



**Politécnico  
Castelo Branco**

Escola Superior de Saúde  
Dr. Lopes Dias

# **Influência do tempo e temperatura de armazenamento na morfologia das células sanguíneas e/ou parâmetros hematológicos**

Margarida Dias Mateus

Nº 20211465

## **Orientador**

Professora Doutora Marisa Regina Reduto Santos Barbeira

## **Co-Orientador**

Professora Doutora Sílvia Raquel Monteiro Martins

Artigo de Investigação apresentado à Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biomédicas Laboratoriais, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Marisa Regina Reduto Santos Barbeira e Professora Doutora Sílvia Raquel Monteiro Martins, do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

**Junho de 2025**



## **Composição do júri**

### Presidente do júri

Professor Doutor, Francisco José Barbas Rodrigues

Professor Adjunto da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias – Instituto Politécnico de Castelo Branco

### Orientador

Professora Doutora, Marisa Regina Reduto Santos Barbeira

Professora Adjunta da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias – Instituto Politécnico de Castelo Branco

### Arguente

Professora Mestre, Carla Isabel Soares Batista

Professora Assistente Convidada da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias – Instituto Politécnico de Castelo Branco



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais, pela dedicação incansável, pelo apoio constante e pelos valores que sempre me transmitiram. À minha irmã, pela presença, compreensão e incentivo ao longo deste percurso. À minha tia Natália, pelo carinho, pelas palavras de encorajamento e pela confiança que sempre depositou em mim.



## **Agradecimentos**

A realização deste artigo de investigação, no âmbito da obtenção do grau de licenciada em Ciências Biomédicas Laboratoriais pela Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, representa o culminar de uma etapa extremamente significativa da minha vida académica e pessoal.

Em primeiro lugar, expresso o meu profundo agradecimento à minha co-orientadora, Professora Doutora Sílvia Raquel Monteiro Martins, pela orientação rigorosa, pela dedicação constante e pelas valiosas contribuições científicas ao longo de todo o processo. Agradeço, igualmente, o entusiasmo que me transmitiu pela área da Hematologia, ao longo da licenciatura.

À minha orientadora, Professora Doutora Marisa Regina Reduto Santos Barbeira, deixo uma sincera palavra de gratidão pelo acompanhamento atento, pela disponibilidade e pelas orientações que enriqueceram de forma significativa este trabalho.

Agradeço também ao Professor Doutor João Luís de Moraes de Oliveira Belo pelo apoio prestado na análise estatística deste estudo. A sua colaboração foi essencial para a concretização desta investigação.

Aos docentes da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, deixo o meu reconhecimento pelo contributo que cada um teve na minha formação ao longo deste percurso académico.

Aos meus pais e à minha irmã, agradeço do fundo do coração pelo amor, pelo apoio incondicional e por estarem sempre ao meu lado, nos momentos fáceis e, sobretudo, nos mais desafiantes.

À restante família, expresso a minha sincera gratidão pelo carinho e pelas palavras de incentivo, ao longo desta caminhada.

Aos meus amigos, sou profundamente grata pela vossa amizade, pelas partilhas e pelo incentivo constante, que tornaram esta jornada mais leve, enriquecedora e memorável.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse possível, o meu mais sincero obrigado.



## Resumo

**Introdução:** A fase pré-analítica é responsável por grande parte dos erros laboratoriais, podendo comprometer significativamente a fiabilidade dos resultados, sobretudo em análises hematológicas como o hemograma e o esfregaço de sangue periférico. Assim, o tempo e a temperatura de armazenamento são fatores pré-analíticos que afetam a estabilidade das amostras.

**Objetivo:** Avaliar a influência do tempo e da temperatura de armazenamento nos parâmetros hematológicos obtidos no hemograma e, na morfologia das células sanguíneas.

**Metodologia:** Analisaram-se seis amostras de sangue venoso de indivíduos saudáveis. Os hemogramas e esfregaços de sangue periférico executaram-se em diferentes tempos (t0h, t1h, t2h, t4h, t6h, t8h, t12h, t24h e t48h), sob duas condições de armazenamento: temperatura ambiente e 4 °C. Utilizou-se o contador hematológico Beckman Coulter DxH 520 e a coloração May-Grunwald Giemsa.

**Resultados:** Verificou-se uma redução significativa dos leucócitos, mais evidente e precoce a 4 °C. Ocorreu uma diminuição do volume corpuscular médio e aumento do volume plaquetar médio, em ambas as temperaturas, 1 hora após a colheita. Morfologicamente, surgiram alterações como *rouleaux*, acantócitos, vacuolização, hipergranulação e hiposegmentação principalmente a partir das 12 horas, sendo as primeiras detetadas 2 horas após a colheita. Contrariamente à expectativa, a refrigeração não garantiu sempre maior estabilidade das amostras.

**Conclusão:** O tempo e a temperatura influenciam de forma significativa os resultados hematológicos e a morfologia celular.

## Palavras-chave

Hemograma, Esfregaço de Sangue Periférico, Tempo, Temperatura, Células Sanguíneas.



## Abstract

**Introduction:** The pre-analytical phase is responsible for a large part of laboratory errors and can significantly compromise the reliability of results, especially in haematological analyses such as the complete blood count and the peripheral blood smear. Thus, storage time and temperature are pre-analytical factors that affect sample stability.

**Objective:** To evaluate the influence of storage time and temperature on the haematological parameters obtained in the complete blood count and on the morphology of blood cells.

**Methodology:** Six venous blood samples from healthy individuals were analysed. Complete blood counts and peripheral blood smears were performed at different times (t0h, t1h, t2h, t4h, t6h, t8h, t12h, t24h, and t48h), under two storage conditions: room temperature and 4 °C. The Beckman Coulter DxH 520 haematology analyser and May-Grünwald Giemsa staining were used.

**Results:** A significant reduction in white blood cells was observed, more evident and earlier at 4 °C. There was a decrease in mean corpuscular volume and an increase in mean platelet volume at both temperatures, 1 hour after collection. Morphologically, changes such as *rouleaux*, acanthocytes, vacuolisation, hypergranulation, and hyposegmentation appeared mainly after 12 hours, with the first changes detected 2 hours after collection. Contrary to expectations, refrigeration did not always ensure greater sample stability.

**Conclusion:** Time and temperature significantly influence haematological results and cell morphology.

## Keywords

Complete Blood Count, Peripheral Blood Smear, Time, Temperature, Blood Cells



## Índice geral

Introdução .....	1
Metodologia.....	3
População de estudo .....	3
Análise dos parâmetros hematológicos .....	3
Análise do esfregaço de sangue periférico .....	4
Análise Estatística .....	4
Aprovação da Comissão de Ética.....	4
Resultados .....	5
População de estudo .....	5
Influência do tempo e da temperatura nos parâmetros hematológicos .....	5
Comparação dos parâmetros hematológicos entre as temperaturas ambiente e 4°C.....	6
Influência do tempo e da temperatura na morfologia das células sanguíneas .....	11
Discussão.....	14
Conclusão .....	18
Referências Bibliográficas .....	19
Apêndices.....	21
Apêndice A .....	21
Apêndice B .....	22
Anexos .....	25
Anexo A.....	25

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Intervalos de tempo de repetição de análises (Hemograma e Esfregaço de Sangue Periférico).....	3
<b>Figura 2</b> - Contagem total de leucócitos- Comparação temperatura ambiente <i>versus</i> temperatura a 4°C em t4h. TA: Temperatura Ambiente; T4°C: Temperatura a 4°C.....	10
<b>Figura 3</b> - Contagem dos subtipos de leucócitos a diferentes temperaturas: temperatura ambiente e temperatura a 4°C. TA: Temperatura Ambiente; T4°C: Temperatura a 4°C. ....	10
<b>Figura 4</b> - Esfregaço de Sangue Periférico em t0h (lâmina controlo). Ampliação total: 400X. ....	11
<b>Figura 5</b> - Alterações morfológicas à TA, t6h. Ampliação total: 1000X (R: Rouleaux; A: Acantócito; HG: Hipergranulação).....	12
<b>Figura 6</b> - Alterações morfológicas a 4°C, t6h. Ampliação total: 1000X (R: Rouleaux; A: Acantócito). ....	12
<b>Figura 7</b> - Alterações morfológicas à TA, t12h. Ampliação total: 1000X (R: Rouleaux; A: Acantócito; HG: Hipergranulação; HS: Hiposegmentação; V: Vacuolização). ....	13
<b>Figura 8</b> - Alterações morfológicas a 4°C, t12h. Ampliação total: 1000X (R: Rouleaux; A: Acantócito; HS: Hiposegmentação; V: Vacuolização).....	13
<b>Figura 9</b> - Alterações morfológicas à TA, t24h. Ampliação total: 1000X. (A: Acantócitos).....	13
<b>Figura 10</b> - Alterações morfológicas a 4°C, t24h. Ampliação total: 1000X. (A: Acantócitos).....	13
<b>Figura 11</b> - Alterações morfológicas à TA, t48h. Ampliação total: 1000X.....	13
<b>Figura 12</b> - Alterações morfológicas a 4°C, t48h. Ampliação total: 1000X .....	13

## Lista de tabelas

**Tabela 1** - Estatística descritiva dos resultados obtidos aos tempos: 0 horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas e, 48 horas, a diferentes temperaturas: temperatura ambiente e 4°C. .... 7

**Tabela 2** - Comparação entre o valor ao tempo 0 e restantes tempos de avaliação à temperatura ambiente e a 4°C. .... 8

**Tabela 3** – Comparação dos subtipos de leucócitos entre as diferentes temperaturas: temperatura ambiente *versus* temperatura a 4°C..... 9

**Tabela 4** - Alterações morfológicas nas células sanguíneas, ao longo do tempo, a diferentes temperaturas (temperatura ambiente e temperatura a 4°C). .... 11

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

**CHCM** - Concentração da hemoglobina corpuscular média;

**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetracético;

**ESALD** – Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias;

**Hb** - Hemoglobina;

**HCM** - Hemoglobina corpuscular média;

**Hct** - Hematócrito;

**RBC** - Contagem total de eritrócitos;

**RDW** - Amplitude de distribuição de eritrócitos;

**t0h** - tempo da colheita (controlo);

**t12h** - tempo 12 horas após a realização da colheita;

**t1h** - tempo 1 hora após a realização da colheita;

**t24h** - tempo 24 horas após a realização da colheita;

**t2h** - tempo 2 horas após a realização da colheita;

**t48h** - tempo 48 horas após a realização da colheita;

**t4h** - tempo 4 horas após a realização da colheita;

**T4°C** - Temperatura refrigerada, a 4°C,

**t6h** - tempo 6 horas após a realização da colheita;

**t8h** - tempo 8 horas após a realização da colheita;

**TA** - Temperatura ambiente;

**VCM** - Volume corpuscular médio;

**VPM** - Volume plaquetar médio;

**WBC** - Contagem total de leucócitos.





## Introdução

Os exames laboratoriais desempenham um papel fundamental no apoio ao diagnóstico, prognóstico, acompanhamento terapêutico e monitorização de diversas patologias. O processo de análise dos vários parâmetros laboratoriais inclui três fases: a pré-analítica, a analítica e a pós-analítica. A fase pré-analítica envolve todos os procedimentos realizados antes da análise laboratorial propriamente dita. É determinante no processo analítico uma vez que a maioria dos erros laboratoriais ocorre nesta fase e condiciona a qualidade do resultado laboratorial. A fase pré-analítica é particularmente suscetível a erros, devido à envolvimento de múltiplos intervenientes no processo, aumentando a probabilidade de não conformidades. Exemplos desses erros incluem a incorreta identificação da amostra, a escolha inadequada de tubos de colheita e as condições de armazenamento ou transporte. Estas ocorrências influenciam significativamente os resultados obtidos, comprometendo a sua precisão e exatidão, e consequentemente, o correto diagnóstico [1,2].

Vários estudos referem o tempo e a temperatura de armazenamento de amostras periféricas como fatores pré-analíticos determinantes na qualidade de amostras para análises hematológicas, tais como o hemograma e o esfregaço de sangue periférico [3–8].

Na rotina laboratorial, as amostras de sangue são frequentemente colocadas à temperatura ambiente durante curtos períodos antes de serem armazenadas em condições ideais, com o intuito de permitir a repetição do hemograma ou a realização de esfregaços de sangue periférico, caso os resultados cumpram determinados critérios. Além disto, podem ocorrer atrasos na realização destas análises, no caso de amostras que sejam enviadas a partir de centros de colheita remotos. Neste sentido, estudos científicos demonstram que os resultados hematológicos são influenciados pelo tempo entre a colheita e o processo analítico em si, bem como pelas condições de armazenamento durante o transporte e a entrega das amostras [3,6,7]. Deste modo, as amostras de sangue devem ser armazenadas entre 4°C e 8°C e analisadas o mais rapidamente possível após a colheita, de modo a prevenir alterações induzidas pelo tempo e pela temperatura de armazenamento. Além disso, é ainda recomendado que, os esfregaços de sangue periférico para análise morfológica sejam preparados no limite de quatro horas após a colheita, de modo a evitar alterações morfológicas induzidas pelo ácido etilendiamino tetracético (EDTA), dada a instabilidade das células sanguíneas a este anticoagulante [8,9].

Algumas investigações mostram que as alterações mais significativas incluem, nas células vermelhas, o aumento do volume corpuscular médio (VCM) e do hematócrito e, a diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Também a diminuição da contagem total de leucócitos (WBC) e diminuição da contagem de plaquetas são relatadas, quando as amostras são

mantidas à temperatura ambiente. Do ponto de vista morfológico, são, igualmente, descritas alterações celulares devidas aos fatores pré-analíticos [3,4].

Neste sentido, o objetivo principal deste estudo é avaliar a influência do tempo e da temperatura de armazenamento nos diversos parâmetros hematológicos obtidos no hemograma, e na morfologia das células periféricas. Pretendeu-se também estabelecer um critério relativamente ao tempo máximo de processamento analítico do hemograma e da realização de esfregaços de sangue periférico na prática laboratorial.

## Metodologia

### População de estudo

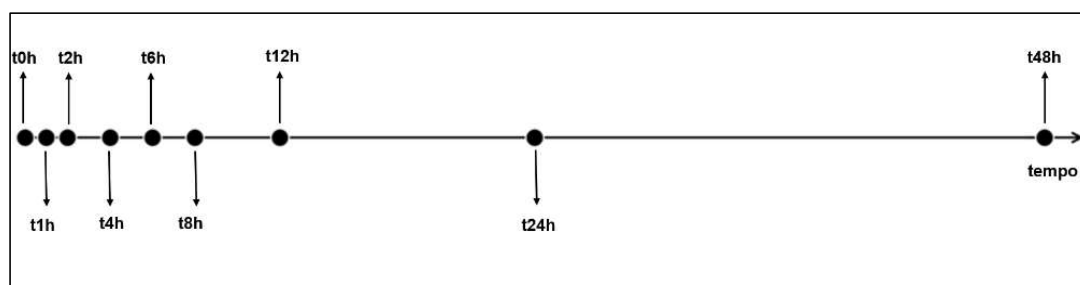
Este estudo observacional foi quantitativo descritivo e correlacional. Decorreu no laboratório de Hematologia Clínica/Imunohemoterapia Clínica (L02) da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias (ESALD) durante os meses de abril e maio de 2025. Foram colhidas um total de 6 amostras de sangue venoso a 3 participantes do sexo feminino e a 3 participantes do sexo masculino. Procedeu-se à seleção dos participantes considerando os seguintes critérios de inclusão: idade compreendida entre os 18 e os 23 anos; adoção de um estilo de vida saudável. Os critérios de exclusão aplicados incluíram: a existência de patologias hematológica, renal ou hepática; toma de qualquer fármaco; consumo de álcool ou drogas; não se encontrar em jejum no momento da colheita. Todos os participantes do estudo preencheram um questionário acerca da sua condição de saúde (apêndice A) e assinaram o consentimento informado (apêndice B).

### Análise dos parâmetros hematológicos

A cada participante do estudo, procedeu-se à colheita de amostra de sangue venoso para dois tubos EDTA (S-Monovette®).

Após breve agitação dos tubos de EDTA no agitador RSLAB-10 foi realizado o hemograma no equipamento Beckman Coulter DxH 520. Antes da utilização do equipamento, foi realizada a sua manutenção e foi efetuado o controlo de qualidade do equipamento (Ref.: B36872; Lote.: 251711), fornecido pela Beckman Coulter Ireland Inc. É de notar que, os tubos foram mantidos em agitação durante cerca de 10 minutos, permitindo que as amostras armazenadas a frio atingissem a temperatura ambiente.

No estudo do efeito do tempo e da temperatura na amostra, o procedimento descrito anteriormente foi repetido em diferentes condições de tempo e temperatura. Assim, conforme descrito na figura 1, o hemograma foi repetido nos seguintes intervalos de tempo após a colheita: (t0h) - análise inicial de controlo; 1 hora (t1h); 2 horas (t2h); 4 horas (t4h); 6 horas (t6h); 8 horas (t8h); 12 horas (t12h); 24 horas (t24h); e 48 horas (t48h).



**Figura 1** - Intervalos de tempo de repetição de análises (Hemograma e Esfregaço de Sangue Periférico).

Durante este período, as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente e a 4°C, no frigorífico do laboratório.

## **Análise do esfregaço de sangue periférico**

No estudo morfológico das células sanguíneas, foram realizados esfregaços de sangue periférico corados pela coloração May-Grunwald Giemsa, nos mesmos intervalos de tempo descritos no procedimento anterior (figura 1). Os esfregaços foram, mais tarde, observados no microscópio Nikon Eclipse E400 a fim de ser possível analisar as alterações morfológicas ocorridas. A análise do esfregaço ao t0h foi considerada o controlo, sendo as alterações dos restantes esfregaços, nas diferentes horas, avaliadas em relação ao t0h.

Durante a observação do esfregaço de sangue periférico foram analisadas as possíveis alterações na série branca: hiper e hipogranulação, hiper e hiposegmentação, *cariorrexis*, vacuolização e sombras nucleares. Na série vermelha avaliou-se a anisocromia, hipocromia, presença de esferócitos, anisocitose, micro e macrocitose, poiquilocitose, *rouleaux* e, a presença de outras alterações na morfologia dos eritrócitos. Relativamente à série plaquetar, foi estudada a trombocitopenia, anisocitose plaquetar, hipogranulação, presença de agregados e satelitismo plaquetar.

## **Análise Estatística**

Na análise dos resultados obtidos, foi utilizado o software de análise de dados SPSS (versão 30.0.0 @IBM Corp.1989, 2023). Foi aplicado o teste não paramétrico Wilcoxon para comparar amostras emparelhadas, com o intuito de avaliar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos entre o t0h (controlo) e os diferentes tempos de armazenamento, à temperatura ambiente e a 4 °C. Foi também utilizado para comparar os valores obtidos à temperatura ambiente *versus* temperatura a 4°C.

As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

## **Aprovação da Comissão de Ética**

O presente estudo, com o código n.º 202/CE-IPCB/2025, foi aprovado pela Comissão de Ética do IPCB, sendo que, o parecer positivo do mesmo se encontra em anexo (anexo A).

## Resultados

### População de estudo

As amostras utilizadas para este estudo compreenderam um total de 6 indivíduos, 3 do sexo feminino e 3 do sexo masculino. A média de idades foi 20,7  $\pm$  1,63 anos. Todos os participantes legitimaram a adoção de um estilo de vida saudável e negaram a toma de qualquer fármaco e o consumo de álcool ou drogas de abuso, cumprindo todos os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos.

### Influência do tempo e da temperatura nos parâmetros hematológicos

Na análise da influência do tempo e da temperatura nos parâmetros hematológicos, foram apenas consideradas as alterações significativas mantidas ao longo do tempo.

No leucograma, a WBC diminuiu 24 horas após a primeira colheita à temperatura ambiente (t0h) ( $p=0,028$ ). No entanto, na mesma análise a 4°C, esta diferença foi notória às 4 horas, comparativamente à análise inicial ( $p=0,028$ ) (tabela 1 e tabela 2).

Relativamente à análise específica de cada subtipo de leucócito, à temperatura ambiente foram detetadas diferenças significativas mantidas às 24 horas nos neutrófilos e linfócitos e às 48 horas nos monócitos (tabela 2). Em todas estas avaliações, os valores das células brancas diminuíram comparativamente a t0h (tabela 1).

Nas mesmas comparações a 4°C não foram detetadas diferenças estatísticas mantidas ao longo do tempo nos neutrófilos. Isto é, as diferenças obtidas às 12 horas e às 24 horas não foram constantes às 48 horas (tabela 2). Quanto aos monócitos e linfócitos, a 4°C, foram encontradas diferenças na primeira avaliação ao t1h, e continuas em todos os momentos seguintes de avaliação (tabela 2). Os níveis destas células foram sempre inferiores à contagem em t0h. Também nesta temperatura, se encontraram alterações permanentes em t24h e t48h nos eosinófilos e basófilos (tabela 2). A contagem de basófilos diminuiu nestas avaliações, no entanto, a contagem de eosinófilos aumentou (tabela 1).

Na análise da série vermelha, não foram detetadas quaisquer alterações na contagem de eritrócitos, no valor de hemoglobina e, no valor de hemoglobina corpuscular média (HCM), quer à temperatura ambiente quer a 4°C (tabela 2). Nos índices hematimétricos, hematócrito, CHCM e amplitude de distribuição de eritrócitos (RDW), encontraram-se algumas diferenças relativamente a t0h, em ambas as temperaturas, contudo estas não foram mantidas ao longo do tempo (tabela 2). Na avaliação do VCM, foi notável uma diminuição deste parâmetro ao longo do tempo, quer à temperatura ambiente quer a 4°C (tabela 1 e tabela 2).

Igualmente na avaliação do plaquetograma, foram detetadas alterações quanto ao volume plaquetar médio (VPM). Neste caso, este índice aumenta logo a partir da primeira hora comparativamente a t0h, mantendo-se ao longo de todos os tempos de estudo. Este achado foi identificado em ambas as temperaturas, ambiente e 4°C (tabela 1 e tabela 2). Quanto à contagem de plaquetas, não foram detetadas alterações constantes ao longo do tempo (tabela 2).

### **Comparação dos parâmetros hematológicos entre as temperaturas ambiente e 4°C**

A comparação dos parâmetros hematológicos entre as temperaturas ambiente e 4°C foi apenas realizada para o leucograma, uma vez que, foi nesta avaliação que foram encontradas maiores diferenças entre as duas temperaturas de análise (figura 2 e tabela 3).

Quanto à WBC, esta diminuiu a 4°C comparativamente à temperatura ambiente (figura 2), a partir de t4h até a t48h ( $p=0,028$ ).

Esta diminuição da contagem de leucócitos deve-se principalmente à diminuição da contagem de linfócitos e basófilos (figura 3), que são notórias desde a avaliação em t1h (tabela 1 e tabela 3).

**Tabela 1** - Estatística descritiva dos resultados obtidos aos tempos: 0 horas, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas e, 48 horas, a diferentes temperaturas: temperatura ambiente e 4°C.

Estatística Descritiva		0h	1h	2h	4h	6h	8h	12h	24h	48h	
<b>Leucograma</b>		<b>Temperatura</b>									
Contagem de Leucócitos	Média ± SD	5,85 ± 1,94	5,85 ± 1,17	5,85 ± 1,13	5,86 ± 1,18	5,71 ± 1,11	5,70 ± 1,15	5,69 ± 1,11	5,44 ± 1,11	5,41 ± 1,15	
			5,54 ± 1,61	5,62 ± 1,77	5,36 ± 1,65	5,17 ± 1,6	5,18 ± 1,56	5,09 ± 1,71	5,03 ± 1,53	5,15 ± 1,68	
			3,25 ± 0,84	3,20 ± 0,84	3,24 ± 0,85	3,19 ± 0,82	3,15 ± 0,84	3,18 ± 0,84	3,07 ± 0,84	3,03 ± 0,84	
Neutrófilos	Média ± SD	3,27 ± 1,48	3,27 ± 1,44	3,30 ± 1,51	3,24 ± 1,38	3,21 ± 1,43	3,22 ± 1,44	3,16 ± 1,46	3,16 ± 1,37	3,19 ± 1,55	
			1,95 ± 0,49	1,97 ± 0,47	1,96 ± 0,49	1,86 ± 0,43	1,87 ± 0,47	1,85 ± 0,39	1,74 ± 0,48	1,82 ± 0,47	
			1,69 ± 0,11	1,60 ± 0,16	1,55 ± 0,09	1,37 ± 0,04	1,36 ± 0,03	1,30 ± 0,08	1,26 ± 0,07	1,32 ± 0,01	
Linfócitos	Média ± SD	0,48 ± 0,19	0,49 ± 0,14	0,49 ± 0,16	0,48 ± 0,16	0,48 ± 0,13	0,49 ± 0,16	0,48 ± 0,14	0,46 ± 0,10	0,41 ± 0,14	
			0,48 ± 0,08	0,38 ± 0,08	0,42 ± 0,11	0,41 ± 0,14	0,42 ± 0,09	0,43 ± 0,12	0,37 ± 0,04	0,23 ± 0,04	
			0,15 ± 0,11	0,15 ± 0,12	0,16 ± 0,11	0,16 ± 0,11	0,17 ± 0,12	0,16 ± 0,11	0,16 ± 0,13	0,13 ± 0,08	
Eosinófilos	Média ± SD	0,15 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,07	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,18 ± 0,05	0,23 ± 0,04	0,24 ± 0,07	
			0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	
			0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	
Basófilos	Média ± SD	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	
			0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	
			0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	
<b>Eritrograma</b>											
Contagem de Eritrócitos	Média ± SD	4,74 ± 0,53	4,74 ± 0,53	4,74 ± 0,59	4,72 ± 0,52	4,73 ± 0,58	4,71 ± 0,63	4,73 ± 0,53	4,72 ± 0,69	4,69 ± 0,52	
			4,79 ± 1,2	4,79 ± 1,36	4,78 ± 1,15	4,73 ± 1,24	4,73 ± 1,2	4,73 ± 1,2	4,73 ± 1,15	4,73 ± 1,27	
			14,57 ± 2,07	14,57 ± 2,14	14,59 ± 2,08	14,56 ± 2,12	14,48 ± 2,18	14,53 ± 2,07	14,52 ± 2,30	14,54 ± 2,04	
Hemoglobina	Média ± SD	14,58 ± 4,55	14,64 ± 4,26	14,66 ± 4,57	14,66 ± 4,06	14,49 ± 4,33	14,52 ± 4,22	14,54 ± 4,37	14,53 ± 4,31	14,59 ± 4,45	
			41,70 ± 5,15	41,55 ± 5,62	41,33 ± 5,11	41,35 ± 5,42	41,20 ± 5,81	41,45 ± 5,25	41,55 ± 6,49	42,57 ± 5,51	
			42,08 ± 11,31	41,98 ± 12,66	42,02 ± 10,82	41,38 ± 11,60	41,38 ± 11,46	41,28 ± 11,46	41,42 ± 10,82	41,65 ± 11,74	
Volume Corpuscular Médio	Média ± SD	88,32 ± 1,70	87,85 ± 2,76	87,63 ± 2,65	87,45 ± 2,61	87,37 ± 2,52	87,45 ± 2,53	87,52 ± 2,92	87,92 ± 2,60	90,23 ± 2,00	
			87,80 ± 2,05	87,65 ± 2,12	87,82 ± 1,91	87,45 ± 1,98	87,42 ± 2,47	87,18 ± 2,12	87,45 ± 2,19	87,97 ± 1,77	
			30,63 ± 1,35	30,68 ± 1,2	30,58 ± 1,13	30,80 ± 1,34	30,55 ± 1,21	30,72 ± 1,08	30,60 ± 1,24	30,75 ± 1,35	
Hemoglobina Corpuscular Média	Média ± SD	30,70 ± 1,34	30,53 ± 1,58	30,57 ± 1,13	30,58 ± 1,41	30,60 ± 1,41	30,62 ± 1,41	30,63 ± 1,56	30,62 ± 1,91	30,78 ± 1,34	
			34,87 ± 0,77	35,03 ± 0,48	35,22 ± 0,93	35,17 ± 0,82	35,12 ± 0,49	35,00 ± 0,66	34,93 ± 0,52	34,12 ± 0,72	
			34,73 ± 0,92	34,88 ± 0,57	34,82 ± 0,85	34,82 ± 0,85	34,97 ± 0,85	35,02 ± 0,64	35,15 ± 0,99	35,02 ± 1,41	
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média	Média ± SD	43,70 ± 0,85	43,70 ± 3,23	43,56 ± 3,27	43,43 ± 3,63	43,32 ± 3,70	43,20 ± 2,91	43,37 ± 3,39	44,33 ± 3,22	47,28 ± 4,82	
			44,18 ± 6,08	44,32 ± 5,94	43,85 ± 5,73	43,92 ± 5,37	43,20 ± 5,66	43,75 ± 6,72	43,35 ± 6,43	43,37 ± 7,00	
			272,28 ± 74,80	275,05 ± 72,26	274,10 ± 71,22	268,30 ± 69,99	269,95 ± 71,66	264,02 ± 67,06	279,48 ± 62,73	268,17 ± 77,41	
Plaquetograma	Média ± SD	260,08 ± 126,15	260,53 ± 122,61	270,05 ± 131,03	259,30 ± 101,47	273,08 ± 136,83	249,95 ± 110,87	270,10 ± 133,50	262,90 ± 143,05	267,70 ± 121,83	
			8,77 ± 0,78	9,07 ± 0,82	9,27 ± 1,00	9,35 ± 0,99	9,44 ± 1,02	9,47 ± 0,99	9,29 ± 0,81	10,23 ± 1,19	
			8,56 ± 0,25	8,72 ± 0,64	8,94 ± 0,54	9,06 ± 0,43	9,27 ± 0,15	9,34 ± 0,41	9,51 ± 0,08	10,04 ± 0,84	

SD: Desvio Padrão; TA: Temperatura ambiente; T4°C: Temperatura a 4°C.

**Tabela 2 -** Comparação entre o valor ao tempo 0 e restantes tempos de avaliação à temperatura ambiente e a 4°C.

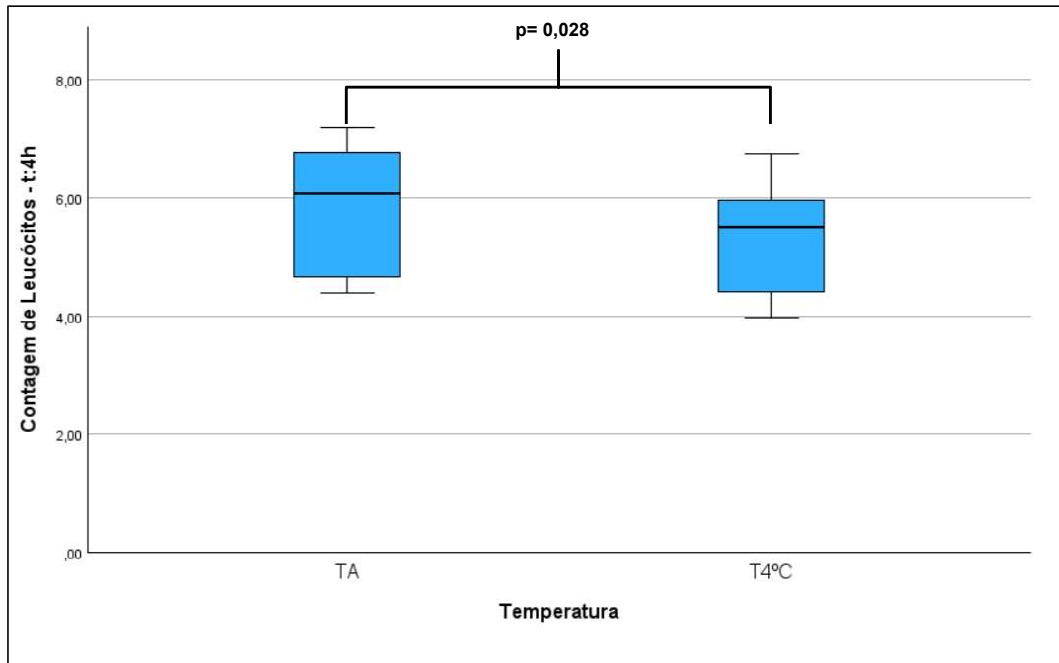
P Value - Wilcoxon Test		0h vs 1h	0h vs 2h	0h vs 4h	0h vs 6h	0h vs 8h	0h vs 12h	0h vs 24h	0h vs 48h
Leucograma	Temperatura								
	TA	0,917	0,917	0,465	0,116	0,042	0,138	0,028	0,028
	T4°C	0,115	0,249	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
	TA	0,463	0,042	0,102	0,028	0,027	0,066	0,028	0,028
	T4°C	0,600	0,463	0,249	0,249	0,249	0,028	0,028	0,500
	TA	0,138	0,345	0,116	0,225	0,249	0,345	0,028	0,028
	T4°C	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
	TA	1	0,344	0,854	0,5	0,527	0,713	0,462	0,043
	T4°C	0,027	0,028	0,028	0,027	0,027	0,026	0,028	0,028
	TA	0,595	0,891	0,916	0,892	0,044	0,496	1	0,248
Eosinófilos	T4°C	0,4	0,892	0,671	0,596	0,176	0,066	0,027	0,043
	TA	0,564	0,102	0,059	0,028	0,317	0,102	0,564	0,157
Basófilos	T4°C	0,059	0,034	0,059	0,180	0,046	0,059	0,023	0,023
	Eritrograma								
Contagem de Eritrócitos	TA	0,917	0,671	0,917	0,750	0,098	0,686	0,463	0,293
	T4°C	0,345	0,172	0,462	0,753	0,916	0,753	0,753	0,916
Hemoglobina	TA	0,833	0,344	0,833	0,917	0,173	0,173	0,753	0,599
	T4°C	0,786	0,686	0,753	0,345	0,463	0,588	0,753	0,917
Hematócrito	TA	0,600	0,116	0,345	0,141	0,026	0,343	0,400	0,028
	T4°C	0,752	1,000	0,917	0,141	0,104	0,138	0,674	0,598
Volume Corpuscular Médio	TA	0,027	0,028	0,027	0,027	0,027	0,043	0,027	0,046
	T4°C	0,027	0,024	0,027	0,026	0,028	0,028	0,028	0,046
Hemoglobina Corpuscular Média	TA	0,527	1,000	0,893	0,340	0,832	0,500	1,000	0,854
	T4°C	0,167	0,176	0,066	0,197	0,334	0,336	0,528	0,496
Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média	TA	0,891	0,044	0,141	0,058	0,042	0,345	0,279	0,027
	T4°C	0,750	0,269	0,276	0,041	0,058	0,026	0,207	0,339
RDW	TA	0,917	0,753	0,279	0,043	0,279	0,345	0,116	0,028
	T4°C	0,293	0,400	0,686	0,893	0,207	0,340	0,462	0,344
Plaquetograma									
Contagem de Plaquetas	TA	0,892	0,046	0,6	0,046	0,917	0,173	0,463	0,345
	T4°C	0,116	0,028	0,046	0,345	0,075	0,345	0,225	0,6
Volume Plaquetar Médio	TA	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,043	0,028
	T4°C	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,027

TA: Temperatura ambiente; T4°C: Temperatura a 4°C. Teste de Wilcoxon: resultados sombreados, a laranja, indicam valores de  $p < 0,05$ .

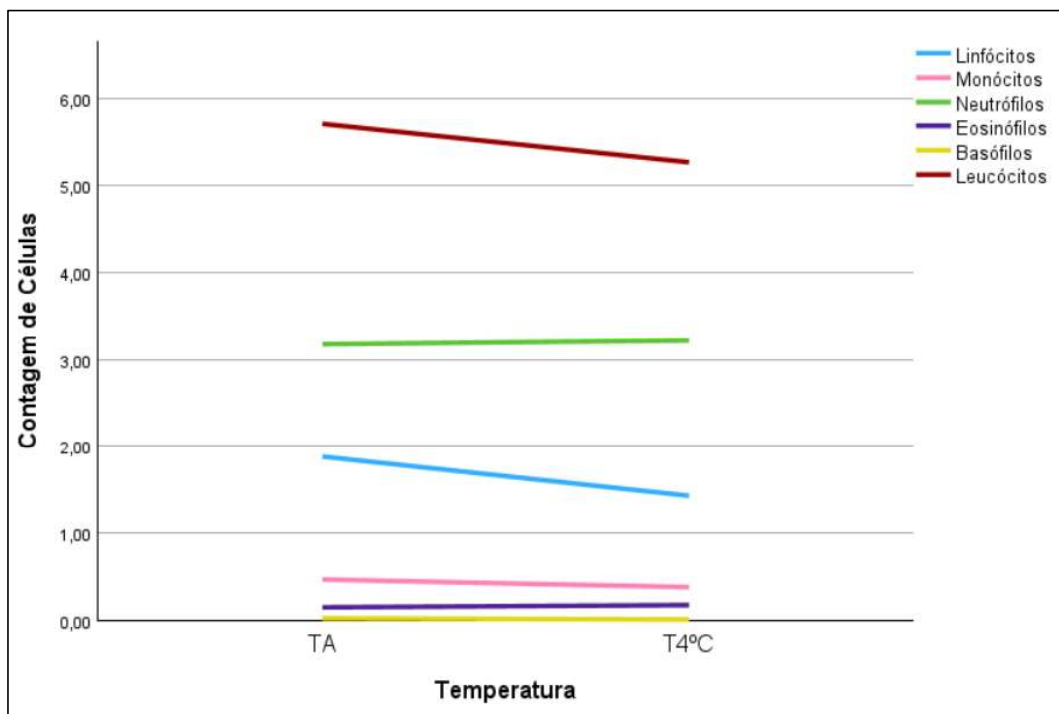
**Tabela 3** - Comparação dos subtipos de leucócitos entre as diferentes temperaturas: temperatura ambiente *versus* temperatura a 4°C.

Leucograma	P Value - Wilcoxon Test									
	0h vs 1h	0h vs 2h	0h vs 4h	0h vs 6h	0h vs 8h	0h vs 12h	0h vs 24h	0h vs 48h		
<b>Temperatura</b>										
Neutrófilos	0,917	0,115	0,833	0,917	0,045	0,458	0,075	0,345		
Linfócitos	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028		
Monócitos	0,043	0,072	0,072	0,046	0,074	0,043	0,046	0,027		
Eosinófilos	0,496	1,000	0,750	0,157	0,891	0,114	0,027	0,028		
Basófilos	0,034	0,041	0,026	0,039	0,025	0,039	0,034	0,024		

TA: Temperatura ambiente; T4°C: Temperatura a 4°C. Teste de Wilcoxon: resultados sombreados, a laranja, indicam valores de  $p < 0,05$ .



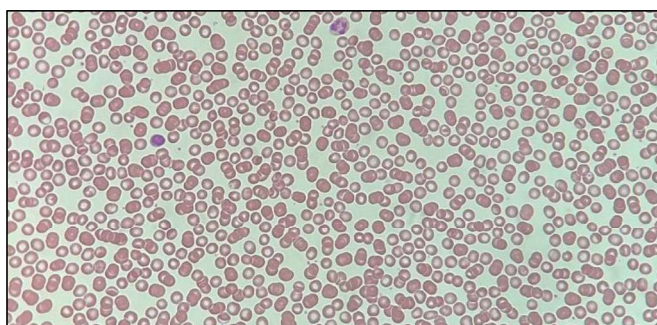
**Figura 2** - Contagem total de leucócitos- Comparação temperatura ambiente *versus* temperatura a 4°C em t4h. TA: Temperatura Ambiente; T4°C: Temperatura a 4°C.



**Figura 3** - Contagem dos subtipos de leucócitos a diferentes temperaturas: temperatura ambiente e temperatura a 4°C. TA: Temperatura Ambiente; T4°C: Temperatura a 4°C.

## Influência do tempo e da temperatura na morfologia das células sanguíneas

Em t0h, o esfregaço de sangue periférico realizado encontrava-se sem alterações morfológicas, servindo como lâmina controle para comparação dos restantes esfregaços de sangue periférico (figura 4).



**Figura 4** - Esfregaço de Sangue Periférico em t0h (lâmina controle). Ampliação total: 400X.

Do ponto de vista morfológico, foram observadas várias alterações nas séries branca e vermelha ao longo de diferentes tempos, à temperatura ambiente e a 4°C. Os valores apresentados na tabela 4, referem-se ao número de amostras que evidenciaram as respectivas alterações.

**Tabela 4** - Alterações morfológicas nas células sanguíneas, ao longo do tempo, a diferentes temperaturas (temperatura ambiente e temperatura a 4°C).

Série Branca	Temperatura	t1h	t2h	t4h	t6h	t8h	t12h	t24h	t48h
Hipergranulação (HG)	TA	0	0	0	2	5	6	6	6
	T4°C	0	0	0	0	2	3	3	3
Hiposegmentação (HS)	TA	0	0	0	0	0	1	3	4
	T4°C	0	0	0	0	0	1	3	3
Vacuolização (V)	TA	0	0	0	0	0	1	5	6
	T4°C	0	0	0	0	0	2	5	6
<b>Série Vermelha</b>									
Acantócitos (A)	TA	0	0	1	3	4	4	6	6
	T4°C	0	0	2	4	5	6	6	6
Rouleaux (R)	TA	0	3	4	6	6	6	6	6
	T4°C	0	3	5	6	6	6	6	6

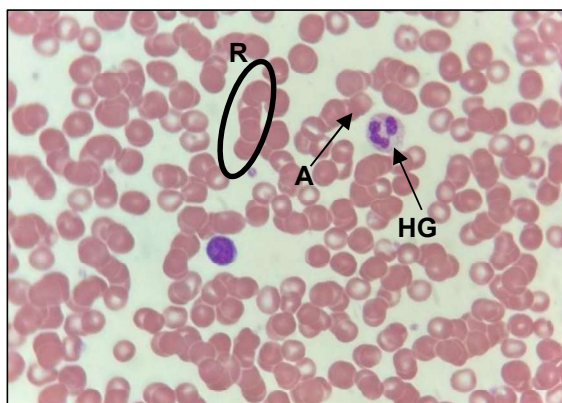
TA: Temperatura Ambiente; T4°C: Temperatura a 4°C

A série branca não sofreu quaisquer alterações até 4 horas após a colheita (t4h), quer à temperatura ambiente, quer a 4°C. A hipergranulação, à temperatura ambiente, evidenciou-se a partir das 6 horas após a colheita (t6h) em 2 amostras (tabela 4 e figura 6). No entanto, o número de amostras com esta alteração aumentou a partir deste momento, mantendo-se constante até t48h em todas as amostras estudadas. A 4°C, o surgimento de hipergranulação ocorreu mais tarde, 8 horas após a colheita (t8h), em 2 amostras e, nos seguintes tempos de análise, esta alteração foi evidente apenas em 3 amostras (tabela 4 e figura 8).

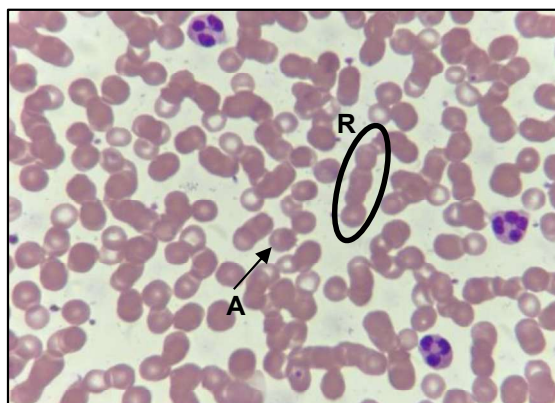
A hiposegmentação dos leucócitos foi evidente a partir de t12h, numa amostra, quer à temperatura ambiente, quer a 4°C. Após 24 horas da realização da colheita (t24h), 3 amostras evidenciaram esta característica, em ambas as temperaturas e, em t48h houve 4 amostras com esta alteração à temperatura ambiente e, 3 amostras com a mesma alteração a 4°C (tabela 4, figura 7 e figura 8).

A vacuolização mostrou-se presente em ambas as temperaturas a partir de t12h, sendo que, em t24h e t48h, 5 e 6 amostras, respetivamente, mostravam esta alteração celular (tabela 4, figura 7 e figura 8).

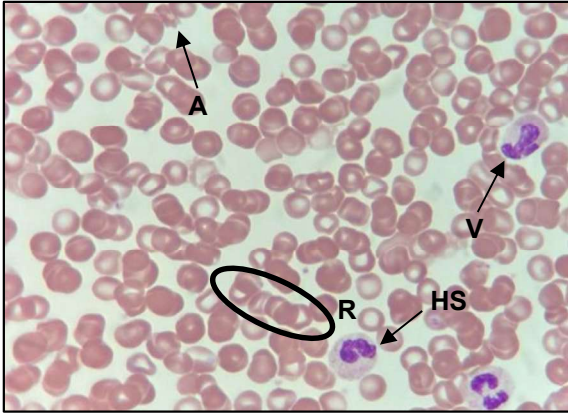
Quanto à série vermelha, as alterações morfológicas foram evidentes 1 hora após a colheita (t1h), em ambas as temperaturas (tabela 4). Verificou-se o aparecimento de acantócitos após 4 horas da realização da colheita (t4h), que foram aumentando gradualmente ao longo do tempo, sendo que, a partir de t24h, à temperatura ambiente, todas as amostras estudadas evidenciaram esta alteração, enquanto a 4°C, a partir de t12h, este achado foi evidente no total das amostras em estudo (tabela 4). O *rouleaux* teve início em t2h, a ambas as temperaturas, e a partir de t6h todas as amostras em estudo mostraram esta alteração, quer à temperatura ambiente quer a 4°C (tabela 4, figura 5, figura 6, figura 7, figura 8, figura 9, figura 10, figura 11 e figura 12).



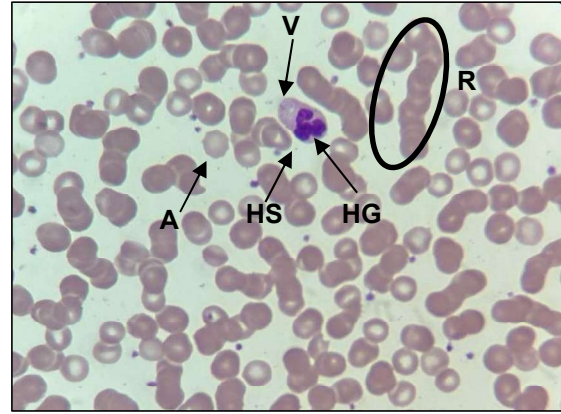
**Figura 5** - Alterações morfológicas à TA, t6h. Ampliação total: 1000X (R: Rouleaux; A: Acanócito; HG: Hipergranulação).



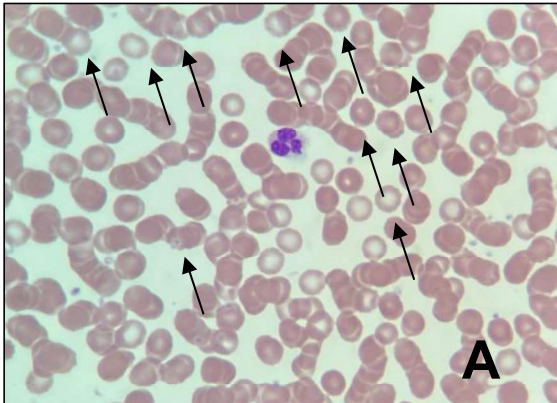
**Figura 6** - Alterações morfológicas a 4°C, t6h. Ampliação total: 1000X (R: Rouleaux; A: Acanócito).



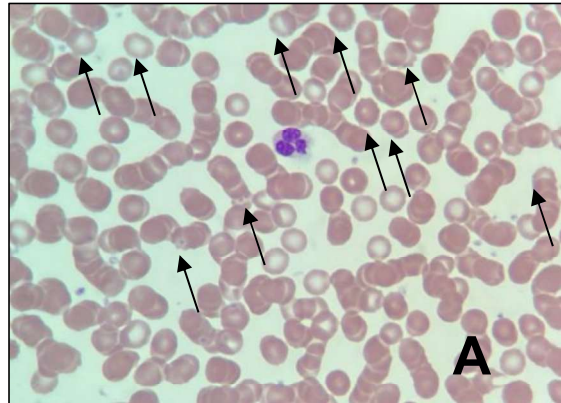
**Figura 7** - Alterações morfológicas à TA, t12h. Ampliação total: 1000X (R: *Rouleaux*; A: Acanatócito; HS: Hiposegmentação; V: Vacuolização).



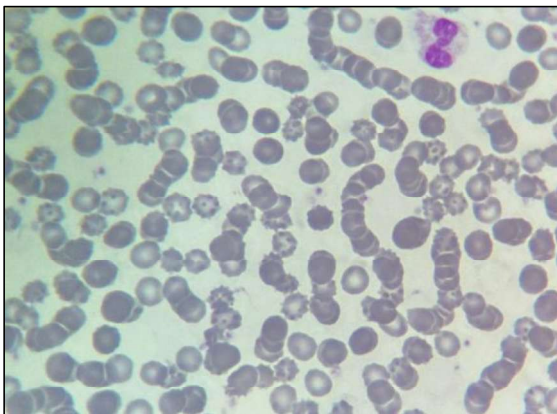
**Figura 8** - Alterações morfológicas a 4°C, t12h. Ampliação total: 1000X (R: *Rouleaux*; A: Acanatócito; HG: Hipergranulação; HS: Hiposegmentação; V: Vacuolização).



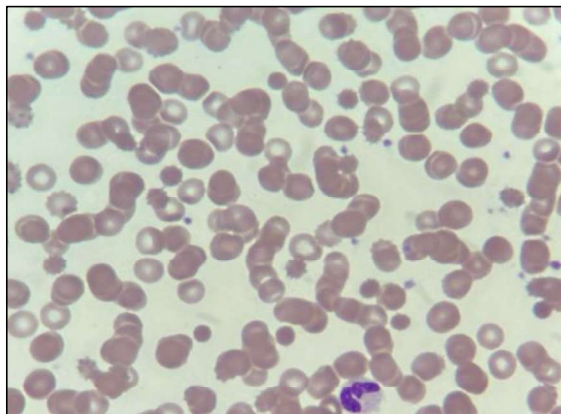
**Figura 9** - Alterações morfológicas à TA, t24h. Ampliação total: 1000X. (A: Acanatócitos)



**Figura 10** - Alterações morfológicas a 4°C, t24h. Ampliação total: 1000X. (A: Acanatócitos)



**Figura 11** - Alterações morfológicas à TA, t48h. Ampliação total: 1000X



**Figura 12** - Alterações morfológicas a 4°C, t48h. Ampliação total: 1000X

## Discussão

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que o tempo e a temperatura de armazenamento influenciam significativamente diversos parâmetros hematológicos, assim como, a morfologia das células sanguíneas, corroborando o descrito em estudos prévios [3–9].

Relativamente ao leucograma, neste estudo observou-se uma redução progressiva significativa da WBC a partir de t24h à temperatura ambiente e, a partir de t4h a 4°C. No estudo realizado por Wood et al. verificou-se uma diminuição significativa da WBC a 4°C, embora mais tardiamente (às 24 horas), sustentando os resultados descritos neste trabalho. No entanto, não descreveram alterações significativas na WBC à temperatura ambiente [10]. Na investigação de Majumdar et al., a WBC sofreu alterações significativas em ambas as temperaturas, apresentando uma diminuição significativa após 48 horas. Este resultado está concordante com as alterações obtidas no presente estudo, embora a diminuição da WBC também seja descrita mais tardiamente [6]. Para a mesma análise, também no trabalho de Schapkaitz et al., a WBC diminuiu ao longo do tempo. Manteve-se estável até 36 horas após a colheita, mas diminuiu significativamente às 48 horas à temperatura ambiente, e às 72h a 4°C [8]. Noutros estudos efetuados [11–13], foi descrita, de igual modo, uma contagem uniforme nos valores da WBC até 48 horas após a colheita, à temperatura ambiente. No presente estudo, obtiveram-se diferenças na contagem de glóbulos brancos mais precocemente, uma vez que nos referidos trabalhos, a primeira avaliação das contagens de leucócitos só acontecia após 24h [11–13]. Assim mostra-se que as alterações na WBC acontecem logo após 4 horas, quando os tubos de colheita são armazenados no frio.

Quanto aos subtipos de leucócitos, este estudo mostrou diminuição significativa dos neutrófilos à TA. Este resultado está de acordo com o estudo de Jaya et al., no qual se verificou uma diminuição da percentagem de granulócitos às 24 horas, à temperatura ambiente. Segundo estes autores, estas células mostraram-se estáveis quando armazenadas a 4°C, não tendo sido detetadas alterações significativas, o que corrobora o presente trabalho [3]. Na investigação de Schapkaitz et al., foi verificado um aumento significativo destas células às 24 horas à temperatura ambiente [8]. Esta alteração vai contra o constatado no presente estudo, dado que, em t24h à TA foi detetada uma diminuição significativa das mesmas. A 4°C, os mesmos autores observaram uma diminuição significativa dos neutrófilos apenas 72 horas após a colheita [8]. Visto que a presente investigação só decorreu até 48 horas após a colheita, não é possível fazer uma comparação relativamente a este tempo de análise, no entanto, em t48h não eram evidenciadas alterações significativas nestes glóbulos brancos. Outras investigações demonstraram que, 24 horas após a colheita, à temperatura ambiente, há uma diminuição da percentagem de granulócitos [10,11,14–16].

Quanto aos linfócitos, às 24 horas verificou-se uma diminuição deste subtipo de leucócitos à TA e, a 4°C esta diminuição foi evidente logo 1 hora após a colheita. No estudo de Jaya et al., não foi manifestada nenhuma alteração significativa, quer à TA quer a 4°C, nestas células [3]. No entanto, na investigação de Schapkaitz et al., foi observada uma diminuição destes glóbulos brancos, 12 horas após a colheita, à TA e, a 4°C não foram detetadas alterações [8].

Relativamente aos monócitos, em t24h verificou-se uma diminuição deste subtipo de leucócitos à TA e, a 4°C esta diminuição foi evidente logo 1 hora após a colheita. Contrariamente, Schapkaitz et al., observaram um aumento significativo destas células à TA e a 4°C [8].

No caso dos eosinófilos, foi observado um aumento significativo da sua contagem 24 horas após a colheita, nas amostras armazenadas apenas a 4°C. Na investigação de Schapkaitz et al., foi verificado, da mesma forma, um aumento significativo destas células, mas em ambas as temperaturas. [8]. Embora, noutras investigações seja descrita uma diminuição da percentagem de granulócitos 24 horas após a colheita, os autores não distinguem quais os subtipos de granulócitos sofrem a referida diminuição [10,11,14–16].

Relativamente aos basófilos, na presente investigação, foi detetada uma diminuição significativa dos mesmos, a 4°C, 24 horas após a colheita. Mas, considerando os valores normais dos basófilos, a diminuição na sua contagem não traduz qualquer significado clínico. Contrariamente a este estudo, Schapkaitz et al., referem um aumento significativo destas células 24 horas após a colheita a 4°C [8].

As diferenças nas contagens dos subtipos de leucócitos, encontradas nos diferentes estudos podem estar relacionadas com o uso de diferentes contadores hematológicos, cuja diferenciação leucocitária pode utilizar diferentes colorações e metodologias.

Na análise da série vermelha, não se verificaram alterações significativas nos índices hematimétricos, à exceção do VCM, em que ocorreu uma diminuição do mesmo, nas duas temperaturas de estudo. Vários estudos demonstram o aumento significativo do VCM à temperatura ambiente, 24 horas após a colheita, o que é contraditório dos resultados da atual investigação. Além disso, estes autores reportaram ainda alterações significativas noutros parâmetros hematimétricos como, aumento do RDW e Hct e, diminuição da CHCM, que não se verificaram na investigação do momento. Nos mesmos trabalhos, a 4°C, não foram evidenciadas alterações significativas [3,17,18]. No estudo de Ramya D et al. [4] e Schapkaitz et al. [8], por exemplo, foi relatado o aumento do VCM à temperatura ambiente, contrariamente ao ocorrido no presente estudo. Ramya D et al. justificam este resultado devido às alterações morfológicas que ocorrem nos eritrócitos (acantócitos) [4]. Neste trabalho, embora também se tenham detetadas alterações na forma do eritrócito, o VCM diminuiu.

Quanto ao plaquetograma, detetou-se um aumento do VPM à TA e a 4°C, tendo esta alteração ocorrido 1 hora após a colheita e mantendo-se constante nos seguintes tempos estudados. Estudos prévios, indicaram um aumento do VPM à temperatura ambiente, 24 horas após a colheita [3,17,18].

Quanto à comparação dos parâmetros hematológicos, entre as duas temperaturas de estudo, observou-se que a diminuição da contagem de glóbulos brancos ocorreu mais prematuramente e mais drasticamente a 4°C, do que à temperatura ambiente. Contrariamente ao nosso estudo, Jaya et al., declaram que o armazenamento das amostras a 4°C apresenta melhor estabilidade em comparação com o armazenamento à temperatura ambiente. Os autores não obtiveram variações significativas entre as amostras mantidas nas diferentes temperaturas [3]. Outros trabalhos também relatam uma maior estabilidade na WBC quando refrigerados a 4°C [4,6,8]. No presente estudo não foi demonstrado qualquer favorecimento no armazenamento a 4°C na contagem de glóbulos brancos e nos seus subtipos. As diferenças de resultados que ocorreram entre o presente estudo e investigações prévias pode dever-se às diferentes metodologias estatísticas utilizadas, o que limita uma comparação precisa [8] e ao número de amostras estudadas. Além deste fator, o uso de diferentes contadores hematológicos e as condições do laboratório, podem ser fatores determinantes, que comprometem a comparação dos determinados parâmetros hematológicos [3].

Considerando as alterações morfológicas, ao longo dos tempos analisados (t1h, t2h, t4h, t6h, t8h, t12h, t24h e, t48h), foram observadas transformações progressivamente mais evidentes.

As alterações morfológicas começaram a manifestar-se simultaneamente nas séries branca e vermelha, a partir de t6h. Foram observados raros acantócitos, em ambas as temperaturas de estudo, os eritrócitos encontravam-se em rouleaux, quer à temperatura ambiente quer a 4°C e, verificou-se alguma hipergranulação nos leucócitos à temperatura ambiente. Em t12h, começaram a ser evidenciadas outro tipo de alterações morfológicas como, a hiposegmentação e vacuolização dos leucócitos, em ambas as temperaturas. A hipergranulação dos leucócitos passou a ser manifestada a 4°C. Em t24h, as alterações morfológicas observadas anteriormente mantiveram-se, no entanto, mostraram-se mais visíveis ao longo do tempo. Neste sentido, conseguiu-se observar um maior número de acantócitos, em ambas as temperaturas, assim como, se verificou um aumento da intensidade do *rouleaux*. Em t48h, observou-se um aumento bastante acentuado do número de acantócitos, quer à temperatura ambiente, quer a 4°C. No entanto, é de referir que, a presença de mais acantócitos, assim como, maior intensidade do *rouleaux*, no esfregaço de sangue periférico de amostras armazenadas à temperatura ambiente é mais notável, quando comparado ao esfregaço de sangue periférico de amostras armazenadas a 4°C. O aparecimento de acantócitos pode estar relacionado com o aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos [19].

O estudo de Jaya et al., está de acordo com esta investigação, uma vez que, nas lâminas de amostras que se mantiveram à temperatura ambiente, verificaram-se variadas alterações na morfologia das células sanguíneas como, o aparecimento de acantócitos, vacuolização nos leucócitos e hipergranulação dos neutrófilos. No entanto, não reportaram alterações morfológicas nos esfregaços de sangue periférico das amostras armazenadas a 4°C [3]. Também de acordo com o descrito, o estudo realizado à temperatura ambiente por Narasimha et al., indica que as alterações morfológicas se começam a manifestar 2 horas após a colheita, tornando-se mais evidentes 6 horas depois [19]. Na investigação de Majumdar et al., também o surgimento de acantócitos e a formação excessiva de *rouleaux* foram detetados. Neste caso, estas alterações foram também detetadas em amostras armazenadas a 4°C [6].

É importante salientar que, estudos realizados por outros autores que foram utilizados como base comparativa a este trabalho não incluíram tempos precoces de análise, tendo iniciado a mesma 24 horas após a colheita. Este facto poderá ter contribuído para as discrepâncias nos resultados obtidos, dado que, não foram avaliados tempos anteriores às 24 horas, nos quais, segundo o presente estudo se verificava haver alterações hematológicas, como por exemplo, a diminuição da WBC às 4 horas a 4°C.

Apesar dos resultados obtidos serem relevantes para a compreensão do efeito do tempo e da temperatura de armazenamento nos parâmetros hematológicos e na morfologia celular, este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. Em primeiro lugar, o número reduzido de participantes (n=6) limita a representatividade estatística dos dados bem como a sua generalização. Além disso, a amostra foi homogénea, composta apenas por indivíduos jovens e saudáveis, sendo que poderiam ser interpretados diferentes resultados no caso de indivíduos pertencentes a outras faixas etárias ou em indivíduos com patologias. No entanto, considerando que as mesmas amostras foram analisadas em diferentes tempos, estas são controlos delas próprias.

Com base nos resultados obtidos, pode-se constatar que o tempo limite para o processamento do hemograma à temperatura ambiente é até 8 horas após a colheita para a avaliação dos leucócitos e no imediato para os eritrócitos devido às alterações precoces no VCM. Mesmo com este estudo, é difícil estabelecer um tempo ideal para a análise de todos os parâmetros hematológicos, e apesar das diferenças obtidas entre os diferentes momentos de avaliação, é importante analisar os resultados considerando o que é clinicamente significativo. Este estudo também demonstra que o armazenamento a 4°C não favorece a preservação das células a curto prazo.

## Conclusão

O presente estudo demonstra que o tempo e a temperatura de armazenamento influenciam significativamente tanto os parâmetros hematológicos como a morfologia das células sanguíneas. Aqui mostrou-se, que os leucócitos são as células mais suscetíveis a alterações ao longo do tempo, especialmente quando as amostras são armazenadas a 4°C.

Do ponto de vista morfológico, as alterações celulares surgem progressivamente ao longo do tempo, manifestando-se, quer nas células brancas, quer nas células vermelhas, com maior evidência após as 6 horas de armazenamento. O aparecimento de determinadas alterações morfológicas como, surgimento de acantócitos ou *rouleaux* reforça a importância de uma rápida preparação do esfregaço de sangue periférico.

A análise dos dados obtidos permitiu concluir que a estabilidade das amostras de sangue venoso varia consoante o parâmetro avaliado e que o armazenamento a 4°C não garante, necessariamente, uma melhor preservação das células.

## Referências Bibliográficas

1. Lima-Oliveira G, Volanski W, Lippi G, Picheth G, Guidi GC. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. Vol. 77, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 153–63.
2. Valenstein PN, Sirota RL. Identification errors in pathology and laboratory medicine. Vol. 24, *Clinics in Laboratory Medicine*. 2004. p. 979–96.
3. Jaya A, Kakkar N, John Mj. Effect of Room Temperature and Refrigerated Storage on Automated Complete Blood Count. *CHRISMED Journal of Health and Research*. 2022 Jan;9(1):57–61.
4. Vijayambika J N, Ramya D S, V E. Effect of room temperature and refrigerated storage on automated hematological parameters. *Indian Journal of Pathology and Oncology*. 2020 Nov 28;7(4):625–30.
5. Tyrrell L, Rose G, Shukri A, Kahwash SB. Morphologic changes in red blood cells: An illustrated review of clinically important light microscopic findings. Vol. 43, *Malays J Pathol*. 2021.
6. Majumdar P, Thakurta G. Effect of Storage Time and Temperature on Hematological and Biochemical Parameters of Blood. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS)* e-ISSN [Internet]. 2019;18:10–5. Available from: [www.iosrjournals.org](http://www.iosrjournals.org)
7. Uyuklu M, Cengiz M, Ulker P, Hever T, Tripette J, Connes P, et al. Effects of storage duration and temperature of human blood on red cell deformability and aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;41(4):269–78.
8. Schapkaitz E, Pillay D. Prolonged storage-induced changes in haematology parameters referred for testing. *Afr J Lab Med*. 2015 May 13;4(1).
9. Turhan T, Sezer S. Effects of Storage Conditions on Complete Blood Cell Count Parameters [Internet]. Available from: <http://www.TurkJBiochem.com>
10. Wood BL, Andrews J, Miller S, Sabath DE. Refrigerated storage improves the stability of the complete blood cell count and automated differential. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1999 [cited 2025 Jun 13];112(5):687–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10549256/>
11. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2002

- [cited 2025 Jun 13];126(3):336–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11860310/>
12. Imeri F, Herklotz R, Risch L, Arbetsleitner C, Zerlauth M, Risch GM, et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2008 Nov [cited 2025 Jun 13];397(1–2):68–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18706900/>
  13. Hedberg P, Lehto T. Aging stability of complete blood count and white blood cell differential parameters analyzed by Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2025 Jun 13];31(1):87–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18190587/>
  14. De Baca ME, Gulati G, Kocher W, Schwarting R. Effects of Storage of Blood at Room Temperature on Hematologic Parameters Measured on Sysmex XE-2100. *Lab Med* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2025 Jun 14];37(1):28–36. Available from: <https://dx.doi.org/10.1309/1EERK1M02QFJRX6P>
  15. Survey of changes in complete blood count and red cell indices of whole blood incubated in vitro at different temperatures up to 48 hours - PubMed [Internet]. [cited 2025 Jun 14]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16773962/>
  16. Vogelaar SA, Posthuma D, Boomsma D, Kluft C. Blood sample stability at room temperature for counting red and white blood cells and platelets. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2025 Jun 14];39(3):123–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1537189102002987?via%3Dihub>
  17. Cornet E, Behier C, Troussard X. Guidance for storing blood samples in laboratories performing complete blood count with differential. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2012 [cited 2025 Jun 14];34(6):655–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22823600/>
  18. Gunawardena D, Jayaweera S, Madhubhashini G, Lokumarakkala DD, Senanayake SJ. Reliability of Parameters of Complete Blood Count With Different Storage Conditions. 2016;
  19. Narasimha A, Kumar H, B R Prasad CS. Anticoagulant induced artefacts in peripheral blood smears. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 24(2):43–8.

## Apêndices

### Apêndice A

#### Questionário para participação no estudo “Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento na morfologia das células sanguíneas e parâmetros hematológicos”

**Objetivo do estudo:** O objetivo deste estudo é avaliar a influência que o tempo e a temperatura têm na morfologia das células sanguíneas, assim como nos variados parâmetros hematológicos e, possivelmente estabelecer um critério relativamente ao tempo máximo de processamento analítico do hemograma e esfregaço de sangue periférico, na prática laboratorial.

ID numérico (a preencher pelo investigador): \_\_\_\_\_

#### 1. Dados Sociodemográficos

1.1. Idade: \_\_\_\_\_ anos

1.2. Sexo:

( ) Masculino

( ) Feminino

#### 2. Hábitos e Estilo de Vida

2.1. Possui um estilo de vida saudável?

( ) Sim

( ) Não

2.2. Frequência de consumo de bebidas alcoólicas?

( ) Nunca

( ) Raramente

( ) 1-2 vezes por semana

( ) Mais de 3 vezes por semana

2.3. Consome drogas?

( ) Sim

( ) Não

#### 3. Histórico de Saúde

3.1. Já foi diagnosticado com alguma destas condições?

( ) Doença hematológica

( ) Doença Hepática

( ) Doença Renal

( ) Outras: \_\_\_\_\_

3.2. Toma medicamentos regularmente?

( ) Sim

( ) Não

Se sim, quais? \_\_\_\_\_

## Apêndice B



### **CONSENTIMENTO INFORMADO ESCLARECIDO E LIVRE PARA INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA**

Este documento, designado Consentimento Informado Esclarecido e Livre, dado por escrito, contém informação importante em relação ao estudo para o qual foi abordado/a, bem como o que expectável acontecer, se decidir participar no mesmo. Leia atentamente toda a informação aqui contida. Deve sentir-se inteiramente livre para colocar qualquer questão, assim como para discutir com terceiros (amigos, familiares) a decisão da sua participação neste estudo.

Eu, Margarida Dias Mateus, estudante do 4ºano da licenciatura em Ciências Biomédicas Laboratoriais na Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias e, sob orientação da Prof. Dr. Marisa Barbeira e, sob co-orientação da Prof. Dr. Sílvia Martins, venho por este meio solicitar a sua participação no meu projeto de investigação para a conclusão da licenciatura, cujo tema é “Efeito do tempo e da temperatura de armazenamento na morfologia das células sanguíneas e parâmetros hematológicos”. Este estudo irá ser realizado no laboratório de hematologia da ESALD e, tem como objetivo perceber as alterações morfológicas que ocorrem nas células vermelhas, influenciadas pelo tempo e temperatura, após a colheita, assim como, o estudo de possíveis alterações em determinados parâmetros hematológicos.

Para a realização deste estudo, será necessário a recolha de uma amostra de sangue para dois tubos EDTA, sendo expectável que todo o processo da colheita dure, no máximo, 5 minutos, não apresentando qualquer custo. A participação neste projeto é voluntária, sendo que o participante pode decidir desistir e/ou não participar na investigação a qualquer momento, e sem qualquer tipo de consequência. No caso de desistência, o estatuto enquanto estudante será mantido e não sofrerá nenhuma consequência da não-participação ou desistência.

Como benefício a obter deste projeto de investigação, o participante voluntário receberá o resultado do hemograma que irá ser realizado.

Os possíveis riscos da sua participação são mínimos e incluem possível hematoma, ligeiro mal-estar e possibilidade de reações vasovagais à colheita. Estas situações poderão ser facilmente solucionadas com gelo ou um copo água com açúcar, dependendo da situação sendo, no entanto, desaconselhada a participação de indivíduos que já demonstraram maior desconforto ou mal-estar em colheitas sanguíneas prévias. Ainda que os riscos sejam mínimos e não se prevendo complicações durante ou após a participação, em caso de algum evento adverso os responsáveis serão todos os membros da equipa de investigação (Investigadora: Margarida Mateus; Orientadora: Marisa Barbeira e Co-orientadora: Sílvia Martins), não existindo seguro previsto para esta situação. Em caso de urgência deve contactar o seguinte número: 911942084.

Os dados obtidos vão ser confidenciais e mantidos sob anonimato durante todo o estudo. Foi pedida e obtida uma autorização da Comissão Nacional de Proteção de Dados e/ou do Encarregado de Proteção de Dados da Instituição que nos garante que o anonimato de todas as participantes e que os contactos foram realizados em ambiente de privacidade. Após o

Mod.IPCB.CE.05.02



Instituto Politécnico  
de Castelo Branco  
Comissão de Ética

final do estudo, os resultados serão divulgados na Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias como trabalho final de curso e os dados obtidos serão eliminados.

Em caso de alguma dúvida ou se tiver alguma questão, pode contactar a responsável pela investigação, Margarida Mateus, através do e-mail (margaridamateus492@gmail.com), ou através do contacto telefónico, 911942084. Este estudo foi validado e mereceu parecer favorável da Comissão de Ética.

O IPCB é o responsável pelo tratamento dos seus dados pessoais, recolhidos e tratados exclusivamente para as finalidades do estudo científico supra identificado, tendo como base legal o seu consentimento com base no art.º 9, n.º 2, alínea a) e o disposto Artº 6º, n.º 1, a) e ainda o cumprimento da missão do IPCB, no que à investigação científica diz respeito, enquadrado no Artº 6º, n.º 1, e) do RGPD.

A operação de tratamento de dados foi registada no IPCB com o nº 84/2024.

É possível a consulta, a retificação ou o apagamento dos seus dados pessoais, caso a metodologia de recolha utilizada no estudo o permita, contactando o investigador para o efeito. O IPCB tem um Encarregado de Proteção de Dados, contactável através do email protecaodados@ipcb.pt. Caso considere necessário tem ainda o direito de apresentar reclamação à autoridade de controlo competente – Comissão Nacional de Proteção de Dados.

### **ASSINATURA DO CONSENTIMENTO INFORMADO ESCLARECIDO E LIVRE PARA INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA**

Li (ou alguém leu para mim) o consentimento informado esclarecido e livre para investigação científica e estou consciente do que esperar quanto á minha participação no projeto ou estudo (Influência do tempo e da temperatura de armazenamento na morfologia das células vermelhas e/ou em parâmetros hematológicos) .Tive a oportunidade de colocar todas as questões e as respostas esclareceram todas as minhas dúvidas. Assim, aceito voluntariamente participar neste estudo. Foi-me dada uma cópia deste documento.

Consinto voluntariamente que os meus dados pessoais sejam tratados de acordo com as informações que me foram disponibilizadas anteriormente. Sim/Não

---

**Nome do participante**

---

**Assinatura do participante**

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
**Data**

---

**Nome do representante legal do participante (se aplicável)**

---

**Assinatura do representante legal do participante**

Mod.IPCB.CE.05.02



Instituto Politécnico  
de Castelo Branco  
Comissão de Ética

---

**Grau de relação com o participante**

—/—/—  
**Data**

**Investigador/Equipa de Investigação**

Os aspetos mais importantes deste estudo foram explicados ao participante ou ao seu representante, antes de solicitar a sua assinatura. Uma cópia deste documento ser-lhe-á fornecida.

**Margarida Mateus, 911942084**

---

**Nome e contacto da pessoa que obtém  
o consentimento**

---

**Assinatura da pessoa que obtém  
o consentimento**

—/—/—  
**Data**

## Anexos

### Anexo A



**PARECER N.º 202 CE-IPCB/2025**

### PARECER

<b>Título do projeto:</b>	Influência do tempo e da temperatura de armazenamento na morfologia das células vermelhas e/ou em parâmetros hematológicos
<b>Área científica:</b>	Ciências Biomédicas Laboratoriais
<b>Investigador principal</b>	Margarida Dias Mateus
<b>Equipe de investigação</b>	-
<b>Orientador</b>	Marisa Regina Reduto Santos Barbeira
<b>Co-Orientador</b>	Sílvia Raquel Monteiro Martins
<b>Local do estudo</b>	Laboratório de Hematologia da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias
<b>Tipo de estudo</b>	Clínico sem intervenção
<b>Submissão completa</b>	23/01/2025
<b>Reunião e/ou reuniões de avaliação</b>	N.º 3, 12/03/2025
<b>Relatores</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Alexandre José Marques Pereira</li> <li>- António Júlio Apóstolo Pereira Coutinho</li> </ul>

### RELATÓRIO

Elaborado nos termos do nº 7 do artigo 11º do [Reg.IPCB.CE.01.02 – Regulamento da Comissão de Ética do IPCB](#).

No decorrer da avaliação deste projeto, foram solicitados esclarecimentos à investigadora responsável, de modo a garantir a conformidade com os requisitos éticos exigidos. As respostas foram fornecidas atempadamente e de forma completa, o que contribuiu para uma análise mais detalhada e precisa do estudo. Dessa forma, consideramos que todos os aspetos relevantes foram devidamente esclarecidos, permitindo a emissão de um parecer positivo.

### DELIBERAÇÃO

**Parecer:** Positivo\*

\* Assim que o projeto esteja concluído, o investigador deverá enviar o estudo final para arquivo na pasta do projeto existente nesta Comissão.

**Data de deliberação em reunião n.º 3:** Castelo Branco, 12 de março de 2025

**Membros presentes:** Alexandre José Marques Pereira, António Júlio Apóstolo Pereira Coutinho (online), Arnandina Maria Abrantes de Loureiro, Eduardo Sabina dos Santos Valente, Isabel Maria de Sousa Lourenço, Maria João da Silva Guardado Moreira, Maria Luísa Faria de Sousa Cerqueira Correia Castilho, Maria Teresa Pita Pegado Gonçalves Rodrigues Coelho, Marta Filipa Gerales Falcão, Sara Margarida Araújo Ferreira.

**Relator**

Assinado por: **Alexandre José Marques Pereira**  
Num. de Identificação: 11268072  
Data: 2025.03.19 09:07:42+00'00'

**Relator**

Assinado por: **António Júlio Apóstolo Pereira  
Coutinho**  
Num. de Identificação: 04191777  
Data: 2025.03.20 09:52:37+00'00'



**Presidente da Comissão de Ética**

Assinado por: **ISABEL MARIA DE SOUSA  
LOURENÇO**  
Num. de Identificação: 04242187  
Data: 2025.03.24 17:58:33+00'00'

