

# Doença dos Eritrócitos

Autor: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum

## Técnicas Laboratoriais Aplicadas aos Estudos dos Eritrócitos

Coloração de May-Grunwald-Giemsa .....	4
Reagentes.....	4
Pesquisa de Corpos de Heinz e Agregados de Hb H.....	5
Princípio.....	5
Equipamentos .....	5
Reagentes.....	5
Procedimento.....	6
Precauções .....	6
Coloração intra-eritrocitária de Hb Fetal .....	6
Princípio.....	6
Equipamentos .....	6
Reagentes.....	6
Procedimento.....	7
Interpretação .....	7
Teste de Falcização.....	7
Princípio.....	7
Equipamentos .....	7
Reagentes.....	7
Procedimento.....	8
Interpretação .....	8
Precauções .....	8
Dosagem de Hb Fetal .....	8
Princípio.....	8
Método de Singer.....	9
Equipamentos .....	9
Reagentes.....	9
Procedimento.....	9
Interpretação.....	10
Método de Betke.....	10
Equipamentos .....	10

Reagentes.....	10
Procedimento.....	10
Cálculo.....	11
Interpretação.....	11
Teste de Precipitação para Hemoglobinas Instáveis.....	11
Princípio.....	11
Teste de Desnaturação ao Calor .....	12
Equipamento .....	12
Reagentes.....	12
Procedimento.....	12
Controle.....	13
Interpretação.....	13
Precauções .....	13
Teste de Precipitação por Isopropanol .....	13
Equipamento .....	13
Reagentes.....	13
Procedimento.....	13
Interpretação.....	13
Precauções .....	14
Resistência osmótica em Solução de NaCl 0,36% .....	14
Princípio.....	14
Equipamento .....	14
Reagentes.....	14
Procedimento.....	15
Interpretação .....	15
Precaução.....	15
Curva de Fragilidade Osmótica .....	15
Princípio.....	15
Equipamento .....	15
Reagentes.....	15
Procedimento.....	16
Valores Referenciais.....	17
Eletroforese Qualitativa de Hemoglobinas em Acetato de Celulose pH 8,0 e 9,0.....	17
Princípio.....	17



Equipamento .....	18
Reagentes.....	18
Procedimento.....	18
Controle.....	19
Precauções .....	19
Dosagem de Hb A2 por Eletroforese em Acetato de Celulose pH 8,0 e 9,0 .....	20
Procedimento Específico.....	20

# TÉCNICAS LABORATORIAIS APLICADAS AOS ESTUDOS DOS ETRITRÓCITOS

---

## Coloração de May-Grunwald-Giemsa

### Reagentes

**1.a – Solução de May-Grunwald:** pesar 300 mg do corante (pó seco), dissolvê-lo com 100 ml de metanol, em banho-maria a 50-60°C. Agitar constantemente durante 1 a 2 horas. Deixar em repouso por 24 horas e, em seguida, filtrar.

### 1.b – Tampão fosfato pH 7.2

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2,7 \text{ g}$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow 11,3 \text{ g}$

$\text{H}_2\text{O q.s.p.} \rightarrow 1000 \text{ ml}$

**1.c – Solução de Giemsa:** pesar 1,0 g do corante e dissolvê-lo em 100 ml de metanol em banho-maria a 50-60°C. Agitar constantemente durante 1 a 2 horas. Deixar em repouso por 24 horas, e em seguida filtrar. Tomar 50 ml de filtrado e misturar com 200 ml do tampão fosfato. Esta é a solução trabalho de Giemsa.

### Procedimento

- Fazer o esfregaço sangüíneo em lâmina limpa e seca, e deixá-lo secar bem.
- Colocá-lo no suporte de lâmina e cobrí-lo com 3 ml da solução de May-Grunwald por 3 minutos.
- Após os 3 minutos, gotejar sobre o corante May-Granwald 5 gotas (200 ml) de tampão fosfato pH 7.2 ao longo do esfregaço, e aguardar por 1 minuto. Após completar o tempo, entornar a lâmina e desprezar o corante. Lavar rapidamente o esfregaço com 1 a 3 ml de água destilada.
- Colocar de volta o esfregaço no suporte e cobrí-lo com 3 ml de solução de trabalho de Giemsa por 7 minutos. Ao terminar o tempo de coloração, desprezar o corante e lavar cuidadosamente a lâmina com água destilada. Deixe secá-la.
- Analisar o esfregaço inicialmente com a objetiva 10x e depois, detalhadamente com a objetiva 100x (imersão).

## Pesquisa de Corpos de Heinz e Agregados de Hb H

### Princípio

Os corpos de Heinz são precipitados de polipeptídeos oriundos da desnaturação de hemoglobinas, e que se fixam junto à membrana dos eritrócitos. São encontrados em pacientes com hemoglobinas instáveis, e após ingestão, inalação, ou absorção dérmica de produtos químicos, por exemplo: cloratos, fenilhidrazinas e drogas oxidantes. Em pacientes portadores de hemoglobinas instáveis, e esplenectomizados, os corpos de Heinz apresentam-se grandes e grosseiros, enquanto naqueles não esplenectomizados essas precipitações mostram-se menores.

Os corpos de inclusões de Hb H (agregados de Hb H) são formados por cadeias polipeptídicas beta, oriundas da formação do tetrâmero  $\beta_4$ . Após coloração vital, esses corpúsculos apresentam-se dispostos homogeneamente no interior dos eritrócitos, como pequenos pontos azulados. Essas inclusões são facilmente diferenciadas dos reticulócitos.

Os corpos de Heinz e de Hb H somente são observáveis após coloração vital (aquosa). Entretanto, quando submetidos a corantes que usam álcool (Ramanowsky, Giemsa, Wright, etc.) esses corpúsculos desaparecem por dissolução.

### Equipamentos

- Microscópio com lentes de imersão
- Tubos de vidro 12 x 75 mm
- Lâminas
- Banho-maria a 37°C
- Pipetas Pasteur ou micropipetas de 20 ml

### Reagentes

a. *Solução azul crezil brilhante a 1%*

azul crezil brilhante 1,0 g

citrato de sódio 0,4 g

cloreto de sódio 0,8 g

água destilada q.s.p. 100 ml

b. *Solução violeta de metila (optativo)*

violeta de metila 0,5 g

NaCl 0,9% q.s.p. 100 ml

## Procedimento

- a. Colocar 100 ml de sangue em um tubo e adicionar 100 ml de azul crezil brilhante (ou violeta de metila).
- b. Incubar o material contido no tubo a 37°C por 30 minutos.
- c. Fazer esfregaços finos e examinar ao microscópio com objetiva de imersão.

## Precauções

- a. Utilizar um controle normal.
- b. Usar sangue fresco, com anticoagulante (EDTA, ACD e heparina são recomendados). O excesso de EDTA causa dificuldade na coloração.
- c. Checar a temperatura de 37°C do banho-maria.
- d. Confirmar o diagnóstico de uma hemoglobina instável, realizando os seguintes testes adicionais: desnaturação ao calor e ao isopropanol, eletroforese de hemoglobina, eritrograma e análise da morfologia eritrocitária.
- e. Confirmar a presença de Hb H, geralmente sugestivo de talassemia alfa, realizando eletroforese de hemoglobina com tampão TEB pH 8,0-9,0; o hemolizado deve ter feito preferencialmente com saponina a 1%. Realizar também o eritrograma e análise da morfologia eritrocitária.

## Coloração intra-eritrocitária de Hb Fetal

### Princípio

Esse método é baseado na diferença que existe na capacidade de dissociação das subunidades entre Hb A e Hb Fetal, em pH abaixo de 4,0. A Hb Fetal é ácido-resistente e por isso não é eluída das células, corando-se facilmente com eritrosina ou similar, enquanto que outros tipos de hemoglobinas por serem eluídas não fixam o corante.

### Equipamentos

- microscópio
- pHmetro
- vasilha-suporte de lâmina
- lâminas
- banho-maria a 37°C

### Reagentes

- a. *Tampão citrato-fosfato pH 3,3*

ácido cítrico 0,1M 100 ml

fosfato di-sódico hidratado 0,1M 30 ml

- b. *Solução aquosa de eritrosina a 0,1%*

c. *Solução de etanol a 80%*

## Procedimento

Fazer esfregaços finos, obtidos de sangue sem anticoagulante, e fixá-los com etanol a 80% por 5 minutos. Lavar, a seguir, com água corrente e secar ao ar.

Introduzir os esfregaços em vasilha-suporte de lâminas contendo tampão citrato-fosfato pH 3,3 previamente aquecido a 37°C por 5 minutos. Lavar com água corrente e secar ao ar. Corar com eritrosina por 2 minutos. Lavar com água e examinar em microscópio com aumento de 400x.

## Interpretação

Os eritrócitos contendo Hb Fetal aparecem corados internamente enquanto que os outros que não a contêm permanecem sem coloração interna.

A coloração é homogênea quando todos os eritrócitos aparecem uniformemente corados e podem ser encontrados em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos, e de portadores de persistência hereditária de Hb Fetal.

A coloração é heterogênea quando existem duas populações eritrocitárias distintas, ou seja, uma corada e outra sem coloração, e esses são os casos principalmente das diferentes formas de beta talassemias maior – com exceção dos portadores de genótipo talassêmico  $\beta^{\circ}\delta/\beta^{\circ}\delta$ .

## Teste de Falcização

### Princípio

Sob baixa tensão de oxigênio, os eritrócitos contendo hemoglobina S tomam a forma característica de foice, ou de meia-lua. O metabisulfito de sódio reduz a tensão de oxigênio. Assim, quando uma solução de metabisulfito é adicionada ao sangue total, e esta mistura é vedada entre lâmina e lamínula por meio de esmalte, os eritrócitos contendo Hb S se deformam, após algumas horas de repouso.

### Equipamentos

- microscópio
- lâminas de microscopia e lamínulas
- pipetas Pasteur
- placas de Petri
- esmalte para colorir unhas

### Reagentes

- a. *Solução de metabisulfito de sódio a 2%*

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  200 mg

água destilada q.s.p. 10 mg

b. *Esmalte*

## Procedimento

- Diluir em um tubo de hemólise 100 ml do sangue em estudo com 200 ml de solução fisiológica (NaCl 0,8%).
- Misturar na lâmina de microscopia 10 ml do sangue diluído e 10 ml de metabisulfito de sódio a 2%.
- Cobrir a preparação com lamínula e vedar os quatro lados com esmalte. Conservar a preparação em câmara úmida (placas de Petri com algodão embebido com água).
- Examinar em microscópio com objetiva 40x após 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas.

## Interpretação

O fenômeno da falcização (teste positivo) ocorre em portadores de Hb S, com variação de tempo entre os diferentes tipos: Hb SS (1 a 3 horas); Hb SC e Hb SD (6 a 12 horas); Hb S/talassemia beta (12 a 24 horas); Hb AS (12 a 24 horas). Entretanto, essa relação falcização/genótipo/tempo não é constante, e também não serve para caracterizar o genótipo. Após 24 horas, na ausência de eritrócitos falcizados, o resultado será dado como negativo.

## Precauções

- O metabisulfito deve estar dentro do prazo de validade e preparados momentos antes de ser utilizado.
- A câmara úmida deve ser colocada em lugar fresco, à temperatura ambiente.
- A vedação lâmina-lamínula com esmalte é fundamental.
- A concentração do metabisulfito, bem como sua preparação no momento de uso são pontos críticos.
- Hb Fetal aumentada, em associação com Hb S, prejudica a falcização.

## Dosagem de Hb Fetal

### Princípio

A Hb Fetal é mais resistente à desnaturação por soluções fortemente alcalinas que outros tipos de hemoglobinas. O teste é realizado adicionando uma determinada quantidade de solução alcalina em uma concentração conhecida de hemolisado. Após um tempo específico, a desnaturação é bloqueada por adição de sulfato de amônio saturado, ou parcialmente saturado. O sulfato de amônio diminui o pH e precipita a hemoglobina desnaturada. Após a filtração, a quantidade de hemoglobina alterada é avaliada e expressa como hemoglobina alcali-resistente (ou Hb Fetal) em valores percentuais. Apresentaremos duas técnicas de quantificação de Hb Fetal:



- a. método de Singer, usado para altas concentrações de Hb Fetal;
- b. método de Betke, usado para baixas concentrações de Hb Fetal.

## Método de Singer

### Equipamentos

- espectrofotômetro
- pipetas de 5 ml
- micro-pipetas de 20 a 100 ml, ou equivalente
- cronômetro
- papel de filtro (Whatman n° 44, S&S ou equivalente)
- tubos de vidro 13 x 100 mm
- funis pequenos (3 a 4 cm de diâmetro)
- banho-maria a  $\pm 20^{\circ}\text{C}$

### Reagentes

- a. *Solução de NaOH N/12 (3,3 g/l litro de água destilada)*
- b. *Solução saturada de sulfato de amônio*

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  500 g

água destilada 500 ml

Preparação do sulfato de amônio parcialmente saturado: remover 400 ml do sobrenadante da solução acima, colocando-o em um becker, e adicionar 400 ml de água destilada e 2 ml de HCl 10 N (80,6 ml de HCl + 19,4 ml de água destilada).

### Procedimento

- a. Pipetar 1,6 ml de NaOH N/12 em um tubo de 13 x 100 mm, identificando-o como "Hb Fetal".
- b. Tomar outro tubo 13 x 100 mm, identificando-o como "Hb Total", e pipetar inicialmente 5 ml de água destilada e depois 20 ml de solução de hemoglobina. Homogeneizar a solução por inversão.
- c. No tubo rotulado "Hb Fetal", adicionar 100 ml da solução de hemoglobina, e ao mesmo tempo acionar o cronômetro. Agitar cuidadosamente o tubo por 10 a 15 segundos. Exatamente após 60 segundos, adicionar 3,4 ml de sulfato de amônio parcialmente saturado. Homogeneizar a solução por inversão.
- d. Deixar por 30 minutos em repouso e filtrar, a seguir, a solução do tubo "Hb Fetal" em duplo papel de filtro.
- e. Ler as densidades ópticas (DO) das soluções dos tubos "Hb Fetal" e Hb Total" em 540 nm.
- f. Cálculo:

$$\% \text{ Hb Fetal} = \frac{DO \text{ HbFetal}}{DO \text{ HbTotal}} \times 0,203 \times 100$$

Desde que a diluição do tubo "Hb Fetal" apresenta a proporção volume da solução de Hb/volume total no valor 1:51, e que a diluição do tubo "Hb Total" seja 1:251 resulta o valor de 0,203.

## Interpretação

Os resultados com valores de hemoglobina alcali-resistente menores que 3% são considerados normais. Concentrações acima de 4% são indicativas da presença de significativa quantidade de Hb Fetal. Em sangue de cordão umbilical, é possível obter níveis de 60 a 90% de hemoglobina alcalina resistente. Aproximadamente metade dos pacientes com talassemia beta menor apresenta Hb Fetal variável entre 2 a 5%. Nos pacientes com talassemia beta maior, a concentração de Hb Fetal é alta: 20 a 90%. Quando se obtém aumento de hemoglobina alcali-resistente acima de 10% em pacientes sem nenhuma outra alteração hematológica aparente, deve suspeitar-se da presença de persistência hereditária de hemoglobina Fetal (PHHF).

## Método de Betke

### Equipamentos

- espectrofotômetro
- pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml
- cronômetro
- papel de filtro (Whatman nº 1, S&S, Toyo)
- tubos 17 x 100 mm
- funis pequenos – 3 e 4 cm de diâmetro

### Reagentes

a. *Solução de Drabkin (cianeto)*

$K_3Fe$  200 mg

KCN 200 mg

água destilada q.s.p. 1 litro

b. *NaOH 1,2 N*

NaOH 48 g

água destilada q.s.p. 1 litro

c. *Solução saturada de sulfato de amônio*

$(NH_4)_2SO_4$  500 g

água destilada 500 ml

### Procedimento

- a. Diluir 0,6 ml da solução de hemoglobina em um tubo contendo 10 ml da solução de Drabkin. Homogeneizar por inversão.

- b. Colocar 5,6 ml da solução de hemoglobina diluída em um tubo rotulado "Hb Fetal". Adicionar 0,4 ml da solução de NaOH 1,2 N e acionar o cronômetro. Agitar cuidadosamente por 10 segundos.
- c. Ao final de 2 minutos exatos, adicionar 4 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Homogeneizar por inversão e deixar em repouso por 5 a 10 minutos, no máximo.
- d. Filtrar o conteúdo do tubo "Hb Fetal" em duplo papel de filtro.
- e. Preparar a solução padrão colocando em um tubo de ensaio 1,4 ml da solução de hemoglobina diluída no item 1, 0,1 ml de água destilada e 1 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Transferir 1 ml dessa solução para outro tubo e juntar 9 ml de solução de Drabkin. A solução padrão é dez vezes mais diluída que a solução de hemoglobina alcali-resistente ou "Hb Fetal".
- f. Ler a densidade óptica (DO) do tubo "Hb Fetal" e do padrão em 540 nm, contra um branco de solução de Drabkin.

### Cálculo

$$\% \text{ Hb Fetal} = \frac{DO \text{ HbFetal}}{DO \text{ padrão}} \times 100$$

### Interpretação

Adultos normais: 0,0 a 2,0% de Hb Fetal.

Essa técnica é recomendada quando os níveis de Hb Fetal estão baixos (< 4%). Para estes valores o método de Singer não é recomendado.

## Teste de Precipitação para Hemoglobinas Instáveis

### Princípio

As cadeias da hemoglobina (e o tetrâmero) são estruturas altamente estáveis, e dependem da força coletiva de quatro fatores:

- a. um grande conteúdo helicóide que constitui 75% da estrutura de cada cadeia polipeptídica;
- b. o firme ligamento entre o grupo heme e o polipeptídeo (globina);
- c. a localização interna de aminoácidos não-polares e hidrofóbicos, que mantém o "pacote" de proteção ao grupo heme;
- d. os contatos  $\alpha^1\beta^1$  que estabilizam a integração entre as cadeias alfa e beta.

A diminuição da estabilidade da hemoglobina pode ser resultante da alteração de qualquer um dos quatro fatores, geralmente sensíveis quando expostos ao calor.

Em um tampão apropriado, a hemoglobina normal é dificilmente precipitada quando submetida à determinada temperatura (50°C a 60°C), por um certo tempo de exposição sob as mesmas condições, as hemoglobinas instáveis se desnaturam e se precipitam.

Apresentaremos dois testes específicos para detectar hemoglobinas instáveis: a) desnaturação ao calor e b) precipitação por isopropanol.

## Teste de Desnaturação ao Calor

### Equipamento

- tubos de vidro 17 x 100 mm e 12 x 75 mm
- pipetas de 5 ml
- centrífuga
- banho-maria: 50°C a 60°C
- pHmetro
- balão volumétrico de 100 ml

### Reagentes

- a. *Solução de fosfato monobásico de sódio 0,1 M*

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  13,8 g

água destilada q.s.p. 1 litro

- b. *Solução de hidrogeno-fosfato de di-sódio 0,1 M*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anidro) 14,2 g

água destilada q.s.p. 1 litro

- c. *Solução tampão fosfato pH 7,4*

solução de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,1 M 19,2 ml

solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M 80,8 ml

- d. *NaCl 0,8%*

### Procedimento

- Em um tubo de hemólise colocar 1 ml de sangue fresco, coletado com anticoagulante. Centrifugar a 1.500 rpm e desprezar o plasma. Lavar os eritrócitos com NaCl 0,85% por duas vezes. Hemolisar os eritrócitos com 5 ml de água destilada. Homogeneizar por seis vezes.
- Transferir o hemolisado para um tubo maior, e adicionar 5 ml do tampão fosfato (pH 7,4). Homogeneizar por seis vezes e centrifugar por 10 minutos a 1.500 rpm.
- Transferir 2 ml do sobrenadante para outro tubo e incubá-lo a 50°C em banho-maria por uma hora, ou a 60°C por trinta minutos.
- Observar se houve precipitação.

### Controle

É fundamental o uso de uma amostra controle, obtida nas mesmas condições da amostra teste.

### Interpretação

Em sangue com hemoglobinas normais, é possível que ocorra discreto grau de precipitação. O resultado é positivo quando a precipitação é floculenta e em grande quantidade.

### Precauções

- As amostras a serem analisadas não devem exceder 72 horas após a coleta.
- O diagnóstico da Hb instável deve ser confirmado por outros testes específicos: corpos de Heinz, eletroforese de hemoglobina, dosagem de metahemoglobina.
- A temperatura e o pH 7,4 do tampão são pontos críticos nesse teste.

## Teste de Precipitação por Isopropanol

### Equipamento

- tubo de vidro 17 x 75 mm e rolha
- pipeta de 5 ml
- micropipeta de 100 µl
- banho-maria 37°C
- centrífuga
- pHmetro

### Reagentes

- Solução tampão Tris/isopropanol pH 7,4*

Tris-hidroximetil-aminometano	12,11 g
isopropanol puro	170 ml
água destilada q.s.p	1 litro

ajustar o pH 7,4 com HCl concentrado.

### Procedimento

- Colocar 100 ml de sangue + 100 ml de saponina a 1% em um tubo de hemólise. Agitar moderadamente até que se processe a hemólise.
- Adicionar ao hemolisado, 2 ml de tampão Tris/isopropanol previamente equilibrado a 37°C. Agitar moderadamente ou homogeneizar por inversão, e incubar essa solução por uma hora a 37°C.
- Observar, a cada 10 minutos, se houve precipitação.

### Interpretação

A presença de Hb instável causa floculação nos primeiros 10 minutos, seguida de precipitação.

### Precauções

- As hemoglobinas normais permanecem estáveis durante todo o processo. Entretanto, pode ocorrer discreta precipitação em alguns casos, após 30 a 45 minutos. A Hb S é mais instável que a Hb A. A Hb A<sub>2</sub> é a hemoglobina mais estável entre as hemoglobinas humanas.
- É necessário o uso de uma amostra controle, obtida nas mesmas condições que o teste.
- A temperatura de 37°C, o pH 7,4 do tampão e a concentração de isopropanol são pontos críticos neste teste.
- O diagnóstico de Hb instável deve ser confirmado por outros testes específicos: corpos de Heinz, eletroforese de hemoglobina, dosagem de metahemoglobina.

## Resistência osmótica em Solução de NaCl 0,36%

### Princípio

Os eritrócitos de pacientes portadores de talassemia beta, homozigoto e heterozigoto, apresentam maior resistência globular em solução de cloreto de sódio 0,36%, quando comparados com eritrócitos de pessoas sem essa forma de anemia. Esse teste é positivo para 97% dos portadores de talassemia beta, porém nem todos que apresentam maior resistência globular em solução NaCl 0,36% são talassêmicos. A anemia ferropriva também pode apresentar positividade nessa concentração, o mesmo ocorrendo com a Hb C.

### Equipamento

- tubo 12 x 75 mm
- micropipeta de 10 ml
- pipeta de 5 ml

### Reagentes

- Solução estoque de cloreto de sódio tamponada a 10%\**

NaCl	90,00 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13,65 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2,82 g

água destilada q.s.p. 1 litro

Para obter a solução de NaCl 0,36%, diluir 36 ml da solução estoque em q.s.p. 1 litro destilada.

\* osmoticamente equivalente a 10%

## Procedimento

Colocar 1,5 ml de solução de NaCl 0,36% em tubo de hemólise e adicionar 10 ml de sangue fresco. Homogeneizar por inversão, e deixar em repouso por 5 minutos. Fazer a leitura visual.

## Interpretação

A leitura é realizada verificando se a solução está transparente (eritrócitos hemolisados), ou turva (eritrócitos resistentes). Para melhor constatação, coloca-se por trás do tubo, distante a 2 cm, uma folha traçada com três linhas pretas bem visíveis. O resultado é positivo quando, nas condições acima sugeridas, **não se vê** os traços.

As amostras positivas podem indicar talassemia beta menor, necessitando, entretanto, para comprovação, testes adicionais: eritrograma, dosagem de Hb A<sub>2</sub>, e análise da morfologia eritrocitária.

## Precaução

1. A solução de cloreto de sódio 0,36% deve ser preferencialmente tamponada.
2. Os resultados em que as linhas **são visualizadas** com dificuldade devem ser considerados negativos.

## Curva de Fragilidade Osmótica

### Princípio

Os eritrócitos de pessoas portadoras de esferocitose são mais frágeis que os eritrócitos normais em soluções com concentrações diferenciadas de NaCl (0,1%, 0,2% ... a 0,9%). A hemólise dos eritrócitos é avaliada porcentualmente e comparada com o padrão de normalidade.

### Equipamento

- tubo 12 x 75 mm
- micropipeta de 50 ml
- pipeta de 5 ml
- espectrofotômetro ou fotocolorímetro
- papel milimetrado

### Reagentes

- a. *Solução estoque de NaCl osmoticamente equivalente a 10%*

NaCl 9,0 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,3 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,3 g

$\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 100 ml

b. *Solução trabalho de NaCl 0,1% a 0,9%*

NaCl (%)	Solução Estoque (ml)	H <sub>2</sub> O destilada (ml)
0,1	1	99
0,2	2	98
0,3	3	97
0,4	4	96
0,5	5	95
0,6	6	94
0,7	7	93
0,8	8	92
0,9	9	91

Obs.: as soluções estoque e trabalho podem ser conservadas em refrigeração a 4°C por 6 meses.

## Procedimento

- Identificar em cada tubo de hemólise a concentração da solução de NaCl que o mesmo receberá (0,1%, 0,2% ... 0,9%).
- Colocar em cada tubo 5 ml da respectiva solução trabalho de NaCl.
- Adicionar em cada tubo **exatamente** 50 ml de sangue total coletado com heparina (preferencialmente) ou EDTA-K3. Homogeneizar suavemente por inversão até completa mistura do sangue na solução.
- Deixar em repouso por 25 a 30 minutos. Centrifugar todos os tubos por 5 minutos a 2.000 rpm.
- Retirar o sobrenadante com pipeta Pasteur de cada tubo, transferindo-o para outro previamente identificado.
- Fazer a leitura da densidade óptica (DO) de cada tubo em comprimento de onda 415 nm, ou filtro verde. Usar o sobrenadante da solução NaCl 0,9% como **branco**.
- A densidade óptica do tubo NaCl 0,1% representará 100% de hemólise, e desse valor serão calculados por regra de três simples todos os outros valores. Ex.:

D.O. NaCl 0,1% -----100% de lise

D.O. NaCl 0,2% ----- x

$x = \% \text{ de lise de NaCl a } 0,2\%$



## Valores Referenciais

% NaCl	% Hemólise Normal	% Hemólise na Esferocitose(*)
0,1	100	100
0,2	100	100
0,3	90-100	100
0,4	50-90	90-100
0,5	0-10	20-50
0,6	0	5-10
0,7	0	0
0,8	0	0
0,9	0	0

(\*) há grandes variações entre os diferentes casos de esferocitoses. A representação numérica é o intervalo de confiança (75%) de um grupo de análises realizadas em nosso laboratório.

## Eletroforese Qualitativa de Hemoglobinas em Acetato de Celulose pH 8,0 e 9,0

### Princípio

Em pH 8,0-9,0 a hemoglobina é uma proteína carregada negativamente, migrando em direção ao pólo positivo (anodo). Esse método identifica as hemoglobinas normais e grande parte das variantes. As diferentes mobilidades verificadas entre as diversas hemoglobinas com defeitos estruturais se devem às alterações de cargas elétricas, causadas por substituições de aminoácidos de diferentes pontos isoelétricos (pI). As hemoglobinas variantes, oriundas de mutações que não envolvem alterações de cargas elétricas, geralmente apresentam mobilidade eletroforética semelhante à da Hb A; nesse grupo situa-se a maioria das hemoglobinas instáveis. A **figura 1** mostra a mobilidade relativa em eletroforese alcalina de algumas hemoglobinas anormais, em comparação com os padrões normais.

## Equipamento

- cuba de eletroforese e fonte geradora de voltagem
- tiras de acetato de celulose
- papel absorvente
- aplicador de amostras

## Reagentes

- a. *Solução tampão: Tris-EDTA-borato 0,025M pH 8,5 (TEB pH 8,5)*

Tris (hidroximetil) aminometano 10,2 g

ácido etileno-diamino-tetracético 0,6 g

ácido bórico 3,2 g

água destilada 1 litro

- b. *Solução corante: Ponceau*

Ponceau S 0,5 g

ácido tricloroacético 5,0 g

água destilada q.s.p. 100 ml

- a. *Solução descorante*

ácido acético glacial 100 ml

metanol 50 ml

água destilada q.s.p. 1 litro

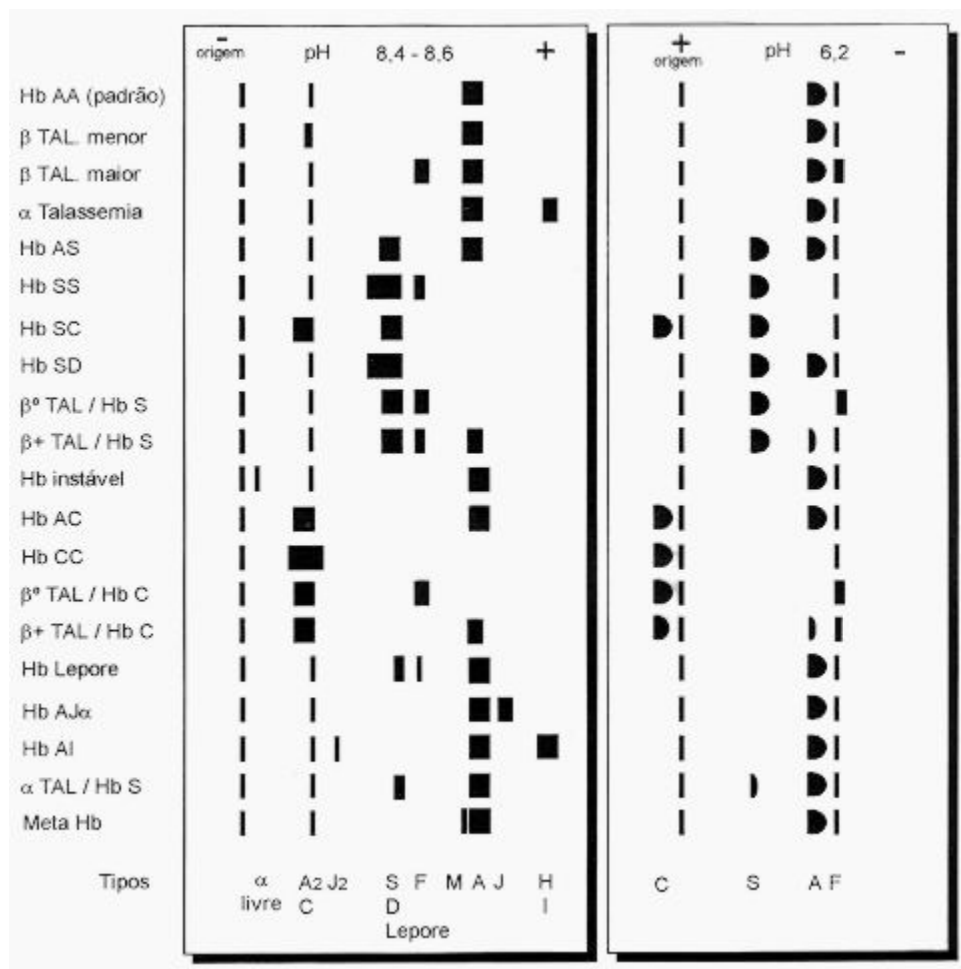
## Procedimento

- a. Colocar igual quantidade de solução tampão em cada compartimento eletrolítico da cuba de eletroforese.
- b. Embeber o acetato de celulose na solução tampão, previamente colocada numa vasilha, pelo menos durante 15 minutos.
- c. Enxugar o acetato de celulose entre duas folhas de papel absorvente para remover o excesso de solução tampão.
- d. Ajustar as tiras de acetato de celulose na cuba de eletroforese, deixando-as esticadas. Verificar se as suas extremidades estão mergulhadas na solução tampão de cada compartimento da cuba.
- e. Aplicar as amostras nas tiras de acetato de celulose (hemolisado com saponina a 1% ou solução de hemoglobina) a 2 cm do compartimento do pólo negativo (catodo).
- f. Passar 200 ou 300 volts por 30 ou 20 minutos, respectivamente.
- g. Analisar o fracionamento, inicialmente sem corar.
- h. Remover as tiras e corar com Ponceau (ou outro corante de proteínas) por 10 minutos, no mínimo.

- i. Transferir as tiras para vasilha que contém solução descorante, agitando-a cuidadosamente por 3 a 5 minutos. Trocar a solução descorante usada por outra limpa, e deixar as tiras por tempo necessário para clareá-las. Analisar a disposição das frações.

### Controle

Durante a eletroforese, é importante o uso de, pelo menos, uma amostra controle. Na ausência de padrões tipo Hb AS, Hb AC, ou outra forma de hemoglobina variante, usar uma amostra com hemoglobina normal. O padrão normal constitui-se num excelente meio de comparação entre hemoglobinas "normais" e "anormais". A utilização de "mapas" de referência é muito útil na interpretação dos resultados (**figura 1**).



**Figura 1.** Posições padrões das principais hemoglobinas variantes e talassemias em pH 8,4 e pH 6,2.

### Precauções

Para o sucesso de qualquer eletroforese, é fundamental os seguintes cuidados:

- a. verificar se as mãos, a cuba de eletroforese, as tiras de acetato, o aplicador e o papel absorvente estão limpos;
- b. observar se a solução tampão não está contaminada por colônias de fungos;

- c. a solução tampão, usada continuamente, é suficiente para oito a dez procedimentos seguidos, porém, no uso esporádico, por exemplo, uma vez por semana, é interessante conservar a cuba com tampão no refrigerador;
- d. a obtenção de fracionamento deficiente pode ser causada por:
  - solução tampão deteriorada, ou envelhecida;
  - alteração do pH do tampão;
  - alta molaridade do tampão;
  - corrente elétrica deficiente;
  - má qualidade do acetato de celulose;
  - excesso ou deficiência da amostra aplicada.

## Dosagem de Hb A<sub>2</sub> por Eletroforese em Acetato de Celulose pH 8,0 e 9,0

Utiliza-se os mesmos equipamentos, reagentes e procedimentos da técnica anterior.

### Procedimento Específico

- a. Aplicar 20 ml da solução de hemoglobina, por meio de pipeta de Shalli, numa única tira de acetato de celulose, com 4,5 a 5,5 cm de largura. Para acetato de celulose com 2,5 cm de largura, usar duas tiras, depositando 10 ml em cada uma delas.
- b. Passar 200 ou 300 volts por 30 ou 20 minutos, respectivamente.
- c. Após o fracionamento, as hemoglobinas A e A<sub>2</sub>, sem prévia coloração, são recortadas com tesoura e eluídas em tubos contendo água destilada na quantidade de 3 ml (para Hb A<sub>2</sub>) e 15 ml (para Hb A). Deixar a eluição se processar por 2 horas à temperatura ambiente, agitando os tubos a cada 15 minutos. Nas eluições superiores a 2 horas, conservar o material sob refrigeração. Usar a água destilada como branco. Fazer a leitura das densidades ópticas (DO) em 415 nm.
- d. Cálculo:

$$\% \text{ Hb A}_2 = \frac{DO \text{ HbA}_2}{DO \text{ HbAx5} + DO \text{ HbA}_2} \times 100$$

Valor normal: 2,0 a 4,0