é possível a sua visualização em situações em que se verificam anomalias enzimáticas eritrocitárias de origem hereditária (Bain, 2007; Melo, 2014; Romana and Rios, 2020).

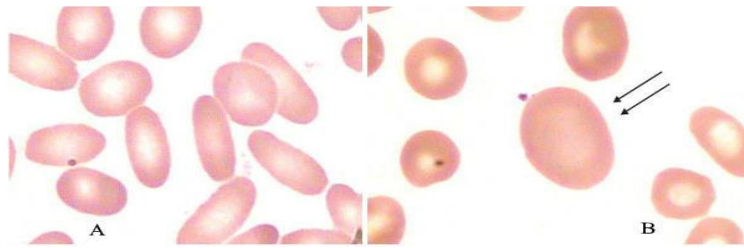


Figura 10: Eliptócitos (A), ovalócitos (B)  
Fonte: Romana e Rios, 2020

Os esferócitos, como são visualizados na Figura 11, são eritrócitos que se apresentam não com a forma discóide habitual, mas sim, com uma forma esférica ou geralmente esférica. Estas células compactas, apresentam um diâmetro que se encontra compreendido entre 5 a 6  $\mu\text{m}$ , o qual, se deve a anomalias herdadas ou adquiridas no citoesqueleto ou na membrana, que se traduzem por perda de membrana sem perda correspondente de citosol e que, como consequência, induzem ao aparecimento desta morfologia (Bain, 2007).

Nesta morfologia verifica-se que a Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) é normal ou aumentada, aparecendo os esferócitos no esfregaço de sangue periférico com uma coloração intensa laranja-vermelho. Uma característica visível nos esfregaços sanguíneos é a não formação de *rouleaux* eritrocitário contrariamente ao que se verifica com os eritrócitos normais. Contudo, dada a constituição do seu citoesqueleto em que o espessamento da membrana leva a um aumento da permeabilidade ao sódio e, conseqüentemente, a uma hiperhidratação, o esferócito apresenta-se com perda de elasticidade e de plasticidade e, assim com baixa deformabilidade o que acarreta na sua destruição prematura, traduzindo-se por um aumento da hemólise aquando da sua passagem pelo baço (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Bain, 2007).

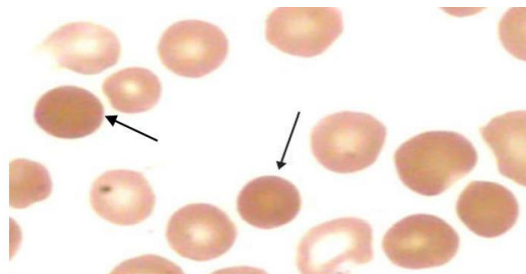


Figura 11: Esferócitos  
Fonte: Gualandro, 2015



O estomatócito (Figura 12) é morfologicamente um eritrócito que apresenta uma pequena fenda ou faixa, linear, central de cor clara. A sua formação está associada a defeitos raros na membrana do eritrócito, em que, esta, apresenta uma permeabilidade passiva aumentada com diminuição do potássio e aumento do sódio no interior do eritrócito (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Bain, 2007).

Os estomatócitos estão associados a diversas patologias sendo que, uma delas, é a estomatocitose hereditária. Contudo, a sua presença em número considerável num esfregaço sanguíneo pode, igualmente estar relacionado ao consumo excessivo de álcool, a hepatopatia alcoólica evolutiva para cirrose hepática, entre outras patologias (Melo, 2014).

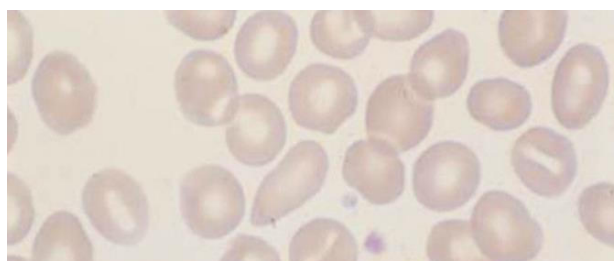


Figura 12: Estomatócitos  
Fonte: Gualandro, 2015

Designam-se por células em alvo (Figura 13) ou *Target Cells* os eritrócitos que se apresentam com uma coloração mais densa na zona central rodeada de uma zona de maior palidez. Estas células são formadas na sequência de um excesso de membrana devido ao aumento do conteúdo lipídico, relativamente ao volume de citoplasma. Tal morfologia é associada a diferentes patologias, destacam-se, associado a um número elevado destas células a anemia das células falciformes e associado a um número mais pequeno e moderado a  $\beta$ -talassemia *major* e *minor* e a deficiência de ferro (Bain, 2007).

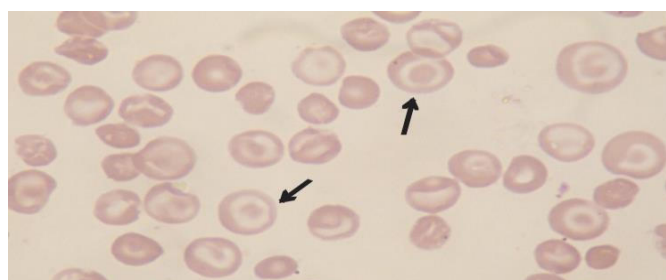


Figura 13: Células em alvo (Setas indicam a morfologia das células)  
Fonte: Gualandro, 2015



Para além das morfologias que podem ser observadas, normalmente, nos esfregaços sanguíneos de algumas patologias, existem outras formas que são menos visualizadas. Falamos dos eritrócitos fusiformes e dos picnócitos (Figura 14) também designados por “hemácias borradas”. Assim, os eritrócitos fusiformes são células morfológicamente alongadas e de extremidades afiadas. Esta forma de eritrócito é devida ao rompimento no processo de falcização, na secagem da lâmina e na falta de oxigénio, sendo que a falcização é incompleta e a célula toma o formato fusiforme (Dalanhol *et al.*, 2010; Melo, 2014). Uma das patologias associadas é a característica de pacientes portadores do genótipo Hemoglobina AS.

Por fim, o picnócito é uma forma de eritrócito cuja hemoglobina se encontra concentrada nas zonas laterais da célula, ficando com a área central vazia, sem hemoglobina. Geralmente, apresenta-se como uma célula alongada, sendo importante diferenciar esta forma das várias formas de “eritrócitos mordidos”. Estas células podem surgir em pacientes com deficiência de G-6-PD, em anemias hemolíticas graves e na deficiência hereditária de lipoproteínas (Dalanhol *et al.*, 2010; Melo, 2014).

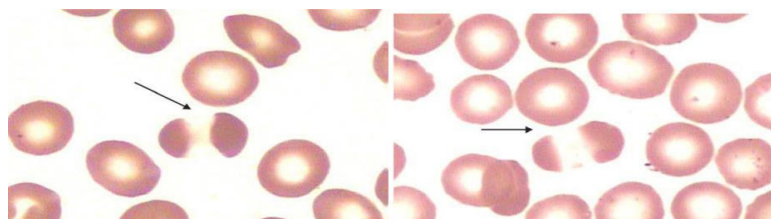


Figura 14: Eritrócitos em forma de picnócito ou “hemácia borrada”  
Fonte: Melo, 2014

Como anteriormente é referido, nos eritrócitos também podem ser observadas variações no seu tamanho. Quando apresentam um tamanho normal são designados por normocíticos. Contudo, quando os eritrócitos apresentam um aumento do seu tamanho, o que é verificado por um Volume Corpuscular Médio (VCM) acima de 100 fL (fentolitro), observamos a presença de macrocitose e o aparecimento de macrócitos em circulação na corrente sanguínea (Figura 15). Pelo contrário, se o VCM é inferior a 80 fL são designados por eritrócitos microcíticos. Por vezes, num esfregaço sanguíneo de um doente, é visível o aparecimento de um aumento da variação do tamanho dos eritrócitos, que excede o que é, normalmente, encontrado nos indivíduos saudáveis. Esta anomalia é denominada por anisocitose. É uma anomalia que, muitas das vezes, se encontra associada

a distúrbios hematológicos. Contudo, não é específica (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Bain, 2007).

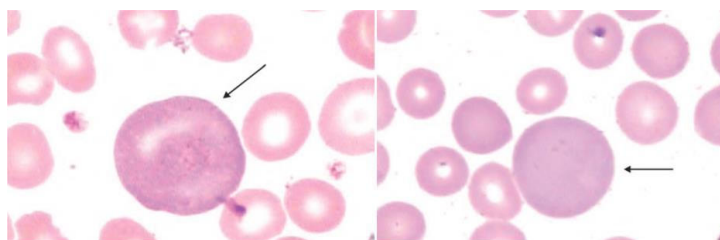


Figura 15: Eritrócitos macrocíticos indicados pelas setas  
Fonte: Melo, 2014; Gualandro, 2015

Um outro tipo de alteração que pode ser observada aquando da visualização microscópica do esfregaço sanguíneo é a cor que apresenta o eritrócito após coloração pelos métodos de referência. Assim, se o eritrócito se apresenta com uma coloração normal, ou seja, indicando que contém um quantidade e concentração de hemoglobina normal, este é designado como normocrômico. No entanto, existem situações clínicas, patológicas, em que os eritrócitos se apresentam com uma coloração, mais clara que o normal como é visível na Figura 16. Isto, é motivado pela redução do conteúdo da hemoglobina que, desta forma, aumenta a palidez do halo central no eritrócito. O índice hematimétrico, Concentração Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) que na hipocromia severa se encontra reduzido, confirma a baixa concentração de hemoglobina na célula. No entanto, a sensibilidade deste índice à hipocromia, depende do método de medição utilizado (Bain, 2007; Melo, 2014; Romana e Rios, 2020).

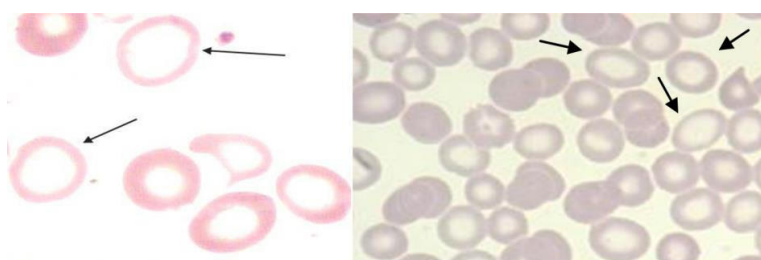


Figura 16: Eritrócitos hipocrômicos indicados pelas setas  
Fonte: Melo, 2014; Romana e Rios, 2020

A hipercromia é um termo que não é muito utilizado na descrição dos eritrócitos aquando da observação dos esfregaços sanguíneos. Todavia, esta designação aplica-se quando estes coram mais intensamente do que um eritrócito normal. A CHCM pode estar

aumentada, indicando que a hipercromia está relacionada, não só, com a alteração na forma da célula, mas, também, com uma maior concentração da hemoglobina intracelular. Como pode ser observado na Figura 17, esta alteração é comum nos eritrócitos irregularmente contraídos, nos esferoacantócitos e nos esferócito (Bain, 1998; Bain, 2007; Melo, 2014; Romana and Rios, 2020).

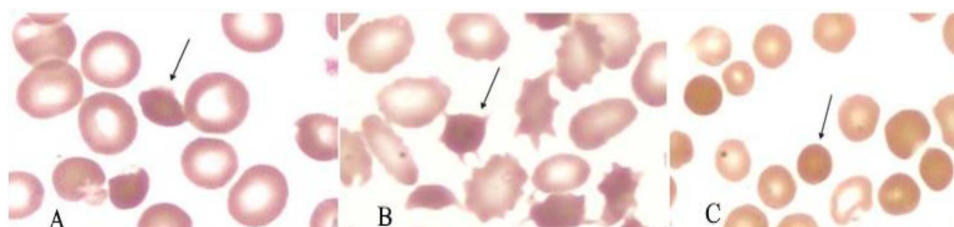


Figura 17: (A a C) Eritrócitos hipercrômicos: eritrócitos irregularmente contraídos (seta) (A); esferoacantócitos (seta) (B); e esferócitos (seta) (C).

Fonte: Melo, 2014

O termo anisocromia ou anisocromasia consiste numa variação excessiva da cor dos eritrócitos com diferenças na distribuição da hemoglobina entre células. Tal variação é frequentemente observada em anemias ferroprivas. Esta anisocromia, na prática, corresponde a uma variação no espectro de coloração do eritrócito que vai desde a hipocromia até à normocromia. Assim, em esfregaços de sangue periférico podem ser observados, num campo e, ao mesmo tempo, eritrócitos normo e hipocrômicos (Bain, 1998; Bain, 2007; Melo, 2014).

Os eritrócitos, num esfregaço sanguíneo, podem apresentar-se com uma coloração róseo-azulada por captação, em simultâneo, de eosina pela hemoglobina e de corantes básicos pelo RNA ribossomal residual. Esta particularidade é designada por policromasia ou policromatofilia (Figura 18). Tal como os reticulócitos indiciam um estágio imaturo dos eritrócitos por possuírem restos de RNA ribossômico com capacidade de reterem corantes supra vitais e levarem à formação de um retículo visível, também, os eritrócitos policromatófilos são eritrócitos imaturos. É, por isso, possível estabelecer uma certa relação entre os dois tipos de células. Ambas são células imaturas recém-lançadas na corrente sanguínea, a partir da MO, mas, num sangue normal, a percentagem de reticulócitos (1 a 2%) é consideravelmente superior à dos eritrócitos policromatófilos (inferior a 0,1%) (Bain, 2007; Melo, 2014; Romana and Rios, 2020).

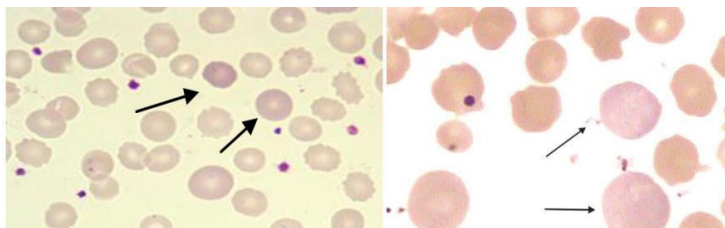


Figura 18: Policromasia, eritrócitos corados a róseo-azulada  
 Fonte: Melo, 2014; Romana and Rios, 2020

Os eritrócitos podem, também, apresentar inclusões citoplasmáticas designadas por inclusões eritrocitárias que resultam de material celular remanescente, nomeadamente, de DNA, de mitocôndrias ou ainda, da presença de microrganismo no seu interior (Romana e Rios, 2020).

Assim, os Corpúsculos de *Howell-Jolly* (Figura 19-A) são inclusões eritrocitárias, de tamanho médio, arredondadas, de 1 a 2 $\mu$ m de diâmetro e com cor igual à do núcleo. Estas inclusões são fragmentos de material nuclear, compostas de DNA. Estes fragmentos são frequentes em doentes hipoesplênicos, nas anemias megaloblásticas, anemias hemolíticas, em alcoólicos e, ainda, nos recém-nascidos devido ao baço ser funcionalmente imaturo (Bain, 2007; Naoum e Naoum, 2008; Barbara H. Estridge, 2011). Já os corpúsculos de *Pappenheimer*, outras inclusões que podem estar presentes em pequeno número nos eritrócitos, são basófilas, que na sua composição contêm agregados de ferritina ou de mitocôndrias ou de fagossomas que contêm ferritina agregada (Figura 19-B) (Bain, 2007).

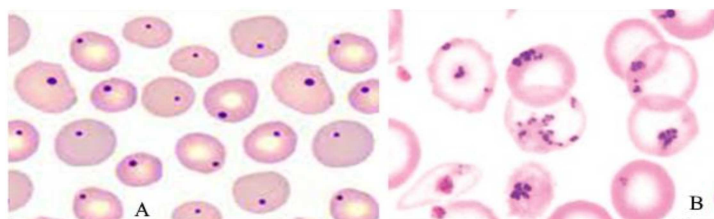


Figura 19: A-Corpúsculos de *Howell-Jolly*, B-Corpúsculos de *Pappenheimer*  
 Fonte: Melo, 2014; Gualandro, 2015

Por vezes verificamos, no esfregaço sanguíneo, a presença de pequenas e numerosas inclusões, grânulos azul-escuro, geralmente finos, de RNA, que se encontram distribuídos no interior do citoplasma do eritrócito. Estas inclusões basófilas designadas por pontuado

basófilo (Figura 20), que, ocasionalmente, podem ser observadas no sangue de indivíduos saudáveis, estão também presentes em algumas doenças hematológicas. Entre outras doenças, são exemplo: a talassemia *major*, a anemia hemolítica, as hepatopatias, a intoxicação pelo chumbo ou outros metais pesados (Bain, 1998; Bain, 2007; Zago, 2013).

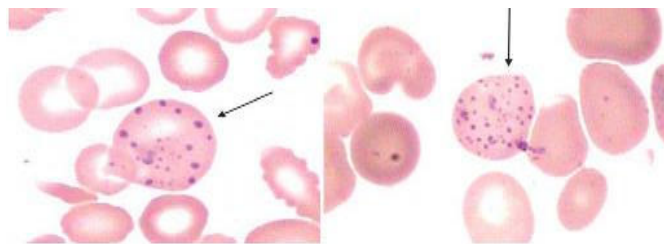


Figura 20: Esfregaço de sangue periférico contendo pontuado basófilo (seta).  
Fonte: Melo, 2014

Por vezes verifica-se o empilhamento dos eritrócitos lembrando o empilhamento de moedas, isto, quando distendidos num esfregaço sanguíneo. Esta formação, como é observada na Figura 21, é designada por *rouleaux* eritrocitário e, é devida a um aumento da concentração plasmática de proteínas de elevado peso molecular. Como causas mais comuns temos a gravidez devido ao aumento da concentração de fibrinogénio; os quadros inflamatórios pelo aumento de imunoglobulinas, da  $\alpha_2$ -macroglobulina e do fibrinogénio e no mieloma múltiplo pela presença de uma paraproteína monoclonal. Também poderá ser devido a um artefacto, como seja, o aumento do tempo na realização do esfregaço sanguíneo (Bain, 1998; Bain, 2007).

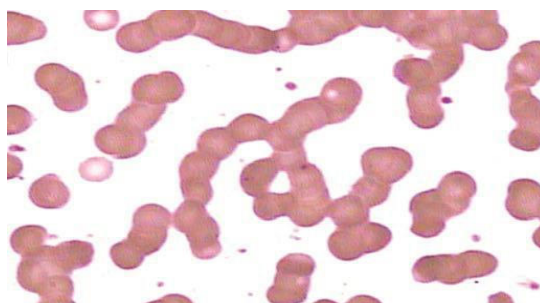


Figura 21: Formação de *rouleaux* eritrocitário  
Fonte: Gualandro, 2015

Em exames de determinação da velocidade de sedimentação sanguínea, caso haja formação de *rouleaux*, poderá haver uma elevação do resultado pelo facto de os eritrócitos se tornarem mais densos (Zago, 2013; Melo, 2014).

### 1.1.2.2. Eritrócitos vs reticulócitos - características e ontogenia/ função biológica

A transição entre eritroblasto e eritrócito requer 5 a 7 dias, mas, pode ser acelerada até dois dias quando a medula é estimulada por indutores de crescimento ou por fatores externos, como a exposição do sangue a baixas concentrações de oxigênio, por longos períodos de tempo ou, até, em casos de hemorragias. A destruição de grandes porções da MO, por qualquer causa, provoca hiperplasia da medula restante, na tentativa de suprimir a demanda de eritrócitos pelo organismo (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Guyton e E. Hall, 2005; Tobergte e Curtis, 2013).

A primeira célula que pode ser identificada como pertencente à linhagem vermelha é o proeritroblasto. Como foi anteriormente referido, uma vez formado, o proeritroblasto divide-se por diversas vezes na presença de estimulação pela eritropoietina, que por sua vez, estimula os progenitores eritroides a formar mais eritroblastos (Tabela 4) (Guyton e E. Hall, 2005; Melo, 2014).

Tabela 4: Células de linhagem eritroide da medula óssea e suas características

| Células                      | Diâmetro   | Relação N/C*      | Citoplasma   | Núcleo  |
|------------------------------|------------|-------------------|--|---|
| Proeritroblastos             | 14 - 20µm  | Alta (4:1)        | Escasso, em coroa, intensamente basófilo, halo claro perinuclear | Cromatina avermelhada, clara, homogênea e firmemente reticulada |
| Eritroblasto Basófilo        | 12 - 20 µm | Media (1:1)       | Mas amplo, em coroa intensamente basófilo                        | Central cromatina irregular com algumas condensações            |
| Eritroblasto policromatófilo | 12-15µm    | Baixa (1:4)       | Azul-pálido ao cinzento, tonalidade lilás                        | Central, redondo, cromatina violeta, densa e condensada         |
| Eritroblasto ortocromático   | 8-12µm     | Muito Baixa (1:8) | Abundante, acidófilo   | Pequeno, condensado ou picnótico central ou excêntrico.         |

\*Relação Núcleo/Citoplasma

Fonte: Zago, 2013

A primeira geração de eritroblastos é denominada de eritroblastos basófilos, seguindo-se os policromatófilos e os ortocromáticos (Figura 22). Ao mesmo tempo, o retículo endoplasmático também é reabsorvido. As células nesse estágio são denominadas por



reticulócitos, saem da MO, entram nos capilares sanguíneos por diapedese e modificam a sua conformação para passarem pelos poros das membranas capilares. O material basófilo remanescente do reticulócito, normalmente, desaparece ao fim de 1 a 2 dias e, a partir daí, a célula passa a ser referida como eritrócito maduro (Guyton e E. Hall, 2005; Bain, 2007; Jelkmann, 2011).

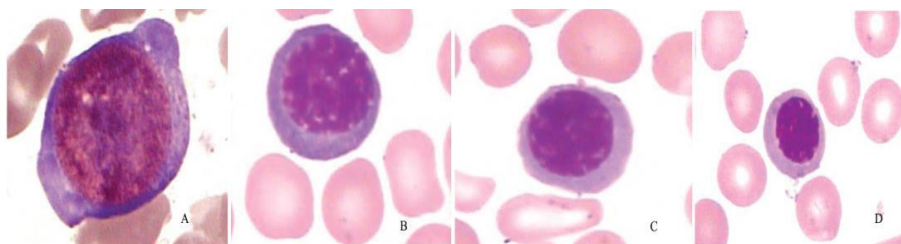


Figura 22: Diferentes tipos de eritroblastos (A – Proeritroblasto, B – Eritroblasto Basófilo, C – Eritroblasto Policromático, D – Eritroblasto Ortocromático)

Fonte: Melo, 2014

A contagem dos reticulócitos é de primordial importância nos casos das anemias, uma vez que permite verificar se a anemia é de causa medular ou extramedular. Assim, e para que seja expressa com maior exatidão a produção de eritrócitos pela MO é relevante que após a determinação da percentagem de reticulócitos se proceda à determinação do seu valor absoluto tendo em conta o valor absoluto dos eritrócitos (Bain, 2007; Melo, 2014).

Segundo Bain (2007) é possível obter-se um resultado mais significativo do valor de reticulócitos do que a sua percentagem. Este, pode ser obtido determinando o índice reticulocitário, o qual, corrige como iremos ver mais adiante o valor dos reticulócitos para o grau de anemia.

### 1.1.3. Plaquetas

As plaquetas também denominadas de trombócitos são fragmentos citoplasmáticos provenientes de megacariócitos, grandes células da MO, cujo diâmetro oscila entre 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  e uma espessura entre 0,6 e 1,2  $\mu\text{m}$  (Figura 23). Cada megacariócito origina, em média, 3.000 plaquetas. Na circulação sanguínea, as plaquetas quando normais, vivem em média, de 8 a 12 dias sendo à *posteriori* removidas pelo sistema reticuloendotelial do baço e do fígado (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Bain, 2007; Rinaldi, 2008).

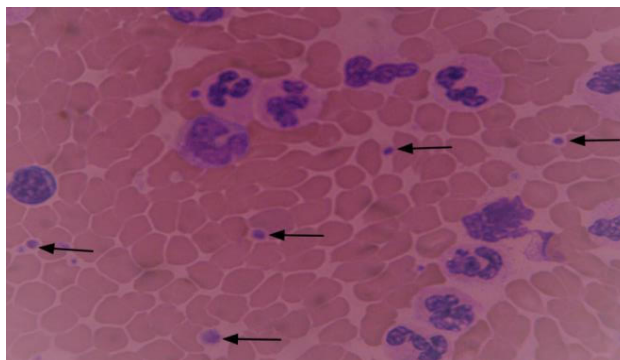


Figura 23: Plaquetas  
Fonte: Zago, 2013

No sangue periférico, circulam dois terços do total de plaquetas, com valores de referência que variam entre 150.000 a 450.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>, sendo que, o restante se encontra no baço (Melo, 2014).

À microscopia ótica apresentam-se como células sem núcleo, com citoplasma azul-claro evidenciando-se numerosos grânulos azurófilos, dispersos no citoplasma ou concentrados no centro. Quando observadas em esfregaço sanguíneo, obtido a partir de sangue nativo, apresentam-se em forma de agregados plaquetários contrariamente ao que se observa em esfregaços obtidos em sangue anticoagulado com EDTA. Porém, em determinadas patologias do foro hematológico é possível observarem-se, não só, variações na sua morfologia, mas, também, no diâmetro e na sua distribuição ao longo do esfregaço (Castro *et al.*, 2006; Bain, 2007).

#### 1.1.4. Leucócitos

O termo leucócito é de origem grega. *Leuco* significa “branco” e *cito*, “célula”. Leucócitos, ou glóbulos brancos, são células nucleadas descritas pela primeira vez por William Hewson (1739-1774), um cirurgião e anatomista inglês, considerado o pai da hematologia por vários autores. Estas células, oriundas da medula óssea, são transportadas no corpo por intermédio do sangue, estão presentes na linfa, nos órgãos linfoides e, ainda, em vários tecidos conjuntivos. Formam o grupo mais heterogêneo do sangue (Melo, 2014).



Os valores normais absolutos e relativos do número de leucócitos e suas subpopulações encontradas no sangue periférico, em diferentes idades, estão descritos na Tabela 5.

Dados conhecidos da literatura suportam que o número de leucócitos muda com a idade e durante a gravidez. No dia do nascimento, o recém-nascido apresenta uma contagem alta de leucócitos, variando de 9.000 a 30.000 leucócitos, mas após cerca de duas semanas este número cai para os níveis de adulto. A percentagem de neutrófilos é alta nas primeiras semanas após o nascimento, mas depois é observada a predominância de linfócitos. Até aos 8-10 anos de idade, os linfócitos são mais predominantes do que os neutrófilos. Nos idosos, o total de leucócitos diminui ligeiramente.

A situação de gravidez resulta numa leucocitose “normal”, principalmente com um aumento nos neutrófilos e com um ligeiro aumento nos linfócitos. A leucocitose, leucócitos acima de 10.000, geralmente deve-se a um aumento em um dos cinco tipos de leucócitos e recebe o nome da célula que mostra o aumento primário, como por exemplo, leucocitose neutrofílica, quando há aumento primário dos neutrófilos, aliás a população mais comum estar aumentada na gravidez (Souza, B. Filho e Ferreira, 2002).

Tabela 5: Valores de referência relativos aos leucócitos, número de células no sangue: variação com a idade.

|                         |    | Valores referência (células/ $\mu$ L) e contagem diferencial (%) |         |                |         |                |         |
|-------------------------|----|--|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Tipo de Células         |    | 1 ano  | %       | 10 anos        | %       | Adultos        | %       |
| Total leucócitos        | de | 6.00 – 17.500  | -       | 4.500 – 13.500 | -       | 4.000 – 11.000 | -       |
| Neutrófilos bastonetes  |    | 0 – 1.000  | 7 -13   | 0 – 1.000      | 6 – 8   | 1.000 – 700    | 0 - 7   |
| Neutrófilos segmentados |    | 1.000 – 8.500  | 15 - 35 | 1.800 – 7.000  | 45 - 50 | 1.800 – 7.000  | 50 - 65 |
| Eosinófilos             |    | 50 – 700   | 1 - 3   | 0 – 600        | 1 – 3   | 0 – 450        | 1 - 3   |
| Basófilos               |    | 0 – 200  | 0 - 1   | 0 – 200        | 0 – 1   | 0 – 200        | 0 - 1   |
| Linfócitos              |    | 4.000 – 10.500   | 40 - 70 | 1.500 – 6.500  | 35 - 40 | 1.000 – 4.800  | 25 - 40 |
| Monócitos               |    | 50 – 1.100 0   | 5 - 8   | 0 – 800        | 3 -8    | 0 – 800        | 3 - 9   |

Fonte: Zago, 2013

Podemos observar da Tabela um decréscimo do número total de leucócitos com a idade, sobretudo apoiado num défice de linfócitos e num acréscimo de neutrófilos segmentados (Zago, 2013).

O número de leucócitos é reconhecido, não só, como um indicador inflamatório e infeccioso, mas, também, como um preditor de eventos cardiovasculares (Paulo, Rocha e Faria, 2016). Em média, existem de 4.000 a 11.000 leucócitos/mm<sup>3</sup> no sangue periférico. Subpopulações de leucócitos estão relacionadas a diferentes processos inflamatórios e/ou infecciosos. São exemplo as infecções por Vírus Epstein Bar (EBV) em que, a presença de uma leucocitose associada a linfocitose, com o aparecimento das chamadas células de *Downey*, e linfócitos de citoplasma hiperbasófilo são presuntivas de um diagnóstico de Mononucleose Infecciosa (Santos, N., Romanos, M., Wigg, 2008).

#### **1.1.4.1. Leucócitos: ontogenia e morfologia**

Os leucócitos englobam um grupo de células muito versátil, tanto na sua morfologia, como no desenvolvimento e na função imunológica, com a principal função de proteger o organismo dos vários microrganismos estranhos/ ou agentes infecciosos, assumem, igualmente, o papel de manter a homeostasia imunológica.

Oriundos de um mecanismo denominado de leucopoiese, que se inicia na MO e onde são produzidos diariamente cerca de  $1,5 \times 10^9$  de células, o rácio de produção de leucócitos, sobretudo da linha mieloide, por cada eritrócito é de 4:1 (Ciesla, 2007).

Os leucócitos têm origem nas células precursoras pluripotentes, dando origem à célula precursora mieloide, que define a linha mieloide, e à célula precursora linfoide, que define a linha linfoide. Através de interleucinas hematopoiéticas e de outros fatores de crescimento, estruturam-se para originar diversas formas maduras de leucócitos, nomeadamente, os leucócitos polimorfonucleares ou granulócitos, que incluem neutrófilos, eosinófilos e basófilos, e as células mononucleares, que incluem, os monócitos, que se diferenciam mais tarde noutros tipo celulares, como macrófagos ou células dendríticas, e os linfócitos. Estes últimos, ainda divididos em linfócitos B, linfócitos T, NKT e *natural killer* (NK) (Ciesla, 2007).

Os mastócitos são, igualmente, células que colaboram na resposta imune, contudo derivam de um precursor mieloide diferente na MO e são consideradas células do tecido

conjuntivo. O mastócito sai da MO no seu estado imaturo e circula na sua forma imatura, apenas amadurecendo no tecido de atuação (Junqueira e Carneiro, 2008).

No global, o ciclo de maturação dos leucócitos é mais complexo que o dos eritrócitos (Ciesla, 2007). O seu tempo de vida é igualmente diferente, os leucócitos apresentam um tempo de vida mais curto, 6-10 dias e os eritrócitos de 120 dias. Após saída de MO, os leucócitos libertados na circulação periférica têm aqui curta permanência até migrarem para os tecidos. Assim, os leucócitos que se visualizam na circulação periférica são uma parte de um todo, que se localiza em três compartimentos distintos: a medula óssea, a circulação e os tecidos (Ciesla, 2007).

A maior parte da função dos leucócitos é desempenhada nos tecidos, e é nestes que persistem entre 2 a 5 dias. Podemos ainda considerar a existência de duas reservas distintas: o *pool* marginal, para os leucócitos que se encontram ao longo do endotélio dos vasos sanguíneos e prontos a migrarem para o local de infeção; e o *pool* circulante para os leucócitos que circulam na corrente sanguínea periférica. O baço é um órgão linfóide que alberga uma boa reserva de leucócitos (Ciesla, 2007).

Nos granulócitos, os núcleos lobados apresentam-se pleomórficos, com forma variável, em que os grânulos que se encontram no seu citoplasma são bem evidentes, coram de modo diferente consoante a célula e a sua afinidade para corantes ácidos como a eosina, básicos ou com afinidade neutra, sendo respetivamente eosinófilos, basófilos ou neutrófilos (Ciesla, 2007).

Os aspetos chave que distinguem estas células incluem a presença ou ausência de grânulos e nas fases imaturas e maduras são, o tamanho da célula, o rácio núcleo-citoplasma (N:C), o padrão de cromatina, o tipo de citoplasma e seus grânulos.

Na granulopoiese, processo de diferenciação e maturação de granulócitos, o mieloblasto é a primeira célula reconhecida, e com os promielócitos dão origem a três linhagens celulares, de acordo com o tipo de grânulos secundários e morfologia nuclear. Após a divisão e diferenciação apresentam fases de maturação crescentes, de mais imaturo a mais maturo. Assim, encontramos: mieloblasto, promielócito ou pro-granulócito (que contém os grânulos primários), mielócito, metamielócito, granulócito em banda (ou bastonetes) e numa fase madura e mais definida, o granulócito segmentado/maduro (Figura 24).

Contudo, o neutrófilo em banda pode, por vezes, ser encontrado na circulação periférica, embora em número muito reduzido (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000; Ciesla, 2007).

Os grânulos específicos secundários (neutrofilicos, eosinofilicos ou basofilicos) aparecem a partir da fase de promielócito (Figura 25). (Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000).

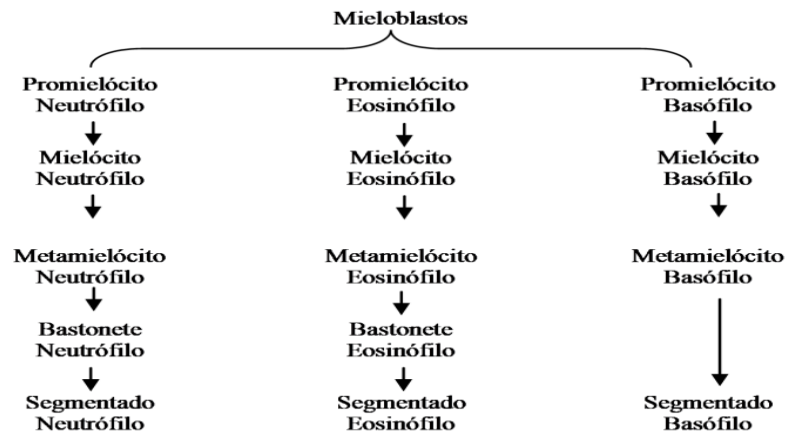


Figura 24: Processo de formação dos leucócitos granulócitos (Granulopoiese)  
Fonte: Almeida, 2008

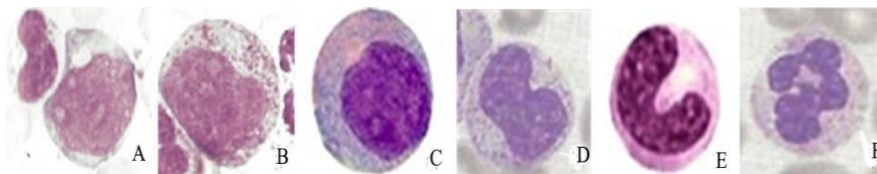


Figura 25: A- Mieloblasto, B- Promielócito, C- Mielócito, D- Metamielócito, E- Neutrófilo em banda, F- Neutrófilo segmentado.  
Fonte: Hoffbrand, A. V. e Pettit, 2000

Segundo a literatura, as características que definem estas fases são:

- no mieloblasto: diâmetro de 12 a 20µm, N:C: 4:1, núcleo redondo, oval ou discretamente recortado; cromatina vermelha-púrpura suave de textura fina e onde se observam 2 a 5 nucléolos, em geral refringentes e arredondados; o citoplasma azul suave e em geral não granuloso.

- no promielócito: com aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , N:C: 3:1, núcleo oval, redondo ou plano e não centrado; cromatina vermelho-púrpura densa, pode conter ou não nucléolos; citoplasma contém grânulos azurófilos que são “não específicos”. Distingue-se por ser maior que o mieloblasto, com nucléolos grandes e cromatina do núcleo ligeiramente grosseira.

- no mielócito: de menor diâmetro entre 10 a 18  $\mu\text{m}$ , N:C: 2:1, núcleo oval invaginado e denso; cromatina vermelho-púrpura discretamente granulosa e mais grosseira; citoplasma com grânulos específicos, que no neutrófilo têm a aparência de poeira fina vermelha azulada; no eosinófilo, os grânulos são grandes de cor vermelha alaranjada e isolados e no basófilo, são grandes e de cor azul escura purpúrea. É a última fase capaz de se dividir. Distingue-se por coloração do núcleo mais escura e cromatina de padrão granuloso.

- no metamielócito: diâmetro de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , N:C: 1:1, núcleo em forma de rim/feijão, manchas de cromatina grosseira e sem nucléolos, citoplasma de tom azul pálido rosado com grânulos específicos de tamanho médio.

- no neutrófilo em banda: diâmetro entre 9 a 15  $\mu\text{m}$ ; sem lobo nucleares, sem filamentos, cromatina em forma de faixa e grosseira; citoplasma castanho rosado com muitos grânulos finos secundários.

- no neutrófilo segmentado: diâmetro de 9 a 15  $\mu\text{m}$ ; 2 a 5 lobos nucleares com filamentos bem nítidos e grânulos como uma poeira pálida; citoplasma lilás pálido com sombras azuladas e muitos grânulos secundários, finos como pó (Figura. 25-A).

A Tabela 6 resume algumas das principais características morfológicas das fases celulares dos granulócitos (Ciesla, 2007)

Além das características morfológicas que definem as células leucocitárias, as diferentes fases evolutivas deste processo podem ser distinguidas através da análise da expressão de marcadores fenotípicos “cluster differentiation” ou CD, característicos de cada célula e da sua fase evolutiva, usando por exemplo a citometria de fluxo. Contudo, este assunto não será explorado para os granulócitos, mas para os linfócitos mais à frente no texto.

Tabela 6: Características morfológicas das células de linhagem granulocítica

| Células        | Tamanho aproximado | Núcleo   | Citoplasma   |
|----------------|--------------------|--|--|
| Mieloblasto    | 12-20 µm           | Redondo<br>Cromatina delicada<br>Nucléolos                 | Basófilo<br>Granulações azurófilas   |
| Promieloblasto | 20 µm              | Redondo<br>Cromatina delicada<br>Nucléolos                 | Basófilos<br>Granulações azurófilas<br>Granulações específicas                   |
| Mielócito      | 10-18 µm           | Oval<br>Cromatina, mas condensada<br>Ausência de nucléolos | Acidófilos<br>Granulações específicas<br>(Neutrófilos, eosinófilos<br>basófilos) |
| Metamielócito  | 10-15 µm           | Reniforme<br>Cromatina grosseira                           | Acidófilos<br>Granulações específicas<br>(Neutrófilos, eosinófilos<br>basófilos) |
| Bastonete      | 9-12 µm            | Em ferradura<br>Cromatina grosseira                        | Acidófilos<br>Granulações específicas<br>(Neutrófilos, eosinófilos<br>basófilos) |
| Segmentado     | 9-12 µm            | Lobulado (media=3)   | Acidófilos<br>Granulações específicas<br>(Neutrófilos, eosinófilos<br>basófilos) |

Fonte: Almeida, 2008

Nos outros dois tipos de granulócitos, eosinófilo e basófilo, as fases descrevem-se como:

- no eosinófilo: diâmetro de 10 a 16 µm; N:C cerca de 1:1, núcleo não centrado e bilobado; citoplasma com grânulos grandes específicos (com histamina) de cor vermelha alaranjada; citoplasma laranja- rosado com muitos grânulos finos secundários (Figura 26-B).

- no basófilo: diâmetro de 10 a 14 µm; N:C difícil de determinar, núcleo quase indistinto; cromatina grosseira, aglutinada e bilobada; citoplasma com muitos grânulos grandes e específicos de cor púrpura quase preta (Figura 26-C).

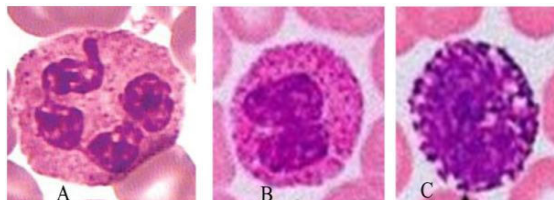


Figura 26: A-Neutrófilo, B-Eosinófilo, C-Basófilo  
Fonte: Melo, 2014

#### 1.1.4.2. Leucócitos não-granulocíticos

Os agranulócitos (monomórficos) que incluem os linfócitos e os monócitos, são leucócitos que não apresentam grânulos. Porém, em pequeno número grânulos azurófilos de cor violeta intensa podem ser observados em monócitos e em células NK.

- no monócito: o mieloblasto (ou monoblasto) é o estágio jovem do monócito e apresenta as características descritas anteriormente.

- no promonócito: diâmetro de 12 a 20  $\mu\text{m}$ ; N:C: 3:1, núcleo redondo e achatado, podem encontrar-se nucléolos e zonas rugosas; citoplasma cinzento azulado e com raros grânulos.

- no monócito: diâmetro de 12 a 20  $\mu\text{m}$ ; N:C: 1:1, núcleo com diversas formas e sem nucléolos; cromatina de malha larga e fina; citoplasma abundante cinzento azulado e com grânulos médios (Ciesla, 2007; Zago, 2013).

Dos agranulócitos, o mais evidenciado é o linfócito, em que a sua célula jovem toma o nome de linfoblasto, seguindo os estádios de prolinfócito a linfócito maduro. As principais características são:

- no linfoblasto: célula precursora linfoide imatura, encontrada em baixa percentagem na MO normal; tamanho superior ao linfócito maduro; apresenta maior abundância citoplasmática; núcleo com cromatina menos condensada, podem ser visíveis um ou mais nucléolos.

Na Leucemia Linfoide Aguda (LLA) existe grande proliferação clonal destas células na MO, sendo que, as mesmas podem aparecer no sangue periférico.

- no prolinfócito: diâmetro de 9 a 18  $\mu\text{m}$ ; N:C: 3:1; cromatina discretamente grosseira, presença de nucléolos; citoplasma cinzento azulado, mais azulado na periferia.

- no pequeno linfócito: diâmetro de 7 a 18  $\mu\text{m}$ ; N:C: 4:1, núcleo redondo com grumos de cromatina grosseira (em geral compacta); citoplasma de apenas um fino bordo com alguns grânulos azurófilos (contendo enzimas lisossomais).

- no grande linfócito: diâmetro entre 9 a 12  $\mu\text{m}$ ; N:C: 3:1; cromatina mais solta e transparente; citoplasma em maior quantidade e de cor mais clara e com tendência a ter grânulos azurófilos (Ciesla, 2007).

Assim, no sangue periférico os linfócitos têm diâmetros variados e morfologia diferente, consoante são pequenos ou grandes. Os linfócitos grandes constituem cerca de 10% dos linfócitos circulantes. Os linfócitos nas crianças são maiores e mais pleomórficos do que no adulto (Bain, 2007).

Acresce dizer que a MO é o principal local de formação (linfopoiese) de precursores de futuros linfócitos *naïve*, os linfócitos T e linfócitos B, mas a sua maturação final ocorre no timo e no baço, respetivamente. Contudo, ambas as populações de linfócitos, ditas circulantes, passam pelos tecidos linfoides periféricos, tais como, linfonodos, baço e tecidos linfoides dos tratos gastrointestinal e respiratório. Os linfócitos B atingem 10-20% da população linfocitária total e os linfócitos T cerca de 60-80%, com relevante contribuição ao nível da resposta imune adaptativa e de memória (Bain, 1998; Bain, 2007).

Uma terceira população de linfócitos, em menor número no sangue, são os linfócitos *natural killer* (NK) que constituem menos de 10% da população total linfocitária. Esta população NK tem maior relevância de ação na luta contra células infetadas por vírus e contra células tumorais (Ciesla, 2007).

Os linfócitos B podem transformar-se em plasmócitos (célula que produz e secreta os anticorpos) após estimulação antigénica e ativação, mas, em geral, são células teciduais, sendo encontradas nos órgãos linfoides e na MO (Mínges Wols, 2006). Por vezes, podem ser vistos no sangue periférico plasmócitos em doenças neoplásicas como no mieloma múltiplo ou na leucemia plasmocítica, onde apresentam uma variação ampla de anormalidades citológicas. Não costumam ser vistos em indivíduos saudáveis (Bain, 1998; Bain, 2007).

#### **1.1.4.3. Ontogenia dos linfócitos B e T**

A ontogénese dos linfócitos B e T é um processo que tem início na MO no processo de hematopoiese. Contudo, os linfócitos T, como precursores ou timócitos, rapidamente vão



ser direcionados para o timo (também órgão linfoide primário), onde decorrerão as restantes etapas de maturação e desenvolvimento, até se tornarem em linfócitos T maduros “naive” ou imunologicamente competentes. Por outro lado, os linfócitos B saem da MO na forma de linfócitos B imaturos (expressando só IgM de membrana) e dirigem-se até ao baço, onde decorrerá a última etapa de maturação para linfócitos B maduros “naive” expressando IgM e IgD de membrana (Júnior *et al.*, 2010).

Para ambos, linfócitos B e T, o seu completo amadurecimento é caracterizado pela sua competência a responder a um determinado estímulo antigénico, associado à expressão de determinadas moléculas de superfície que os caracterizam fenotipicamente (Wang *et al.*, 2012).

Os linfócitos B, para além de apresentarem um recetor específico BCR para reconhecimento de antígenos e do recetor associado, CD79  $\alpha/\beta$ , para a transdução de sinal, expressam outros marcadores de membrana, por vezes típicos de estágio evolutivo, que funcionam como biomarcadores do desenvolvimento dos linfócitos B (Wang *et al.*, 2012).

O recetor CD19 (ou cluster of differentiation 19) é uma glicoproteína de membrana de 95kD e funciona como o componente dominante de sinalização de um complexo multimolecular, que inclui o CD21 (recetor para o complemento), o CD81, TAPA-1 e CD225, como recetores complementares de função da sinalização celular (Wang *et al.*, 2012).

Está descrito que o CD19 exerce diversas funções ao nível do linfócito B, assim e de forma sucinta, atua como um co-recetor crucial para a transdução de sinal do BCR em que recruta e amplia a ativação de várias famílias de proteínas tirosina cinases (Src, Lyn e Fyn) das vias de sinalização celular; atua na ativação do linfócito B de forma independente e dependente do antígeno, assim como na expansão da célula B após ativação. Há autores que acrescentam que o CD19 está envolvido, embora não seja essencial, na regulação do desenvolvimento ao nível dos estádios evolutivos na MO e até nas etapas de maturação tardia no baço (Wang *et al.*, 2012).

Durante a linfopoiese de células B, a expressão de superfície do CD19 ocorre conjuntamente com o rearranjo do gene da imunoglobulina, logo em estádios iniciais,

sendo expresso a partir de célula pró-B até à diferenciação terminal em célula plasmática. Ao longo do desenvolvimento, a densidade superficial do CD19 é altamente regulada e a sua expressão é muito superior na célula B madura em relação à célula B imatura (Forsthuber *et al.*, 2018).

O CD19 é expresso em todas as células B normais (Figura 27) e neoplásicas, tendo sido inicialmente excluído nas células plasmáticas (Wang *et al.*, 2012). Contudo, estudos muito recentes, apoiam a sua expressão nas células plasmáticas da MO, mas, de uma forma heterogénea, com populações CD19 positivo (*high*) e outras CD19 negativo (*low*) (Forsthuber *et al.*, 2018; Khodadadi *et al.*, 2019).

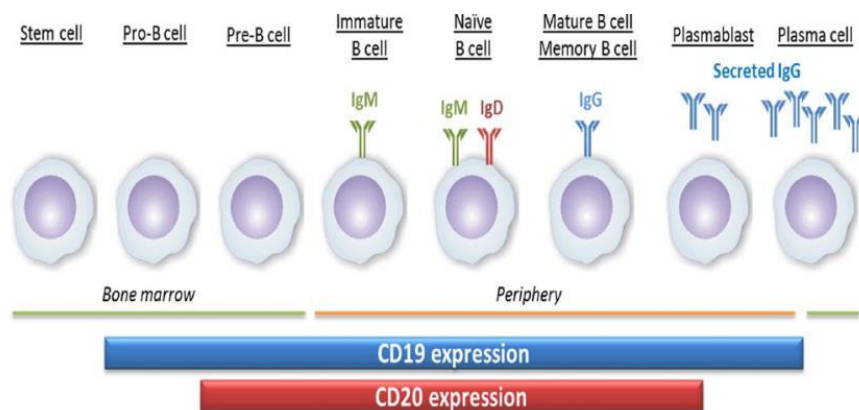


Figura 27: Estádios da célula B com expressão de CD19 e CD20  
Fonte: Forsthuber *et al.*, 2018

Em resumo, a expressão de CD19 é observada em células B de estágio anterior ao do CD20. Além disso, a expressão de CD19 persiste nas células B secretoras de anticorpos em estágio avançado (plasmoblastos e células plasmáticas) após a perda da expressão de CD20.

Todavia, a ubiquidade de expressão torna o CD19 como um marcador de células B e um alvo para imunoterapias direcionadas a linfócitos B neoplásicos.

Este foi o marcador fenotípico escolhido, no nosso trabalho laboratorial, para a identificação da população B em circulação e presente nos BC.

Os linfócitos T, como as outras células sanguíneas, também são gerados na MO, mas migram para o timo entre a sétima e oitava semana de gestação nos humanos. Sendo que

o timo é o órgão responsável pelo desenvolvimento e maturação de diferentes populações de linfócitos T e promove a aquisição de recetores específicos (de la Guardia Peña, Macias Abraham e Ruiz Villegas, 2021).

O timo suporta a diferenciação de vários subconjuntos distintos de células T que desempenham papéis únicos no sistema imunológico. Células T com TCR $\alpha\beta$  CD4 e CD8, células T $\gamma\delta$  (TCR $\gamma\delta$ ), células NKT, Treg e IEL (linfócitos intraepiteliais) desenvolvem-se e maturam e devem deixar o timo para desempenhar as suas funções noutras partes do organismo (Weinreich e Hogquist, 2008).

Local único para o desenvolvimento de linfócitos T, o timo, fornece o microambiente indutor para o compromisso da linhagem T e a recombinação dos genes do recetor específico V(D)J nos loci TCR  $\gamma\delta$  e  $\alpha\beta$ . Igualmente importante, ele fornece um ambiente especializado para a seleção de clones timocompetentes da resposta adaptativa, pelo facto que inclui a seleção positiva de células T, com restrição ao MHC (Complexo Major de Histocompatibilidade) do próprio e a seleção negativa contra células T autorreativas (permitindo a tolerância ao próprio) e, ainda, o desenvolvimento de propriedades regulatórias exclusivas em subconjuntos como NKT, Treg e IEL (Weinreich e Hogquist, 2008).

Os progenitores das células T proveem da MO e vão para o timo por intermédio das vénulas da junção corticomedular, sendo aqui denominados de timócitos e vão percorrer as zonas do córtex e da medula do timo passando por várias fases de desenvolvimento até à maturação (Figura 28). Seguem os seguintes estádios: célula pró-T (sem rearranjo do TCR), célula pré-T (pré-TCR organizado e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (ou double-negative), célula T-DN (double positive) (TCR/CD3<sup>low</sup> expresso à membrana e expressão conjunta de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), célula T-SP (single positive) (TCR/CD3<sup>high</sup> expresso à membrana e expressão única de CD4<sup>+</sup> ou de CD8<sup>+</sup>), sendo esta a última fase de maturação no timo. É depois exportado para a circulação como linfócito TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ou linfócito TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, respetivamente T *helper* ou T citotóxico (Weinreich e Hogquist, 2008).

Assim, a presença dos recetores de membrana CD3<sup>+</sup> (que identifica todas as células T) e dos recetores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nas subpopulações Th e Tc, permite a identificação destas células no sangue periférico e, ainda, avaliar quantitativamente, os seus níveis no sangue

em situação de “saudável” e de “patologia imune”. Neste trabalho as populações TCD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e TCD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram avaliadas nos *buffy coats* de doadores do CHUSJ. As populações T foram separadas por gradiente de densidade e as suas suspensões analisadas pela técnica multiparamétrica de citometria de fluxo. Assim, a presença dos recetores de membrana CD3<sup>+</sup> (que identifica todas as células T) e dos recetores CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nas subpopulações Th e Tc, permite a identificação destas células no sangue periférico.

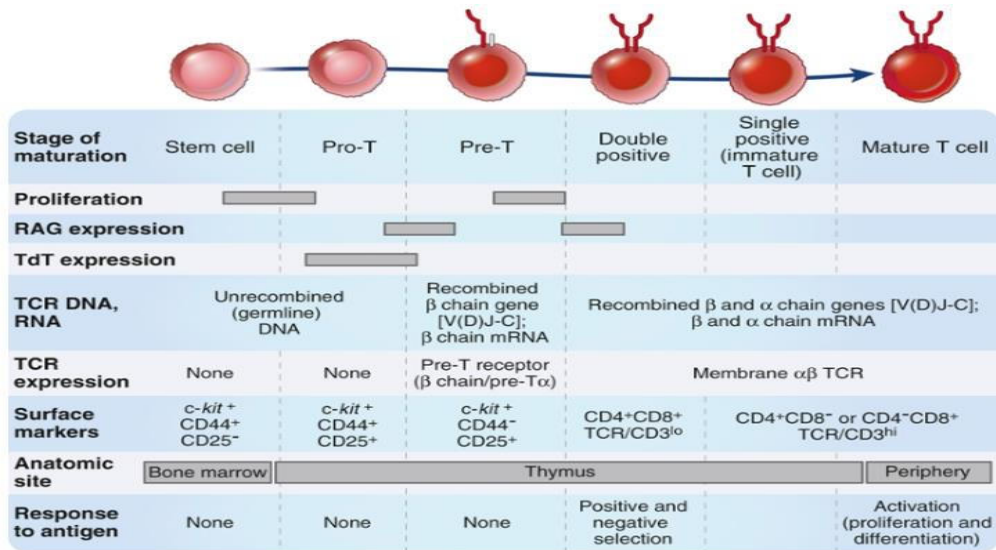


Figura 28: Estádios de desenvolvimento até à maturação das células T  
 Fonte: Abbas *et al.*, 2014; Abbas Kuby, Lichtman AH, 2017

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Embora a fração *buffy coat* residual, rica em leucócitos, não tenha aplicação a nível de transfusão, contudo, não só, é de amplo valor na área de investigação, principalmente, na análise celular, ao nível da purificação de sub-populações (Kizhakeyil *et al.*, 2019) diferenciação de monócitos, células dendríticas, linfócitos T (Moldenhauer *et al.*, 2003; Salam *et al.*, 2013) como também, o seu estudo é fundamental na área da imunologia.

Vários são os estudos publicados que descrevem e comparam métodos de separação, processamento, viabilidade, recuperação e preservação dos hemocomponentes (Meyer *et al.*, 2005; van der Meer, 2013; Vučetić *et al.*, 2018).

No caso dos *buffy coats* residuais a bibliografia é mais escassa, mas, o seu uso na investigação clínica implica a necessidade de mais rigor e optimização, considerando a alo-heterogeneidade do dador (Moldenhauer *et al.*, 2003; Mallone *et al.*, 2011; Tremblay & Houtman, 2015).

A bibliografia refere ainda que ocorrem alterações no *buffy coat* residual com origem no processamento, armazenamento, temperatura, transporte, ou até, associadas à idade e declínio do sistema imunológico do dador e, com isto, promovem variabilidade nos parâmetros celulares a avaliar (Bain, 2007; Mallone *et al.*, 2011).

Assim, como objetivos gerais deste estudo pretendeu-se avaliar em vários *buffy coats* recolhidos no Banco de Sangue do CHUSJ parâmetros celulares de referência, como, hematócrito, contagem de eritrócitos, de reticulócitos, observação da morfologia eritrocitária, contagem de leucócitos e fórmula leucocitária. Também, tivemos como objetivo, a partir do *buffy coat* processado em gradiente de densidade e obtendo-se a fração mononuclear (linfócitos e monócitos), analisar a viabilidade celular e quantificar sub-populações T/B, por citometria de fluxo. A avaliação destes parâmetros foi executada a *timings* diferentes após a data da colheita, de forma a analisar a perda da viabilidade celular e o grau de degradação.

A análise incluirá métodos clássicos de coloração e contagem em esfregaço de sangue e a análise quantitativa por citometria de fluxo de populações linfocitárias.

### 2.1.1. Objetivos específicos

- Preparação de lâminas de esfregaço sanguíneo a partir de BC dos vários dadores
- Observação de lâminas de esfregaço sanguíneo e contagem de eritrócitos, quantificação e análise morfológica.
- Observação de reticulócitos e análise quantitativa, em lâminas de esfregaços sanguíneos após coloração pelo azul de crezil brilhante (Reiculocyte Stain, Sigma- Aldrich).
- Cálculo dos seguintes parâmetros: hematócrito, percentagem de reticulócitos, contagem de reticulócitos corrigida e índice de produção de reticulócitos.
- Observação de lâminas de esfregaço sanguíneo e determinação da fórmula leucocitária após coloração pelo Wright.
- A partir do *buffy coat* processado em gradiente de densidade, separação e obtenção da fração mononuclear (CMN-linfócitos e monócitos).
- Análise da viabilidade celular de suspensões celulares CMN e quantificação das sub-populações T e da população B por citometria de fluxo.

Inicialmente o projeto de trabalho incluía o uso de dadores “identificados” como de doação única ou frequente, para uma avaliação do grau de recuperação clínico ou do dador. Contudo, o desenvolvimento do trabalho de tese acabou por decorrer durante a pandemia COVID, o que impossibilitou ao serviço do Banco de Sangue do CHUSJ garantir o seguimento dos dadores, por ser uma época instável de doação e, ainda, pelos respetivos constrangimentos que o momento acabou por impor. Apesar disso, a recolha dos BC foi programada, foram obtidos nas melhores condições e o trabalho de tese seguiu com o estudo dos outros objetivos.

Com este estudo pretendeu-se avaliar vários parâmetros celulares, a nível sanguíneo de eritrócitos e de reticulócitos, que nos permitiu ter uma análise da qualidade destas células e da forma como a medula óssea processa a demanda de novas células no dador. Foi também nosso objetivo e, tendo em conta que os BC estão armazenados com anti-coagulante, verificar a sua possível influência na análise, pormenor que será discutido

posteriormente. Por outro lado, a avaliação de outros parâmetros celulares mais intrínsecos em populações linfocitárias, veio permitir observar o grau de variabilidade/integridade e de degradação dos BC num determinado período de tempo. No global, possibilitou, em simultâneo, fazer o enquadramento e a preparação do aluno de mestrado na área da imuno-hematologia.

## 2.2. Hipóteses

Portanto, a hipótese é a proposição testável ou tentativas de explicação sobre a relação entre duas ou mais variáveis, as que se supõe que possam ser encontradas na realização de um estudo científico. De acordo com os resultados as hipóteses podem ser aceites ou recusadas nem sempre se vai demonstrar como verdadeiro o que se supõe, mas, de qualquer forma a investigação realizada terá sua validade, porque chega a uma demonstração (Alvarenga, 2012).

Assim, fundamentando-nos no suporte teórico e empírico encontrado na revisão da literatura e, em consonância com os objetivos que definimos, colocámos as seguintes hipóteses, que esperamos confirmar no decurso do nosso estudo.

H<sub>0</sub> - o IPR é independente do sexo

H<sub>1</sub> - existe relação entre a percentagem de reticulócitos e o IPR.

H<sub>2</sub> - existe relação entre o IPR e valores de reticulócitos corrigidos.

H<sub>3</sub> - a viabilidade celular é inferior a dia 7 (D7) em relação a dia 1(D1).

H<sub>4</sub> - a viabilidade celular é inferior a dia 15 (D15) em relação a dia 1(D1).

H<sub>5</sub> - existe uma relação entre os resultados analisados ao dia 1 (D1) e os resultados analisados após 7 dias (D7).

H<sub>6</sub> - o número de linfócitos (T CD4+, T CD8+ e B CD19+) são inferiores ao dia 7 (D7) em relação ao dia 1 (D1).

### III. MATERIAL E MÉTODOS

A realização destes estudos experimentais tiveram como principal material biológico 23 *buffy coats* (BC) provenientes do Banco de Sangue do Centro Hospitalar Universitário São João (CHUSJ), recolhidos, transportados e armazenados seguindo um protocolo de boas práticas. Foram anotados, o tempo de transporte e a forma de armazenamento e identificou-se com código para registo interno no laboratório da instituição.

Os componentes do *buffy coat* (ou camada leuco-plaquetária), obtidos após centrifugação de sangue total do dador no CHUSJ, são constituídos por toda a camada de leucócitos (glóbulos brancos), plaquetas e muito pouco plasma. Enquanto, PBMCs refere-se à fração mononuclear (linfócitos e monócitos) dos leucócitos isolada por gradiente de densidade realizada no nosso laboratório (Tobergte e Curtis, 2013). Os conservantes que constam na bolsa matriz (sangue total) podem preservar as células em até 35 dias, bolsa CPDA1- constituído por: ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose, adenina, ou até 45 dias, bolsa SAG-M constituída por: soro, adenina, glicose e manitol. No nosso caso os BC estão em conservante CPD (citrato de sódio, fosfato de sódio, dextrose).

Após os procedimentos anteriores foram anotados os dados de: data de colheita, género do dador, grupo sanguíneo e volume do *buffy coat*. Seguidamente, foram analisados os parâmetros: contagem de reticulócitos, de reticulócitos corrigidos e índice de produção de reticulócitos, assim como, de leucócitos, seguida da determinação da fórmula leucocitária com análise da morfologia de ambos os tipos de células. Estes parâmetros foram analisados diretamente dos BC à data seguinte ao dia da colheita (D1) e, posteriormente, ao dia 7 (D7) e dia 15 (D15) após colheita. Nesta situação, os BC homogeneizados foram abertos através de uma agulha e a amostra recolhida, sendo, em seguida, devidamente fechados e guardados à temperatura ambiente.

Seguidamente, procedeu-se ao isolamento e contagem celular de leucócitos, após lise eritrocitária, e ao isolamento de células mononucleares por gradiente de densidade, bem como, à análise das populações linfocitárias, população T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e população B (CD19<sup>+</sup>). Nesta situação, igualmente, os BC foram usados aos dias D1, D7 e D15 após



colheita no dador. Na condição D7 incluímos D7 (BC em condição aberto) e D7\* ( BC em condição fechado).

Descrevem-se em seguida as diferentes metodologias utilizadas e, no fim, os principais reagentes de trabalho.

### 3.1. Reticulócitos: método de coloração e realização dos esfregaços

Para a coloração dos reticulócitos foi utilizada a metodologia baseada na precipitação do RNA pelo corante catiónico (SIGMA-ALDRICH). Este corante é uma solução estável, constituída de azul de metileno novo a 1%, cloreto de sódio 0,09% e oxalato de potássio 1,6%. Para a contagem dos reticulócitos, procedeu-se à realização de vários esfregaços sanguíneos tendo-se, no final, escolhido apenas dois por *buffy coat*. A coloração e os respetivos esfregaços foram realizados de acordo com a seguinte técnica:

Num tubo de *ependorf* adicionou-se, a 3 gotas de sangue, devidamente homogeneizado, 2 gotas de corante de reticulócitos (SIGMA-ALDRICH); procedeu-se à sua homogeneização com o auxílio de uma pipeta Pasteur e, deixou-se repousar durante 10 minutos à temperatura ambiente (18-26°C); após este período, colocou-se uma gota da mistura na extremidade direita da lâmina. Com o auxílio de uma lâmina distensora, aplicada a 25-30°, à frente da gota de sangue e, após recuo da mesma para permitir que o sangue se espalhe entre a superfície de contato das duas lâminas, promoveu-se o seu deslizamento ao longo da lâmina, num movimento rápido e leve de modo a obter-se uma fina película da mistura ou seja, o esfregaço (Bain, 2007).

Colocaram-se as lâminas à temperatura ambiente, durante, pelo menos 15 minutos e, após secagem, procedeu-se à contagem dos reticulócitos.



Figura 29. Esfregaços para a contagem de reticulócitos

### **3.1.1. Método de contagem e determinação do número de reticulócitos**

Os esfregaços obtidos após coloração do sangue com azul de metileno novo foram avaliados quanto à presença ou ausência de reticulócitos.

Reticulócitos são eritrócitos jovens que possuem restos de RNA de origem ribossômica, ou seja, são eritrócitos que possuem um retículo mais ou menos denso e, que foram libertados pela MO na corrente sanguínea, ainda jovens. Considerou-se um reticulócito, segundo a classificação do Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos (NCCLS), qualquer eritrócito não nucleado que contenha duas ou mais partículas coradas de azul que são correspondentes a RNA ribossômico (Bain, 2007).

Para a contagem de reticulócitos utilizou-se um microscópio ótico, com uma objetiva de imersão que proporcionou uma ampliação de 1000 vezes e, selecionou-se aleatoriamente uma área de esfregaço onde os glóbulos vermelhos se encontravam separados, mas, não sobrepostos. Procedeu-se à contagem de 1000 eritrócitos incluindo os reticulócitos. Observou-se a presença de conjuntos de filamentos ou de retículo de RNA corados em azul intenso ou púrpura-azulado, dispostos ao acaso no interior dos reticulócitos (Reynolds, 2011a).

Os reticulócitos podem ser classificados em quatro categorias consoante o seu grau de maturação. Este, varia entre os reticulócitos do Grupo I, mais imaturos, até aos reticulócitos do Grupo IV, mais maduros e, sendo estes, maioritariamente, os mais encontrados em circulação no sangue periférico. Os mais jovens, os do Grupo I, são caracterizados pela maior quantidade de grânulos ou massa densa reticular, enquanto os do Grupo IV são caracterizados pela presença de poucos grânulos de RNA (Bain, 2007; Saraiva, 2009). Contudo, durante as contagens dos reticulócitos, não foram realizadas quaisquer distinções quanto ao seu grau de maturação, tendo sido contados apenas como reticulócitos.

A proporção de reticulócitos foi calculada utilizando a seguinte fórmula: (Reynolds, 2011a).

$$\text{Contagem de reticulócitos (\%)} = \frac{\text{Número total de reticulócitos}}{10}$$

Os valores de referência dos reticulócitos para adultos variam de 0,5% a 1,5%.

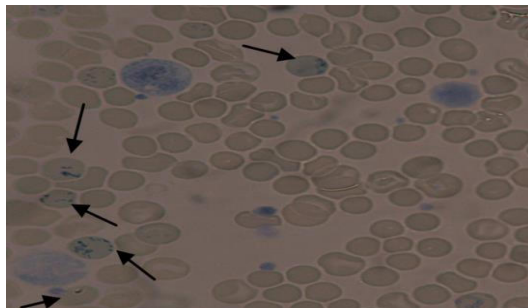


Figura 30. Reticulócitos indicados pelas setas

### 3.1.2. Reticulócitos corrigidos e índice de produção de reticulócitos

Devido à variabilidade dos reticulócitos é necessário corrigir a contagem de reticulócitos observada tendo em conta, um Hematócrito considerado como de referência ou normal, que será igual a 45%. (Calado, 2013).

$$\text{Valor de reticulócitos corrigida (\%)} = \frac{\text{R (\%)} \times \text{Hct (\%)}}{45\%}$$

Onde:

R (%) = Percentagem de reticulócitos encontrados para o indivíduo em estudo

Hct (%) = Hematócrito, em percentagem, calculado para o mesmo indivíduo

O índice reticulocitário para um dado indivíduo foi estabelecido com base na contagem de reticulócitos desse indivíduo e do seu Hematócrito em relação a um Hematócrito considerado como de referência (Bain, 2007; Reynolds, 2011a). Contudo, poderemos fazer uma correção, mais complexa, de modo que o valor encontrado de reticulócitos reflita verdadeiramente a produção medular, quando, por exemplo em presença de uma anemia. Isto porque, em indivíduos anémicos, e, devido ao aumento da eritropoietina, os reticulócitos são libertados a partir da MO mais precocemente e, permanecem durante mais tempo na corrente sanguínea antes de se transformarem em eritrócitos maduros. Assim, calcula-se o índice de produção de reticulócitos (IPR).

O índice de produção de reticulócitos é calculado dividindo-se o valor dos reticulócitos corrigidos pelo tempo médio de maturação do reticulócito ao nível do sangue periférico, para o grau de anemia respetivo (Bain, 2007).

$$\text{Índice de produção de reticulócitos} = \frac{\text{Reticulócitos corrigidos (\%)}}{\text{Tempo de maturação (dias)}}$$

Sendo o tempo de maturação esperado relativamente a valores de Hematócrito:

| Hematócrito | Sangue periférico (dias) |
|-------------|--------------------------|
| 45 - 40     | 1                        |
| 39 - 35     | 1,5                      |
| 34 - 25     | 2                        |
| 24 - 15     | 3                        |

Figura 31. Tempo de maturação dos reticulócitos em dias

Um índice de produção de reticulócitos superior ou igual a 3 (IPR  $\geq 3$ ) é considerado um índice normal, enquanto um valor inferior a 2 (IPR  $\leq 2$ ) está abaixo do índice normal.

### 3.2. Esfregaços sanguíneos: coloração de Wright

Esta coloração assim denominada, é devida a James Homer Wright, que, em 1902, a inventou. É uma modificação da coloração de Romanowsky (protozoologista russo do final do séc. XIX). A coloração de Wright é uma técnica de coloração histológica que utiliza uma combinação de um corante ácido, como a eosina, vermelho, mais concretamente a variedade eosina Y e, também, de um corante básico, o azul de metileno. Este tipo de coloração facilita a distinção entre os diferentes tipos de células sanguíneas. É usada, principalmente, para a coloração do esfregaço de sangue periférico, para posteriormente, ser examinado ao microscópio ótico (Bain, 2007).

Como foi referido anteriormente, a coloração de Wright, porque distingue facilmente as células do sangue, tornou-se amplamente utilizada para diferenciar as subpopulações de leucócitos. Esta coloração é, por rotina, realizada sempre que é formalizado um pedido analítico de um Hemograma (Laborclin, 2018).

Os esfregaços devem ser feitos de preferência sem o uso de anticoagulantes, pois o anticoagulante pode alterar a morfologia leucocitária. Assim, as lâminas dos esfregaços sanguíneos feitas a partir de sangue colhido com anticoagulantes devem ser realizadas até 30 minutos após a colheita, a fim de evitar deformações celulares (Bioclin, 2013a). O esfregaço deve ser realizado de modo a ser constituído por três zonas, a cabeça o corpo e a cauda (Bain, 2007).

O procedimento implica colocar a lâmina no suporte de coloração; fixar o esfregaço com metanol absoluto durante 10 a 20 mn; cobrir o esfregaço com 20 gotas do corante de Wright (Merck KGaA) e aguardar de um a três minutos e adicionar 20 gotas de água desionizada. Homogeneizar a mistura do corante e da água. Aguardar a coloração de três a cinco minutos; lavar a lâmina com água desionizada (tamponada pH 6,8-7,0) e, limpar cuidadosamente a parte oposta ao esfregaço para melhor visualização da lâmina ao microscópio; deixar secar em posição vertical; examinar com objetiva de imersão (Bioclin, 2013b; Laborclin, 2018).

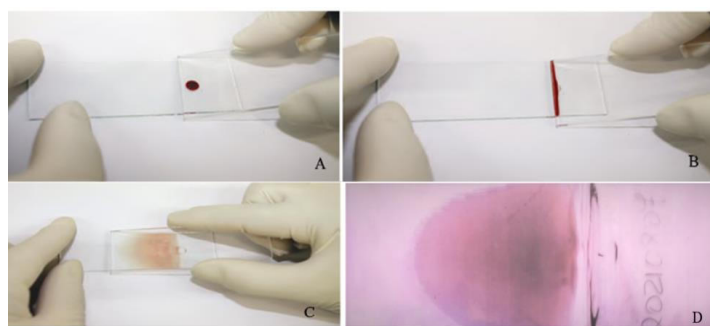


Figura 32. Procedimentos para elaboração de esfregaço sanguíneo.  
Adaptada de Melo, 2014

Um esfregaço de sangue periférico preparado corretamente, corado de modo adequado, pode fornecer dados valiosos para um diagnóstico preciso e, conseqüente tratamento adequado do paciente. Este, tem de apresentar uma cor róseo-azulado a olho nu, já os eritrócitos, quando examinados ao microscópio, devem exibir uma coloração rosa.

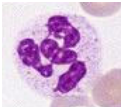
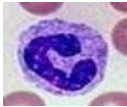
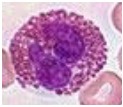
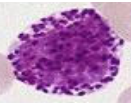
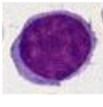
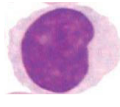
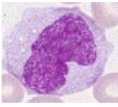
Normalmente, o núcleo dos leucócitos tem a cor púrpura e a cor de citoplasma varia entre o azul-violeta e o rosa-azulado, dependendo do tipo de célula. Porém, colorações malsucedidas, podem ser originadas por vários fatores, de entre os quais, salientamos: variações no pH, no tampão ou até, alterações na própria composição do corante (Reynolds, 2011b).

Assim, esfregaços muito róseos, ocorrem, não só, devido ao uso de um tampão demasiadamente ácido ou a uma alteração do pH, mas, também, a um tempo reduzido de imersão no corante ou ainda, a um tempo de lavagem mais prolongado. Contrariamente, os esfregaços muito azuis, ocorrem devido ao excessivo tempo de coloração ou a um pH do tampão demasiadamente alcalino (Laborclin, 2018).

Para melhor visualização das características das células, os esfregaços, devem ser observados utilizando a objetiva de imersão. Conseqüentemente, num esfregaço bem corado, com uma distribuição “normal” é possível visualizar todas as células, cujas características estão descritas na Tabela 7 e que se resumem no seguinte parágrafo.

Os eritrócitos com coloração rósea. As plaquetas com coloração azulada. Os neutrófilos com núcleo lobado azul-escuro e citoplasma rosa-pálido, apresentando no seu interior granulações que variam de rosa a azul claro. Os eosinófilos com núcleo bi a trilobado, de cor azul, citoplasma rosa-pálido e no seu interior grânulos volumosos que variam do vermelho ao laranja. Os basófilos com o núcleo de cor púrpura a azul-escuro e, o citoplasma com granulações volumosas azul-escuro. Já os linfócitos, o núcleo apresenta-se com uma cor azul-violeta e, o citoplasma azul. Finalmente, os monócitos apresentam-se com núcleo em forma de “rim ou ferradura”, azul violeta e citoplasma azul claro (Bioclin, 2013b; Laborclin, 2018).

Tabela 7. Identificação dos leucócitos sanguíneos

|                          | Neutrófilos   |   |   |   | Linfócitos   |   |   |
|--------------------------|---|---|---|---|--|---|---|
|                          | Segmentado Maduro   | Segmentado/maduro   | Eosinófilos   | Basófilos   | Pequeno  | Grande  | Monócitos   |
|                          |  |  |  |  |  |  |  |
| Tamanho da célula (µm)   | 10 - 15   | 10 - 15   | 10 - 15   | 10 -15  | 7 - 8  | 9 - 10  | 10 - 20   |
| Forma do núcleo          | 2 – 5 lóbulos   | Salsicha ou forma de U  | Bilobulado  | Segmentado  | Redondo oval   | Redondo oval  | Ferradura   |
| Estrutura do núcleo      | Grosseira   | Grosseira   | Grosseira   | Difícil de visualizar   | Levemente corado, aveludado  | Levemente corado, aveludado   | Dobra torcida   |
| Quantidade do citoplasma | abundante   | abundante   | Abundante   | Abundante   | Escasso  | Escasso   | Abundante   |
| Cor do citoplasma        | Rosa-pálido   | Rosa-pálido   | Rosa-pálido   | Rosa-pálido   | Azul   | Azul  | Azul-acinzentado  |
| Inclusões no citoplasma  | Pequenos grânulos lilases   | Pequenos grânulos lilases   | Grosseiros<br>Grânulos vermelhos-alaranjados                                      | Grosseiros, grânulos preto-azulado  | Grânulos ocasionais vermelho-púrpura   | Grânulos ocasionais vermelho-púrpura  | Aparência de vidro  |

Fonte. Adaptada de Barbara H. Estridge, 2011; Melo, 2014

### 3.2.1. Determinação da fórmula leucocitária: avaliação morfológica das células sanguíneas

Após contagem das células presentes no sangue periférico procedeu-se à contagem diferencial e avaliação morfológica dos leucócitos e dos eritrócitos, por intermédio da observação dum esfregaço sanguíneo corado pela coloração de Wright. O esfregaço de sangue periférico corado foi examinado ao microscópio ótico mediante objetiva de imersão. Para que o resultado da observação fosse o mais fiável possível, o condensador do microscópio foi colocado totalmente para cima, junto à preparação. O diafragma totalmente aberto, de modo que a incidência da luz ao passar pela janela da platina do microscópio fosse máxima, possibilitando a correta visualização das células.

As células foram examinadas e contadas na borda e cauda do esfregaço, ou seja, na cauda do esfregaço, onde as hemácias se encontram mais individualizadas. Isto, porque, é nesta zona, que as células são mais facilmente identificadas e observadas possíveis alterações morfológicas. Foram contados 200 leucócitos e divididos por diferentes populações conforme é representado na Tabela 7. No final, foi feito o cálculo percentual para cada tipo de leucócito (Reynolds, Barbara H. Estridge, 2011).

### 3.3. Separação e isolamento de leucócitos

Para a separação e isolamento dos leucócitos dos *buffy coats* utilizamos o método de centrifugação, após lise dos eritrócitos com o tampão de lise (NH<sub>4</sub>Cl/pH 7,4), e em seguida procedeu-se à contagem total das células, usando a câmara de Neubauer e a respetiva fórmula.

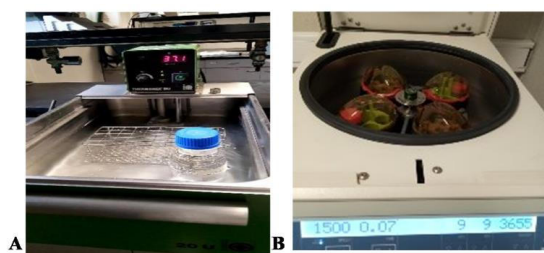


Figura 33. Material necessário para o isolamento de leucócitos (A - banho-maria, B - centrifuga)

#### 3.3.1. Procedimento para isolamento de leucócitos totais do sangue

Num tubo de 50 mL, colocou-se 48 mL de tampão de lise a pré-aquecer num banho-Maria a 37°C. Em seguida, procedeu-se ao uso do BC: transferiu-se o volume total de sangue do *buffy coat* (10-12 mL) para um tubo de 50 mL e realizou-se uma diluição com *Phosphate Buffered Saline* (PBS/pH 7,4) na proporção 1:1. Desta solução diluída, transferiu-se 2 mL para o tubo com os 48 mL de tampão de lise pré-aquecido e, colocou-se num banho-Maria a 37°C durante 10 minutos. Ao fim deste tempo, centrifugou-se o tubo a 1500 rpm durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* de células com agitação e adicionou-se PBS/ pH 7,4 até perfazer o volume de 40 mL (etapa de lavagem). Voltou-se a centrifugar durante 5 minutos a 1500 rpm, rejeitou-se novamente o



sobrenadante, ressuspensando o *pellet* e repetiu-se a etapa de lavagem como descrito acima. Ao *pellet* final adicionou-se um volume de 3 mL de PBS, com pipeta automática para determinação da concentração e da viabilidade celular. Para a contagem na câmara de Neubauer, a solução final de leucócitos foi ainda diluída a 1:10.

### **3.3.2. Procedimento para a contagem das células e determinação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi estimada usando o corante de azul de tripano a 0,1% (Gibco) numa diluição de 1:10 (10 µL suspensão celular + 90 µL de azul de tripano 0,1%), a contagem foi realizada usando microscópio ótico com objetiva de 40x.

Agitou-se e transferiu-se 10 µL desta suspensão para cada uma das duas grelhas da câmara de Neubauer. Procedeu-se à contagem no quadrado grande central, discriminando-se as células de cor azul (células mortas) das não azuis (células vivas). Das células posicionadas sobre as linhas das arestas do quadrado central contou-se apenas duas arestas (por ex., contar a aresta à esquerda e a aresta superior); determinou-se a média das duas contagens e calculou-se a concentração na suspensão, expressa como número de células/mL, segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração celular} = \text{N}^{\circ} \text{ células vivas} \times \text{factor da câmara de Neubauer} \times 10^3 \times \text{factor de diluição}$$

Para calcular a percentagem da viabilidade celular, aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células vivas} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células vivas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de células totais}} \times 100$$

### **3.3.3. Separação/isolamento de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells)**

Os PBMCs referem-se à fração mononuclear (linfócitos e monócitos) dos leucócitos e foram isolados utilizando a metodologia de centrifugação em gradiente de densidade. Sendo que a mesma consiste em centrifugar o sangue sobre uma solução comercial o *Lymphoprep* ou *Biocoll*. Esta solução é uma mistura de polissacarídeos e de um composto

de alta densidade, o diatrizoato de sódio, que permite separar os diferentes tipos de células presentes de acordo com a sua densidade, as quais, após centrifugação, se distribuem em camadas de acordo com a sua densidade. Assim, os glóbulos vermelhos sedimentam-se na parte mais inferior do tubo, imediatamente seguidos dos granulócitos, na camada superior fica a solução de gradiente. Acima desta vamos encontrar um anel (de cor branca) formado pelas células mononucleares (que deve ser removido com auxílio de uma pipeta de Pasteur e de forma cautelosa, pois trata-se da camada celular de interesse). A camada menos densa e logo acima do anel é constituída por plasma e plaquetas.

#### **3.3.4. Separação/isolamento das células mononucleares do sangue em gradiente de densidade**

Transferiu-se o volume total de sangue do *buffy coat* (10-12 mL) para um tubo de 50 mL e procedeu-se à diluição com PBS, pH 7,4 na proporção 1:1. Desta solução diluída, transferiu-se 3 mL para um tubo de 15 mL, previamente, preparado com 3 mL de *Biocoll* (solução gradiente), tendo o cuidado de não misturar as duas soluções. Rapidamente colocou-se o tubo a centrifugar a 2200 rpm (aproximadamente 600xg) durante 20 minutos, à temperatura ambiente. No final da centrifugação, o tubo apresenta 4 camadas de densidades e células diferentes. A camada de interesse, o anel/camada de células mononucleares, foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico e transferido para um novo tubo de 50 mL. Em seguida, procedeu-se a um conjunto de lavagens, que consistiram em adicionar PBS pH 7,4 (40 ml PBS) e centrifugar a 1800 rpm (aproximadamente 450xg) durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular com agitação. Após 2 a 3 lavagens, as células são ressuspendidas em 3 mL de PBS e determinou-se a concentração e viabilidade celular, como descrito anteriormente.

Em certas situações em que a presença de eritrócitos foi identificada na solução “anel branco de CMN”, antes das etapas de lavagem, procedeu-se ao uso do tampão de lise NH<sub>4</sub>CL pH 7,4 acima descrito, e nas mesmas condições (3.3.1.), para eliminação completa dos eritrócitos.

### 3.4. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (ou FACS (fluorescence-activated cell sorter) é um método de análise multiparamétrico de partículas em suspensão, e tem como princípio a dispersão da luz e a emissão de fluorescência de fluorocromos conjugados com moléculas específicas, que vão identificar, analisar ou purificar, recetores de membrana das populações celulares de interesse.

O tamanho (FSC) e a granulosidade/complexidade (SSC) das células formam características únicas para a caracterização de cada tipo celular, nomeadamente das células sanguíneas, e, em particular, neste estudo, dos linfócitos.

Assim, o estudo combinado do FSC/SSC permite a identificação das diferentes populações de células usando anticorpos monoclonais específicos para recetores de superfície que identificam cada tipo celular.

O nosso objetivo foi o de analisar de forma quantitativa, por citometria de fluxo, a população de CMN isolada dos *buffy coats*, em particular os linfócitos T, subpopulações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, e ainda os linfócitos B, através de anticorpos monoclonais específicos para marcadores de superfície destas células.

#### 3.4.1. Procedimento para caracterização fenotípica de linfócitos

Preparou-se uma suspensão celular de CMN, como descrito no ponto 3.3.4. e analisou-se a viabilidade celular e a contagem de células totais.

Desta solução de CMN, transferiu-se  $1 \times 10^6$  células (volume variável em função da concentração celular da amostra) da suspensão celular para cada um de três tubos *ependorf* identificados Tubo 1, 2 e 3. Em seguida, adicionou-se 500  $\mu$ L de PBS pH 7,4 e centrifugou-se a 2500 rpm durante 5 minutos numa microcentrífuga. No fim, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* de células segundo o seguinte protocolo:

Tubo 1 - 50  $\mu$ L suspensão celular + sem anticorpos de marcação (tubo controlo);

Tubo 2 - 50 µL suspensão celular + 50 µL da mistura de anticorpos anti-CD8-PE, CD4-FITC e CD3-RPE-Cy5 diluição a 1:50 em tampão PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN<sub>3</sub> (marcação tripla CD3CD4CD8);

Tubo 3 - 50 µL suspensão celular + 50 µL do anticorpo anti-CD19-PE diluição 1:50 em tampão PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN<sub>3</sub> (marcação simples CD19).

As soluções de marcação consistem em anticorpos monoclonais (DAKO/PALEX) específicos para CD3, CD4 e CD8 humanos, que identificam a população de células T convencionais do sangue periférico e para CD19 que identifica a população de linfócitos B, diluídos a 1:50 em tampão PBS + 0,2% BSA + 0,1% NaN<sub>3</sub>.

Os três tubos são seguidamente tratados de forma idêntica, sendo colocados a incubar no gelo e no escuro durante 20 minutos. Ao fim deste tempo, adicionou-se 500 µL de PBS e centrifugou-se a 2500 rpm durante 5 minutos na microcentrífuga (1ª lavagem). Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* de células. Executou-se uma 2ª lavagem e no fim as células foram ressuspensas no volume final de 500 µL de PBS e foram transferidas para um tubo de FACS e analisadas.

A leitura foi realizada, à temperatura ambiente, num citómetro (Becton Dickinson FACS Calibur Flow Cytometer) e em que a percentagem de células analisadas foi restrita à população de linfócitos e com contagem até 100.000 eventos.

### **3.5. Reagentes**

Solução de lise (neste estudo para os glóbulos vermelhos) (10 mM Tris, 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, pH 7,4);

Solução salina tampão (PBS *1x*, *Phosphate Buffered Saline*) (constituintes: NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; o PBS resultante deve ter uma concentração final de NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, e um pH de 7,4);

Solução de azul tripano (Gibco, Invitrogen cat: 15250-061) a 0,1% (é um corante utilizado para discriminar entre as células vivas e mortas devido à sua capacidade de atravessar as

membranas biológicas de células mortas ou em vias de morrer “células com coloração azul” deixando intacta as células vivas);

Multiplex triple colour anti-human CD3 RPE-Cy5, anti-CD4 FITC, anti-CD8 RPE (DAKO, Palex); Anti-human anti-CD19RPE (DAKO, Palex);

Corante de reticulócitos (SIGMA-ALDRICH); Corante de Wright (Merck KGaA).

### **3.6. Análise estatística**

Para o tratamento estatístico dos dados recorreremos ao Software Estatístico *Statistical Package for Social Sciences* [SPSS], versão 27.0 do Windows 2007, criando uma base onde foram introduzidos e analisados todos os dados recolhidos. O tratamento dos dados e a apresentação dos resultados foram realizados de acordo com as hipóteses de investigação por nós colocadas. Neste sentido, ao longo da nossa análise de dados recorreremos a diferentes técnicas não paramétricas, devido ao facto de os dados não seguirem uma distribuição normal e o número de amostras ser inferior a 30.

Assim sendo, para verificar se o IPR é dependente do sexo, utilizou-se o teste *Exato de Fisher*. Para verificar se o número de linfócitos é superior em D7 comparativamente com D1, bem como se a viabilidade celular é inferior D7 comparativamente com D1 e em D15 comparativamente com D1, utilizou-se o teste *Wilcoxon Signed Ranks*.

Para verificar a associação entre a percentagem de reticulócitos e o IPR, bem como entre os resultados analisados no dia e os analisados no dia 7, calculamos o coeficiente de correlação de *Spearman*. A interpretação dos resultados obtidos assenta nas diretrizes transmitidas por Pestana e Gageiro (2008), através das quais, valores de  $r$  inferiores a 0,2 indicam-nos a existência de associações muito baixas ou muito fracas; de 0,2 a 0,39, baixas ou fracas; 0,4 a 0,69, moderadas; 0,7 a 0,89, altas; e superiores a 0,9 são consideradas muito elevadas, sendo o valor 1 indicador de uma correlação perfeita.

Relativamente à interpretação estatística dos resultados, serão utilizados níveis de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), 1% ( $p < 0,01$ ), e 0% ( $p < 0,001$ ), permitindo-nos desta forma garantir que os mesmos, não serão produto do acaso.

#### IV. RESULTADOS

Entre as 23 amostras de dadores de *buffy coats* foram selecionadas, aleatoriamente, 13 destas amostras (Anexo 1, resultado bruto). Nestas, foram avaliados os seguintes parâmetros reticulocitários: percentagem de reticulócitos, valor dos reticulócitos corrigidos (VRC) e índice de produção de reticulócitos (IPR). Assim, na Figura 34, é possível visualizar que o maior número dos dadores são do sexo masculino (n=8) e o menor número (n=5) corresponde ao sexo feminino. As percentagens associadas a cada um dos sexos são, respetivamente, 61,5% ao masculino e 38,5% ao sexo feminino. Contudo, ambos os sexos apresentaram um resultado superior a 1,5% para a contagem de reticulócitos. Verificou-se ainda que todos os resultados se situam acima dos valores considerados como de referência, ou seja, entre 0,5% e 1,5%.

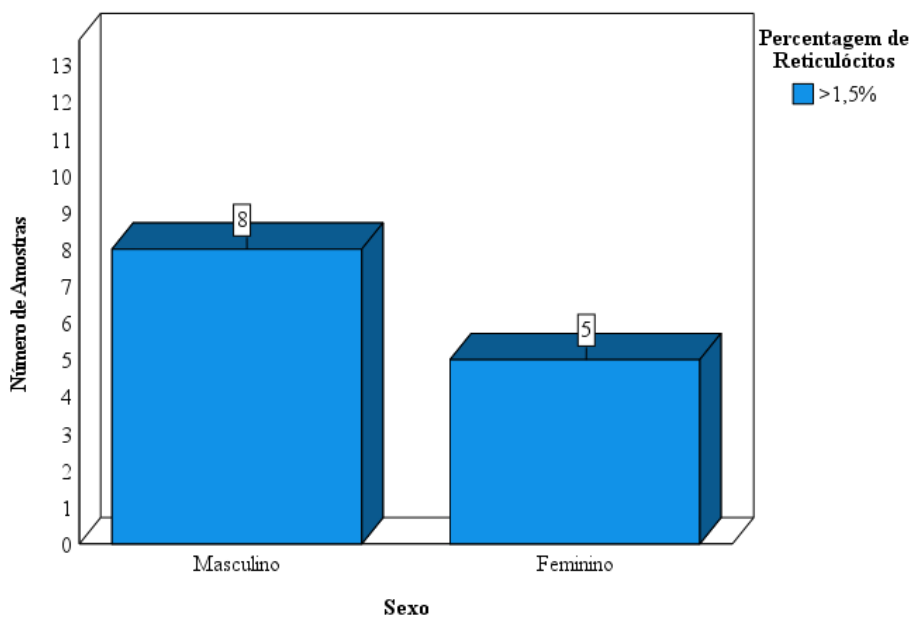


Figura 34. Resultados da percentagem de reticulócitos de acordo com o sexo

No que concerne ao índice de produção de reticulócitos (Figura 35), nos 13 dadores, observou-se que a maior parte (n=8) ou seja 61,5%, que são do sexo masculino, apresentaram um IPR  $\Rightarrow 3$ . Já no sexo feminino (n=5), 3 dos dadores ou seja 23,1%, tiveram um IPR  $\Rightarrow 3$  e 15,4%, o correspondente a (n=2) apresentaram um IPR  $\leq 2$ . Ao

analisarmos os resultados estatísticos, o teste exato de Fisher mostrou que não existe uma relação significativa entre o domínio IPR e o sexo, o valor de Qui-quadrado de Pearson é 3,782, ( $p=0,128>0,05$ ) (Tabela 8).

Tabela 8. Teste do Qui-quadrado de Person entre os domínios IPR e sexo

|                         | Valor              | Sig. | N  |
|-------------------------|--------------------|------|----|
| Qui-quadrado de Pearson | 3,782 <sup>a</sup> |      | 13 |
| Teste Exato de Fisher   |                    | ,128 |    |

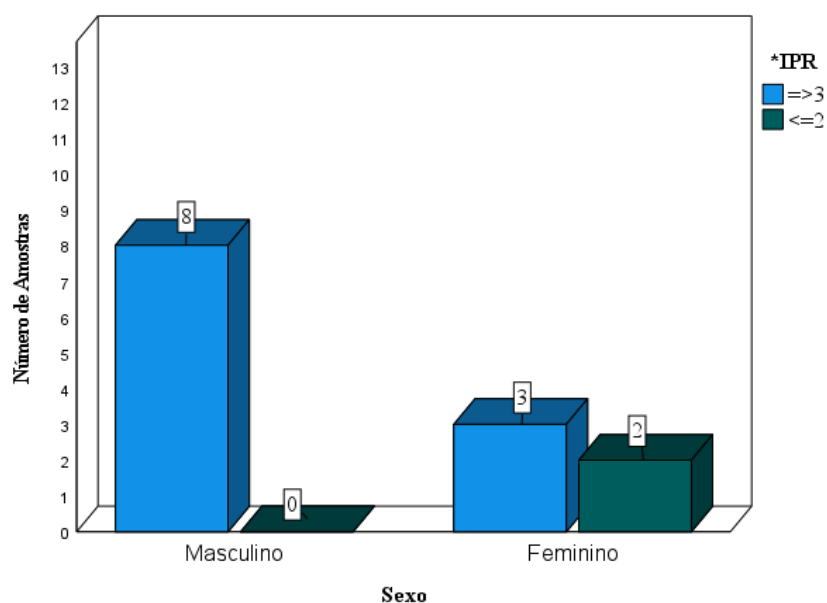


Figura 35. Resultados do índice de produção de reticulócitos de acordo com o sexo  
\*IPR – Índice de produção de reticulócitos

Na Figura 36, em que se relacionou o valor do IPR com a percentagem de reticulócitos verificou-se que a maioria dos doadores ( $n=11$ ), ou seja, cerca de 84,6% apresentou um valor de  $IPR \Rightarrow 3$ . Contudo, apenas 15,4% ( $n=2$ ) dos doadores apresentou um  $IPR \leq 2$ , nomeadamente, 2,25 e 2,33 e em que a percentagem de reticulócitos é  $>1,5\%$ .

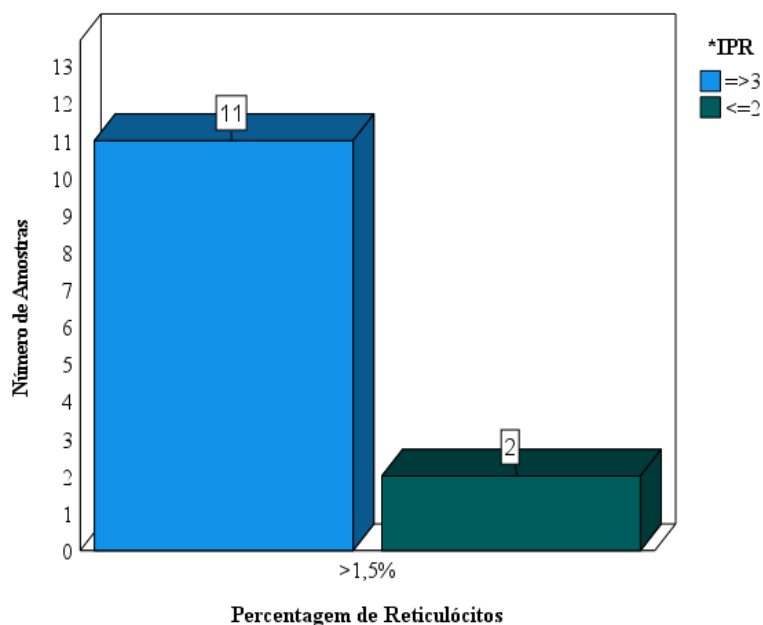


Figura 36. Resultados do IPR e percentagem de reticulócitos  
\*IPR – Índice de produção de reticulócitos

Ao analisar, na Figura 37, a percentagem de reticulócitos contados e o IPR podemos observar que na maioria dos doadores não existe uma diferença significativa entre os resultados das duas contagens. Porém, nas amostras 6 e 7 houve uma diferença considerável. O coeficiente de correlação de Spearman demonstra uma relação, positiva bastante forte e estatisticamente significativa entre os dois domínios ( $r= 0,946$   $p<0,01$ ), (Tabela 9).

Tabela 9. Teste  $\rho$  de Spearman entre os domínios IPR e percentagem de reticulócitos

|                |     | % de Reticulócitos         |      |
|----------------|-----|----------------------------|------|
| rô de Spearman | IPR | Coefficiente de Correlação | ,946 |
|                |     | Sig.                       | 0,01 |
|                |     | N                          | 13   |



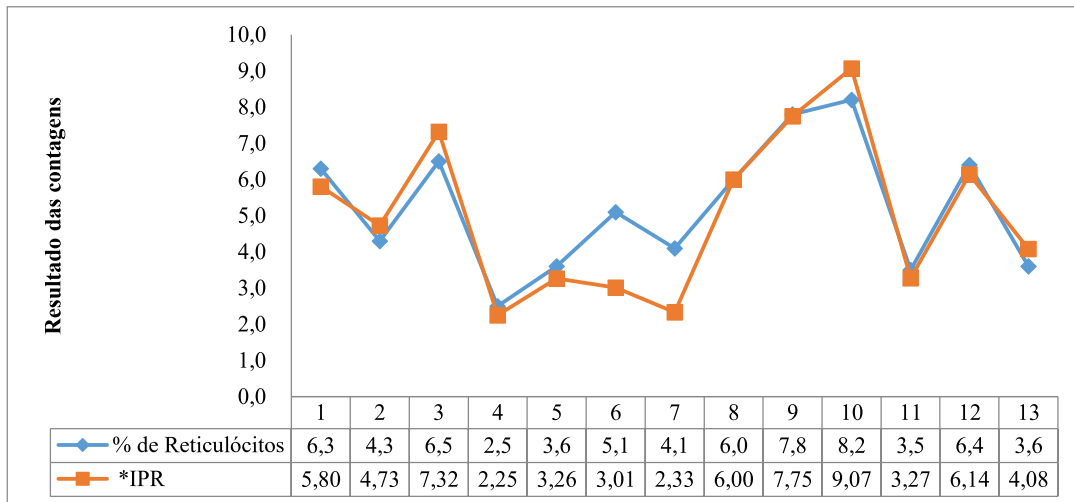


Figura 37. Resultados da percentagem de reticulócitos e IPR  
\*IPR – Índice de produção de reticulócitos

Relativamente ao significado clínico do IPR observou-se, na Figura 38, que a maior parte 84,6% (n=11) de dadores apresentaram como resultado uma resposta aumentada à solicitação do organismo/Medula Óssea e 15,4% ou seja (n=2) apresentou uma resposta considerada como adequada (=2). Contudo, em todos eles se constatou uma percentagem de reticulócitos  $>1,5\%$ , considerada clinicamente como reticulocitose. Verificou-se, ainda, que não houve dadores com valor de IPR inferior a 2 ( $<2$ ), cujo significado clínico é sugestivo de falta de estimulação da MO no sentido de repor a quantidade de reticulócitos suficientes, na corrente sanguínea, para compensar da perda eritrocitária. Porém, quando se determina apenas a percentagem de reticulócitos é considerado como valor de referência, percentagens compreendidas entre 0,5 e 1,5%.

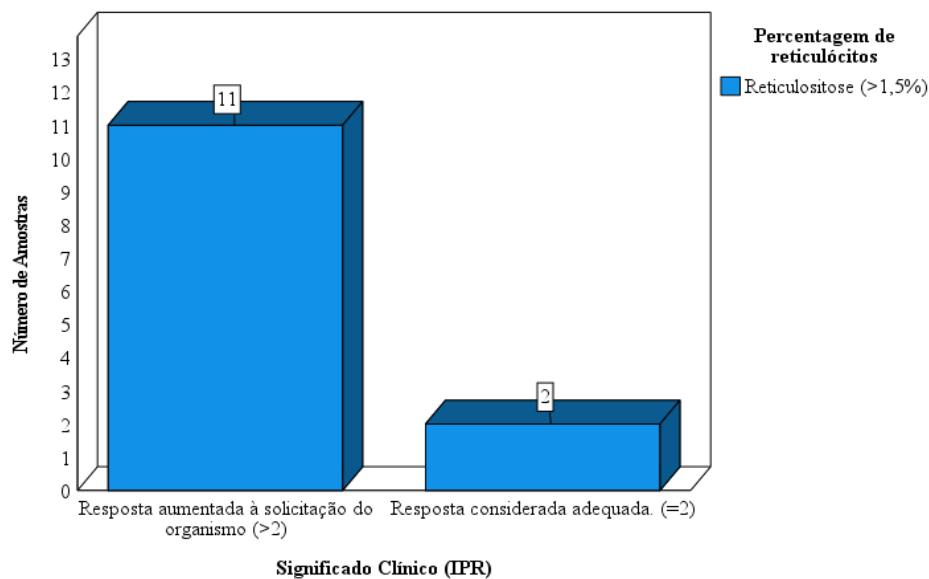


Figura 38. Significado clínico do IPR (Índice de produção de reticulócitos) e percentagem de reticulócitos

Na Figura 39 e, dado que para ser determinado o valor do IPR é necessário proceder à determinação do valor dos reticulócitos corrigidos para o indivíduo/dador, esquematizou-se a representação entre os resultados do IPR e os VRC. Foi visível um maior número de dadores (n=11) ou seja 84,6% com um valor de IPR  $\Rightarrow 3$  e, simultaneamente, com VRC superior a 1,5%. Contudo, verificou-se que apenas um dador (n=1) apresentou um VRC de 2,25 ao qual corresponde um valor de IPR  $\leq 2$ . Ainda se observou um dador (n=1) com VRC igual a 3,49 sendo o seu IPR igual a 2,33 e considerado, também, como  $\leq 2$ . Este valor foi encontrado tendo em consideração o tempo de maturação do reticulócito que, para o valor do seu hematócrito é igual a 1,5. O valor de 2,33 é encontrado dividindo o valor do VRC por este tempo de maturação. Assim, justifica-se o facto de, na Figura 39, ser apresentado apenas um valor de VRC de 2,25 e 2 valores de IPR  $\leq 2$ .

Os resultados estatísticos demonstram que existe uma relação positiva, muito forte e estatisticamente significativa entre os domínios, valor do IPR e VRC ( $r=0,984$ ;  $p<0,01$ ). O que significa uma maior quantidade de resultados do valor de reticulócitos corrigidos (VRC) altos, esta relacionada a maior quantidade de resultados altos do índice de produção de reticulócitos (IPR) (tabela 10).

Tabela 10. Teste r  de Spearman entre os domínios IPR e valores de reticulócitos corrigidos

|                | IPR | Coefficiente de Correla o | valores de reticulócitos corrigidos |
|----------------|-----|---------------------------|-------------------------------------|
| r  de Spearman |     |                           | ,984                                |
|                |     | Sig.                      | 0,01                                |
|                |     | N                         | 13                                  |

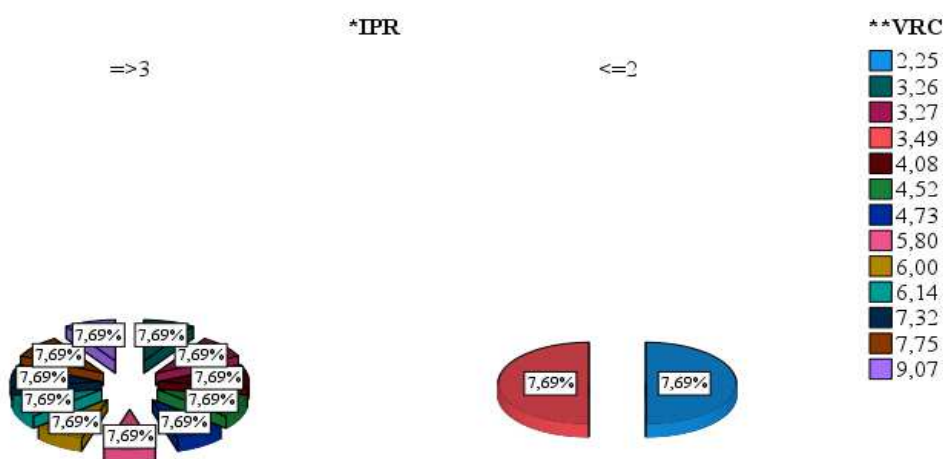


Figura 39. Resultado do IPR e do VRC.  
 \*IPR –  ndice de produ o de reticulócitos; \*\*VRC – Valor de reticulócitos corrigidos

No Anexo 2 encontram-se os resultados obtidos da contagem do número de leucócitos/mL e da viabilidade celular desta popula o, numa amostra de cerca de 20 BC,   data seguinte de colheita (D1) e aos dias 7 (D7) e 15 (D15) após colheita. Os resultados são apresentados em número de leucócitos/mL e não reportados em número de leucócitos total, devido ao facto que tal valor necessita de medi o do volume total do BC e segundo as condi es do nosso estudo, este nem sempre foi aberto ao D1. Em geral, o volume total de um BC   cerca de 10-12 mL, assim no final da Tabela indicamos o fator x10 para o cáculo do n  leucócitos totais contidos no BC.

Os resultados analisados permitem observar a redução do número de leucócitos ao D7 e D15 comparativamente com D1, e o mesmo se evidencia com a viabilidade celular (Figura 40). Estes itens serão posteriormente avaliados nas CMN, às quais dedicamos maior interesse. Estas contagens apesar de fastidiosas e de repetição, permitiram ao aluno uma melhor aprendizagem das metodologias práticas.

O teste de Wilcoxon mostrou que os resultados da viabilidade celular analisados após 7 dias (D7) são inferiores aos resultados analisados ao dia 1 (D1), sendo estas diferenças estatisticamente significativas ( $Z = -3,408$ ;  $p < 0,001$ ), os resultados 15 dias após seguem a mesma tendência, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ( $Z = 3,408$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 11).

Tabela 11. Teste de Wilcoxon entre os domínios D7 - D1 e D15 - D1

|      | D7 - D1 | D15 - D1 | N  |
|------|---------|----------|----|
| Z    | -3,408  | -3,408   | 15 |
| Sig. | 0,001   | 0,001    |    |

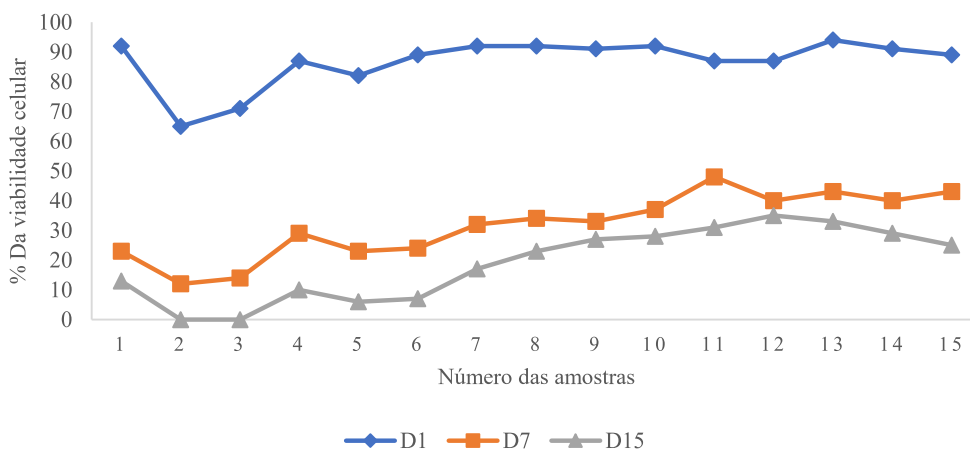


Figura 40. Análise da viabilidade celular da população de leucócitos à data seguinte de colheita (D1) e aos dias 7 (D7) e 15 (D15) após colheita.

Em relação a análise das células da serie branca, foi possível identificar e numerar os diferentes tipos celulares: polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (linfócitos e monócitos). A contagem diferencial, foi obtida após coloração de Wright, em esfregaço de BC.

Este estudo foi realizado, em 10 amostras BC do total recebido, de forma aleatória, e para controlo da integridade das populações celulares, e foi realizada ao dia 1 (D1), após recolha do sangue BC do dador, e posteriormente ao dia D7 (após 7 dias, condição BC aberto) e D7\* (após 7 dias, condição BC fechado) em esfregaços de BC (dados não apresentados).

Esta análise, constituiu a fonte para a fórmula leucocitária, onde foram calculados os valores em percentagem para cada tipo de célula. No geral, todas as células, ao dia D1, se apresentaram morfológicamente normais (tamanho e forma) e quanto ao seu número, igualmente, dentro do padrão estabelecido pela literatura (Zago, 2013). Observou-se, um predomínio de neutrófilos seguido de linfócitos.

A análise ao dia D7 mostrou as células com uma morfologia muito alterada, destruída ao nível da membrana e sobretudo do núcleo. As populações de polimorfonucleares apareceram mais degradadas que a população de linfócitos, mas não foi possível fazer uma contagem diferencial válida, pois no global as lâminas encontravam-se em condição inapropriada de contagem. Similarmente, ao dia D7\* (em condição fechado) as células apresentaram o mesmo tipo de alteração da morfologia, mas menos marcada que ao dia D7, sugerindo novamente que a condição BC fechado garante maior preservação celular. Foi, igualmente, realizada uma análise a D15 (dados não apresentados) onde a morte celular era evidente e contagem impraticável (Figura 41).

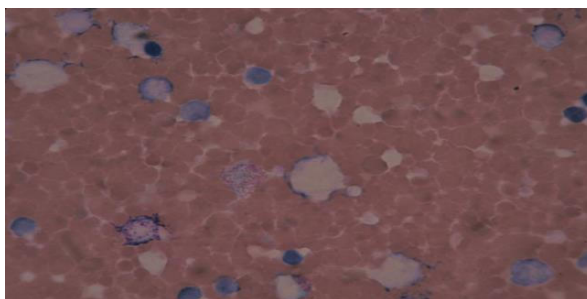


Figura 41. Lâmina em condição inapropriada de realização da contagem

A observação da Figura 42, que representa a % de viabilidade celular das CMN separadas por gradiente de densidade, indica que a viabilidade ao D1 após recolha do BC apresenta valores médios de 95,2% (n=5) e decresce ao D7 (em condição aberto) para 57,8% (n=3) e ao D7\* (em condição fechado) para 75,8% (n=3), mostrando um decréscimo maior a D7 do que a D7\*. Todavia, ao dia D7 e D7\* os valores observados apresentam elevada variabilidade, possivelmente pelo número restrito de amostras estudadas. Saliente-se, que as preparações celulares para a contagem foram executadas e lidas de imediato, após adição do corante de exclusão azul de tripano, para evitar a toxicidade extra, deste, sobre as células.

A perda de viabilidade celular indica que as células perderam a sua integridade celular, encontrando-se “degradadas”, mortas ou em vias de morrer. Se observarmos os resultados da contagem dos leucócitos aos dias D7 e D7\* podemos verificar que estes dados estão em concordância, pois como referido anteriormente, foram encontradas alterações morfológicas notórias que, na maioria das vezes, nem permitiram uma contagem válida para a fórmula leucocitária.

Por outro lado, a análise do coeficiente de correlação de Spearman, entre os resultados ao dia 1 (D1) e ao dia 7 (D7), demonstrou uma correlação positiva forte e estatisticamente significativa entre os domínios, ( $r = -0,835$ ,  $p = 0,010$ ). O que indica que quanto maior for o resultado ao dia 1 (D1) maior será o resultado ao dia 7 (D7) (Tabela 12).

Tabela 12. Teste  $\rho$  de Spearman entre os domínios D1 e D7.

|                |    | D7                              |
|----------------|----|---------------------------------|
| rô de Spearman | D1 | Coeficiente de Correlação 0,835 |
|                |    | Sig. 0,010                      |
|                |    | N 8                             |

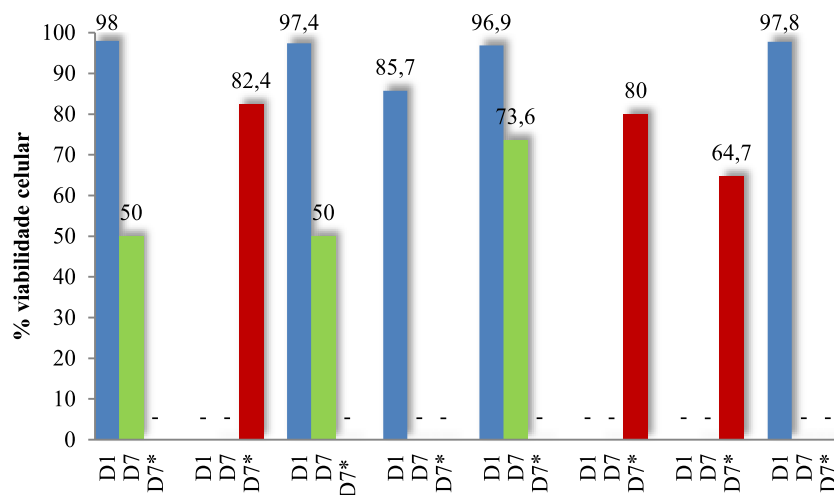


Figura 42. Análise da viabilidade celular da população de células mononucleares (CMN) isoladas pelo método de gradiente de densidade. A análise realizou-se ao dia 1 (D1) e após 7 dias em condição de BC aberto (D7) e após 7 dias em condição de BC fechado (D7\*). A indicação (-) significa que não há análise.

Numa análise mais pormenorizada (Figura 43), podemos observar que, ao D1, a população TCD4+ corresponde a 62,2% dos linfócitos T totais e que ao D7 (condição BC aberto) está a 8,52%, com uma redução superior a 50%. A população TCD8+ ao D1 (7,86%) reduz ao valor 0,05% a D7, e a população B (CD19+) apresenta 4,69% (ao D1) e diminui até 0,25% (D7).

O teste de Wilcoxon mostrou que o número de linfócitos analisados após 7 dias (D7) é inferior aos números de linfócitos analisados ao dia 1 (D1), sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $Z = -2,023$ ;  $p = 0,043$ ), o mesmo se verifica entre os dadores 16 e 18 ( $Z = -2,201$ ;  $p = 0,043$ ), (Tabela 13).

Tabela 13. Teste de Wilcoxon entre os domínios D7\_16 - D1\_16

|      | D7_16 - D1_16 | N |
|------|---------------|---|
| Z    | -2,023        | 5 |
| Sig. | 0,043         |   |

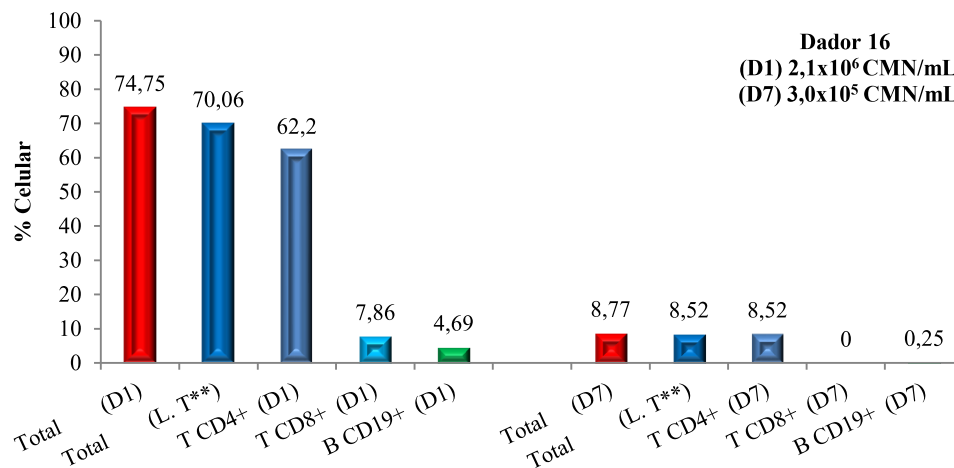


Figura 43. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+) por citometria de fluxo ao dia D1 e D7 (Dador 16). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/mL foi analisada a D1 e D7 e encontra-se indicada no canto superior direito.

Conclusão semelhante é possível de ser verificada para a análise das mesmas populações, a D1 e D7, e relativas ao Dador 18 (Figura 44).

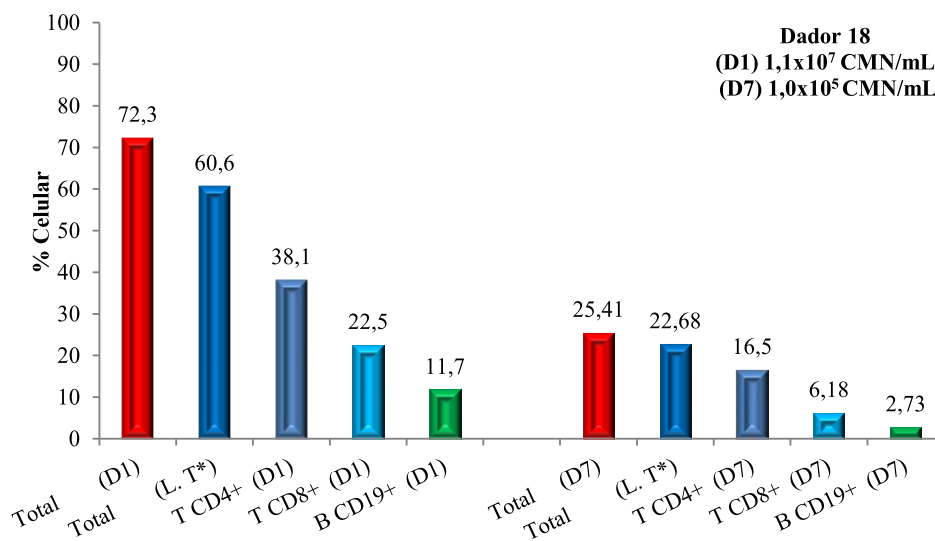


Figura 44. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+) por citometria de fluxo ao dia D1 e D7 (Dador 18). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/ml foi analisada a D1 e D7 e encontra-se indicada no canto superior direito.



No estudo com o Dador 18, a análise das populações T (CD4+ e CD8+) e B (CD19+) veio igualmente confirmar, de forma clara, a diminuição de todas as populações celulares, acima dos 50%, ao dia D7 em relação ao dia D1.

No seguimento do nosso estudo, na Figura 45, estão evidenciados os dados de uma análise de um BC ao dia D7\* em condição fechado (Dador 17). Este BC é da mesma data de recolha do Dador 16 (cuja análise foi realizada a D7 em condição aberto).

Neste caso podemos observar, de forma similar, a redução do número de células das várias populações em estudo, contudo os resultados mostram uma redução menor que em condição de aberto. O que sugere que manter o BC fechado 7 dias preserva de forma clara a viabilidade e integridade das células.

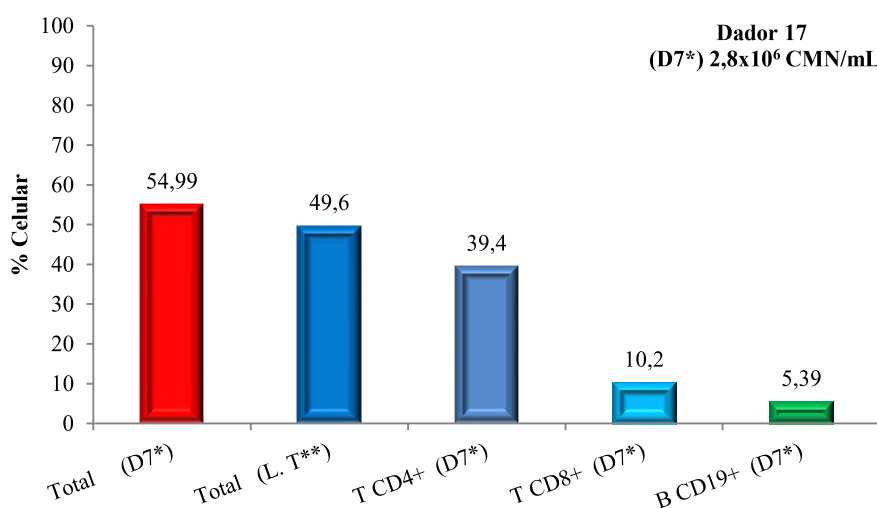


Figura 45. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+)) por citometria de fluxo ao D7\* (condição BC fechado) (Dador 17) (nota: BC da mesma data que dador 16). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/mL foi analisada ao D7\*(em condição fechado) e encontra-se indicada no canto superior direito.

Em seguida, apresentamos os resultados no contexto da análise das populações linfocitárias ao dia D7\* (condição de BC fechado). Os resultados brutos encontram-se descritos novamente no Anexo 3 e apresentados na Figura 46.

A análise, em 2 BC, voltou a mostrar a redução do número de células nas várias populações linfocitárias ao dia D7\* (BC condição fechado) em relação ao dia D1 e igualmente em relação ao dia D7 (condição BC aberto). Desta forma, os resultados obtidos parecem evidenciar que os BC em condição de aberto levam a uma maior perda celular (em número e em viabilidade/integridade celular) em comparação com a condição BC fechado.

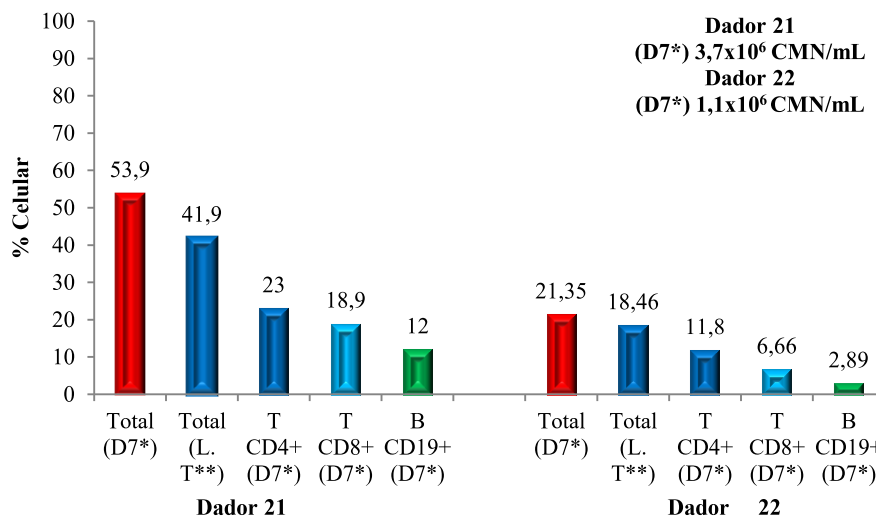


Figura 46. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+) por citometria de fluxo ao dia D7\* (condição BC fechado) (Dador 21 e Dador 22) (nota: BC da mesma data). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos Ttotais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/mL foi analisada ao D7\*(em condição fechado) e encontra-se indicada no canto superior direito.

Na Figura 47, ilustra-se os resultados de 2 BC (Dador 19 e 23) analisados unicamente ao D1, e que relevam que existe à partida um grau de variabilidade das amostras considerável, que num futuro estudo teria que ser tido em conta. Pois, poderá implicar tratar e analisar amostras cujos valores percentuais estejam obrigatoriamente dentro de um limite pré-definido para o estudo em questão.

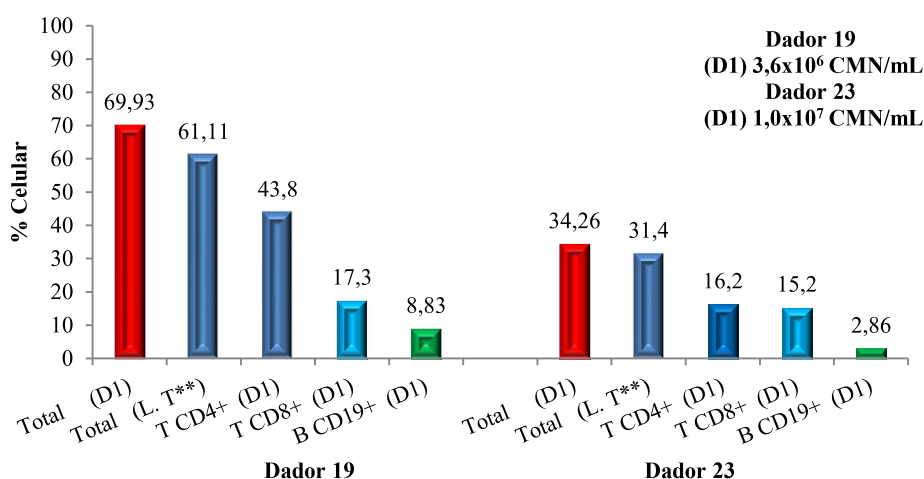


Figura 47. Análise da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+)) por citometria de fluxo ao dia D1 (Dador 19 e dador 23). Coluna a vermelho % de linfócitos totais (T+B); Coluna a azul-escuro % de linfócitos T totais (TCD4+ + TCD8+), as restantes sub-populações estão indicadas no gráfico. A contagem do nº CMN/mL foi analisada ao D1 e encontra-se indicada no canto superior direito.

A análise global destes resultados permite evidenciar uma redução da concentração celular das populações linfocitárias e da respetiva viabilidade, em função do tempo, neste caso a D1, D7 e D7\*. Contudo, não permitiu evidenciar uma possível diferença entre as sub-populações T e a população B nestes parâmetros. Este estudo preliminar, tem um número pequeno de amostras e não permitiu uma análise consistente em todos os itens estatísticos. Evidenciar se a perda celular seria maior na população B em relação à população T teria sido pertinente, pois, sabemos que no sangue periférico a população B, em geral, apresenta menor tempo de vida (menor sobrevivência) que a população T, além de menor representatividade.

Para finalizar, ilustra-se no gráfico seguinte (Figura 48) a análise comparativa entre amostras de dadores diferentes (n=3), ao dia D1 e D7 (condição aberto), e onde se pode presenciar, nas populações linfocitárias em estudo, uma variabilidade considerável nos valores percentuais obtidos para cada amostra. Apesar disso, em todas elas é evidente o decréscimo no número total de células com o tempo.

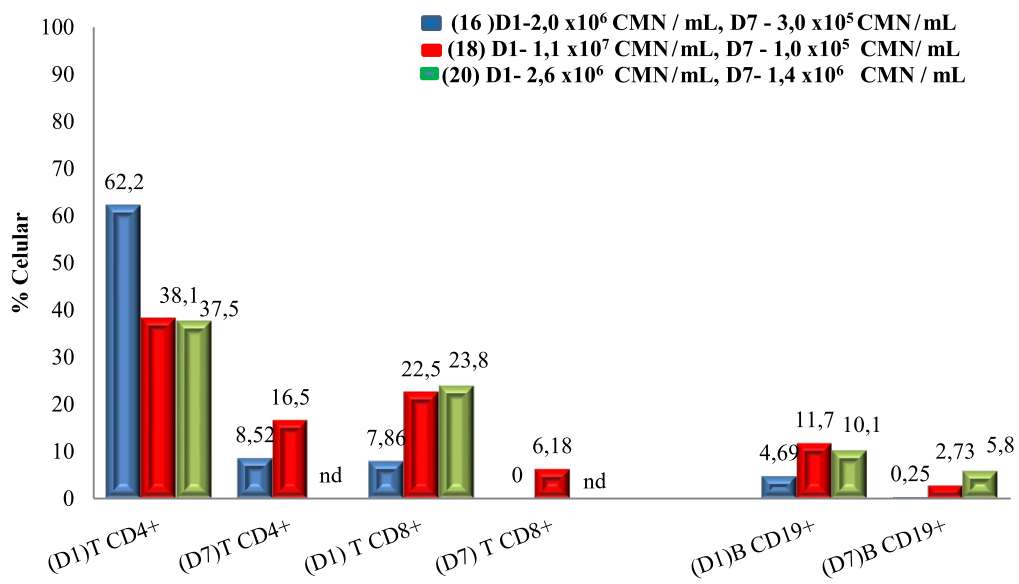


Figura 48. Gráfico comparativo da percentagem (%) celular das populações linfocitárias (TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (CD19+)) por citometria de fluxo ao dia D1 e D7 (BC condição aberto), para três amostras diferentes (Dador 16, 18 e 20). Cada amostra está representada pela sua cor, os dados estão organizados de forma a comparar D1 com D7 para cada população linfocitária, respetivamente, linfócitos TCD4+, linfócitos TCD8+ e linfócitos B (CD19+). A contagem do nº CMN/mL foi analisada e encontra-se indicada no canto superior direito.

## V. DISCUSSÃO

A partir de uma *Stem cell* hematopoiética da MO as células do sangue de todas as linhagens são constantemente renovadas. As células sanguíneas (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) sofrem proliferação e diferenciação antes de serem libertadas no sangue periférico (Riley *et al.*, 2001).

Também os eritrócitos são libertados na corrente sanguínea após um período de maturação na MO. Durante esta fase de maturação verifica-se a passagem de eritroblasto ortocromático, por perda do núcleo, a reticulócito ou eritrócito imaturo. Estes amadurecem gradualmente, em parte na MO durante três dias, em média, e parcialmente, durante um dia no sangue periférico (Brugnara C, 2000; Riley *et al.*, 2001).

A contagem de reticulócitos no sangue periférico é um dado importante para se verificar da integridade funcional da MO. Esta contagem é um meio auxiliar de diagnóstico que permite verificar se, em presença de uma anemia, esta, é do tipo regenerativa ou não regenerativa. Assim, em doentes anémicos e em presença de uma boa resposta medular verifica-se uma reticulocitose, ou seja, um aumento da percentagem de reticulócitos em circulação no sangue periférico num valor superior ao valor considerado como de referência, de 1,0 a 1,5%, com 3% como limite superior do normal (Riley *et al.*, 2001). Se, pelo contrário, existir uma eritropoiese ineficaz por produção inadequada de eritrócitos na MO, observamos uma diminuição da percentagem de reticulócitos em circulação na corrente sanguínea também denominada por reticulocitopenia (de Gois *et al.*, 2019). Contudo, em presença de alguns tipos de anemia, nomeadamente, a do tipo microcítica, em que a contagem de reticulócitos pode ser normal, a avaliação da concentração da hemoglobina nos reticulócitos é um parâmetro a determinar (de Gois *et al.*, 2019). No entanto, a contagem de reticulócitos que tem como princípio da técnica a deteção de RNA no citoplasma da célula, é de extrema importância, não só, como primeiro exame auxiliar e complementar na diferenciação do tipo de anemias, mas, também, na monitorização da atividade medular (Riley *et al.*, 2001; Chasis & Mohandas, 2008; de Gois *et al.*, 2019).

A contagem tradicional dos reticulócitos por coloração supravital ao microscópio é considerada como o método de referência desde 1940, de baixo custo e de simples execução técnica (Pinto & Ifr, 2008; de Gois *et al.*, 2019). No entanto, este método sendo

mais demorado, comparativamente aos métodos automatizados na obtenção do resultado, apresenta também um coeficiente de variação elevado (João *et al.*, 2008; de Gois *et al.*, 2019). É sabido que existem vários fatores que podem comprometer a precisão das contagens de reticulócitos como sejam a colheita, o transporte e armazenamento de amostras, a qualidade do esfregaço e a variabilidade entre observadores para identificação do reticulócito (Riley *et al.*, 2001, de Gois *et al.*, 2019). Também, e segundo Bain (2007) as contagens devem ser realizadas até 6h após a colheita, embora estas sejam estáveis durante 24h à temperatura ambiente quando se usa como anticoagulante EDTA ou, por vários dias, a 4 °C. Estes requisitos vão de encontro aos estabelecidos no nosso estudo, uma vez que, para minimizar alguns destes fatores procedeu-se à realização de vários esfregaços para o mesmo dador tendo-se escolhido no final e, no mínimo, os dois melhores. Também as contagens foram sempre realizadas em duas lâminas contando para o efeito 500 eritrócitos em cada uma (no total 1000 eritrócitos) e, desses, contar quantos são reticulócitos.

Embora os estudos sobre reticulócitos, a partir de amostras de sangue obtidos em *buffy coats* sejam muito reduzidos, porém, é possível retirarmos algumas elações no que respeita às contagens obtidas com os dadores que constituem a nossa amostra.

No atual estudo foram selecionados aleatoriamente 13 amostras de *buffy coats* de dadores, tendo sido analisados vários parâmetros para a determinação de reticulócitos, tais como: a percentagem de reticulócitos, o valor dos reticulócitos corrigidos e o índice de produção de reticulócitos. A Figura 34, apresenta os resultados da contagem de reticulócitos segundo o sexo/género, onde mais de metade dos dadores ou seja 61,5% (n=8) são do sexo/género masculino e, apenas 38,5% (n=5) são do sexo/género feminino. Os dadores de ambos sexo/género apresentaram um resultado superior a 1,5%. Alguns estudos focados na contagem de reticulócitos, mostraram diferenças de valores em relação ao sexo/género, mas, isso não tem sido universalmente confirmado (Koepke & Koepke, 1986; Riley *et al.*, 2001; Bain, 2007).

Porém, num estudo sobre reticulócitos realizado por Riley *et al.*, (2001), com 154 dadores, em que, 78 eram do sexo masculino e 76 pertenciam ao sexo feminino, verificou-se uma diferença nas contagens absolutas de reticulócitos relativamente ao sexo ( $p < 0,005$ ). Já no atual estudo, ao aplicar-se o teste estatístico, exato de Fisher ( $p=0,128$ ),

foi notório que não existe uma relação significativa entre o IPR e o sexo. Assim, em função do teste pode entender-se que o valor do IPR não depende do sexo/género, logo aceita-se hipótese nula ( $H_0$ ). Hoffmann *et al.*, (2012) encontrou resultados semelhantes onde não foram encontradas diferenças significativa entre o sexo/género e os parâmetros reticulocitários. De realçar que, trabalhos científicos mais recentes, em que as contagens são realizadas por métodos automatizados, estas, não têm apresentado diferenças entre os sexo/género (Bain, 2007).

Em relação ao significado clínico da percentagem de reticulócitos verificou-se que os dadores, escolhidos aleatoriamente, 100% (n=13) apresentam um valor aumentado (>1,5%) de reticulócitos circulantes no sangue, o qual, também é denominado por reticulocitose e que se verifica, normalmente, em indivíduos com perdas sanguíneas ou anemias. Em contraste, uma eritropoiese prejudicada ou uma diminuição da produção de eritropoietina pode mostrar uma contagem de reticulócitos normal ou diminuída (Riley *et al.*, 2001; Pinto & Ifr, 2008; Parodi *et al.*, 2020). De acordo com Piva *et al.*, (2015) no seu estudo sobre utilidade clínica dos parâmetros reticulocitários destaca que, a contagem de reticulócitos reflete a atividade eritropoética da MO e, portanto, é útil tanto no diagnóstico de anemias quanto na monitorização da resposta medular à terapêutica. Ainda Ceylan *et al.*, (2007) num estudo em que analisou, não só, a percentagem de reticulócitos, mas, também, a contagem absoluta de reticulócitos, o seu conteúdo médio em hemoglobina (CHr), o volume corpuscular médio do reticulócito (MCV<sub>r</sub>), a concentração de hemoglobina corpuscular média de reticulócitos (CHCM<sub>r</sub>), a razão MCV<sub>r</sub>/MCV, a razão CHr/CH e, ainda, a razão CHCM<sub>r</sub>/CHCM em diferentes tipos de dadores, como dadores saudáveis, dadores com deficiência de ferro (IDA), com deficiência de Vitamina B12 e com talassemia beta *minor* (TM), vem reforçar a importância da utilidade clínica dos parâmetros reticulocitários no diagnóstico de IDA e TM. Este estudo, com uma sensibilidade e especificidade de 85,4% e de 97,1% respetivamente, veio revelar-se como indicativo de deficiência de ferro.

No nosso estudo, ao relacionar-se a percentagem de reticulócitos (número de reticulócitos contados e analisados em percentagem) com o IPR, parâmetro essencial para avaliação medular, verificou-se que a maioria dos dadores (n=11), ou seja, cerca de 84,6% apresentou um valor de IPR=>3. Todavia, apenas 15,4% (n=2) dos dadores apresentaram um IPR <=2, nomeadamente, 2,25 e 2,33, mas, em que a percentagem de reticulócitos é

>1,5%. Este resultado realça a importância da determinação do IPR. Neste contexto, poder-se-á entender que os referidos dadores apresentam uma estimulação da MO que não será muito eficiente ou, até mesmo, que apresentam um ligeiro *déficit* na eritropoiese.

Contudo na Figura 37, apenas houve diferença considerável nos dadores nº 6 (% R=5,1; IPR=3,01) e no dador nº 7 (% R=4,1; IPR=2,33), onde os resultados do IPR foram consideravelmente diferentes tomando como comparação a percentagem de reticulócitos e os valores encontrados para os outros dadores. Assim, deste modo, mais uma vez se destaca a importância da aplicação deste parâmetro. Sendo que, entre os domínios, existe uma relação estatisticamente significativa, positiva muito forte (rô de Spearman= 0,946), com um nível de significância de 1%, isto é indicativo de que, quando a percentagem de reticulócitos aumenta, existe uma tendência também de aumento do IPR, valor determinado para cada indivíduo. Isto, uma vez que o valor do IPR para um dado indivíduo é encontrado após correção da percentagem dos reticulócitos para o seu hematócrito, tendo como referência um hematócrito normal (45%) e, ainda, tendo em consideração o tempo de maturação do reticulócito na corrente sanguínea e que é variável segundo o valor do hematócrito (Bain, 2007; Pinto & Ifr, 2008; Piva *et al.*, 2015; Parodi *et al.*, 2020).

Na contagem de reticulócitos e, como foi referido anteriormente, a determinação do IPR é um item importante, uma vez que, estando essencialmente relacionado com a atividade medular permite um diagnóstico diferencial relativamente aos tipos de anemias, bem como, ao de outras doenças do foro hematológico. No entanto, o seu valor quando aumentado é também sugestivo de perda sanguínea ou de hemólise (de Gois *et al.*, 2019). Neste contexto, comparou-se, na Figura 38, o valor encontrado do IPR e seu significado clínico com os valores dos reticulócitos. Podemos observar que, mais de metade, ou seja o equivalente a 84,6% (n=11) dos dadores apresentaram IPR superior a 2 (>2) o que significa, uma resposta aumentada da MO à solicitação do organismo quanto à produção de eritrócitos, pese embora, o estudo tenha sido realizado em *buffy coats* e não em sangue total, em dadores de sangue e não em doente com anemia e, ainda, também pelo facto de a literatura, neste tipo de população/dadores de sangue, ser demasiado escassa. Em contrapartida, verificou-se que apenas dois dos dadores (n=2) apresentaram um valor de IPR considerado como resposta adequada (IPR=2). Do mesmo modo, podemos salientar



que não houve nenhum dador que tivesse demonstrado uma não estimulação medular frente à perda pela dádiva.

Também no nosso estudo foi ainda constatado que, quando se compara o IPR para valores maiores ou iguais a 3 ( $IPR \geq 3$ ) com o VRC, 84,6% dos dadores ( $n=11$ ) se encontram neste intervalo de valores do IPR e que, simultaneamente, apresentam um VRC superior a 1,5%. É ainda observado que existem dois dadores que apesar de apresentarem valores de VRC superiores a 1,5% mostraram valores de  $IPR \leq 2$ , o que é típico de uma insuficiente resposta medular, já que, um IPR superior ou igual a 3 é considerado como normal, enquanto um índice inferior a 2 é considerado como estando abaixo do normal. Isto, segundo as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) de 1985. Também Hoffmann *et al.*, (2012) no seu estudo sobre “Intervalos de referência alargados para parâmetros de eritrócitos e de reticulócitos”, enfatiza que, os parâmetros reticulocitários têm testemunhado ser de grande utilidade clínica no diagnóstico diferencial da anemia e, também, na monitorização da terapêutica relativamente a estes casos.

Em relação aos resultados estatísticos, estes demonstram que existe uma relação positiva, muito forte e estatisticamente significativa entre os domínios, valor do IPR e VRC ( $r=0,984$ ;  $p<0,01$ ). O que significa que um valor VRC alto, está relacionado com um valor de IPR alto, com um nível de significância de 1%. Logo aceita-se a hipótese nula ( $H_1$ ).

Pelo que foi apresentado é notório, no nosso estudo, a presença em todos os dadores de uma reticulocitose, ou seja, de um aumento da percentagem de reticulócitos em circulação no sangue periférico e, também, na sua grande maioria, de um valor de IPR igual ou superior a 3, o que espelha bem a boa atividade da MO como resposta à dádiva sanguínea.

Como foi referido anteriormente foram realizados em alguns sangues dos *buffy coats*, destes dadores, esfregaços sanguíneos para determinação da fórmula leucocitária, após coloração destes pela técnica de Wright. Esta foi efetuada, na zona da cauda do esfregaço, na qual, existe uma melhor separação das células permitindo a obtenção de uma contagem mais correta, bem como, uma visualização mais fácil de possíveis alterações na morfologia celular. Foi verificado que as contagens apresentaram uma distribuição normal das populações leucocitárias. Isto, quando realizadas um dia após a colheita do *buffy coat*, porque quando estas foram realizadas uma semana após, verificou-se que,

maioritariamente, houve destruição das diferentes populações dos leucócitos, mantendo-se apenas intactos os linfócitos embora com citoplasma hiperbasófilo.

No que se refere aos eritrócitos foi visível, em alguns esfregaços a presença de poiquilocitose. Foi também observado, embora em número pouco significativo, aglutinação/empilhamento eritrocitário o que pode ser explicado pelo facto de os reticulócitos se poderem aglutinar quando presentes em número excessivo, evento que foi por nós observado com a contagem de reticulócitos. E, também, pela circunstância de estarmos perante dadores, aos quais, foram retirados cerca de 450 mL de sangue (Bain, 2007). Este processo leva a um aumento do número de reticulócitos em circulação como resposta medular, normal, à dádiva.

Foi igualmente observado em alguns casos anisocitose plaquetária com a presença de plaquetas gigantes de dimensões próximas do diâmetro dos linfócitos e dos eritrócitos, e ou de macroplaquetas, o que, pode ser entendido como um aumento do *turnover* ou da renovação plaquetária acelerada associada à resposta à dádiva sanguínea (Bain, 2007).

Como foi referido anteriormente, verificou-se ainda num esfregaço sanguíneo de um dador, a presença de linfócitos atípicos, com citoplasma hiperbasófilo e núcleo em forma de “trevo”. Contudo, não foi possível fazer o seguimento deste dador. Isto, em virtude de não termos acesso aos nomes dos dadores e, também, não ser do nosso conhecimento o intervalo de tempo com que decorrem as colheitas para o um mesmo dador. Teria sido útil que tais dados pudessem ter sido por nós conhecidos, uma vez que, algumas hipóteses se poderiam colocar, tais como, se se trata de um problema associado ao dador ou, se pelo contrário, poderia ser resultado da utilização de um anticoagulante/conservante que sabemos ser CPD (Citrato Fosfato Dextrose), o qual, permite a conservação dos eritrócitos até 28 dias, uma vez que, viabiliza a continuação do metabolismo celular (Adriana González *et al.*, 2003). Porém, não nos foi possível verificar se o CPD utilizado como anticoagulante/conservante dos eritrócitos teve algum impacto na alteração da morfologia dos PMN (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) em virtude de não existirem estudos nos quais nos possamos apoiar. Assim, só pelo *follow-up* deste dador seria possível verificar se as alterações morfológicas dos linfócitos se mantinham e, se eventualmente, seriam associadas a alguma alteração do estado de saúde do dador ou se, porventura, pudessem ser atribuídas ao processo de colheita, nomeadamente, ao CPD.

Com a finalidade de se chegar a alguma conclusão relativamente ao efeito do CPD na colheita e o modo como este poderá afetar determinados parâmetros hematológicos sugerimos: a realização de um novo estudo, em que para o efeito seriam realizados dois tipos de colheita de sangue para um mesmo dador, uma com um tubo contendo EDTA e outra utilizando o sangue do próprio *buffy coat*, com CPD como anticoagulante/conservante.

Em continuidade do nosso estudo fomos analisar os parâmetros leucocitários e linfocitários (células T e B) igualmente nos BC, como fonte de células vivas, de forma a conhecer o seu grau de viabilidade celular, de integridade das células e de sobrevivência durante um período de tempo, acrescentando o seu valor percentual e expressão à membrana de marcadores fenotípicos, fazendo uso de um método de contagem manual e da técnica de citometria de fluxo.

É escassa a bibliografia que refere estudos relacionados com análise da viabilidade e da integridade celular a partir de amostras de BC. Um estudo de 1981 (van Oss *et al.*, 1981) compara dois métodos de remoção de eritrócitos de suspensões de leucócitos, um pelo uso de cloreto de amónio e usam exatamente a viabilidade, avaliada pela exclusão do azul tripano, e a observação ao microscópio associada à coloração de Wright para qualificar a morfologia e integridade das células, tendo observado que os linfócitos e certos granulócitos permaneciam em suspensão e morfologicamente intactos.

No que respeita à análise da viabilidade celular, foi realizada em leucócitos e em células mononucleares (CMN) usando o corante de exclusão azul de tripano. Na primeira população, o estudo foi realizado ao dia D1, D7 e D15 após colheita do BC e observou-se uma notória diminuição da viabilidade celular em todas as amostras analisadas, com maior índice de redução a D15 do que a D7, comparativamente a D1. Aplicou-se o teste estatístico Wilcoxon que mostrou que os resultados da viabilidade celular analisados após 7 dias (D7) são inferiores aos resultados analisados ao dia 1 (D1),  $Z = -3,408$ ;  $p = 0,001$ . Os resultados 15 dias após seguem a mesma tendência, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ( $Z = -3,408$ ;  $p < 0,001$ ). Assim aceita-se hipótese nula  $H_3$  – a viabilidade celular é inferior a dia 7 (D7) em relação a dia 1(D1) e  $H_4$  – a viabilidade celular é inferior a dia 15 (D15) em relação a dia 1(D1).

Na segunda população, CMN, as experiências foram organizadas de forma a avaliar a viabilidade a dois *timings*: a D1, dia seguinte à recolha, e sete dias após recolha, em duas condições, a D7 (em condição BC aberto) e a D7\* (em condição BC fechado). Esta análise permitiu-nos observar uma perda da viabilidade celular destas populações aos dias D7 e D7\* relativamente a D1, e tendo sido mais perceptível a D7 comparativamente com D7\*.

A análise do coeficiente de correlação de Spearman, entre os resultados ao dia 1 (D1) e a dia 7 (D7), demonstrou uma correlação positiva forte e estatisticamente significativa entre os domínios ( $r= 0,835$ ,  $p=0,010$ ), com um nível de significância de 1%. Contudo, entende-se que, quanto maior for o resultado ao dia 1 (D1) maior será o resultado ao dia 7 (D7). Assim, aceita-se a hipótese nula,  $H_5$  - existe uma relação entre os resultados analisados ao dia 1 (D1) e os resultados analisados após 7 dias (D7).

Para análise da viabilidade celular fez-se uso do corante de exclusão azul de tripano, por ser um método simples, rápido e fiável. Contudo, está sujeito ao problema de que a viabilidade celular está a ser determinada indiretamente a partir da integridade da membrana da célula, pelo facto de, ser possível que a viabilidade da célula possa ter sido comprometida, em termos de crescimento ou funcionalidade, embora a integridade da membrana esteja mantida, pelo menos temporariamente. Outros aspetos, referem que a integridade da célula pode ser anormal, mas, esta ser capaz de se reparar e de se tornar completamente viável, ou ainda, o facto da leitura estar dependente da subjetividade do operador (Strober, 2015).

Existem outros métodos de análise da viabilidade celular, nomeadamente o uso do iodeto de propídio (corante emissor de luz) que penetra na célula morta e se complexa com o DNA e que pode ser avaliado por citometria de fluxo ou num contador automático. Por outro lado, um estudo mostrou que o azul de tripano é igualmente possível de ser usado em citometria de fluxo (Avelar-Freitas *et al.*, 2014), pelo facto de este ter a capacidade de emitir fluorescência quando complexado com proteínas (Harrisson *et al.*, 1981). Contudo, os dois métodos, assim como a avaliação manual, fornecem resultados muito semelhantes e a escolha depende de fatores experimentais, como número de amostras a tratar, método de purificação mais complexo e demorado, ou ainda, a disponibilidade de aparelhos de leitura automatizada (Avelar-Freitas *et al.*, 2014; Strober, 2015).

Um dos outros nossos objetivos de trabalho foi a análise quantitativa de sub-populações T/B, por citometria de fluxo, em amostras de BC. As experiências foram organizadas de forma a avaliar estes parâmetros a dois *timings*: a D1, dia seguinte à recolha, e sete dias após recolha, em duas condições, a D7 em condição BC aberto e a D7\* em condição BC fechado. Esta análise permitiu-nos observar uma perda da viabilidade celular das populações T e B aos dias D7 e D7\*, tendo sido mais notória a D7 comparativamente com D7\*.

O teste de Wilcoxon mostrou que o número de linfócitos analisados após 7 dias (D7) é inferior aos números de linfócitos analisados ao dia 1 (D1), sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $Z = -2,201$ ;  $p = 0,043$ ), o mesmo se verifica entre os dadores 16 e 18 ( $Z = -2,201$ ;  $p = 0,043$ ), logo, aceita-se a hipótese nula,  $H_0$  - o número de linfócitos (T CD4+, T CD8+ e B CD19+) são inferiores ao dia 7 (D7) em relação ao dia 1 (D1). Contudo, há necessidade de num futuro estudo a amostra de BC ter que ser obrigatoriamente maior.

No nosso estudo, a análise das sub-populações T, em CD4+ e CD8+, e da população de linfócitos B (CD19+) mostrou valores percentuais dentro dos valores de referência citados na bibliografia, com  $TCD4+ > TCD8+ >$  linfócitos B ao *timing* D1.

A pesquisa bibliográfica documenta, por exemplo, no trabalho de Bisset *et al.*, (2004), valores entre 54,90-84,03% para linfócitos TCD3+, valores entre 32,53-62,88% para linfócitos TCD4+, valores entre 11,55-38,60% para linfócitos TCD8+ e valores entre 4,70-19,13% para linfócitos B (CD19+).

Valores da mesma ordem de grandeza são descritos por Louati *et al.*, (2019), num estudo de 143 dadores da região de Sfax na Tunísia, ou ainda no estudo de Meyer *et al.*, (2005) efetuado em filtros de depleção de leucócitos (Filter Buffy Coats (FBCs)), onde além de uma boa recuperação celular, se comprovou a manutenção da capacidade funcional destas células, usando ensaios padrão.

Contudo, um artigo publicado em 1996 por Bryant, *et al.*, chama a atenção para as contagens absolutas de linfócitos TCD4+ realizadas em sangue de doação, onde se verificou baixas contagens absolutas de células TCD3+CD4+ em pessoas saudáveis, fenómeno denominado linfocitopenia CD4 idiopática (de causa desconhecida) e onde 12

dadores (num total de 565) do estudo apresentaram contagens absolutas de CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ e CD56+ mais baixas após a doação do que antes da doação. Concluindo que, não é satisfatório basear os intervalos de referência para subpopulações de linfócitos a partir do sangue do dador após a doação.

Na bibliografia atual não se encontrou estudos de comparação de BC a outros *timings* de análise, como por exemplo D7 ou D7\*. Os estudos anteriormente descritos fazem a análise de citometria no próprio dia de recolha.

Convém igualmente referir que no nosso estudo não foi possível relacionar valores percentuais de populações linfocitárias com o sexo/género ou a idade do dador. No entanto, a bibliografia apresenta vários estudos científicos, que relacionam valores de populações linfocitárias com o sexo/género, raça, local geográfico, idade, *stress*, em situação saudável versus patológica, mas dependendo do estudo os valores apresentam variações. No estudo de Bryant, *et al.*, (1996), não se observou relação entre populações T/B com o sexo/género dos dadores. Todavia, as mulheres apresentaram uma maior percentagem de TCD3+ que os homens, e uma percentagem e contagem absoluta de TCD3+CD4+ igualmente superiores. Os homens apresentaram maior percentagem de células NK (CD3+CD56+). Mais, a percentagem de TCD3+CD4+ aumenta com a idade e TCD3+CD8+ decresce, o que permite um aumento do rácio CD4:CD8.

Num estudo realizado numa população Asiática, observou-se uma contagem de linfócitos totais maior nas crianças em relação aos adultos e nos homens níveis superiores de células NK e inferiores de TCD3+CD4+ em relação às mulheres (Lee *et al.*, 1996).

Contudo, um outro estudo realizado com um grupo de indivíduos de raças distintas apresentou resultados contrários, onde não foi encontrada relação sexo/género na população TCD4+, o número de TCD8+ aumentou com a idade, mas, a população NK foi superior nos homens (Wee *et al.*, 2004).

Em suma, todos estes diferentes estudos mostram a necessidade de se estabelecer uma plataforma de valores de referência, mais universal de indivíduos sãos, em termos de populações linfócitos/ sexo/género e raças de indivíduos, de forma a reduzir os fatores de variabilidade aquando da comparação entre trabalhos científicos.

Como podemos constatar, o BC constitui uma amostra biológica em si de grande variabilidade ao nível dos seus constituintes celulares, entre os diferentes dadores. Acresce, igualmente, indicar que os diversos protocolos práticos a serem executados, introduzem também variantes na recuperação, no isolamento e na rentabilidade do processo até à obtenção final das células (Kizhakeyil *et al.*, 2019).

Todavia, o uso e aplicabilidade do BC na área clínica não deixa de ser da máxima relevância, permitindo conhecer características de diversidade e funcionalidade, entre outros, dos linfócitos T e B. Estas populações são passíveis de serem usadas em terapias imunológicas, quer em situação de transferência adotiva das próprias células T do doente (auto-T), quer da transferência de células T alogénicas (de indivíduo saudável alo-T), sempre avaliando as restrições de incompatibilidade HLA e infeção por vírus linfotrópicos.

Mais recentemente, novas áreas são exploradas com este material biológico, nomeadamente, o sucesso da aplicação de hibridização fluorescente interfase *in situ* (FISH) usando núcleos extraídos de BC congelados armazenados para fins de análise molecular e citogenética de alterações cromossómicas (Min *et al.*, 2007), ou ainda, para monitorar os níveis de danos ao DNA em estudos epidemiológicos retrospectivos de BC congelados (Bøhn *et al.*, 2019).

E, para finalizar, existem igualmente estudos que descrevem o uso do BC e da camada leucocitária como fonte biológica para o diagnóstico de parasitas, como *Leishmania* e *Plasmodium* (Salam *et al.*, 2012; Kochareka *et al.*, 2012), e ainda na pesquisa de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA-CN) como biomarcador do risco de doença cardiovascular (Ashar *et al.*, 2017).

## VI. CONCLUSÃO

No estudo realizado verificou-se que entre os 13 dadores selecionados aleatoriamente, o maior número (n=8) correspondeu ao sexo masculino com uma percentagem de 61,5%. Os resultados da percentagem de reticulócitos foram, para estes dadores, >1,5% e o valor do IPR =>3. Apenas 15,4% dos dadores, pertencentes ao sexo feminino, apresentaram um IPR de =<2, nomeadamente, de 2,25 e de 2,33.

No que respeita ao significado clínico da análise constatou-se que 100% apresentou reticulocitose com valores da contagem >1,5% o que, indica uma estimulação adequada da MO como resposta à dádiva sanguínea. Contudo, e no que respeita ao valor do IPR, valor mais representativo da atividade medular, a grande maioria dos dadores (84,6%) apresentou como resultado um valor de IPR =>3, o que, denota uma resposta aumentada à solicitação do organismo. Relativamente ao VRC, também, a maioria teve como resultado um valor de reticulócitos >1,5%, ao qual, correspondeu a percentagem de 84,6% dos dadores. Deste modo, é possível entender que existe uma atividade compensatória da MO no sentido de repor a quantidade de sangue doada que, normalmente, ronda os 450 mL de sangue.

Em relação à contagem de leucócitos nos esfregaços provenientes de *buffy coats* todas as células estavam morfológicamente normais quanto ao seu número e tamanho. Porém, ao serem analisados os *buffy coats*, após 7 dias, observou-se que, quase todas as células se encontravam destruídas, com exceção dos eosinófilos e dos linfócitos. Já nos eritrócitos foram evidenciadas algumas alterações na morfologia, ou seja, verificou-se a presença de poiquilocitose. Também nas plaquetas se verificou o aparecimento de plaquetas gigantes e macroplaquetas em presença de outras de dimensões normais, anisocitose plaquetária, o que demonstra uma resposta adequada da MO à duração da colheita.

Assim, e, segundo Bain (2007) para indicar a produção medular, embora seja preferível determinar o valor do IPR ou proceder à contagem absoluta dos reticulócitos, o certo é que, determinar a percentagem de reticulócitos apresenta a vantagem de dar uma indicação da sobrevida periférica dos eritrócitos.

Contudo, somos de opinião que para minimizar o erro e tornar os valores das contagens mais fíáveis dever-se-á eleger, futuramente e por rotina, para além da apresentação do



valor do IPR e dos reticulócitos em valores absolutos, optar-se também, por uma automatização do método de contagem.

Os estudos detalhados sobre a análise de populações linfocitárias, por citometria de fluxo, em *buffy coat* e no contexto de controlo da dádiva do dador, são diminutos.

O BC como material biológico é muito utilizado na imunologia fundamental/investigação, para separação e isolamento de células, tanto mono como polimorfonucleares, para a realização de experiências no quadro de interações celulares, estudos fenotípicos, estimulação antigénica, isolamento e expansão *ex-vivo*, estudo alorreatividade, entre outros.

Mais frequente é a análise por citometria de fluxo de populações de plaquetas, de forma a monitorizar a lesão de armazenamento no concentrado de plaquetas, sendo realizada com base na expressão de marcadores de ativação plaquetária, e ainda, para os parâmetros de controlo de qualidade da transfusão de plaquetas, em indivíduos com trombocitopenia (ou com plaquetopenia) (Vučetić *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2018).

O nosso estudo, referente à análise fenotípica de linfócitos, revelou-se “preliminar” pois não incluiu um número suficiente de BC na nossa amostra, de modo a podermos alcançar todos os resultados validados por um teste estatístico com significância. Porém, com este estudo foi possível concluir, em parte, os objetivos previstos. Pudemos confirmar que os BC contêm a mesma proporção de populações linfocitárias que as estimadas no sangue periférico de um indivíduo saudável, onde predominam linfócitos TCD3+, com TCD4+ superior a TCD8+ e, por fim, a população de linfócitos B. Verificou-se uma perda de viabilidade celular com o tempo, até 7 dias após dádiva, assim como a perda das células em valor percentual. Por outro lado, estes parâmetros foram menos marcados a dia D7\* (BC condição fechado) do que a D7 (BC em condição aberto), mostrando a qualidade da preservação em sistema fechado e com CPD.

No futuro seria interessante realizar um estudo que abrangesse um maior número de BC, fazendo uma análise que incluísse outros *timings* intermédios até ao D7, avaliando a perda celular por sub-população de linfócitos T, dos linfócitos B e até incluir as células NK, de forma a estabelecer uma melhor relação entre estes parâmetros e a sua diferença entre géneros. O estudo poderia ser completado, para além da avaliação da viabilidade celular,

por marcação com anexina V, que é uma proteína que é capaz de se ligar à fosfatidilserina, marcador da apoptose, e que se apresenta na camada externa da membrana citoplasmática. Assim, complementaríamos a atual avaliação da viabilidade celular por um método clássico, com uma avaliação quantitativa da apoptose, que constitui um processo fisiológico de morte celular caracterizado por alterações morfológicas distintas, assim como, de mecanismos bioquímicos e moleculares.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Cellular and molecular immunology E-book*. Elsevier Health Sciences.
- Abbas Kuby, Lichtman AH, P. S. (2017). *Cellular and Molecular Immunology* (E. Saunders (ed.); 9th ed.).
- Adriana Torrella González, Rayssa Toledo González, María F Hondares Cacéres, Lidia Calañas Salati. *Evaluación del anticoagulante citrato dextrosa fosfato para la determinación de parámetros hematológicos en pacientes oncológicos*. Rev Mex Patol Clin, Vol. 50, Núm. 2, pp 77-81 • Abril - Junio, 2003 MG
- Alvarenga, E. M. de. (2012). *Metodologia da Investigação Quantitativa e Qualitativa* (2 Edição). A4 Designs.
- Ashar, F. N., Zhang, Y., Longchamps, R. J., Lane, J., Moes, A., Grove, M. L., Mychaleckyj, J. C., Taylor, K. D., Coresh, J., Rotter, J. I., Boerwinkle, E., Pankratz, N., Guallar, E., & Arking, D. E. (2017). Association of Mitochondrial DNA Copy Number With Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiology*, 2(11), 1247–1255.
- Avelar-Freitas, B. A., Almeida, V. G., Pinto, M. C. X., Mourão, F. A. G., Massensini, A. R., Martins-Filho, O. A., Rocha-Vieira, E., & Brito-Melo, G. E. A. (2014). Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, 47(4), 307–315.
- Bain, B.J. (2007). *Células Sanguíneas. Um Guia prático* (Artmd (ed.); 4ª Ed).
- Bain, B. J. (1998). Células Sanguíneas. Em *Artmed* (Vol. 53, Número 4).
- Barbara H. Estridge, A. P. R. (2011). *Técnicas básicas de laboratório clínico* (5. ed. Art).
- Bernard, J., Lévy, JP, Clauvel, JP., Rain JD. And Varet, B. (1979). *Manual de Hematologia* (3ª edição). Masson do Brasil Ltda.
- Bisset, L. R., Lung, T. L., Kaelin, M., Ludwig, E., & Dubs, R. W. (2004). Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *European Journal of Haematology*, 72(3), 203–212. <https://doi.org/10.1046/j.0902-4441.2003.00199.x>.
- Bøhn, S., Vebratte, V., Shaposhnikov, S., & Collins, A. (2019). Isolation of leukocytes from frozen buffy coat for comet assay analysis of DNA damage. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843.
- Brugnara C. Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2000;37(2):93-130.

- Bryant, J. A., Wylie, B. R., Yuan, F. F., Ribeiro, A., Thomson, A. R., Cooley, M. A., & Fletcher, A. (1996). Effect of blood donation on the establishment of normal ranges of lymphocyte subsets. *Transfusion*, 36(6), 559–566.
- Castro, H. C., Ferreira, B. L. A., Nagashima, T., Schueler, A., Rueff, C., Camisasca, D., Moreira, G., Scovino, G., Borges, L., Leal, M., Filgueira, M., Paschoal, P., Bernardo, V., Bourguinhon, S., Rodrigues, C. R., & Santos, D. O. (2006). Plaquetas: Ainda um alvo terapêutico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42(5), 321–332.
- Ceylan, C., Miskioğlu, M., Colak, H., Kiliççioğlu, B., & Ozdemir, E. (2007). Evaluation of reticulocyte parameters in iron deficiency, vitamin B(12) deficiency and beta-thalassemia minor patients. *International Journal of Laboratory Hematology*, 29(5), 327–334.
- Chasis, J. A., & Mohandas, N. (2008). Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*, 112(3), 470–478.
- Chng, W. J., Tan, G. B., & Kuperan, P. (2004). Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11(1), 168–173.
- Ciesla, B. (2007). *Hematologia na Prática Clínica* (Lusodidacta (ed.)).
- Cotran, Ramzi S; Kumar, Vinay; Collins, T. (2000). *Robbins patologia estrutural e funcional / Robbins pathologic basic of disease* (Guanabara).
- Dacie, J. V. e Lewis, S. M. (1991). *Practical Haematology* (C. Livingston (ed.); Seventh Ed). Longman Group UK.
- Dalanhol, M., Barros, M., Mazuchelli, J., Silva, P. H., Hashimoto, Y., & Largura, Â. (2010). Storage effects on peripheral blood samples as identified from automated hemograms. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32(55 45), 16–22.
- de la Guardia Peña, O. M., Macias Abraham, C., & Ruiz Villegas, L. (2021). Asociación entre hipoplasia del timo y disminución de inmunoglobulina A. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 37(1), 1–10.
- Fernando A. Arosa, E. M. C. C. P. (2012). *Fundamentos de Imunologia - Ciências Fundamentais - Imunologia - Grupo LIDEL*.
- Ferreira, C. R. C. (2020). *Aloanticorpos Relacionados com a Transfusão de Componentes Sanguíneos*.
- Field, A. (2005). *Discovering statistics with SPSS*. Em *London: Sage* (Vol. 27).
- Forsthuber, T., Cimbara, D., Ratchford, J., Katz, E., & Stuve, O. (2018). B cell-based therapies in CNS autoimmunity: differentiating CD19 and CD20 as therapeutic targets. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 11, 175628641876169.

- Fragata, C. G. (2014). *Plasma Humano: Componentes E Derivados (Conservação E Utilização Terapêutica Em Ambiente Hospitalar)*. 1–110.
- Fragoso, V., Gonçalves, A., Carvalho, V. De, Pelegrina, J. O., & Rissato, S. R. (2021). *Brazilian Journal of Forensic Sciences , Medical Law and Bioethics Luminol : Possíveis Interferentes no Estudo de Sangue Humano Luminol : Possible Interferents in the Human Blood Study*. 10(2), 111–129.
- Gabrielson, D. K., Brezden-Masley, C., Keith, M., Bazinet, R. P., Sykes, J., & Darling, P. B. (2021). Evaluation of Nutritional, Inflammatory, and Fatty Acid Status in Patients with Gastric and Colorectal Cancer Receiving Chemotherapy. *Nutrition and Cancer*, 73(3), 420–432.
- Gualandro, S. F. M. (2015). Análise do Exame Hematológico. Alterações dos Eritrócitos. *Tratado de Hematologia* ,84,833–840.
- Guyton, A., & E. Hall, J. (2005). Tratado de Fisiologia Médica. Em *The American Journal of the Medical Sciences* (11 Edição, Vol. 244, Número 3). Elsevier Editora Ltda.
- Harrisson, F., Callebaut, M., & Vakaet, L. (1981). Microspectrographic analysis of trypan blue-induced fluorescence in oocytes of the Japanese quail. *Histochemistry*, 72(4), 563–578.
- Hoffbrand, A. V. e Pettit, J. E. (2000). *Atlas Colorido de Hematologia Clínica* (3ª Edição). Manole Ltda.
- Hoffmann, J. J. M. L., van den Broek, N. M. A., & Curvers, J. (2012). Reference intervals of extended erythrocyte and reticulocyte parameters. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 50(5), 941–948.
- Jelkmann, W. (2011). *Regulation of erythropoietin production*. 6, 1251–1258.
- Jenni Punt, Sharon Stranford, Patricia Jones, J. A. O. (2018). *Kuby Immunology*.
- Jessica Carolini de Gois, Valéria Ladeira Sutana, Roberta Carvalho de Figueiredo, Danyelle Romana Alves Rios. Contagem de Reticulócitos na Prática Clínica: um Exame Pouco Utilizado. *Revista Médica de minas Gerais*, 2019
- Júnior, D. M., Antônio, J., Araújo, P., Tieko, T., & Catelan, T. (2010). *Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B*. 55(11).
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2008). *Histologia Basica* (E. G. K. S.A (ed.); 11 Edição).
- Khodadadi, L., Cheng, Q., Radbruch, A., & Hiepe, F. (2019). The Maintenance of Memory Plasma Cells. *Frontiers in Immunology*, 10, 721.
- Kizhakeyil, A., Ong, S. T., Fazil, M. H. U. T., Chalasani, M. L. S., Prasannan, P., & Verma, N. K. (2019). Isolation of Human Peripheral Blood T-Lymphocytes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1930, 11–17.

- Kochareka, M., Sarkar, S., Dasgupta, D., & Aigal, U. (2012). A preliminary comparative report of quantitative buffy coat and modified quantitative buffy coat with peripheral blood smear in malaria diagnosis. *Pathogens and Global Health*, 106(6), 335–339.
- Koepke, J. F., & Koepke, J. A. (1986). Reticulocytes. *Clinical and Laboratory Haematology*, 8(3), 169–179.
- Kumar, R., Dhawan, H. K., Sharma, R. R., & Kaur, J. (2021). Buffy coat pooled platelet concentrate: A new age platelet component. *Asian Journal of Transfusion Science*, 15(2), 125–132.
- Lee, B. W., Yap, H. K., Chew, F. T., Quah, T. C., Prabhakaran, K., Chan, G. S., Wong, S. C., & Seah, C. C. (1996). Age- and sex-related changes in lymphocyte subpopulations of healthy Asian subjects: from birth to adulthood. *Cytometry*, 26(1), 8–15. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19960315\)26:1<8::AID-CYTO2>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19960315)26:1<8::AID-CYTO2>3.0.CO;2-E)
- Louati, N., Rekik, T., Menif, H., & Gargouri, J. (2019). Blood lymphocyte T subsets reference values in blood donors by flow cytometry. *La Tunisie Medicale*, 97(2), 327–334.
- MacQueen, B. C., Christensen, R. D., Yoder, B. A., Henry, E., Baer, V. L., Bennett, S. T., & Yaish, H. M. (2016). Comparing automated vs manual leukocyte differential counts for quantifying the «left shift» in the blood of neonates. *Journal of Perinatology : Official Journal of the California Perinatal Association*, 36(10), 843–848.
- Maria, H. L., Souza, D., & Oliveira, E. (2005). Princípios de hematologia e hemoterapia. Em *Centro de Estudos Alfa Rio* (Editoração). Editora, Ilustração e Composição APerfusion Line - Alfa Rio - RJ
- Melo, M. de; S. C. (2014). Laboratório de Hematologia – Teorias, Técnicas e Atlas. Em *Rubio*.
- Meyer, T. P. H., Zehnter, I., Hofmann, B., Zaisserer, J., Burkhart, J., Rapp, S., Weinauer, F., Schmitz, J., & Illert, W. E. (2005). Filter Buffy Coats (FBC): a source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters. *Journal of Immunological Methods*, 307(1–2), 150–166.
- Min, H. J., Lee, J., Choi, J. E., Shin, S., & Lee, D. S. (2007). Fluorescence in situ hybridization (FISH) using snap frozen buffy coat. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 37(1), 85–88.
- Minges Wols, H. A. (2006). Plasma Cells. *ELS*, 1–8.
- Murador, P., & Deffune, E. (2007). Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 29(2), 168–178.
- Naoum, P. C., & Naoum, F. A. (2008). *Hematologia Laboratorial - Eritrócitos*. 112. [http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso\\_gratuito/Livro\\_completo - Hematologia Eritrocitos.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso_gratuito/Livro_completo - Hematologia Eritrocitos.pdf)

- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Method for Reticulocyte Counting, Proposed Standard. H16-P, Vol 5, No. 10, 1985.
- Oliveira, N., & Aparecido, L. A. (2019). *A Eritropoetina Recombinante no “Doping” : uma Atualização da Literatura*. 4–9.
- Paraíso, L. F. (2015). *Efeito do exercício físico na estabilidade de membrana de eritrócitos*.
- Parodi, E., Romano, F., & Ramenghi, U. (2020). How We Use Reticulocyte Parameters in Workup and Management of Pediatric Hematologic Diseases. *Frontiers in Pediatrics*, 8(December), 1–4.
- Paulo, P., Rocha, F., & Faria, D. (2016). *Leucócitos como marcadores de risco para doenc , as cardiovasculares na adolescência : associac , ão , ão nutricional e exames bioquímicos*. 34(1), 38–46.
- Pestana, M. H. & Gageiro, J. N. (2008). *Análise de Dados para Ciências Sociais – a Complementaridade do SPSS (5ª ed.)*. Lisboa: Edições Sílabo, Lda.
- Pereira, A. (2008). *Guia Prático de Utilização do SPSS - Análise de Dados Para Ciências Sociais e Psicologia (L. 7 Edição Sílabo (ed.))*.
- Pinto Sandra, Ana R. João; Elísio Costa. Subpopulações dos reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos como indicadores de aumento da eritropoese em doentes com anemia por deficiência de ferro. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2008;30(3):188-192
- Piva, E., Brugnara, C., Spolaore, F., & Plebani, M. (2015). Clinical utility of reticulocyte parameters. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(1), 133–163.
- Riley, R. S., Ben-Ezra, J. M., Goel, R., & Tidwell, A. (2001). Reticulocytes and reticulocyte enumeration. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 15(5), 267–294.
- Rinaldi, S. (2008). “ *A ação plaquetária na resposta imunológica e seu envolvimento em mecanismos inflamatórios crônicos* ”. 1(1), 1–4.
- Romana, D., & Rios, A. (2020). *Atlas de hematologia*.
- Salam, M. A., Khan, M. G. M., Bhaskar, K. R. H., Afrad, M. H., Huda, M. M., & Mondal, D. (2012). Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 837–840.
- Salmon C, Cartron JP, R. P. (1984). The human blood groups part1. Em *New York: Masson Publishing USA*.
- Santos, N., Romanos, M., Wigg, M. (2008). *Introdução à Virologia Humana (2ª edição)*. Guanabara Koogan.
- Saraiva, C. P. (2009). *Estudo comparativo de métodos de contagem de reticulócitos para controle de qualidade*.

- Silva, J. S. (2017). *Descrição da hematopoiese clonal de potencial indeterminado como diagnóstico diferencial para pacientes hematológicos*.
- Silva, R. D. R., & Moura, A. L. D. (2016). *O Ciclo Do Eritrócito*. [http://www.faculdadealfredonasser.edu.br/files/Pesquisar\\_4/12-12-2016-17.47.07.pdf](http://www.faculdadealfredonasser.edu.br/files/Pesquisar_4/12-12-2016-17.47.07.pdf)
- Siqueira, B., Zanotti, L., Nogueira, A., & Maia, A. C. S. (2009). Incidência de anemia falciforme, traço falcêmico e perfil hemoglobínico dos casos diagnosticado na triagem neonatal no estado de Rondônia no ano de 2003. *Saber Científico*, 2(1), 43–53.
- Souza, A. I., B. Filho, M., & Ferreira, L. O. C. (2002). Haematological disorders and pregnancy. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 24(1), 29–36.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111, A3.B.1-A3.B.3.
- Teixeira, D. A. (2021). *Fisiologia Humana*. Teófilo Otoni, Brasil
- Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). O Uso Clínico do Sangue na Medicina, Obstetria, Pediatria e Neonatologia, Cirurgia e Anestesia, Traumas e Queimaduras. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- van Oss, C. J., Bronson, P. M., Dinolfo, E. A., & Chadha, K. C. (1981). Two methods for the removal of erythrocytes from buffy coats for the production of human leukocyte interferon. *Immunological Communications*, 10(6), 549–555.
- Vučetić, D., Ilić, V., Vojvodić, D., Subota, V., Todorović, M., & Balint, B. (2018). Flow cytometry analysis of platelet populations: usefulness for monitoring the storage lesion in pooled buffy-coat platelet concentrates. *Blood Transfusion = Trasfusione Del Sangue*, 16(1), 83–92.
- Wajcman H, Lantz B, G. R. (1984). Les Maladies du globule rouge. Em *Paris: Les editions INSERM* (Médecine-S).
- Wang, K., Wei, G., & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental Hematology & Oncology*, 1(1), 36.
- Weinreich, M. A., & Hogquist, K. A. (2008). Thymic emigration: when and how T cells leave home. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(4), 2265–2270.
- Wim de Kort, D. (2010). *Manual de Gestão de Dadores*. Domaine.
- Zago, F. e P. (2013). *Tratado de Hematologia* (E. M. R. Nelson Spector, Dimas Tadeu Covas (ed.); Editora At).



## ANEXOS

### Anexo 1. Contagem de reticulócitos, hemoglobina, hematócrito, valores de reticulócitos corrigidos e índice de produção de reticulócitos.

| Nº do dador | Reticulócitos contados | Hemoglobina | Hematócrito | % de Reticulócitos | VRC<br>Valores de reticulócitos corrigidos | IPR - Índice de produção de reticulócitos | Sexo/género |
|-------------|------------------------|-------------|-------------|--------------------|--|---|-------------|
| 20192311    | 63                     | 13,8        | 41,4        | 6,3                | 5,80                                       | 5,80                                      | F           |
| 20180073    | 43                     | 16,5        | 49,5        | 4,3                | 4,73                                       | 4,73                                      | M           |
| 20902699    | 65                     | 16,9        | 50,7        | 6,5                | 7,32                                       | 7,32                                      | M           |
| 20192131    | 25                     | 13,5        | 40,5        | 2,5                | 2,25                                       | 2,25                                      | F           |
| 23000052    | 36                     | 13,6        | 40,8        | 3,6                | 3,26                                       | 3,26                                      | M           |
| 20210807    | 51                     | 13,3        | 39,9        | 5,1                | 4,52                                       | 3,01                                      | F           |
| 20201492    | 41                     | 12,8        | 38,4        | 4,1                | 3,49                                       | 2,32                                      | F           |
| 2900055     | 60                     | 15,0        | 45,0        | 6,0                | 6,00                                       | 6,00                                      | M           |
| 20001117    | 78                     | 14,9        | 44,7        | 7,8                | 7,75                                       | 7,75                                      | M           |
| 20171099    | 82                     | 16,6        | 49,8        | 8,2                | 9,07                                       | 9,07                                      | M           |
| 20192032    | 35                     | 14,0        | 42,0        | 3,5                | 3,27                                       | 3,27                                      | F           |
| 20112293    | 64                     | 14,4        | 43,2        | 6,4                | 6,14                                       | 6,14                                      | M           |
| 24001402    | 36                     | 17,0        | 51,0        | 3,6                | 4,08                                       | 4,08                                      | M           |

## Anexo 2. Análise da população de leucócitos nos diversos *buffy coats* (BC)

| Nº interno dador | Código do <i>buffy coat</i> | Concentração de Leucócitos<br>c/mL (1**) |                     |                     | % viabilidade celular |    |     |
|------------------|-----------------------------|--|---------------------|---------------------|-----------------------|----|-----|
|                  |                             | D1                                       | D7                  | D15                 | D1                    | D7 | D15 |
| 1                | 25002873                    | 1,1×10 <sup>7</sup>                      | 1,2×10 <sup>6</sup> | 5,0×10 <sup>5</sup> | 92                    | 23 | 13  |
| 2                | 20202490                    | 1,3×10 <sup>6</sup>                      | 2,0×10 <sup>5</sup> | 0,0                 | 65                    | 12 | 0   |
| 3                | 20160670                    | 5,0×10 <sup>5</sup>                      | 1,0×10 <sup>5</sup> | 0,0                 | 71                    | 14 | 0   |
| 4                | 20900055                    | 1,3×10 <sup>6</sup>                      | 5,0×10 <sup>5</sup> | 1,0×10 <sup>5</sup> | 87                    | 29 | 10  |
| 5                | 20001117                    | 3,6×10 <sup>6</sup>                      | 1,2×10 <sup>6</sup> | 3,0×10 <sup>5</sup> | 82                    | 23 | 6   |
| 6                | 20181171                    | 7,5×10 <sup>6</sup>                      | 1,0×10 <sup>6</sup> | 3,0×10 <sup>5</sup> | 89                    | 24 | 7   |
| 7                | 20202696                    | 5,7×10 <sup>6</sup>                      | 1,9×10 <sup>6</sup> | 4,0×10 <sup>5</sup> | 92                    | 32 | 17  |
| 8                | 20202753                    | 6,0×10 <sup>6</sup>                      | 2,3×10 <sup>6</sup> | 9,0×10 <sup>5</sup> | 92                    | 34 | 23  |
| 9                | 20201235                    | 9,0×10 <sup>7</sup>                      | 3,5×10 <sup>7</sup> | 1,5×10 <sup>7</sup> | 91                    | 33 | 27  |
| 10               | 20901800                    | 5,7×10 <sup>6</sup>                      | 2,3×10 <sup>6</sup> | 1,1×10 <sup>6</sup> | 92                    | 37 | 28  |
| 11               | 20111980                    | 7,7×10 <sup>6</sup>                      | 4,7×10 <sup>6</sup> | 1,1×10 <sup>6</sup> | 87                    | 48 | 31  |
| 12               | 20172563                    | 4,5×10 <sup>6</sup>                      | 2,0×10 <sup>6</sup> | 9,0×10 <sup>5</sup> | 87                    | 40 | 35  |
| 13               | 20192932                    | 6,6×10 <sup>6</sup>                      | 3,7×10 <sup>6</sup> | 1,3×10 <sup>6</sup> | 94                    | 43 | 33  |
| 14               | 20192032                    | 7,7×10 <sup>6</sup>                      | 3,3×10 <sup>6</sup> | 1,2×10 <sup>6</sup> | 91                    | 40 | 29  |
| 15               | 20112293                    | 9,1×10 <sup>6</sup>                      | 4,6×10 <sup>6</sup> | 1,3×10 <sup>6</sup> | 89                    | 43 | 25  |
| 16#              | 20171099                    | nd                                       | nd                  | nd                  | nd                    | nd | nd  |
| 17#              | 20192131                    | nd                                       | 5,0×10 <sup>6</sup> | nd                  | nd                    | 91 | nd  |
| 18#              | 20902699                    | 9,9×10 <sup>6</sup>                      | 9,6×10 <sup>5</sup> | nd                  | 91                    | 76 | nd  |
| 19#              | 20180073                    | 5,4×10 <sup>6</sup>                      | nd                  | nd                  | 84                    | nd | nd  |
| 20#              | 20192311                    | 7,1×10 <sup>6</sup>                      | 4,4×10 <sup>6</sup> | nd                  | 89                    | 64 | nd  |
| 21#              | 20210807                    | nd                                       | 3,7×10 <sup>6</sup> | nd                  | nd                    | 65 | nd  |
| 22#              | 23000052                    | nd                                       | nd                  | nd                  | nd                    | nd | nd  |
| 23#              | 20201492                    | nd                                       | nd                  | nd                  | nd                    | nd | nd  |

Análise da concentração celular e viabilidade de leucócitos, nos BC, à data seguinte de colheita (D1), dia 7 (D7) e 15 (D15) após colheita

(1\*\*) (Para obtenção do nº leucócitos totais no BC): factor x10

nd - não determinado

(#) BC usados na análise de citometria de fluxo

**Anexo 3. Análise de parâmetros reticulocitários e linfocitários em 8 buffy coats.**

| Nº do dador      | Contagem de reticulócitos |           |            | Populações de linfócitos |      |      |        |      |      |         |      |      |
|------------------|---------------------------|-----------|------------|--------------------------|------|------|--------|------|------|---------|------|------|
|                  | %                         | VRC<br>** | IPR<br>*** | T CD4+                   |      |      | T CD8+ |      |      | B CD19+ |      |      |
|                  |                           |           |            | D1                       | D7   | D7*  | D1     | D7   | D7*  | D1      | D7   | D7*  |
| (16)<br>20171099 | 8,2                       | 9,07      | 9,07       | 62,2                     | 8,52 | -    | 7,86   | 0    | -    | 4,69    | 0,25 | -    |
| (17)<br>20192131 | 2,5                       | 2,25      | 2,25       | -                        | -    | 39,4 | -      | -    | 10,2 | -       | -    | 5,39 |
| (18)<br>20902699 | 6,5                       | 7,32      | 7,32       | 38,1                     | 16,5 | -    | 22,5   | 6,18 | -    | 11,7    | 2,73 | -    |
| (19)<br>20180073 | 4,3                       | 4,73      | 4,73       | 43,8                     | -    | -    | 17,3   | -    | -    | 8,83    | -    | -    |
| (20)<br>20192311 | 6,3                       | 5,8       | 5,8        | 37,5                     | nd   | -    | 23,8   | nd   | -    | 10,1    | 5,8  | -    |
| (21)<br>20210807 | 5,1                       | 4,52      | 4,52       | -                        | -    | 23   | -      | -    | 18,9 | -       | -    | 12   |
| (22)<br>23000052 | 3,6                       | 3,26      | 3,26       | -                        | -    | 11,8 | -      | -    | 6,66 | -       | -    | 2,89 |
| (23)<br>20201492 | 4,2                       | 3,84      | 2,56       | 16,2                     | -    | -    | 15,2   | -    | -    | 2,86    | -    | -    |

\*\*\* Índice de produção de reticulócitos

\*\* Valor de reticulócitos corrigido

(-) Não há análise do BC

(D7) Análise do BC ao dia 7, em condição de aberto.

(D7\*) Análise do BC ao dia 7, em condição de fechado.

(nd) Não foi possível a análise da população T, neste BC, por erro com o mAbs triplo