



Universidade Federal do Pará
Instituto de Ciências Biológicas
Laboratório de Patologia Geral – Imunopatologia e Citologia

PROPOSTA DE PADRONIZAÇÃO DE UMA ESCALA COLORIMÉTRICA PARA ANÁLISE DO TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA.

Orientada: ALENE DE OLIVEIRA QUADROS

Orientador: Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior

Belém – Pará

2017

ALENE DE OLIVEIRA QUADROS

**PROPOSTA DE PADRONIZAÇÃO DE UMA ESCALA
COLORIMÉTRICA PARA ANÁLISE DO TESTE DE
FRAGILIDADE OSMÓTICA.**

Projeto de qualificação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção de grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior

Belém – Pará

2017

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
2.1. ESTRUTURA CELULAR DOS ERITRÓCITOS.....	6
2.2. ANEMIAS: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO.....	9
2.3. ANEMIAS HEMOLÍTICAS POR DEFEITOS DE MEMBRANA. DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO.....	10
2.4. USO CLÍNICO DO TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA.....	12
2.5. O TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA COMO PROCEDIMENTO TÉCNICO.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	15
4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	15
4.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	16
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO.....	16
4.5 TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA.....	16
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	18
5. BIBLIOGRAFIA.....	18

FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Modelo Mosaico Fluido da membrana celular.....	7
Figura 2: Mapa de liberação de Fragilidade Osmótica.....	18
Tabela 1: Alterações genéticas das proteínas da membrana celular e respectivas doenças.....	8
Tabela 2: Critérios de anemia segundo a OMS.....	9
Tabela 3: Diluição de amostra estoque de Cloreto de Sódio (NaCl).....	17

RESUMO

Anemias hemolíticas são entidades fisiopatológicas normalmente associadas a diminuição do tempo de vida das hemácias e que estão associadas a um aumento da destruição destas células de forma intra ou extra-vascular, processo hemolítico. Estas alterações frequentemente estão associadas a redução do tempo de vida das hemácias, e estão relacionadas a defeitos de caráter genético, fisiológico ou físico que interferem na constituição normal de membrana celular, citoesqueleto, enzimáticas ou de estrutura da hemoglobina, e conseqüentemente na integridade, flexibilidade, permeabilidade e/ou deformabilidade destas células causando, em última análise, a lise celular das mesmas. O Teste de Fragilidade Osmótica, embora de pouca precisão, ainda hoje, é muito utilizado principalmente para a triagem das anemias hemolíticas, uma vez que qualquer alteração na membrana dos eritrócitos, serve de ferramenta para auxiliar no diagnóstico destas. Através deste teste a fragilidade osmótica dos eritrócitos é testada e permite correlacionar a severidade da doença e grau de significância clínica da hemólise no paciente. Contudo, esta técnica apesar de ser simples e de baixo custo, tem como pontos negativos a baixa precisão, o tempo alto para a sua realização, o fato de ser estritamente manual e exigir operador praticamente exclusivo para a realização da mesma. Assim, visando auxiliar nesses pormenores da técnica, tornando o teste mais prático, rápido e eficiente, é que neste trabalho sugerimos a formulação de uma escala colorimétrica, previamente mensurada, para determinar os valores de fragilidade osmótica para cada tubo contendo solução de cloreto de sódio tamponada, sem a necessidade de posterior leitura da amostra em espectrofotômetro de luz.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as anemias são entidades patológicas avaliadas a partir da observação de concentração sanguínea de hemoglobina inferior ao valor esperado para as referências gênero e idade da população¹, além de outras situações particulares como gestação e lactação, e fatores ambientais, como em elevadas altitudes^{2,3}.

As anemias podem então ser classificadas como consequências de diversos fatores que vão desde dietas pobres em nutrientes fundamentais para a (1) produção e maturação de eritrócitos, como ferro; vitamina B12 e ácido fólico¹; (2) associada a fatores fisiológicos, como a gestação; lactação; menstruação, ou ainda (3) relacionadas a situações em que há má formação de eritrócitos³ ou aumento da sua destruição após reações antígeno anticorpo^{4,5}

Em especial as anemias hemolíticas, normalmente, têm caráter hereditário e, à exceção dos casos associados a defeitos enzimáticos ou de formação da hemoglobina, frequentemente estão associadas a deficiência qualitativa ou quantitativas de proteínas da membrana celular de ligação com o citoesqueleto⁶. Nestas condições a membrana eritrocitária torna-se mais rígida, menos flexível e com menor capacidade de deformabilidade, de tal modo, a torná-las frágeis a variações osmótica com ocorrência de lise eritrocitária⁷.

O Teste de Fragilidade Osmótica, embora de pouca precisão¹, ainda hoje, é muito utilizado principalmente para a triagem⁷ das anemias hemolíticas, uma vez que qualquer alteração na membrana dos eritrócitos, serve de ferramenta para auxiliar no diagnóstico destas. Através deste teste a fragilidade osmótica dos eritrócitos é testada e permite correlacionar a severidade da doença e grau de significância clínica da hemólise no paciente⁸.

Esta é uma técnica que apesar de ser simples e de baixo custo, na prática laboratorial tem se demonstrado muito dispendiosa de tempo, por ser estritamente manual e exigir um operador praticamente exclusivo, pelo menos por algum tempo, para a realização da mesma. E mesmo assim apresenta muitas variáveis que podem ir desde erros operacionais na diluição da solução de cloreto de sódio e suas várias diluições, até a transferência de amostras trocadas no momento da leitura no espectrofotômetro. Assim, visando auxiliar nesses pormenores da técnica, tornando o teste mais prático, rápido e eficiente, é que neste trabalho sugerimos a formulação de uma escala colorimétrica, previamente mensurada, para determinar os valores de fragilidade osmótica para cada tubo contendo solução de cloreto de sódio tamponada, sem a necessidade de posterior leitura da amostra em espectrofotômetro de luz.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. ESTRUTURA CELULAR DOS ERITRÓCITOS.

Os eritrócitos são as principais e mais abundantes células do tecido sanguíneo, e que tem como principal função o transporte de oxigênio (O₂) dos pulmões aos demais tecidos do corpo humano¹. São produzidos, eritropoiese, no tecido hematopoiético da medula óssea³, a qual nos adultos está presente em ossos chatos: crânio, vertebras, esterno, pelve, costelas e cabeça do fêmur².

Este processo de eritropoiese, porém acontece desde a primeira semana de vida do feto no saco vitelino e a partir do primeiro trimestre de gestação passando para o fígado e o baço, e por fim transferindo-se, no fim da gestação e pós-natal, para a medula óssea de ossos longos e chatos².

No adulto todo o processo de produção de hemácias ocorre em torno de 7 a 8 dias até o amadurecimento total dos eritrócitos que já na corrente sanguínea, passam a ter um tempo de vida de 120 dias^{5,9,10}, quando após este período perdem a sua funcionalidade são retiradas da circulação e destruído pelo reticulo endotelial pelo baço e fígado².

Em sua forma final os eritrócitos apresentam formado bicôncavo^{11,12}, fundamental para as trocas gasosas, visto a premente necessidade de aumento da superfície de contato das hemácias com as células endoteliais dos microcapilares para que ocorra a troca gasosa¹. E que é facilitada pelo fato dos eritrócitos possuírem diâmetro de 7 a 8 µm, e serem estruturas corpusculares formadas apenas por citoplasma, membrana celular e citoesqueleto, e não possuírem núcleo¹² ou qualquer outra organela intracitoplasmática em sua fase madura, como mitocôndrias e ribossomos¹. Sendo o seu citoplasma composto predominantemente por hemoglobina (95%) e enzimas², responsáveis pela produção energética e proteção contra estresse oxidativos¹.

Diante da formação estrutural dos eritrócitos torna-se importante entender um pouco mais sobre a membrana eritrocitária e citoesqueleto e seus constituintes. A membrana eritrocitária apresenta-se como um mosaico fluído¹³ formado por uma bicamada lipídica, com proteínas de diferentes tamanhos, formas e propriedades inseridas na bicamada^{1,9}. Sendo constituída por lipídeos (42%), proteínas (52%) e

carboidratos (7%)¹¹, e que tem como função definir o limite celular, manter a assimetria entre as concentrações de íons do meio extra e intracelular, permeabilidade seletiva aos solutos que entram e saem da célula, reconhecer moléculas¹¹, e juntamente com o citoesqueleto, conferir à célula flexibilidade e resistência¹⁴.

Como nas demais membranas celulares, nos eritrócitos, esta também é formada por uma bicamada lipídica¹ é constituída por fosfolipídios, esfingolipídios e esteroides¹³, que são colesterol não esterificado¹⁰, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline, fosfatidilserina e fosfolipídeos¹. Sendo a relação entre as moléculas de colesterol e fosfolipídios de fundamental importância para a permeabilidade e fluidez da membrana^{9,13}.

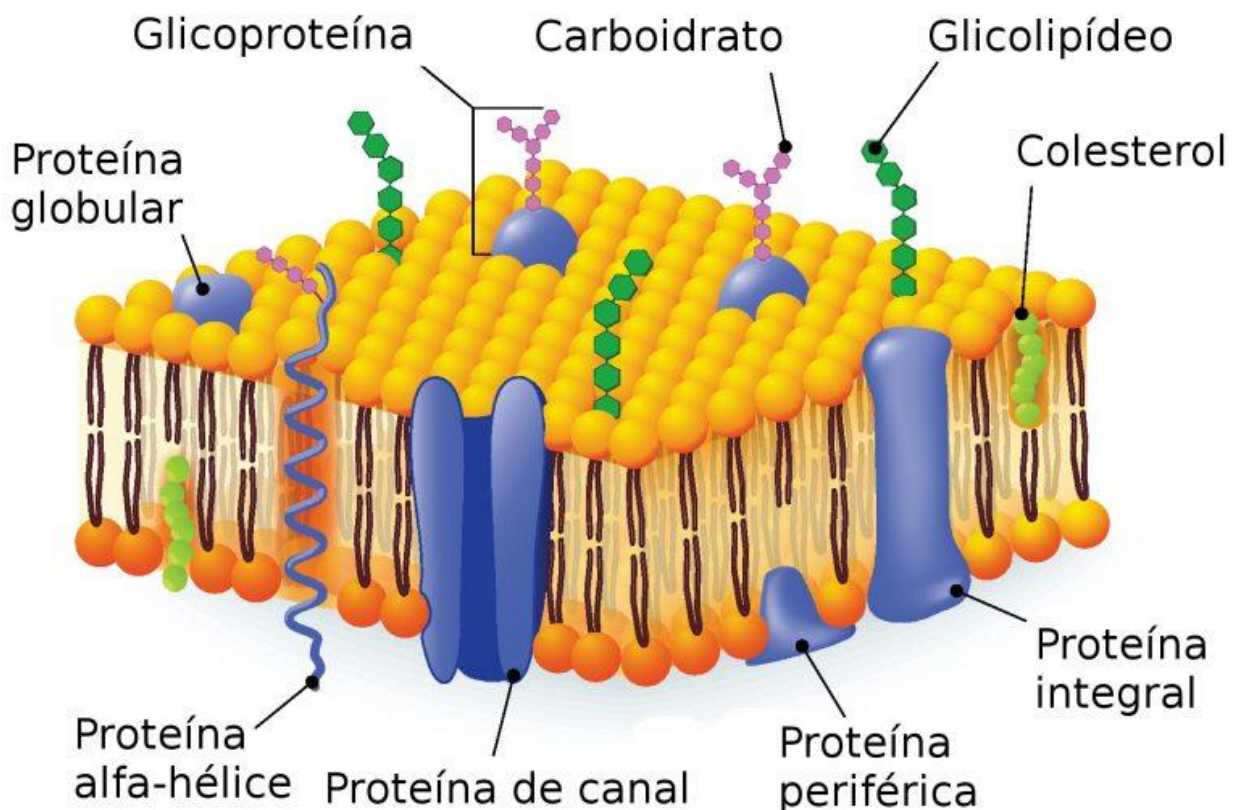


Figura 1: Modelo Mosaico Fluido da membrana celular, fonte: Designua/ Shutterstock.com

Ao longo da bicamada lipídica também encontramos proteínas inseridas, que podem ser tanto integrais, quanto periféricas^{11,13}. As integrais estão imersas na bicamada, atravessando a membrana completamente, apresentam movimento lateral ao longo da bicamada lipídica ou são imóveis¹⁰, como as proteínas internas que estão ligadas e constituem o citoesqueleto celular como as proteínas banda 3¹⁰, espectrina

alfa, espectrina beta, anquirinas, banda 4.1, banda 4.2, demantina, actina, aducina, banda 6¹¹ e banda 7¹. E ainda as proteínas de superfície como as glicoforinas A, B, C e D, que são receptores de membrana e antígeno, responsáveis pelo reconhecimento célula-célula, determinam o grupo sanguíneo ABO¹¹, evitam a adesão celular, por apresentarem grande eletronegatividade as células repelindo-as mutuamente¹.

As proteínas do citoesqueleto juntas são denominadas “complexo juncional”¹⁰, um complexo supramolecular formado por espectrina, actina¹¹, tropomodulinas, tropomiosina, banda4.1, banda 4.2, aducina, que tem por função conectar o citoesqueleto às proteínas da bicamada lipídica¹, a partir da formação de pontes entre o citoesqueleto e a bicamada lipídica, gerando uma verdadeira malha proteica que aumenta a interação entre espectrina e actina, que são as principais proteínas associadas ao citoesqueleto¹. Destas proteínas de citoesqueleto de eritrócitos a espectrina é a mais abundante e importante por conferir integridade, biconcavidade, flexibilidade e elasticidade a célula¹¹.

Em função da semi-permeabilidade da membrana celular dos eritrócitos para diferentes solutos e solventes¹³, defeitos na ultra-estrutura de membrana celular e citoesqueleto de eritrocitoblastos levam a formação de eritrócitos anormais¹⁰, com alterações especificamente em suas capacidades de permeabilidade seletiva, fluidez e resistência osmótica¹¹, o que leva por fim ao desenvolvimento de doenças hemolíticas como nas alterações observadas (TABELA 1) na esferocitose hereditária (HS), epilicose hereditária (HE), estomatocitose hereditária (HSt)¹⁰ e piropoiquilocitose hereditária (HPP)¹, e que cursam de modo geral com quadros de anemia, esplenomegalia e icterícia¹⁵.

Tabela 1: Alterações genéticas das proteínas da membrana celular e respectivas doenças.

Alterações genéticas nas proteínas	Doença característica
Anquirina	Esferocitose
α-Espectrina	Eliptocitose
β – Espectrina	Esferocitose, Eliptocitose (5% dos casos)
Banda 3	Esferocitose
Banda 4.1	Eliptocitose
Banda 4.2	Esferocitose
Glicoforina C	Eliptocitose rara

2.2. ANEMIAS: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO.

Segundo define a Organização Mundial da Saúde (OMS) anemias são entidades patológicas associadas a uma diminuição da concentração de hemoglobina no sangue¹⁶ de um indivíduo, dependente de diversos fatores (TABELA 2) como faixa etária, gênero, gestação e fatores ambientais (por exemplo, altitude), e que é resultado de um ou mais fatores associados a perda de sangue, aumento da destruição de eritrócitos⁴, aumento da demanda e/ou diminuição da produção de eritrócitos^{3,5}.

Tabela 2: Critérios de anemia segundo a OMS.

Idade/Sexo	Varição normal	Anêmico se Hb (g/dL) menor que
Nascido a termo	13,5 – 18,5	13,5
2 a 6 m de vida	9,5 – 13,5	9,5
6 a 12 anos	11,5 – 15,5	11,5
Homem adulto	13,0 – 17,0	13,0
Mulheres não grávidas	12,0 – 15,0	12,0
Grávidas – 1º trimestre	11,0 – 14,0	11,0
Grávidas – 2º trimestre	10,5 – 14,0	10,5
Grávidas – 3º Trimestre	11,0 – 14,0	11,0

Diante disto homens são considerados anêmicos quando apresentam concentração de hemoglobina inferiores a 13g/dL⁹; mulheres com hemoglobina inferior a 12g/dL⁹; crianças, adolescentes e gestantes que apresentem hemoglobina menor que 11g/dL²; e ainda crianças, menores que seis anos, que tenham concentração de hemoglobina menor que 10g/dL²⁸

Segundo a fisiopatologia das anemias estas foram classificadas em anemias carenciais, anemias hemolíticas e anemias por disfunção medular². Sendo as anemias carenciais decorrentes da deficiência de nutrientes essenciais em algumas etapas do processo de eritropoiese (eritropoietina), produção (deficiência de vitamina B12⁶ e ácido fólico¹⁶) e maturação dos eritrócitos (deficiência de ferro)^{6,16}, seja pela dieta nutricional carente, ou por alguma disfunção gastrointestinal que impeça a absorção de tais nutrientes².

Já as anemias hemolíticas normalmente decorrem da diminuição do tempo de vida das hemácias e estão associadas a um aumento da destruição destas células¹ de

forma intra ou extra-vascular⁵, processo hemolítico^{9,17}. Sejam estas alterações no tempo de vida das hemácias associadas a defeitos de caráter genético, fisiológico ou físico¹⁰ que interferem na constituição normal de membrana celular, citoesqueleto, enzimáticas ou de estrutura da hemoglobina¹, e conseqüentemente na integridade, flexibilidade, permeabilidade e/ou deformabilidade destas células causando, em última análise, a lise celular das mesmas².

As anemias por disfunção medular, por sua vez, ocorrem devido à insuficiência medular, hipoplasia ou aplasia da medula óssea, ou seja, redução ou ausência do tecido hematopoiético¹⁰, causada por defeito congênito (anemia de Fanconi); mielofibrose; infiltração de células neoplásicas ou anormais; quimioterapia¹⁷; radioterapia¹⁷; fármacos (antimaláricos, antirreumáticos, clorofênicos) e infecções virais, por vírus da Hepatite C e HIV, podem, em alguns casos, gerar uma hematopoese ineficaz devido à ausência de um processo de maturação eficiente².

2.3. ANEMIAS HEMOLÍTICAS POR DEFEITOS DE MEMBRANA. DEFINIÇÃO E DIAGNÓSTICO.

Como já comentado anteriormente alterações na ultra-estrutura da membrana eritrocitária¹⁶, proteínas ou lipídeos/colesterol, podem prejudicar a integridade e elasticidade dos eritrócitos resultando em redução do tempo de vida e na lise dos mesmos, gerando as chamadas anemias hemolíticas³, normalmente hereditárias¹.

Dentre estas anemias hemolíticas por defeitos de proteínas de membrana, a Esferocitose Hereditária é a mais comum^{1,18}. Esta anemia decorrente de alterações quantitativas e qualitativas¹⁹ nas proteínas de membrana que se ligam e interagem com o citoesqueleto celular²⁰, e que tem na deficiência de anquirina² a sua principal deficiência, porém, não a única, que acaba por interferir na estrutura arquitetônica dos eritrócitos fazendo com que os mesmos se apresentem em forma esférica^{19,21}.

A esferocitose hereditária como doença apresenta sintomatologia heterogênea¹⁰, desde casos assintomáticos, que as vezes são apenas diagnosticados em idosos por outras complicações da idade; a anemia leve^{16,21}, ou a casos graves com diagnóstico no primeiro ano de vida²¹ da criança e com os sintomas clínicos graves associados a fadiga, palidez cutânea-mucosa, icterícia²¹, esplenomegalia^{16,19} e cálculos biliar após longo período da doença².

Na análise do hemograma e esfregaço sanguíneo destes pacientes observa-se a presença de mais de 25% de esferócitos^{16,21} e hemácias policromáticas, com CHCM maior que 36%²², devido a presença de reticulócitos entre 5% a 15%⁶. No entanto, o diagnóstico desta doença ainda é realizado por testes de triagem como o Teste de Fragilidade Osmótica^{18,21}, na qual fica evidenciada a presença de células osmoticamente mais frágeis a variações de concentrados de cloreto de sódio (NaCl), mesmos em condições próximas ao nível isotônico (NaCl 0,9%)²³. Contudo, este teste é inespecífico e não diferencia os vários tipos de deficiência de proteínas do citoesqueleto dos eritrócitos¹⁶, e muito menos os tipos de esferocitose hereditária. Sendo assim necessários testes mais específicos, como a eletroforese de proteínas de citoesqueleto de eritrócitos¹⁸, e a análise do histórico familiar²¹ para finalizar o diagnóstico preciso do paciente.

A Eliptocitose hereditária é também um outro tipo de anemia hemolítica por deficiência de proteínas de citoesqueleto causada por uma série de deficiências genéticas, principalmente na produção da espectrina^{5,24}, de tal modo a diminuir a integridade do citoesqueleto eritrocitário^{9,25}. Também apresenta sintomatologia variada, desde anemia leve a moderada, hemoglobina entre 8g/dL a 10g/dL⁹, com hiperbilirrubemia, icterícia, esplenomegalia²⁴, até casos assintomáticos, normalmente em idosos⁹. No esfregaço sanguíneo observa-se grande quantidade de eliptócitos, mais de 30%⁹.

A Ovalocitose hereditária, por sua vez, também é uma anemia hemolítica genética mais rara, ocasionada por uma deleção do gene da proteína banda 3, que a faz ligar-se excessivamente e firme a anquirina²³, reduzindo a mobilidade celular e aumentando a rigidez dos eritrócitos². Tendo sido esta uma evolução adaptativa que torna as hemácias resistentes a infecções por *Plasmodium*^{10,20}. Nesta anemia os indivíduos são geralmente assintomáticos, com índices hematimétricos e hemoglobina normais ao hemograma¹⁰.

Já a Estomatocitose hereditária, outra forma de anemia hemolítica rara, causada por deficiência na proteína de banda 7.2, está associada ao desequilíbrio do fluxo de cátions trans-membrana¹⁰, aumentando a concentração de sódio e diminuindo a concentração de potássio no meio intracelular¹. Nos casos sintomáticos os pacientes

apresentam entre 10% a 30% de estomatócitos e esferócitos no esfregaço sanguíneo, VCM aumentado e CHCM baixo no hemograma².

Sendo que em todos os casos de anemias hemolíticas citados acima o Teste de Fragilidade Osmótica, embora de triagem laboratorial, tem pelo menos em parte, importância na investigação diagnóstica por mostrar que em muitas destas as alterações na membrana dos eritrócitos provocam fragilidade ou resistência eritrocítica em variação de concentrações de soluções de cloreto de sódio⁸.

2.4. USO CLÍNICO DO TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA

O teste de Fragilidade Osmótica (FO), também conhecida como Curva de Resistência Globular, Curva de Fragilidade Osmótica, Prova de Resistência Osmótica, Prova de Fragilidade Osmótica, Curva de Hemólise ou Resistência Osmótica das Hemácias¹⁶, como já mencionado, é um teste consolidado na prática médica²⁶ que auxilia, ainda que de forma pouco específica¹, no diagnóstico de doenças hemolíticas²⁷ que interferem na resistência globular dos eritrócitos¹³, como talassemias¹⁶, esferocitose hereditária^{12,15} entre outras doenças hemolíticas. Sendo mais indicado para o uso de diagnóstico em pacientes pediátricos⁷ e, embora no passado de forma mais frequente, também utilizado em bancos de sangue para investigar o efeito citotóxico de drogas²⁷ naturais e sintéticas²⁸ sobre as membranas dos eritrócitos em bolsas de concentrados de hemácias^{17,29}.

Através do teste de Fragilidade Osmótica é possível, indiretamente, identifica-se possíveis anormalidades na membrana dos eritrócitos^{7,8,28}, de modo a ser possível avaliar a capacidade de os eritrócitos incorporarem água em seu interior sem que haja ruptura da membrana celular^{13,16}.

Diante do fato de que a resistência globular depende da relação volume/superfície do eritrócito^{6,12,18}, alterações na membrana eritrocitária que interfiram na forma dos mesmos, como esferócitos e leptócitos, alteram a capacidade da célula em se adaptar as alterações osmóticas tornando-os mais permeáveis a entrada de água para o meio intracelular, causando o inchaço celular, tumefação, e subsequente lise celular²⁸.

Sendo este o princípio do teste de F.O. que se baseia em avaliar a capacidade dos eritrócitos resistirem a soluções hipotônicas crescentes e na determinação do seu

grau de fragilidade osmótica^{18,26}. Para tanto, hoje o teste de fragilidade osmótica é realizado tanto em amostra à fresco¹², que devem ser conservadas em temperatura ambiente até seis horas^{16,30}, quanto em amostra incubada a 37°C por vinte e quatro horas, nas quais procura-se detectar a menor presença de esferócitos possíveis na amostra, uma vez que a curva de F.O. de um paciente de amostra à fresco pode ser normal, mas a amostra a 37°C apresenta uma curva de fragilidade aumentada^{12,16,18}, uma vez que a incubação sensibiliza o teste, por expor as hemácias a um estresse metabólico que acentua os defeitos de membrana das mesmas¹³.

Como resultados do teste de fragilidade osmótica este pode apresentar-se aumentado quando as hemácias apresentam fragilidade osmótica, como na anemia esferocítica hereditária^{12,26}, anemia hemolítica não-esferocítica hereditária, anemia hemolítica adquirida, doença hemolítica do recém-nascido devido a incompatibilidade ABO, anemia hemolítica secundária em alguns casos de queimaduras graves, envenenamento químico¹⁶ e em linfomas malignos, leucemia²⁶, carcinoma, gestação, cirrose e infecção¹⁶. Enquanto que o teste de F.O. encontrasse diminuído quando os eritrócitos apresentam maior resistências a variação osmótica¹ como no início da infância, anemia ferropriva, talassemia⁶, anemia falciforme, doença hemolítica C homozigótica⁶, doença hepática, icterícia e leptocitose^{16,29}.

Apesar de não ser o teste-padrão ouro para o diagnóstico de doenças hemolíticas, por apresentar frequentemente resultados indeterminados e não ter padronização de cut-off para positividade¹⁶, sendo necessário teste complementares para o diagnóstico final das anemias hereditárias investigadas, como a esferocitose hereditária³¹, mesmo assim o teste de F.O. ainda hoje mostra-se eficaz, simples, barato e eficiente para triagem destes pacientes¹⁹.

2.5. O TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA COMO PROCEDIMENTO TÉCNICO.

O teste de Fragilidade Osmótica baseado na técnica de Porpart e colaboradores, 1947¹, que avalia qualitativamente e semiquantitativamente os eritrócitos lisados em diferentes concentrações de solução salina⁶, é uma técnica simples de ser realizada. E tem o fundamento da mesma baseado no grau de resistência celular de eritrócitos diante da diminuição gradual da concentração de Cloreto de Sódio²⁷ do meio externo. O teste consiste, assim, em mensurar a intensidade de luz transmitida através de uma

solução de hemoglobina²⁷, produzida por uma suspensão de eritrócitos lisados em meio hipotônico¹³, através de um espectrofotômetro medindo comprimentos de onda igual a 540nm^{15,28}.

A técnica baseia-se na obtenção de uma pequena amostra do sangue de 20µl que é diluída em vários tubos contendo soluções de cloreto de sódio (NaCl) tamponada, em tampão fosfato à pH 7,4, em concentrações de 0,90%; 0,80%; 0,75%; 0,65%; 0,60%; 0,55%; 0,50%; 0,45%; 0,40%; 0,35%; 0,30%, 0,20%; e 0,10%². Ficando a amostra, posteriormente, em repouso à temperatura ambiente por 20 a 30 minutos. Tempo necessário para que ocorra a reação esperada no teste, de modo que, nos tubos que contenham soluções de cloreto de sódio de baixa concentração osmótica de 0,50%, a água penetra nas células causando tumefação e imediatamente a este efeito ocorra a lise da membrana celular²⁸. O resultado de cada tubo é dado em porcentagem a partir do grau de hemólise obtido, por meio de cálculo específico utilizando as densidades ópticas das leituras em espectrofotômetro⁶ de luz com os filtros de 540λ²⁷. Os valores obtidos dos graus de hemólise são plotados em um gráfico para formar uma curva, que é comparada a uma curva-controle já previamente plotada no mesmo gráfico¹⁶.

O teste de Fragilidade Osmótica reflete assim a habilidade dos eritrócitos a absorverem água em meio hipotônico¹⁶. Já tendo sido identificados diversos fatores externos¹³ que influenciam nas propriedades osmóticas da membrana dos eritrócitos como: tensão de cisalhamento e hemólise mecânica¹⁹, temperatura, efeito do ultrassom, drogas²⁷ e irradiação²⁸, como os raios gamas usados em radioterapia para o câncer de mama, que causa diferentes efeitos biológicos na membrana do eritrócitos, devido a produção de radicais livres com peroxidação de lipídeos, hidrólise de fosfolipídeos e formação de pontes de disulfeto, que assim como alteram a membrana celular podem alterar o citoesqueleto levando a lise dos eritrócitos¹⁷.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Criar uma escala colorimétrica, previamente mensurada, para determinar os valores de fragilidade osmótica para cada tubo contendo solução de cloreto de sódio tamponada de modo a tornar o teste mais prático, rápido e eficiente, sem a necessidade de leitura das amostras em espectrofotômetro de luz.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Criar uma escala colorimétrica com valores de referência obtidos por espectrofotometria para as concentrações de hemólise em curva de fragilidade osmótica;
- ✓ Validar os resultados positivos com a escala colorimétrica;
- ✓ Analisar a viabilidade da aplicação da escala colorimétrica na rotina de um laboratório de referência;
- ✓ Comparar as amostras realizadas em à fresco e após incubação de 24h em banho-maria a 37°C.

4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. DESENHO EXPERIMENTAL.

Estruturado a partir da obtenção de 20 amostras de sangue periférico de pacientes encaminhados para realização de teste de Fragilidade Osmótica, independente de solicitação conjunta de hemograma. Quanto a faixa etária os pacientes deverão ser separados em três grupos: Grupo 1 (pacientes em faixa etária de ZERO a 20 anos), Grupo 2 (pacientes em faixa etária de 21 a 50 anos), Grupo 3 (pacientes em faixa etária de 51 a 80 anos).

4.2. AMOSTRAS BIOLÓGICAS.

Serão utilizadas 20 amostras de 5,0 ml de sangue periférico cada, coletadas em dois tubos de hemograma contendo heparina e seguindo o Procedimento Operacional

Padrão do Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo, no período de agosto e setembro de 2016, que tenham solicitação de teste de Fragilidade Osmótica como exame de rotina.

Para padronização da escala colorimétrica do teste de Fragilidade Osmótica e comparar a eficiência da técnica para amostras à fresco e após incubação de 24h em banho-maria a 37°C, um dos tubos contendo sangue periférico em heparina será utilizado para a realização do teste de forma imediata e a outra amostra será processada após incubação em banho-maria a 37°C por 24 horas.

4.3. ASPECTOS ÉTICOS.

O presente estudo não envolverá contato direto entre os pesquisadores e os sujeitos da pesquisa, visto que estes últimos estarão realizando exames de rotina para diagnóstico com a realização do Teste de Fragilidade Osmótica, sem a aplicação de nenhuma metodologia diferente as suas amostras ou mesmo intervenção ao paciente, não havendo assim a necessidade de submissão do referido projeto a um comitê de ética em pesquisa com seres humanos.

Ainda assim, para resguardar a integridade moral e identidade dos sujeitos desta pesquisa, os pesquisadores assinarão termo de compromisso junto a direção do referido laboratório dando fé de que serão resguardadas as identidades de todos os sujeitos da pesquisa. Ficando então os pesquisadores submetidos as leis vigentes do código civil Brasileiro.

4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E DE EXCLUSÃO.

Serão incluídos pacientes com idades entre ZERO e 80 anos, de ambos os gêneros, em investigação para anemias hemolíticas associadas a baixa resistência osmolar de eritrócitos. Serão excluídos pacientes portadores de outros tipos de anemias hemolíticas que não apresentem baixa resistência osmolar de eritrócitos.

4.5. TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA.

As soluções de uso de Cloreto de Sódio serão confeccionadas a partir de uma solução estoque de NaCl concentrada e tamponada, em tampão fostato à pH 7,4 da qual serão feitas diluições para a confecção das soluções de estoque em água

deionizada para a obtenção de soluções de uso em concentrações de 0,90%; 0,80%; 0,75%; 0,65%; 0,60%; 0,55%; 0,50%; 0,45%; 0,40%; 0,35%; 0,30%, 0,20%; 0,10%, seguindo as proporções conforme a tabela abaixo:

Tabela 3: Diluição de amostra estoque de Cloreto de Sódio (NaCl).

Solução	Solução estoque	Água	Concentração final
Solução 1	1,0 ml	100 ml	0,10%
Solução 2	2,0 ml	100 ml	0,20%
Solução 3	3,0 ml	100 ml	0,30%
Solução 4	3,5 ml	100 ml	0,35%
Solução 5	4,0 ml	100 ml	0,40%
Solução 6	4,5 ml	100 ml	0,45%
Solução 7	5,0 ml	100 ml	0,50%
Solução 8	5,5 ml	100 ml	0,55%
Solução 9	6,0 ml	100 ml	0,60%
Solução 10	6,5 ml	100 ml	0,65%
Solução 11	7,5 ml	100 ml	0,75%
Solução 12	8,0 ml	100 ml	0,80%
Solução 13	9,0 ml	100 ml	0,90%

Obs.: As soluções de uso serão preparadas em quantidades reduzidas ou aumentadas de acordo com a necessidade da rotina diária.

Para cada amostra de sangue periférico, tanto das amostras recém coletadas, como das amostras processadas 24h após incubação a 37°C em banho-maria, serão utilizados treze tubos de ensaio, identificados, e contendo cada um 5ml de solução de NaCl de uso de concentrações diferentes, seguido da adição de 20µl da amostra por tubo. Com posterior homogeneização dos mesmos e repouso por 30 minutos, para posterior centrifugação a 3.000rpm por 5 minutos.

Em seguida será realizado o registro fotográfico de cada tubo com câmera de 8.0 megapixels de aparelho celular marca Apple, para confecção da escala colorimétrica. Em seguida o sobrenadante de cada solução será transferido para uma cubeta de leitura em espectrofotômetro de luz, lido a 1 de sensibilidade, 100 de transmitância, 13 de absorbância e 540nm de comprimento de onda. A partir da os resultados serão transferidos para o mapa de liberação da Fragilidade Osmótica padrão do Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo com posterior plotagem dos gráficos pelo sistema Excel.

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA DR PAULO C. AZEVEDO LTDA
 CNPJ: 04.978.805/0001-65
 www.pazevedo.com.br

LABORATÓRIO Paulo C. Azevedo

MAPA DA FOSM

FOSM			FOSM		
PACIENTE:			PACIENTE:		
PEDIDO:		DATA:	PEDIDO:		DATA:
TUBOS	À FRESCO	EM 37° C	TUBOS	À FRESCO	EM 37° C
1			1		
2			2		
3			3		
4			4		
5			5		
6			6		
7			7		
8			8		
9			9		
10			10		
11			11		
12			12		
13			13		

DATA: ___/___/___

RESPONSÁVEL: _____

Matriz: Av. Braz de Aguiar, nº 99, Tel. (91) 4009-8899 Fax. (91) 3129-9404
 Emails: atendimento@pazevedo.com.br

FO-HEM-007
 VERSÃO: 2

Figura 2: Mapa de liberação de Fragilidade Osmótica

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os dados obtidos serão tabulados em planilha do software Bioestat 5.3 (Aires et al, 2007) para futura análise estatística, aonde se avaliará a média e desvio padrão de cada solução.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Santos VR, Estudo de exames laboratoriais para o diagnóstico e acompanhamento de esferocitose hereditária. Curitiba, 2015.
2. Laboratório de Hematologia: teorias, técnicas e atlas. 1ªed. Rio de Janeiro: Rubio; 2015. 280p. Melo MAW e Silveira CM.
3. O uso clínico do sangue na medicina, obstetrícia, pediatria e neonatologia, cirurgia e anestesia, traumas e queimaduras. Organização Mundial de Saúde, Genebra.
4. Hematologia prática de Dacie e Lewis. 9ªed. Porto Alegre: Artmed, 2006. Lewis SM, Bain BJ, Bates I.

5. Dhaliwai G, Cornett PA, Tierney LM Jr. Hemolytic Anemia. *American Family Physician*. 2004; 69(11): 2599-2606.
6. Penman BS, Gupta S, Weatherall DJ. Epistasis and the sensitivity of phenotypic screens for beta thalassaemias. *British Journal of haematology*. 2015; 169: 1117-128.
7. Ryall RG, *et al*. A microtechnique for measuring red cells osmotic fragility of infants. *Journal of Clinical Pathology*. 1978; 31: 878–882.
8. Madden JL, *et al*. Baseline red blood cell osmotic fragility does not predict the degree of post-LVAD hemolysis. *ASAIO Journal*. 2014; 60(5): 524-528.
9. Denadai R e Capellupi-Tófano VA. Eliptocitose hereditária diagnosticada em paciente idosa. Relato de caso. *Ver Bras Clin Med*. 2012; 10(5): 450–4.
10. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *British Journal of Haematology*. 2008; 141: 367-375.
11. Pinto WJ, *et al*. Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2013; 12(1): 106-120.
12. Seibert CS, *et al*. Red blood cell parameters and osmotic fragility curve of *Colossoma macropomum* (Pisces, Osteichthyes, Mileinae) in captivity. *Acta Scientiarum*. 2001; 23(2): 515-520.
13. Rodrigues HG, *et al*. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. *Biotema*. 2009; 22(1): 7-16.
14. Salmon C, Cartron JP, Rouger P. The human blood groups Part 1. New York: Masson Publishing; 1984. 44-53.
15. da Costa L, *et al*. Hereditary spherocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Reviews*. 2013; 27: 167-178.
16. Khoshbin AR, *et al*. The effect of radiotherapy and chemotherapy on osmotic fragility of red blood cells and plasma levels of malondialdehyde in patients with breast cancer. Elsevier. *Reports of practical oncology and radiotherapy*. 2015; 2: 305-308.
17. Caire AC e Gileno MC. Padronização e aplicação da curva de fragilidade osmótica auxílio diagnóstico de anemias. *Revista UNIARA*. 2012;15(2):49-58.
18. Park SH, *et al*. Comparison study of the Eosin-5´-Maleimide Binding Test, Flow Cytometric Osmotic Fragility Test, and Cryohemolysis Test in the Diagnosis of Hereditary Spherocytosis. *Am J Clin Pathol*. 2014; 142:474-484.
19. Matsuzaki Y, *et al*. Open heart surgery using a centrifugal pump a case of hereditary spherocytosis. *Journal of Cardio thoracic Surgery*. 2016; 11:138.
20. Mohanda N, *et al*. Molecular basis for membrane rigidity of hereditary ovalocytosis: A novel mechanism involving the Cytoplasmic Domain of Band 3. *Journal Clinical. Investiment*. 1992; 89: 686-692.
21. Reis DB, *et al*. Esferocitose hereditária no período neonatal: relato de caso e revisão de literatura. *Revista de Ciências Médicas*. 1996; 5(3): 119-123.
22. Hematologia do RN. 3ªed. São Paulo: Manole. 1984. 380p. Osby FA, Naiman JL.

23. Barcellini W, *et al.* Hereditary red cell membrane defects diagnostic and clinical aspects. *Blood Transfus.* 2011; 9: 274-277.
24. Figueiredo S, *et al.* Transient purê red blood cell aplasia as clinical presentation of congenital hemolytic anemia: a case report. *Cases Journal.* 2009; 2: 6814.
25. Bactor FN. Malaria and hereditary elliptocytosis. *American Journal of Hematology.* 2008; 83: 753.
26. Massaldi HA, Richieri GV, Mel HC. Osmotic Fragility Model For Red Cell Populations. *Biophys. J Biophysical Society.* 1988; 54:301-308.
27. Walski T, *et al.* Individual osmotic fragility distribution: A new parameter for determination of the osmotic properties of human blood cells. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International.* 2014; 2014. Disponível dx.doi.org/10.1155/2014/162102.
28. Maiworm AI, *et al.* Osmotic and morphologic effects on red blood cell membrane: action of na aqueous extract of *Lantana camara*. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2008; 18(1): 42-46.
29. Duate AE, *et al.* Polyphenoli compoposition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiadon echinus* (Ness & Mart.) Schauer. *Molecules.* 2016; 21(2). doi:10.3390/molecules21010002.
30. Pardini H. Atualização do manual de exames 2009. Disponível em: http://www.hermespardini.com.br/atual_manual/manual.php.
31. Manual de Técnicas Hematológicas, 1ªed. São Paulo: Atheneu; 2002. Vallada EP.