

Smart Book Ilustrado de Hematologia
Segunda edição revisada de 2021*

Edição da Academia de Ciência e Tecnologia (AC&T) de São José do Rio
Preto, SP

DOENÇAS DOS ERITRÓCITOS

Capítulo 6

**Exames laboratoriais específicos
para identificar as causas de anemias**

Prof.Dr. Paulo Cesar Naoum

2021

**** A primeira edição foi publicada em 2001 em CD-Rom pela AC&T***

Sumário deste capítulo

- 1- Contagem de Reticulócitos
- 2- Pesquisa citológica de corpos de Heinz
- 3- Pesquisa citológica de Hb H
- 4- Pesquisa citológica de Hb Fetal
- 5- Eletroforese e cromatografia de hemoglobinas
- 6- Testes para identificar de Hb instáveis
- 7- Teste e curva de fragilidade osmótica
- 8- Dosagem de metahemoglobina

SINOPSE DAS APLICAÇÕES DOS EXAMES ESPECÍFICOS

1- Contagem de Reticulócitos

Avalia a eritropoiese em anemias e resposta terapêutica

2- Pesquisa citológica de corpos de Heinz

Triagem de Hb Instáveis, Deficiência de G6PD e Hb oxidadas

3- Pesquisa citológica de Hb H

Triagem para presença de talassemia alfa

4- Pesquisa citológica de eritrócitos com Hb Fetal

Avalia a contaminação do sangue da gestante por sangue fetal

5- Eletroforese e cromatografia de hemoglobinas

Diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias

6- Teste para identificar Hb Instáveis

Diagnóstico laboratorial de Hb Instáveis

7- Teste e curva de fragilidade osmótica

Diagnóstico laboratorial de esferocitoses

8- Dosagem de metahemoglobina

Triagem de Hb Instáveis , Deficiência de G6PD e oxidações de hemoglobinas

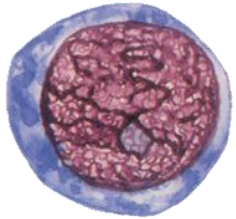
CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

IMPORTÂNCIA DE SEU USO

**AVALIA A ERITROPOIESE EM ANEMIAS E ATUA
COMO MARCADOR DE RESPOSTAS
TERAPÊUTICAS DE ANEMIAS**

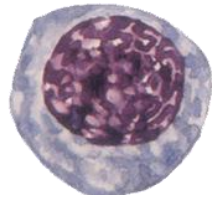
Introdução

Reticulócitos são precursores jovens de eritrócitos formados na medula óssea, com tempo de vida médio de 3 a 4 dias ([figura abaixo](#)). Após este tempo se transformam em eritrócitos e são lançados ao sangue.



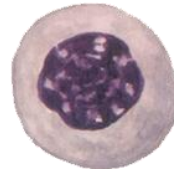
PROERITROBLASTO

20 HORAS DE VIDA



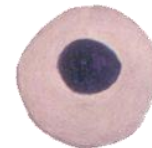
ERITROBLASTO
BASÓFILO

40 HORAS DE VIDA



ERITROBLASTO
POLICROMÁTICO

24 HORAS DE VIDA



ERITROBLASTO
ORTOCROMÁTICO

30 HORAS DE VIDA



RETICULÓCITO

72 HORAS DE VIDA

Para cada *1000 eritrócitos* liberados pela medula para o sangue circulante, ela também libera entre *5 a 15 de reticulócitos*, que corresponde a *0,5 e 1,5%* ([figura 6.1a](#)).

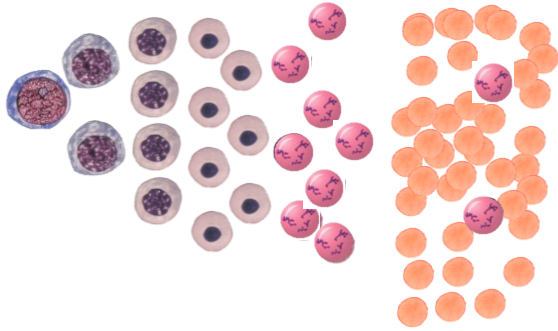
Este padrão pode ser alterado por anemias aplásticas, hipoplásticas, hemolíticas e hemorrágicas agudas, conforme ilustram as [figuras 6.1b/c](#).

Figura 6.1a

Eritropoiese normal

MEDULA ÓSSEA

SANGUE



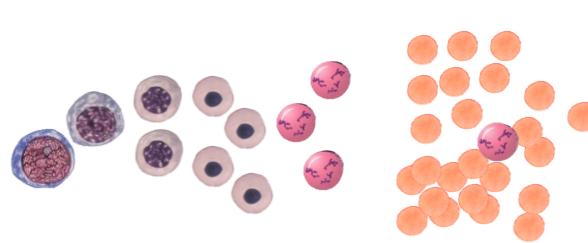
Representação das proporções normais de reticulócitos e eritrócitos liberados da medula para o sangue circulante

Figura 6.1b

Aplasia e hipoplasia

MEDULA ÓSSEA

SANGUE



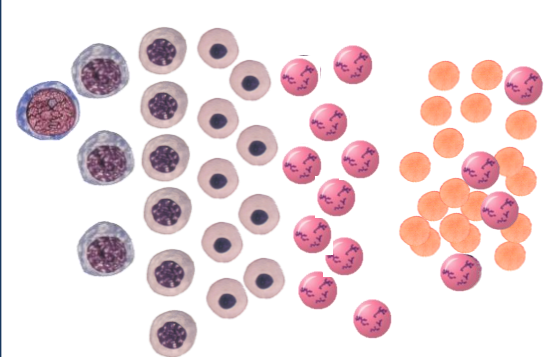
Representação das patologias que **diminuem a eritropoiese** causando anemia e **reticulocitopenia** no sangue circulante

Figura 6.1cc

Hemólise/Hemorragia

MEDULA ÓSSEA

SANGUE



Representação das patologias que **aumentam a eritropoiese** causando anemia e **reticulocitose** no sangue circulante

Importância clínica da contagem de reticulócitos

Os reticulócitos são marcadores biológicos do desenvolvimento da eritropoiese. Em anemias resultantes da falta de tecido hematopoiético na medula óssea (aplasia de medula), a produção de todas as células do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) se tornam diminuídas, e isto reflete na contagem de reticulócitos. Por outro lado, quando os eritrócitos do sangue periférico são destruídos precocemente, tal qual ocorre nas anemias hemolíticas, por exemplo, a medula óssea reage e se torna hiper celular com predomínio de eritroblastos, e causam o aumento de reticulócitos. Portanto, há várias doenças hematológicas e não hematológicas que alteram as contagens de reticulócitos ([tabela 6.1](#)).

Tabela 6.1

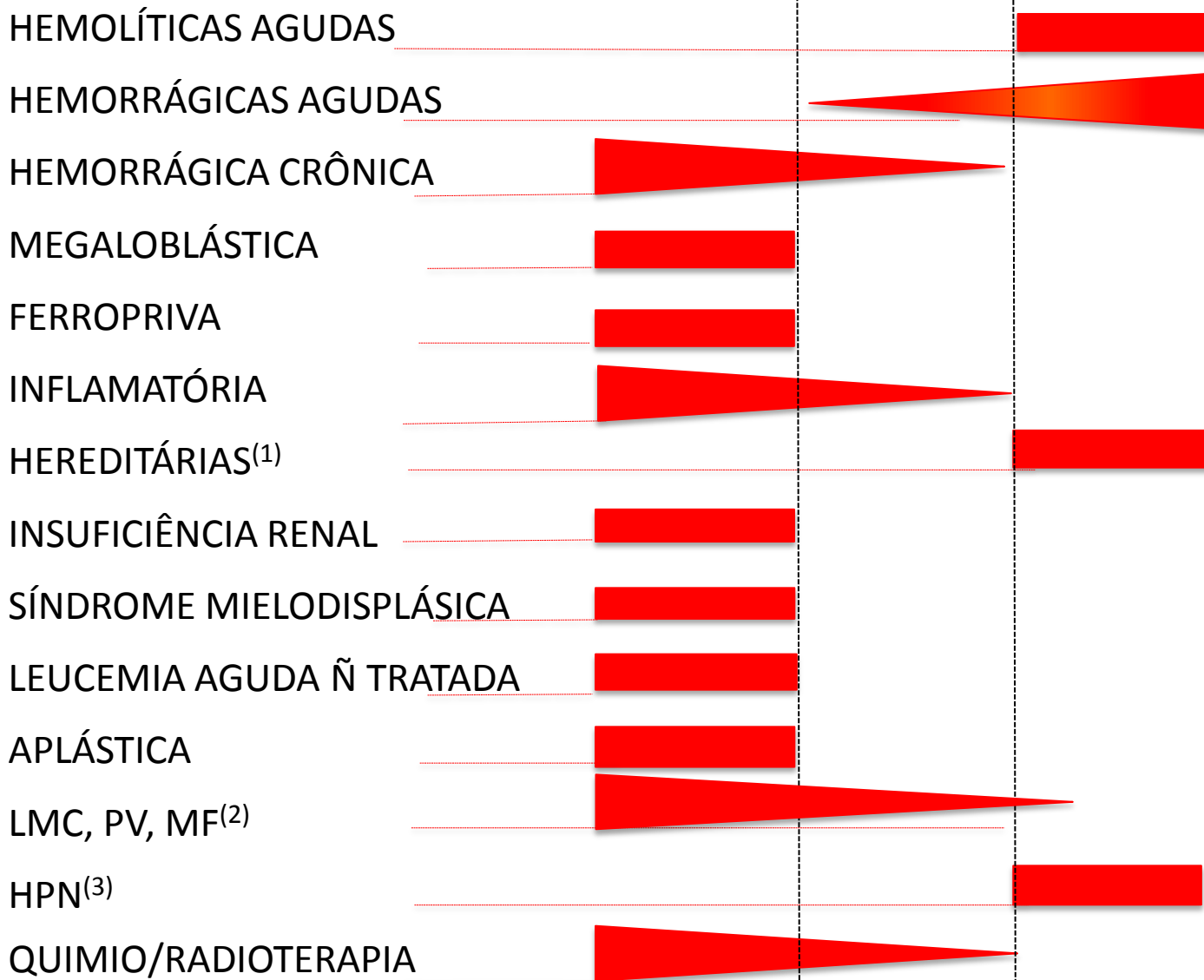
TIPOS DE ANEMIAS

CONTAGEM DE RETICULÓCITOS

DIMINUÍDA

NORMAL

AUMENTADA



(1) – TALASSEMIAS (MAIOR E INTERMÉDIA), DOENÇA FALCIFORME, DEFICIÊNCIA DE G6PD COM ANEMIA, DEFICIÊNCIA DE PIRUVATO-QUINASE COM ANEMIA, ESFEROCITOSE COM ANEMIA; (2) - LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA, POLICITEMIA VERA, MIELOFIBROSE; (3) - HEMOGLOBINÚRIA PAROXISÍSTICA NOTURNA

Métodos para contagens de reticulócitos:

A coleta de sangue para avaliação de reticulócitos através de sua contagem quantitativa é a mesma do hemograma. Há dois métodos de contagens de reticulócitos: o **manual** e o **automatizado**.

A contagem manual de reticulócito é a mais usada, uma vez que poucos laboratórios têm equipamentos automatizados apropriados para realizarem as contagens automatizadas de reticulócitos. Além disso é desaconselhável enviar amostras de sangue para contagens de reticulócitos aos laboratórios de apoio, pois as mesmas devem ser feitas preferencialmente entre duas e quatro horas após a coleta de sangue. Esta recomendação se deve ao curto período de vida dos reticulócitos (**figura 6.2**).

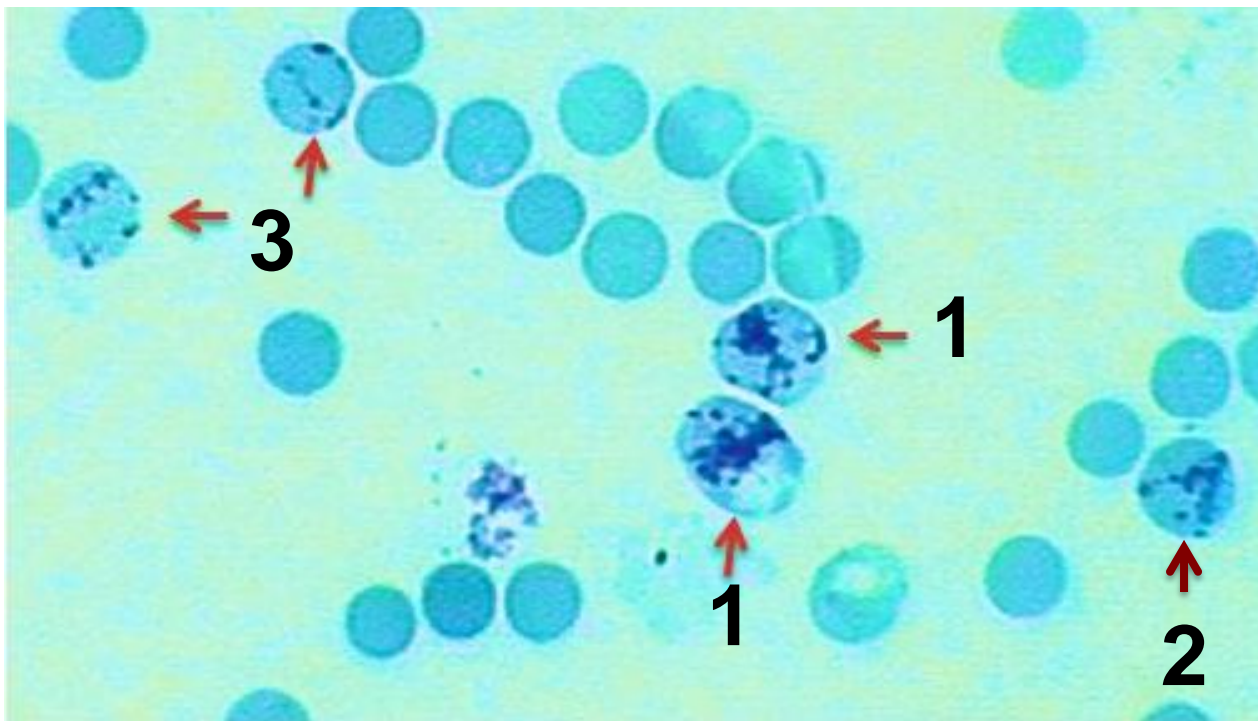


Figura 6.2 – Reticulócitos em sangue com anemia hemolítica. Os reticulócitos identificados com o número 1 (com muitos retículos de RNA ribossômicos) são jovens, ou seja, recém liberados pela medula óssea para o sangue periférico, e sobrevivem, em média, até 3-4 dias antes de se transformarem em eritrócitos. Já o reticulócito 2 com menos retículos pode sobreviver no máximo 24 horas, enquanto que os identificados com o número 3 sobrevivem apenas algumas horas antes de se transformarem em eritrócitos.

Concluindo: Após 24 horas da coleta, muitos reticulócitos se transformam em eritrócitos, diminuindo significativamente seus valores. As **figuras 6.3 e 6.4** mostram estas diferenças em sangue de um mesmo paciente com análises feitas, respectivamente, em 2 horas e 24 horas após a coleta de sangue.

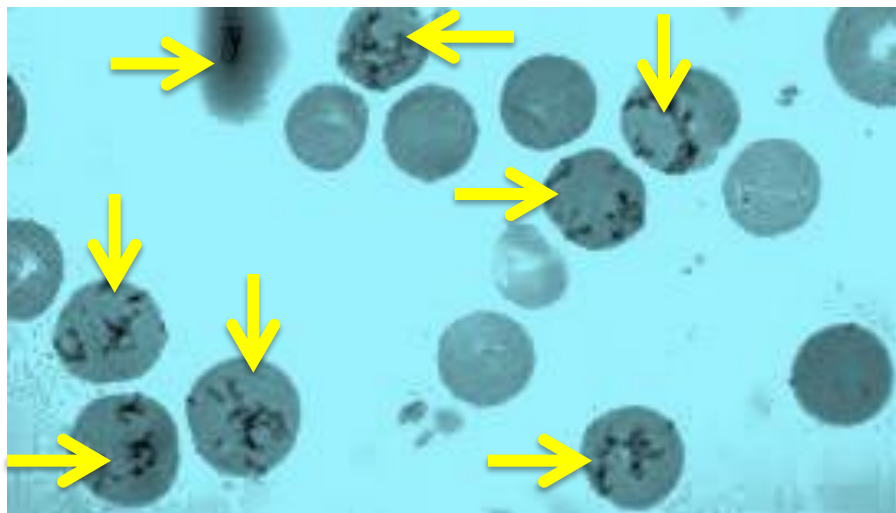


Figura 6.3 – Esfregaço de reticulócitos feito após 2 horas da coleta: setas indicam os reticulócitos.

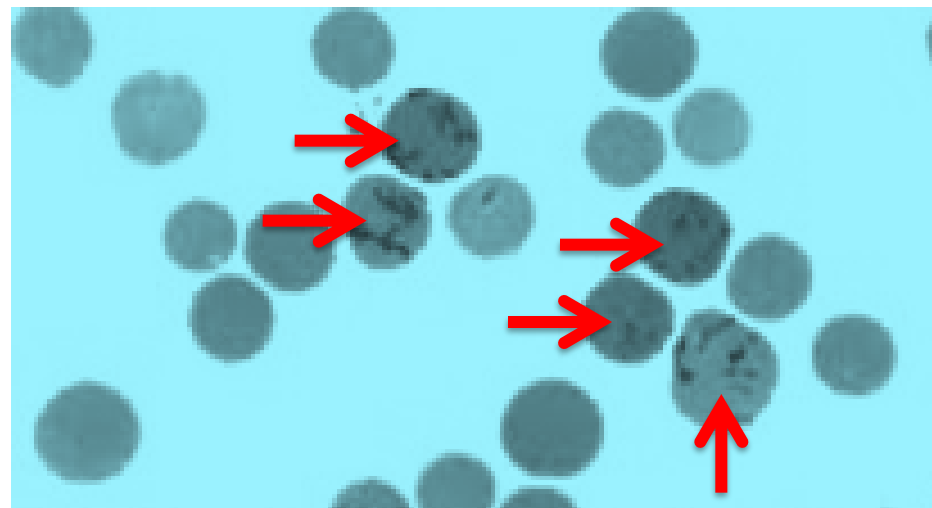


Figura 6.4 – Esfregaço de reticulócitos feito após 24 horas da coleta: setas indicam os reticulócitos.

Técnicas manuais de contagem de reticulócitos

1 – Contagem percentual de reticulócitos

Conceito: Fundamenta-se na porcentagem de reticulócitos contados em relação a 100 eritrócitos.

2 – Contagem corrigida de reticulócitos

Conceito: Fundamenta-se na contagem percentual de reticulócitos, corrigida através da relação entre os hematócritos do paciente e o correspondente normal para sexo e idade.

3 – Índice de produção de reticulócitos

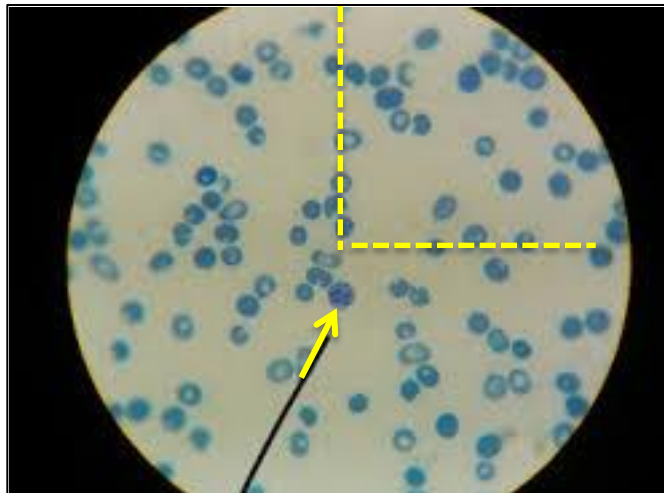
Conceito: Determina se a anemia de uma pessoa é *hipoproliferativa* por aplasia ou deficiência de fatores da hematopoiese, ou se é *hiperproliferativa* por hemólise ou hemorragia recente.

1- Contagem porcentual de reticulócitos

Procedimento técnico: Inicialmente misture num tubo: **300µL** de sangue do paciente com **100µL** de azul de crezil brilhante a 1% em solução salina isotônica. Agite a mistura cuidadosamente e incube-a em banho maria a 37⁰C por **30 minutos**. Em seguida, faça o esfregaço e seque-o ao ar. Examine a lâmina em microscópio com aumento de 1000X (figura abaixo). Após 24 horas o esfregaço se desfaz. Caso tenha interesse em arquivar o esfregaço de reticulócito, faça a contra coloração com Leishman, Wrigth ou Giemsa.

Este corante é “supra vital” e cora especificamente somente estruturas vivas dentro dos eritrócitos: corpos de Heinz, reticulócitos e Hb H (figura 6.5)

1- Contagem porcentual de reticulócitos (continuação)

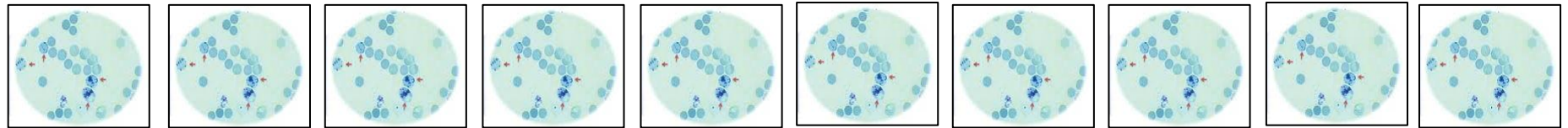


Campo microscópico com aumento de 100X com o quadrante (linhas pontilhadas amarelas). A seta mostra um reticulócito.

Contagem:

- 1) Faça mentalmente um quadrante ([figura acima](#)) e conte quantos eritrócitos há nele, por exemplo: 26. Portanto, este campo óptico deverá ter por volta de 104 eritrócitos (4×26).
- 2) Conte quantos reticulócitos há em todo o campo microscópico. A seta mostra um reticulócito. Faça as contagens em 10 campos e anote-os.

Contagem (continuação): A figura abaixo exemplifica a contagem em 10 campos. São anotados os reticulócitos (Rt) e os eritrócitos (Er) contados em cada campo (1 a 10).



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 Rt	4 Rt	0 Rt	3 Rt	2 Rt	4 Rt	1 Rt	0 Rt	5 Rt	1 Rt
104 Er	307 Er	200 Er	150 Er	203 Er	350 Er	180 Er	235 Er	212 Er	308 Er

Cálculo: Em 10 campos foram contados 21 reticulócitos e 2.249 eritrócitos. O cálculo se faz por meio da regra de três.

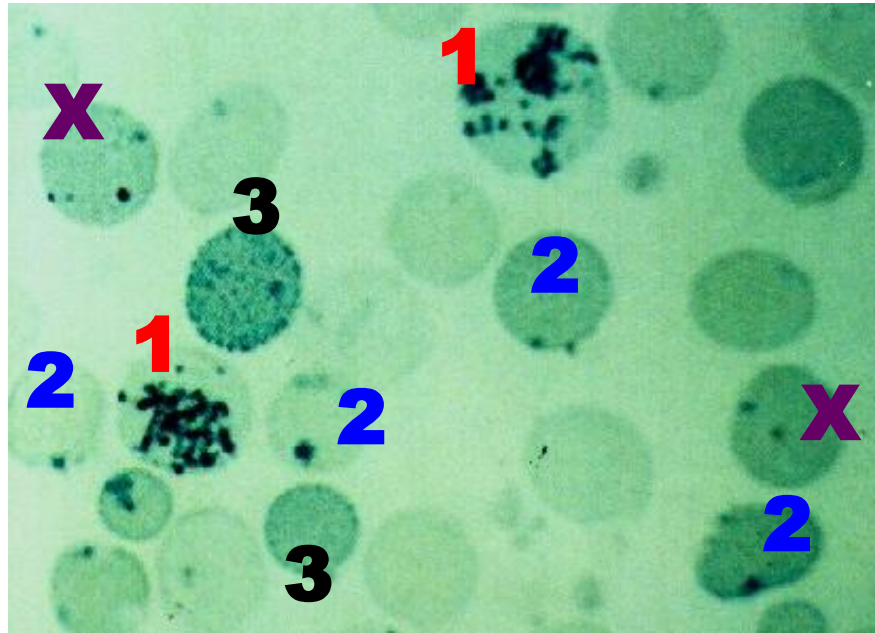
a) 21 reticulócitos..... 2.249 eritrócitos
 X%.....100 eritrócitos

b) $X = 100 \times 21 / 2.249 = 0,93\%$

Resultado da contagem de reticulócitos: 0,93%

Valor padrão normal: 0,5 a 1,5%

Figura 6.5 -Como diferenciar os reticulócitos em relação aos corpos de Heinz e precipitados de Hb H.



(1) Reticulócitos (fase inicial)

(2) Corpos de Heinz – estrutura sempre ligada à membrana

(3) Precipitados de Hb H – estrutura homogeneamente distribuída na célula

(X) Reticulócito (fase final)

2 – Contagem corrigida de reticulócitos (CCR)

Procedimento técnico: Nesta técnica se usa a contagem corrigida dos eritrócitos, o hematócrito do paciente e o hematócrito padrão para sexo e idade correspondente para o paciente. Usaremos como exemplo a contagem porcentual de reticulócitos obtida no *item 1* que resultou em **0,93%**. O paciente deste exemplo é um jovem com 16 anos de idade e o seu hematócrito é 20%. O hematócrito correspondente à sua idade é 40%. Qual é a CCR?

Cálculo:

a) $CCR = \% \text{ de reticulócitos} \times HT \text{ do paciente} / HT \text{ padrão}$

b) $CCR = 0,93 \times 20/40 = \mathbf{0,46\%}$

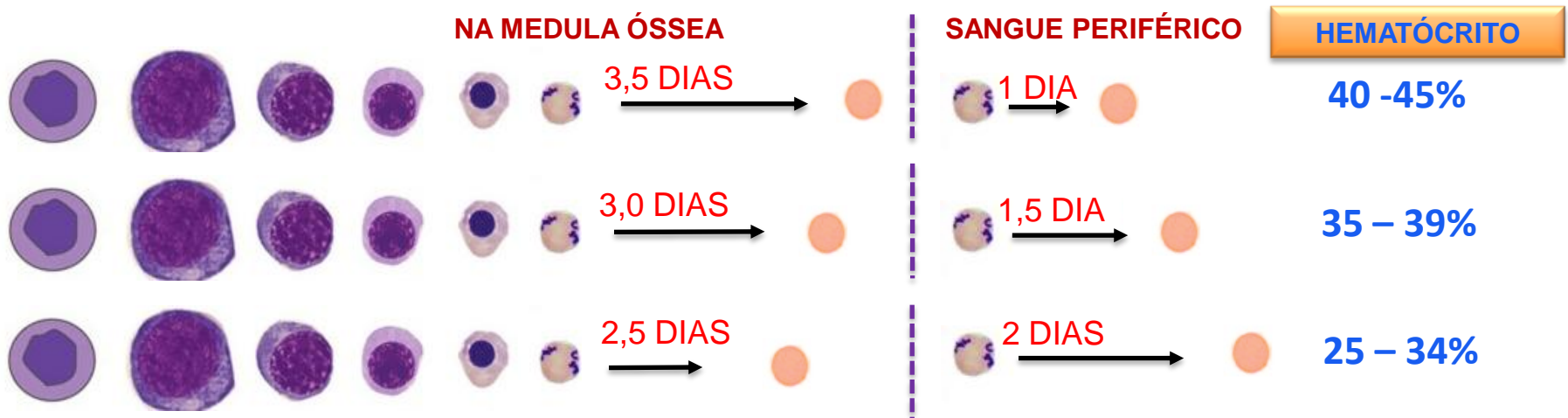
Valor padrão normal: 0,5 a 1,5%

Interpretação: Observe que a contagem porcentual de reticulócito foi de 0,93%, ou seja, normal. Porém na contagem corrigida de reticulócitos (**0,46%**) o valor está diminuído.

3 – Índice de produção de reticulócitos (IPR)

Conceito: É um índice que avalia a produção de eritrócitos e se fundamenta na relação entre o valor da contagem corrigida de reticulócito e tempo de maturação de reticulócito no sangue periférico ([figura abaixo](#)). Em pessoas sem anemia, por exemplo, com hematócrito de 45%, a transformação de reticulócitos em eritrócitos na medula óssea demora, em média, 3,5 dias, enquanto que no sangue periférico demora apenas 1 dia. Este tempo é variável conforme os diferentes graus de anemias ([tabela vermelha](#), a seguir).

TRANSFORMAÇÃO DE RETICULÓCITOS EM ERITRÓCITOS EM DIAS EM RELAÇÃO AO HEMATÓCRITO



Procedimento: O cálculo do IPR é feito com valores da contagem corrigida de reticulócito (CCR) e do tempo de maturação do reticulócito no sangue periférico (**tabela vermelha**), usando a seguinte fórmula:

IPR = CCR / Tempo de maturação do reticulócito no sangue

HEMATÓCRITO	TEMPO MATURAÇÃO NO SANGUE
40 - 45%	1,0 DIA
35 - 39%	1,5 DIA
25 - 34 %	2,0 DIAS
15 - 24%	2,5 DIAS
< 15%	3,0 DIAS

Usaremos como exemplo o resultado do exame do jovem com 16 anos, Ht: 20%, Reticulócitos:0,93% e CCR: 0,46%. Qual é o seu IPR? **IPR = 0,46 / 2,5 = 0,18**

Contagem corrigida do reticulócito do menino

Tempo de maturação de reticulócitos para o hematócrito de 20%

Interpretação:

Valor normal de IPR para pessoa sem anemia é de 0,5 a 2,0

Valores menores de 0,5 em pessoa com anemia indica anemia hipoproliferativa.

Situações mais comuns: anemia aplástica ou eritropoiese inefetiva (ex.: anemia megaloblástica, anemia ferropriva).

Valores acima de 1,0 em pessoa com anemia indica anemia hiperproliferativa.

Situações mais comuns: anemia hemolítica, anemia hemorrágica aguda recente, ou resposta terapêutica positiva.

Conclusão da contagem manual de reticulócitos

A contagem de reticulócitos mais solicitada pelos médicos é a percentual, entretanto a mais fidedigna é a contagem corrigida de reticulócitos. Seu laboratório, no entanto, poderá emitir os dois resultados, mesmo quando o médico solicitar apenas a contagem percentual.

O cálculo de IPR, por sua vez, é opção do médico e seu resultado auxilia a identificação de causas de anemias.

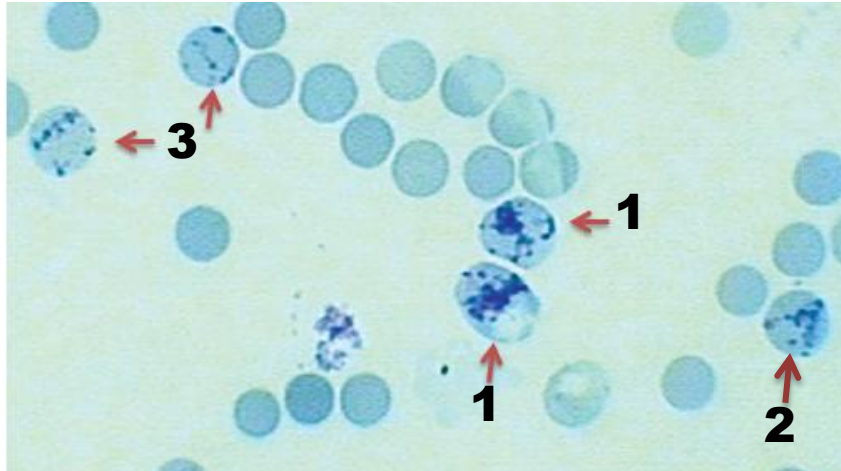
Valores padrões percentuais de reticulócitos

Pesquisas populacionais feitas para todas as faixas etárias, com exceção de recém-nascidos, mostram valores mínimos de 0,4 e 0,5% e máximos de 1,5 a 2,0%. Os médicos hematologistas optam por valores entre 0,5 e 1,5%, mas em alguns centros médicos ainda aceitam valores de 0,5 a 2,0%. Em relação aos recém-nascidos há consenso de que os valores aceitáveis estejam entre 0,5 e 3,5%.

Técnicas automatizadas para avaliar reticulócitos

Inicialmente é importante destacar que várias pesquisas científicas relataram que não há diferenças estatisticamente significantes entre as contagens manual e automatizada para avaliações percentuais e corrigidas de reticulócitos. Alguns equipamentos automatizados de contagens de células do sangue combinam suas tecnologias de laser com algoritmos específicos e produzem um índice conhecido por Fração de Reticulócitos Imaturos – o **IRF** (sigla em inglês). O IRF substitui a análise ocular feita em microscópio e que está representada na [figura 6.6](#). Na figura é possível diferenciar três grupos de reticulócitos através da quantidade de retículos.

Figura 6.6 - As fases evolutivas dos reticulócitos.



(1) fase imatura - há muitos retículos de RNA ribossômico que são gradualmente consumidos durante a síntese de hemoglobinas.

Tempo médio de vida: 3,5 dias*.

(2) fase intermediária - diminuem a intensidade de retículos de RNA e aumenta a ocupação da hemoglobina na célula.

Tempo médio de vida: 2 dias*.

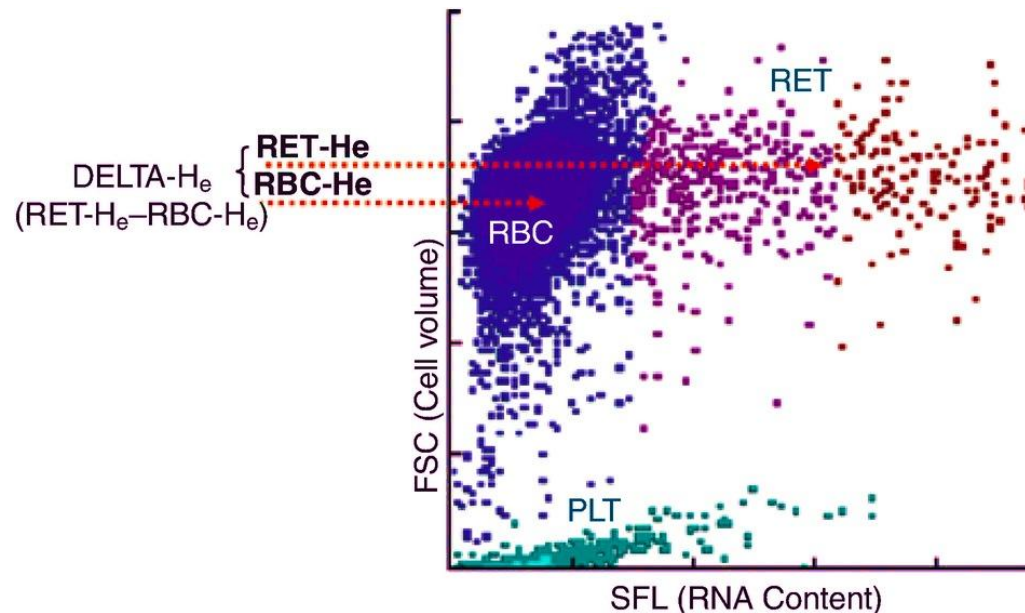
(3) fase final de maturação - há poucos retículos porque a hemoglobina já ocupa quase todo o espaço celular, promovendo a transformação de reticulócito em eritrócito.

Tempo médio de vida – menos de 24 horas*.

* Valores aproximados de tempo de vida

Contagem automatizada de reticulócitos

Na contagem automatizada há inicialmente uma comparação entre quantidade de eritrócitos (grupo com pontos de cor azul) e de reticulócitos (grupo com pontos de cores púrpura e laranja). Esta comparação resulta na contagem porcentual de reticulócitos. A tecnologia de informática deste equipamento, por meio de algoritmos, calcula a contagem corrigida de reticulócitos.

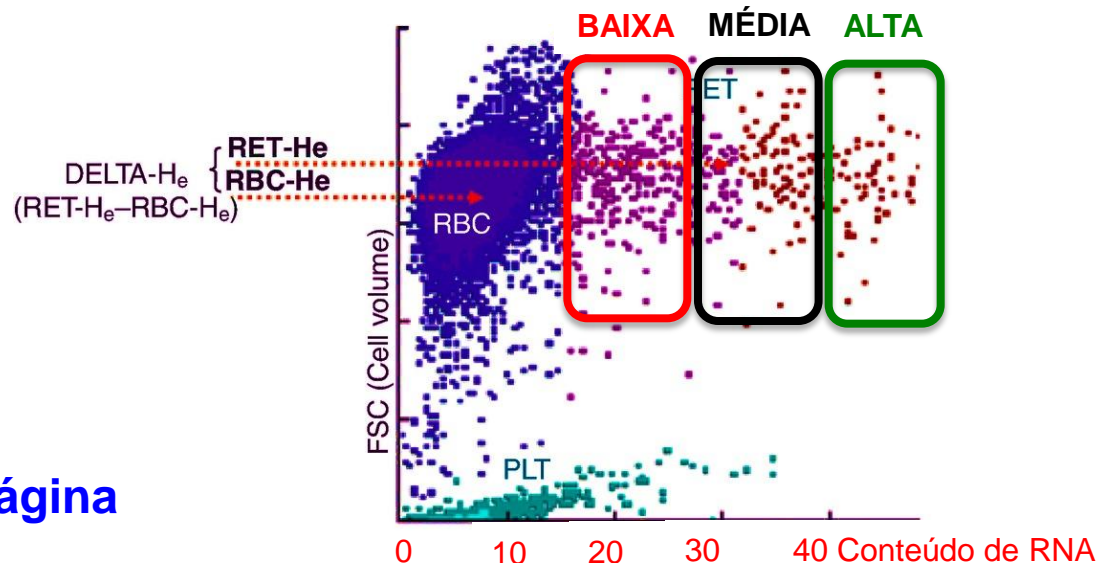


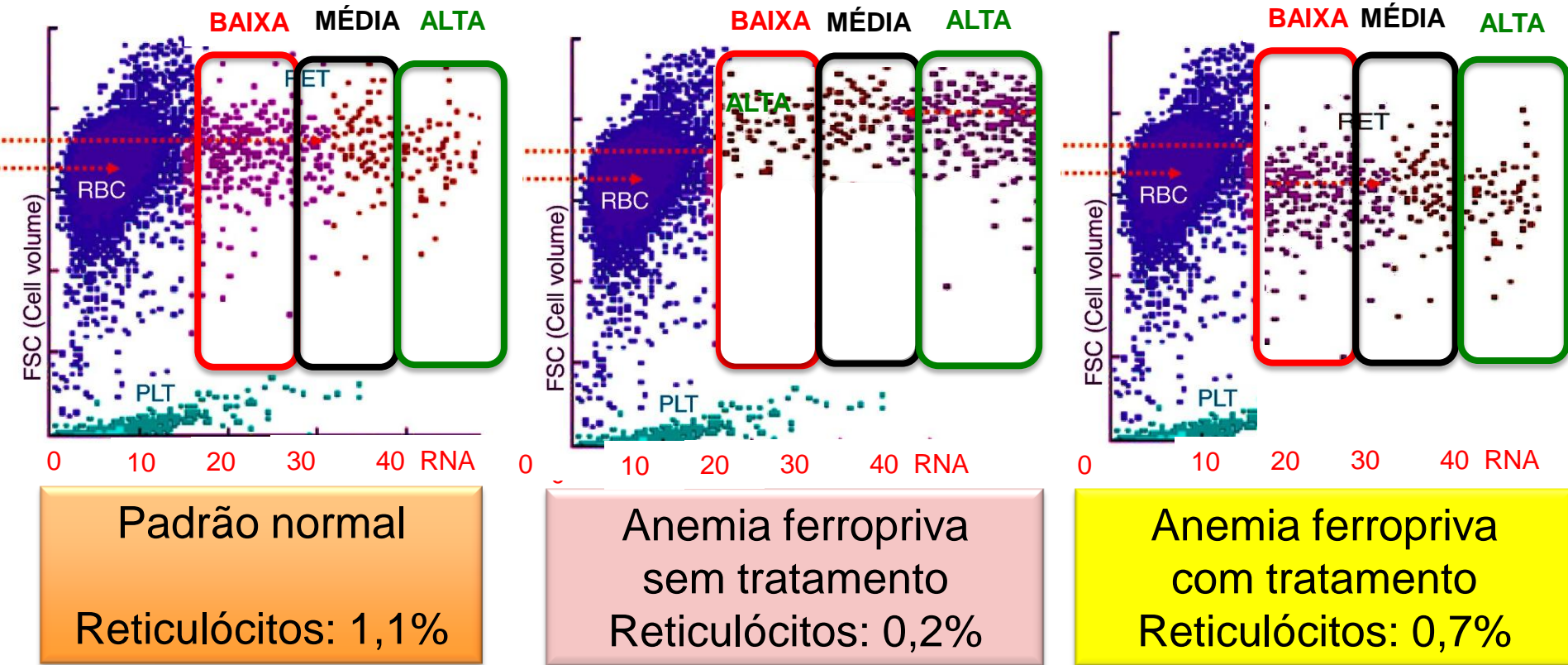
Contagem automatizada de fração de reticulócitos imaturos (IRF)

O laser fluorescente do equipamento detecta a intensidade de retículos dos reticulócitos. Quanto maior a intensidade destes retículos, mais jovens são os reticulócitos (ver figura 6.5). Os reticulócitos da *fase imatura* tem **alta fluorescência** (destaque verde no gráfico abaixo), reticulócitos da *fase intermediária* tem **média fluorescência** (destaque preto) e reticulócitos da fase madura tem **baixa fluorescência** (destaque vermelho).

Qual é o significado de alta, média e baixa fluorescência?

Resposta na próxima página





Interpretação: O padrão normal mostra a eritropoiese em equilíbrio com supremacia de reticulócitos maduros (**baixa fluorescência de retículos**). Na anemia ferropriva sem tratamento a supremacia é de reticulócitos imaturos (**alta fluorescência**) pois há muito retículos de RNA e pouca hemoglobina. Por fim, na anemia ferropriva com tratamento há o aumento de síntese de hemoglobina e os reticulócitos já mostram supremacia daqueles com poucos retículos (**baixa fluorescência**) indicando estímulo à síntese de hemoglobina.

Conclusão da contagem automatizada de reticulócitos

A contagem automatizada de reticulócitos é mais prática pela facilidade em executá-la, porém tem a mesma sensibilidade que a contagem manual.

A vantagem dos contadores automatizados se dá pelos cálculos realizados da contagem corrigida e do índice de produção de reticulócito (IPR).

Em contadores com sistema laser que captam produtos fluorescentes de RNA de reticulócitos e produzem o índice IRF (ou Fração de Reticulócitos Imaturos), a determinação de **alta captação** indica pouca produção de hemoglobina reticulocitária na anemia ferropriva, prevendo com antecedência a carência de ferro.

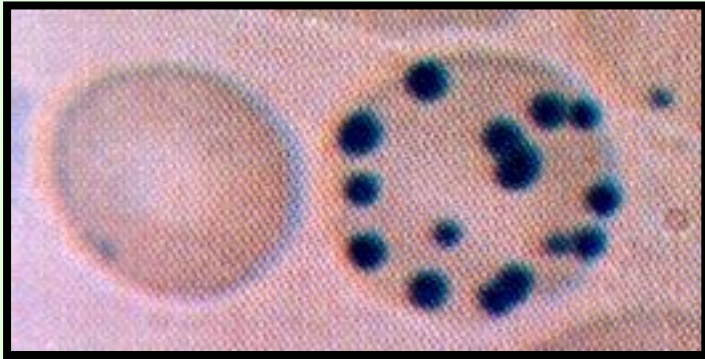
PESQUISA DE CORPOS DE HEINZ

SUA PRESENÇA INDICA:

- **OXIDAÇÃO DE HEMOGLOBINAS NORMAIS E ANORMAIS (Hb SS, SC etc)**
 - **PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA HEMOGLOBINA EM Hb INSTÁVEIS**
 - **OXIDAÇÃO DE HEMOGLOBINAS NAS DEFICIÊNCIAS DE G6PD E DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES**

Introdução

Corpos de Heinz são produtos compostos por globinas que se degradaram da molécula de hemoglobina e se precipitaram nos eritrócitos (**figura abaixo**).

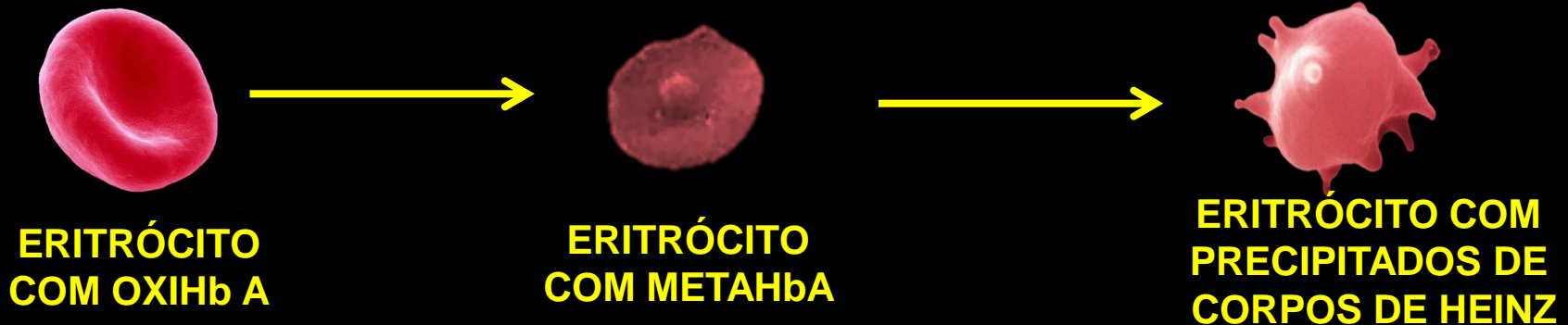
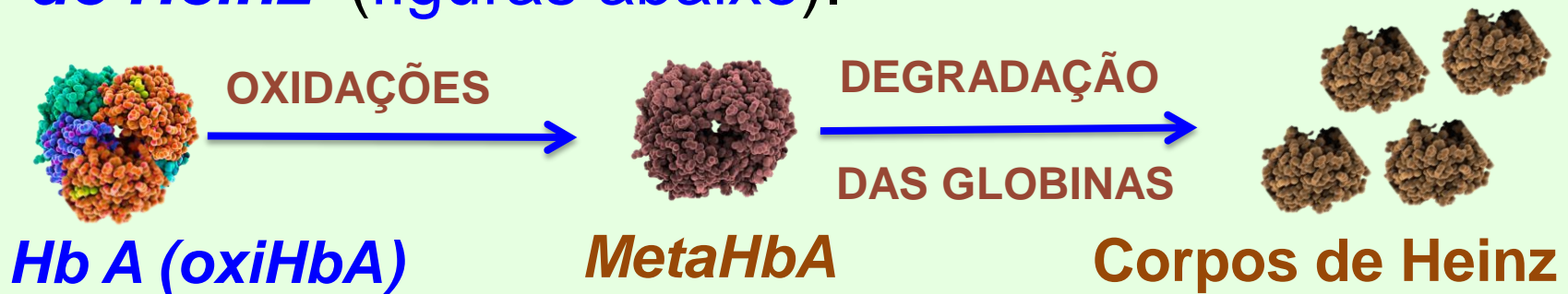


Precipitados de corpos de Heinz em um eritrócito. À esquerda um eritrócito normal. Corado com azul crezil brilhante a 1% (ACB 1%).

Há várias causas que induzem a degradação das hemoglobinas em globinas que se precipitam nos eritrócitos sob forma de corpos de Heinz:

1- Oxidações que afetam a Hb A – o excesso de oxidantes medicamentosos ou ambientais (sulfa, nitritos, nitratos etc) degradam as moléculas de Hb A e as transformam em metahemoglobina (***metaHbA***).

A *metaHbA* é instável pois o ferro do grupo heme contém 3 cargas positivas (Fe^{+++}) ao invés do Fe^{++} da Hb A oxigenada (oxiHb A). Os oxidantes transformam a oxiHbA em *metaHbA* que é estruturalmente instável. Esta mudança faz as globinas da *metaHbA* se desagregarem e se precipitarem sob forma de **corpos de Heinz** (figuras abaixo).

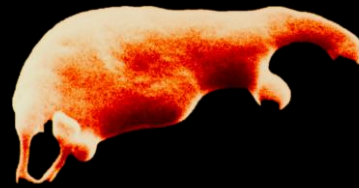


2- Oxidação da Hb S – quando a *oxiHbS* libera o oxigênio ela se torna *deoxiHbS*. A demora para a *deoxiHbS* se reoxigenar a transforma em *metaHbS*, desencadeando a formação de **corpos de Heinz**, e altera, ainda mais, a célula falciforme (**figuras abaixo**).



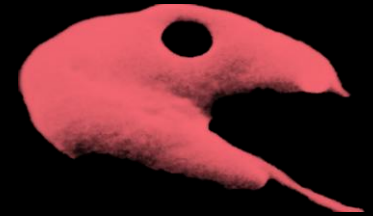
**CÉLULA FALCIFORME
DESOXIGENADA
(*DEOXIHb S*)**

DeoxiHb S
se torna
MetaHb S

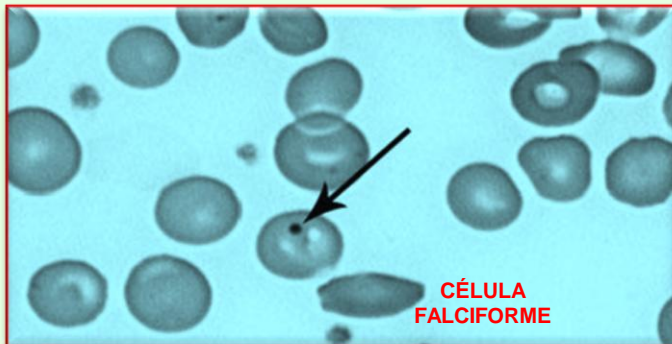


**CÉLULA FALCIFORME
COM MÚLTIPLOS
CORPOS DE HEINZ**

Ação
fagocitária
de
macrófagos



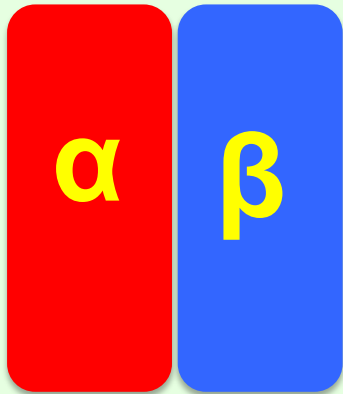
**LESÃO CAUSADA POR
REMOÇÃO DE CORPOS DE
HEINZ POR MACRÓFAGO**



**DESTAQUE: A SETA DA FOTO AO LADO
MOSTRA UM ERITRÓCITO COM CORPOS
DE HEINZ EM SANGUE DE PACIENTE COM
ANEMIA FALCIFORME. (Corante ACB 1%)**

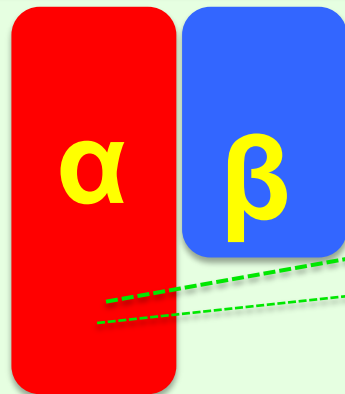
3- Talassemia beta – esta doença é causada por desequilíbrios entre as quantidades de moléculas de globinas alfa e beta. A globina alfa “livre” se precipita nos eritrócitos sob forma de **corpos de Heinz**. A precipitação, geralmente se acumula numa região da célula, deformando-a. Esta é a razão da presença de **dacriócitos** nas talassemias beta (**figuras abaixo**).

Hb Normal



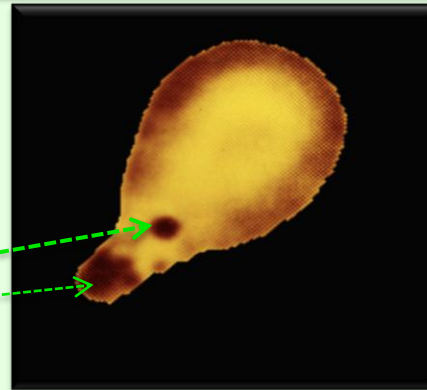
EQUILIBRIO
NORMAL DE
GLOBINAS

Talassemia beta



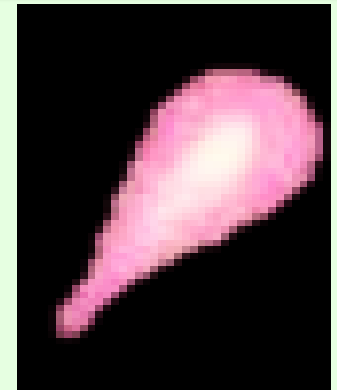
ALFA LIVRE NO
DESEQUILIBRIO DE
GLOBINAS

Dacriócito corado ACB1%



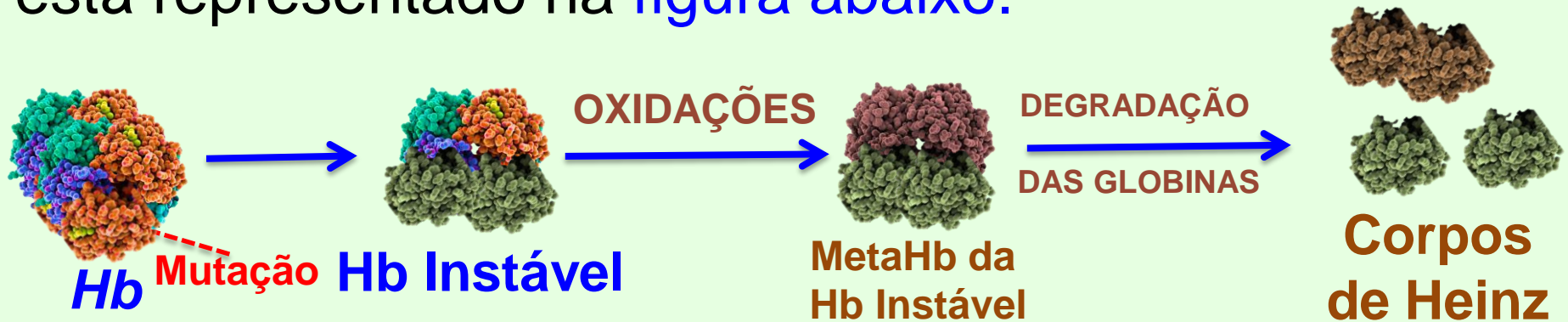
PRECIPITADOS DE
CORPOS DE HEINZ
DEFORMA O
ERITRÓCITO...

Corado com Giemsa



... E RESULTA NO
DACRIÓCITO

4- Hemoglobinas instáveis – estas hemoglobinas anormais se devem a mutações que afrouxam as ligações químicas entre as globinas alfa e beta, notadamente quando induzidas por produtos oxidantes e febre. Estas mutações são transmitidas geneticamente aos descendentes e o processo fisiopatológico está representado na **figura abaixo**.



**ERITRÓCITO
COM OXIh₂A +
Hb INSTÁVEL**



**ERITRÓCITO
COM METAH₂
INSTÁVEL**



**ERITRÓCITO COM
PRECIPITADOS DE
CORPOS DE HEINZ**

5- Oxidação de hemoglobinas na def. de G6PD

Na deficiência da enzima *G6PD* os eritrócitos se tornam mais vulneráveis devido à menor produção de energia (ATP) para a sobrevivência da célula. Esta deficiência afeta o ciclo da enzima metahemoglobina redutase, prejudicando o controle *metaHb* \leftrightarrow *oxiHb*. Este defeito aumenta a concentração de metaHb que, por ser instável, se precipita nos eritrócitos como corpos de Heinz, deformando-os e reduzindo o período de vida destas células (**figura abaixo**).



Deformações de eritrócitos com corpos de Heinz

Eritrócitos com corpos de Heinz (**figura 6.7**) se tornam mais lentos no fluxo sanguíneo e, também, perdem sua capacidade de deformação. Por essas razões deixam de ser circulares para se tornarem dacriócitos, células mordidas e esquisócitos (**figuras 6.8**).

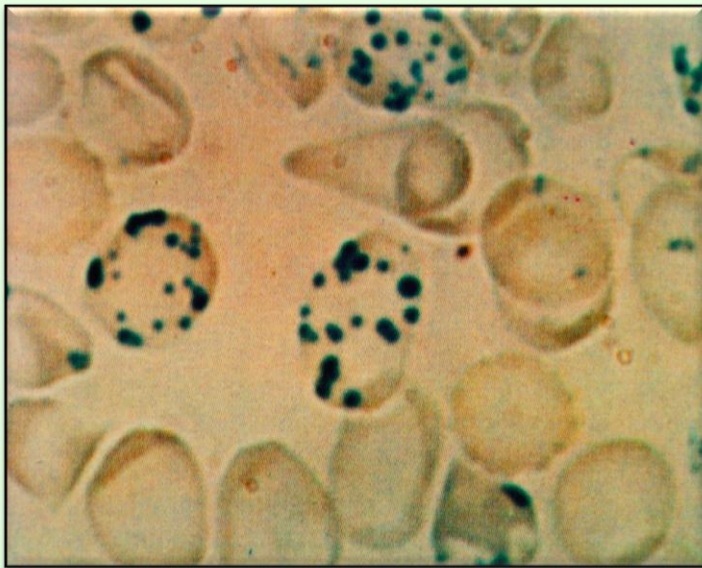


Figura 6.7 – Eritrócitos com corpos de Heinz. Coloração com ACB a 1%

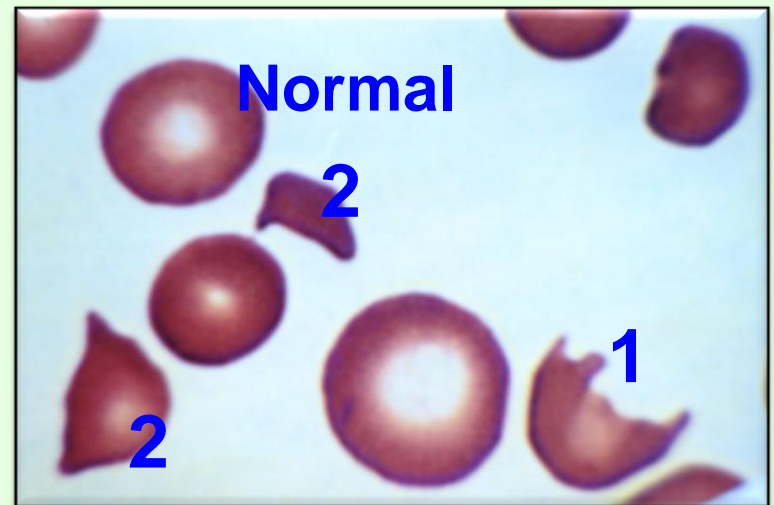


Figura 6.8 – Eritrócitos com deformações : (1) “célula mordida”; (2) esquisócitos. Coloração com Leishman

Por que os eritrócitos com Heinz se deformam

Há duas causas: **1)** Eritrócito com corpos de Heinz se tornam mais lentos na microcirculação sanguínea tecidual e, por isso, “atraem” macrófagos ([figura 6.9](#)); estes fagocitam os corpos de Heinz e os transformam em “células mordidas” ou em esquisócitos ([figura 6.10](#)).

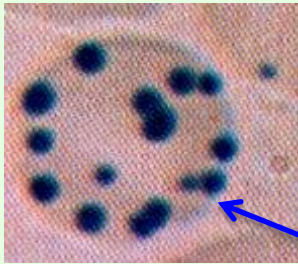


Figura 6.9

ERITRÓCITO
COM
CORPOS DE
HEINZ

MACRÓFAGO
REMOVE OS
CORPOS DE HEINZ
DO ERITRÓCITO



Figura

6.10

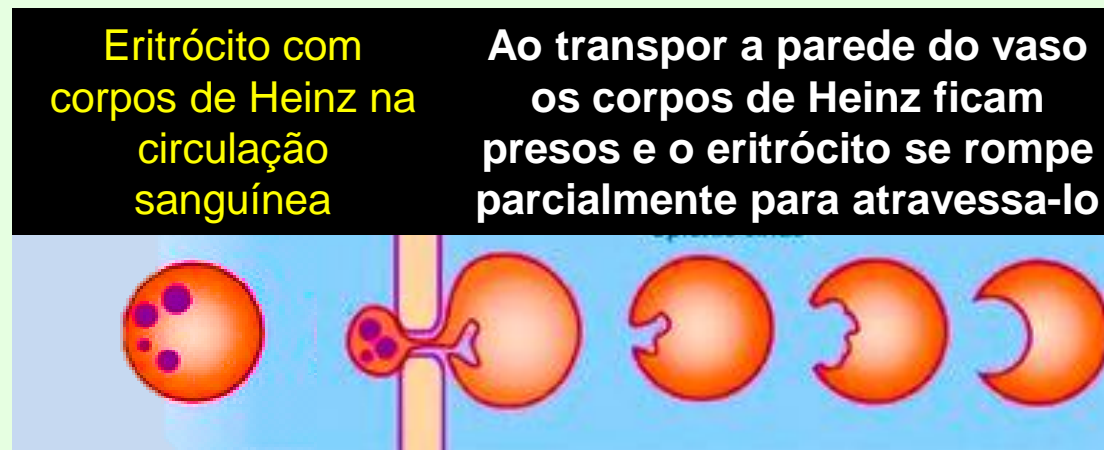
“CÉLULAS MORDIDAS”
POR REMOÇÃO DE
CORPOS DE HEINZ

OS CORPOS DE
HEINZ
FAGOCITADOS SÃO
METABOLIZADOS
PELO MACRÓFAGO



Por que os eritrócitos com Heinz se deformam (cont.)

2) Eritrócitos com corpos de Heinz fluem com dificuldades no fluxo sanguíneo. Ao transporem as paredes de vasos sanguíneos para acessarem tecidos do baço, fígado ou medula óssea, os corpos de Heinz, por serem densos, não conseguem atravessarem a parede do vaso. Assim, os eritrócitos se rompem na região dos corpos de Heinz e dão origem às células mordidas e esquisócitos ([figura abaixo](#)).



Pesquisa citológica de corpos de Heinz

Procedimento técnico: Inicialmente misture num tubo: **300µL** de sangue do paciente com **100µL** de azul de crezil brilhante a 1% em solução salina isotônica. Este corante é “supra vital” e cora especificamente somente estruturas vivas dentro dos eritrócitos: corpos de Heinz, reticulócitos e Hb H (figura 6.11) . Agite a mistura cuidadosamente e incube-a em banho maria a 37°C **por 120 minutos**. Em seguida, faça o esfregaço e seque-o ao ar. Examine a lâmina em microscópio com aumento de 1000X (figura abaixo). Após 24 horas o esfregaço se desfaz. Diferentemente dos reticulócitos, não é possível fazer a contra coloração com corantes que usam metanol, pois há degradação de Heinz e Hb H.

Pesquisa citológica de corpos de Heinz (continuação)

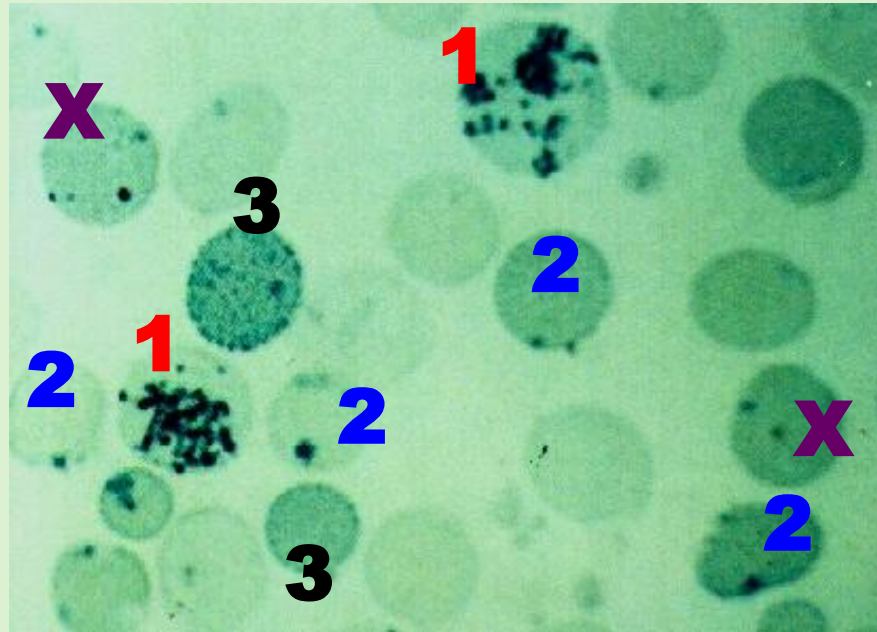


Figura 6.11 -Como diferenciar reticulócitos de corpos de Heinz e precipitados de Hb H.

(1) Reticulócitos (fase inicial)

(2) Corpos de Heinz – estrutura sempre ligada à membrana

(3) Precipitados de Hb H – estrutura homogeneamente distribuída na célula

(X) Reticulócito (fase final)

Pesquisa citológica de corpos de Heinz (continuação)

Análise citológica: É feita em imersão (1000x) com **avaliação qualitativa** em pelo menos dez campos microscópicos. Resultados positivos ocorrem quando se vê com constância, em quase todos os campos microscópicos, eritrócitos com corpos de Heinz.

Suas presenças dependem dos tipos de Hb Instáveis e do grau da deficiência de G6PD que estão sendo analisadas (**figuras 12a e 12 b com laudos**).

Nas oxidações de hemoglobinas por excesso de sulfa, nitritos e nitratos, a presença de corpos de Heinz é menos intensa (**figura 12c com laudo**).

A positividade de corpos de Heinz e a clínica do paciente direcionam o(s) exame(s) específico(s) que deve(m) ser realizado(s) na sequência da pesquisa.

Pesquisa citológica de corpos de Heinz (continuação)

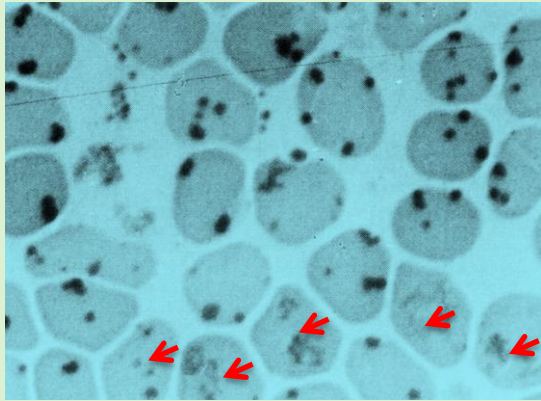


Figura 12a - Hb Instável (Hb Köln). Acentuada presença de eritrócitos com corpos de Heinz. Há, também reticulocitose (setas vermelhas).

***Lauda:* Acentuada presença de corpos de Heinz por campo microscópico, acompanhada de reticulocitose.**

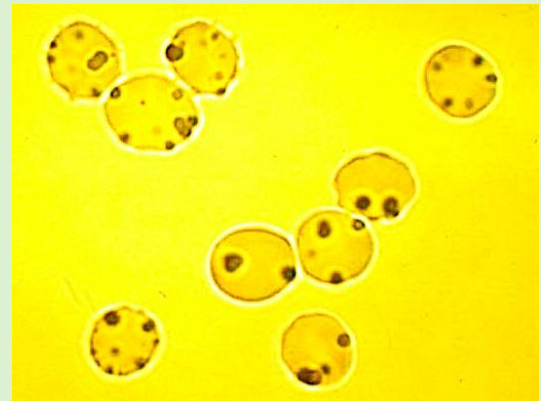


Figura 12a – Caso de paciente com deficiência de G6PD acometido por moderado grau de anemia hemolítica. Análise microscópica usando filtro amarelo

***Lauda:* Acentuada presença de corpos de Heinz por campo microscópico (cerca de 100% dos eritrócitos).**

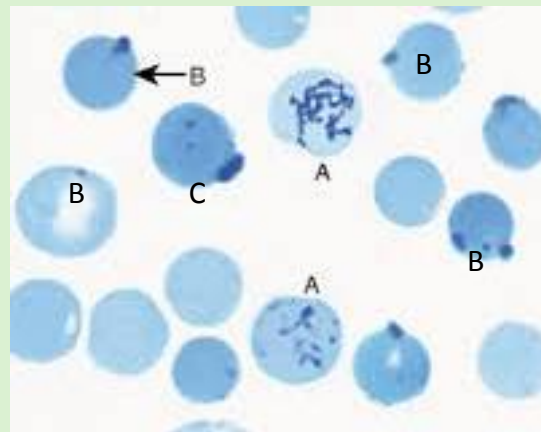


Figura 12c – Caso de paciente com oxidação da hemoglobina causada por poluentes ambientais, por exemplo: óxidos de nitrogênio ou de enxôfre.

***Lauda:* Corpos de Heinz positivo (B)**

Reticulócitos(A)

Reticulócitos com corpos de Heinz (C)

Conclusões da pesquisa de corpos de Heinz

A pesquisa de corpos de Heinz é um excelente marcador de processos oxidativos que afetam moléculas de hemoglobinas e reduzem o tempo de vida dos eritrócitos, causando anemias hemolíticas. As oxidações podem ser adquiridas por poluentes químicos ambientais (óxidos de nitrogênio e de enxôfre, quer sejam como sais, líquidos ou gases) e por intoxicações medicamentosas por sulfas e derivados.

As oxidações também podem ser de causas hereditárias, por exemplo: hemoglobinas instáveis, deficiência de G6PD, doença falciforme e talassemia beta.

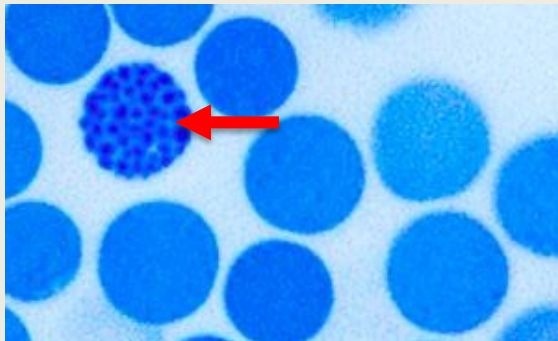
PESQUISA CITOLÓGICA DE Hb H

IMPORTÂNCIA DE SEU USO

A PRESENÇA DE Hb H SUGERE TALASSEMIA ALFA

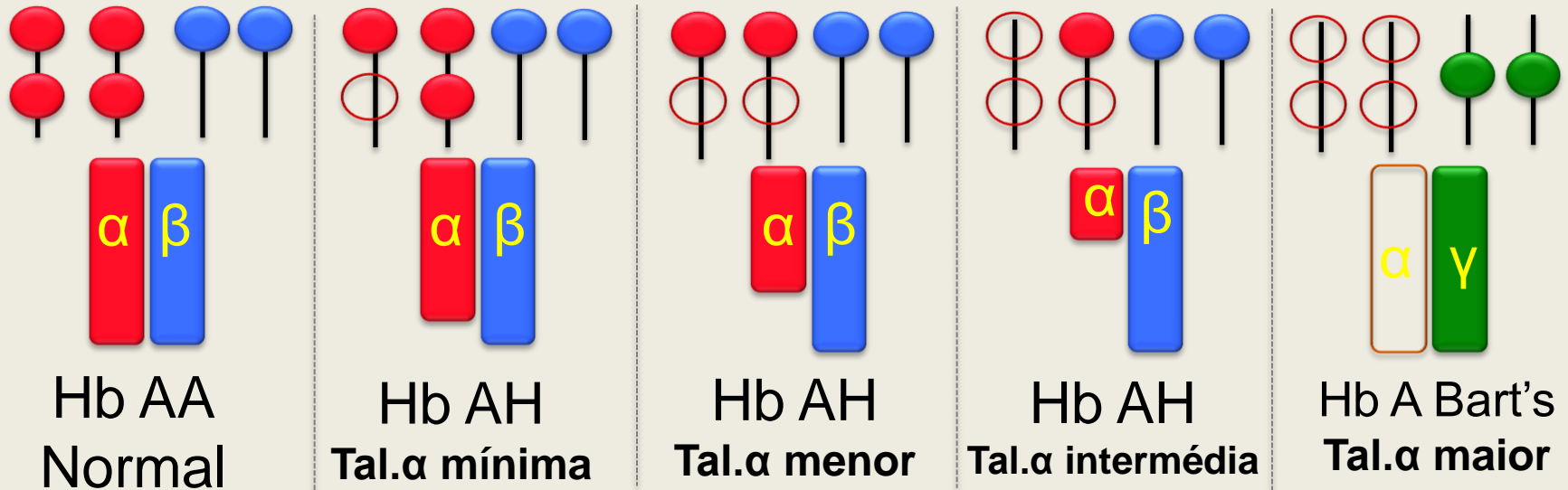
Introdução

A pesquisa citológica de Hb H é muito importante para identificar pessoas portadoras de talassemia alfa. O diagnóstico laboratorial da talassemia alfa é muito complexo pois pode envolver alteração em apenas um dos quatro genes alfa (talassemia alfa mínima), ou alterações em dois genes alfa (talassemia alfa menor), em três genes alfa (doença de Hb H) e em quatro genes alfa (síndrome da hidropsia fetal ou talassemia alfa maior). Em qualquer das situações patológicas acima mencionadas podem aparecer precipitados de Hb H ([figura abaixo](#)).



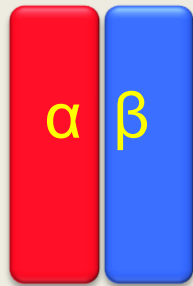
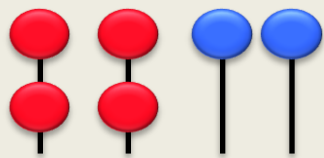
A seta mostra um eritrócito com precipitados de corpos de Heinz em pessoa com talassemia alfa mínima.

Para entender a relação entre genes, talassemia alfa e precipitados de Hb H, a [figura abaixo](#) representa os dois cromossomos 16 com seus quatro genes alfa, e os dois cromossomos 11 com seus dois genes beta. Esses genes sintetizam as globinas alfa (vermelho) e beta (azul) para formarem a Hb A. A globina gama (verde) ao combinar com alfa forma a Hb Fetal. Supressões genéticas nos genes alfa diminuem a síntese de globinas alfa e causam as talassemias alfa.

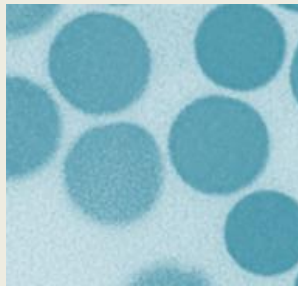


A Hb H surge no eritrócito por conta de *globinas beta livres* que não tiveram as correspondentes globinas alfa para combinarem. As globinas beta se juntam em tetrâmeros (β_4) e formam a Hb H (*figura abaixo*).

A Hb H é instável e tem alta afinidade ao oxigênio, não desempenhando adequadamente a função de transportadora deste gás.

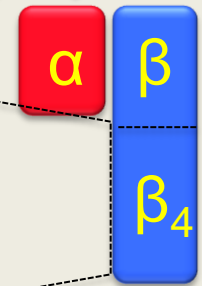
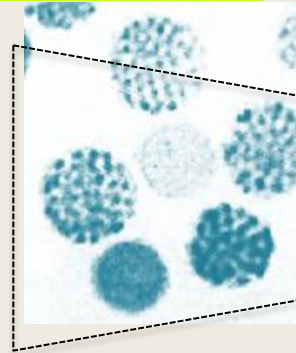
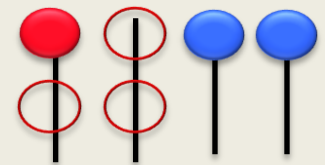


Hb AA
Normal



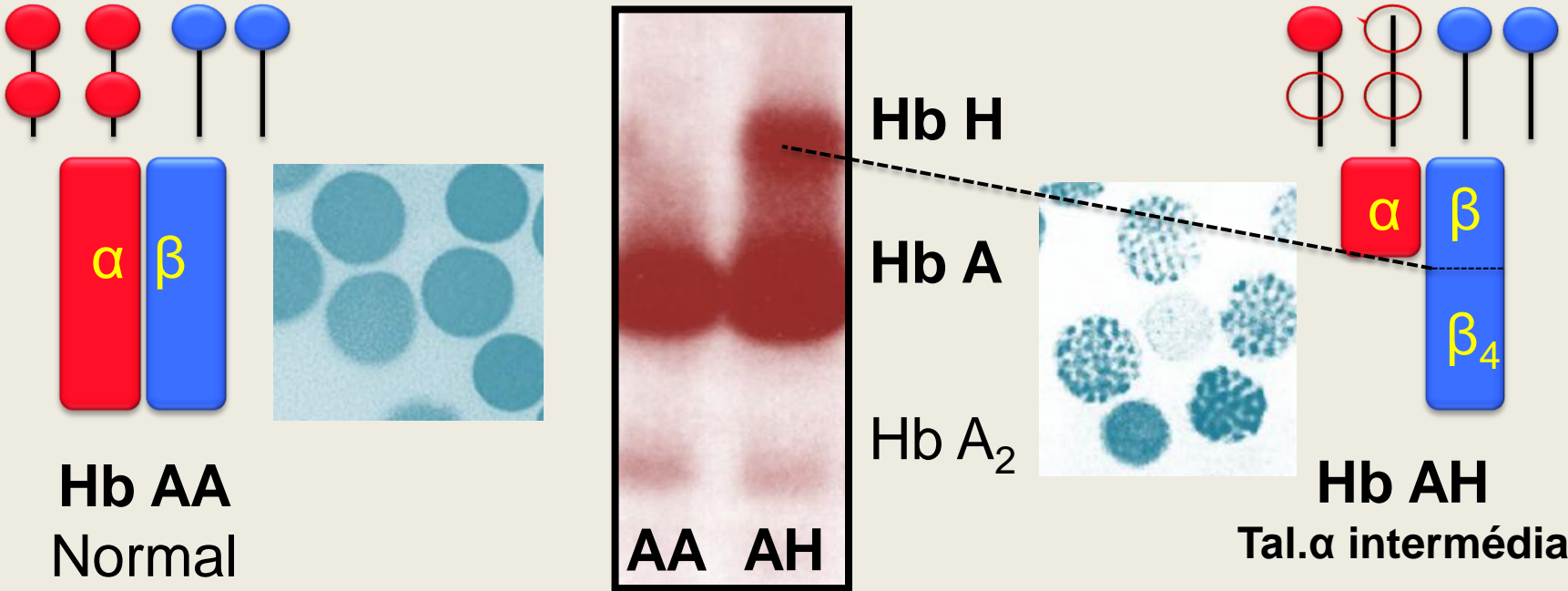
Na Hb AA não há precipitados de Hb H

Na talassemia alfa há precipitados de Hb H



Hb AH
Tal.α intermédia

Quando se faz a eletroforese de hemoglobinas em pessoas com talassemia alfa é possível identificar a Hb H (**figura abaixo**). Quanto maior for a diminuição de globina alfa, maior será a porcentagem de Hb H na eletroforese, determinando as diferentes formas de talassemias alfa em: mínima, menor, intermédia (ou doença de Hb H) e maior (ou síndrome da hidropsia fetal).



As diferentes formas de talassemias alfa são definidas por meio da clínica do paciente, do grau de anemia (eritrograma) e pela concentração de Hb H na eletroforese. A simples presença citológica de Hb H no eritrócito é apenas indicativo de talassemia alfa e não possibilita classificar as suas diferentes formas.

NORMAL

Hb : 12 -16
VCM: 77 - 94
HCM: 27 -32

T. MÍNIMA

Hb : 11,0 -12
VCM: 77 - 94
HCM: 27 -32

T. MENOR

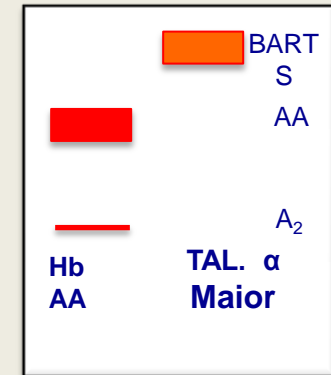
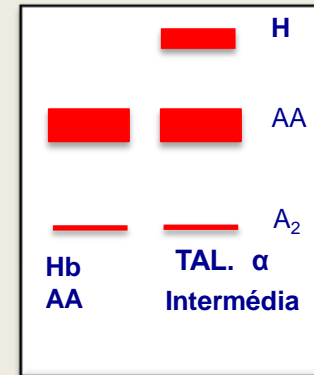
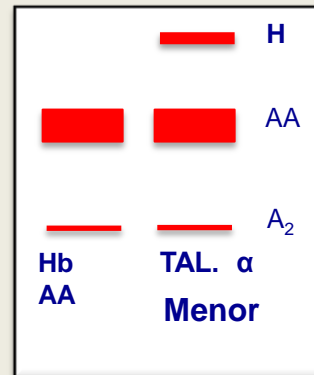
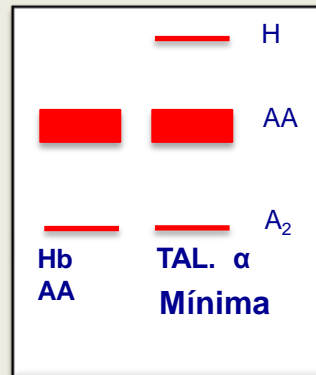
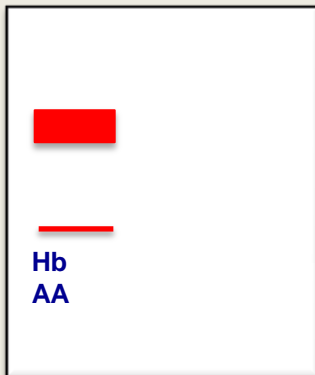
Hb : 10 -11,5
VCM: < 77
HCM: < 27

T. INTERMÉDIA

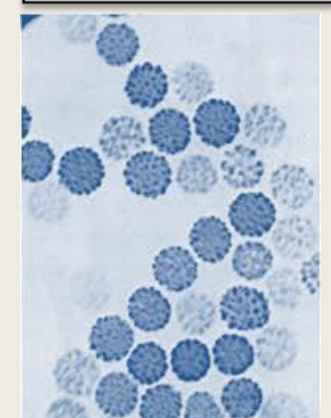
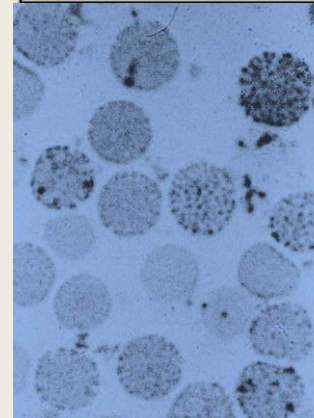
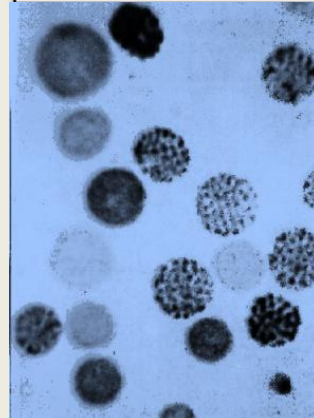
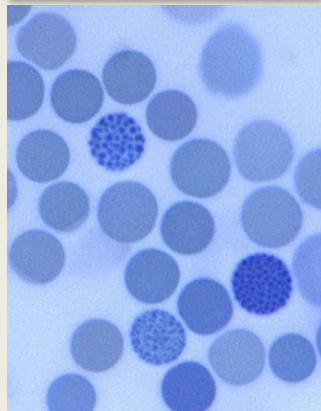
Hb : 9 - 10
VCM: < 77
HCM: < 27

T. MAIOR

Hb : < 4
VCM: <77
HCM: <27



NÃO HÁ
CÉLULAS
COM
INCLUSÕES
DE Hb H



Pesquisa citológica de Hb H

Procedimento técnico: Inicialmente misture num tubo: **300µL** de sangue do paciente com **100µL** de azul de crezil brilhante a 1% em solução salina isotônica. Este corante é “supra vital” e cora especificamente somente estruturas vivas dentro dos eritrócitos: corpos de Heinz, reticulócitos e Hb H (figura 6.13). Agite a mistura cuidadosamente e incube-a em banho maria a 37°C **por 120 minutos**. Em seguida, faça o esfregaço e seque-o ao ar. Examine a lâmina em microscópio com aumento de 1000X (figura abaixo). Após 24 horas o esfregaço se desfaz. Diferentemente dos reticulócitos, não é possível fazer a contra coloração com corantes que usam metanol, pois há degradação de Heinz e Hb H.

Pesquisa citológica de Hb H (continuação)

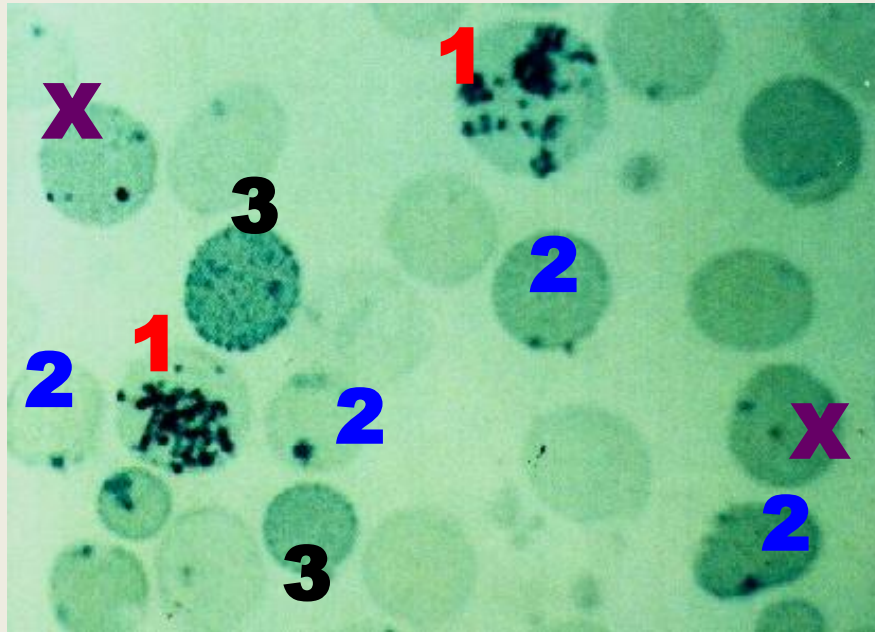


Figura 6.13 -Como diferenciar reticulócitos de corpos de Heinz e precipitados de Hb H.

(1) Reticulócitos (fase inicial)

(2) Corpos de Heinz – estrutura sempre ligada à membrana

(3) Precipitados de Hb H – estrutura homogeneamente distribuída na célula

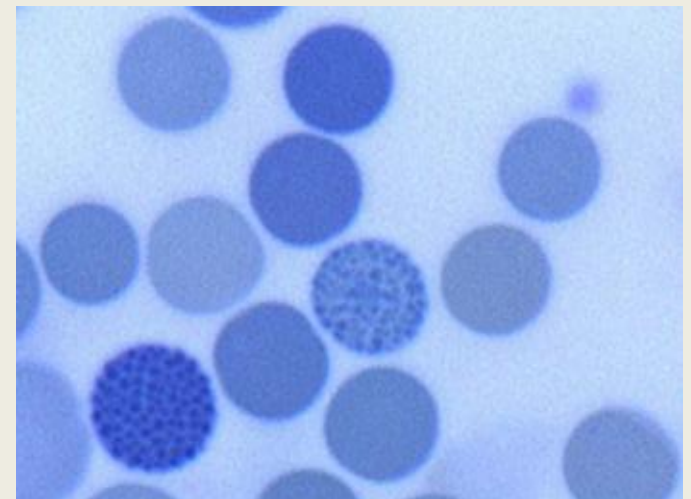
(X) Reticulócito (fase final)

Pesquisa citológica de Hb H (continuação)

Análise citológica: É feita em imersão (1000x) com *avaliação qualitativa* em pelo menos dez campos microscópicos. Resultados positivos ocorrem quando se vê mais de um eritrócito com precipitados de Hb H de forma incontestável (*figura abaixo*). Por vezes, em dez campos pesquisados se encontra(m) eritrócito(s) com Hb H em apenas um deles. No laudo costuma-se reportar como presente (ou positivo) ou ausente (ou negativo).

Este campo microscópio mostra dois eritrócitos com inclusões de Hb H.

Laudo: Presença de Hb H, ou
Citologia positiva para Hb H



Conclusões da pesquisa citológica de Hb H

Talassemias alfa são as formas mais prevalentes entre todas as hemoglobinopatias. A talassemia alfa mínima, por exemplo, está presente em 15 a 30% da população mundial. No Brasil, sua prevalência varia entre 20 e 30%; a talassemia alfa menor de 4 a 5%; a doença de Hb H ocorre na proporção de 1 caso para cada 5 mil pessoas. Por fim, a talassemia alfa maior é raríssima em nossa população. Portanto, quando se faz a pesquisa citológica de Hb H há a necessidade que a mesma seja feita de acordo com a técnica recomendada, com a busca exaustiva em pelo menos dez campos microscópicos. A simples identificação dos precipitados de Hb H tem o significado de que estamos diante de um provável caso de talassemia alfa.

PESQUISA CITOLÓGICA DE ERITRÓCITOS COM Hb FETAL

IMPORTÂNCIA DE SEU USO

**AUMENTO ACIMA DE 5% DE ERITRÓCITOS COM Hb
FETAL INDICA CONTAMINAÇÃO DO SANGUE DA
GESTANTE POR HEMÁCIAS FETAIS**

Introdução:

A hemoglobina fetal (Hb Fetal ou Hb F) faz parte da composição das hemoglobinas humanas, notadamente durante período do desenvolvimento fetal. O recém nascido tem alta concentração desta hemoglobina em seu sangue, mas ao atingir o quarto mês de vida a Hb F é substituída quase integralmente por Hb A. Níveis elevados de Hb F são observados em talassemias beta maior, persistência hereditária de Hb F (PHHF), e em gestantes com hemorragia transplacentária. Exames de Hb F em talassemias e PHHF são feitos por cromatografia em HPLC. Há várias causas que induzem hemorragias materno-fetal ([tabela 6.1](#)). Pesquisas laboratoriais de contaminação materno-fetal se faz citologicamente ([figuras 6.14 e 6.15](#)).

Tabela 6.1 - Causas de hemorragias materno-fetal:

- 1- Cesariana
- 2- Múltiplas gestações,
- 3- Sangramento da placenta prévia ou descolamento
- 4- Remoção manual da placenta
- 5- Manipulação intrauterina
- 6- Aborto
- 7- Parto normal sem complicações.

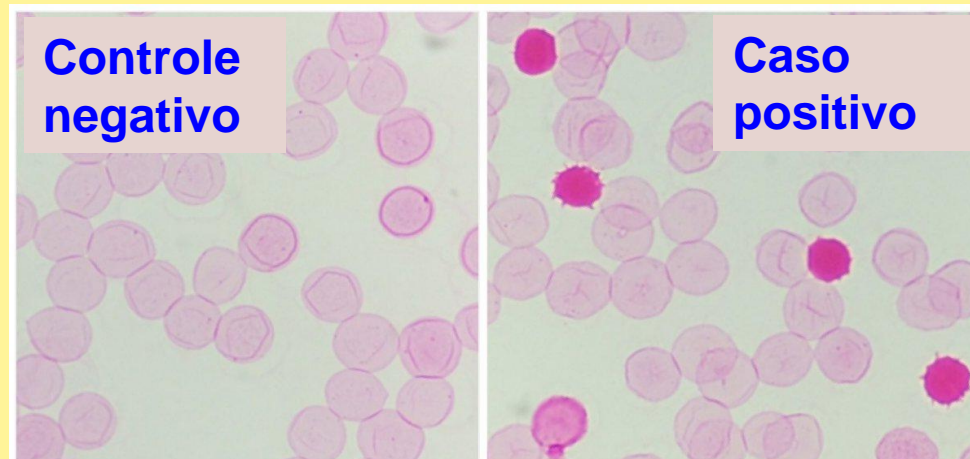


Figura 6.14 – Citoquímica para pesquisar a contaminação no sangue materno de hemácias fetais (à direita, um caso positivo).

Avaliação citológica de eritrócitos com Hb F

Há dois testes para avaliar eritrócitos com Hb F.

O teste citoquímico tem por base o uso de tampão ácido (pH <4) que degrada todo o tipo de hemoglobina, com exceção da Hb F, que é ácido resistente. Em seguida se faz a coloração de contraste. Eritrócitos com Hb F se coram e são contados porcentualmente.

Valores até 5% são aceitáveis até o terceiro trimestre.

Acima de 5% é indicativo de contaminação da gestante por sangue do feto.

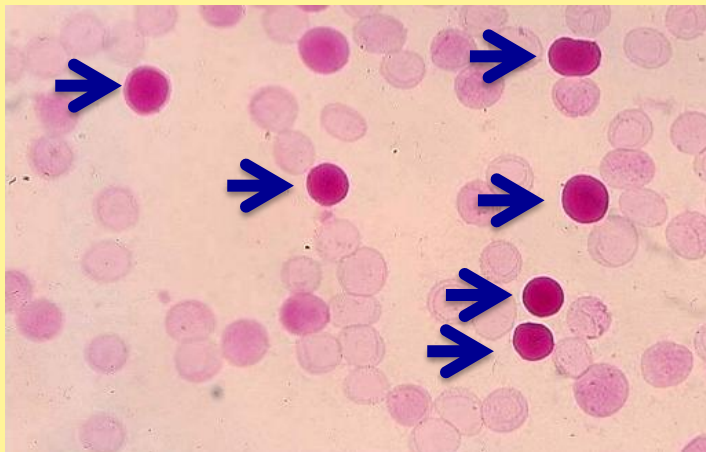


Figura 6.15 – Caso positivo de contaminação de gestante com hemácias fetais (setas).

Lauda: Positivo para contaminação de hemácias fetal. Resultado: 10% de hemácias fetais

Avaliação citológica de eritrócitos com Hb Fetal

O outro teste é feito por metodologia imunofluorescente com anticorpos anti-HbF, associado, ou não, com citometria de fluxo (figura 6.16). Este teste está disponível na maioria dos laboratórios de apoio.

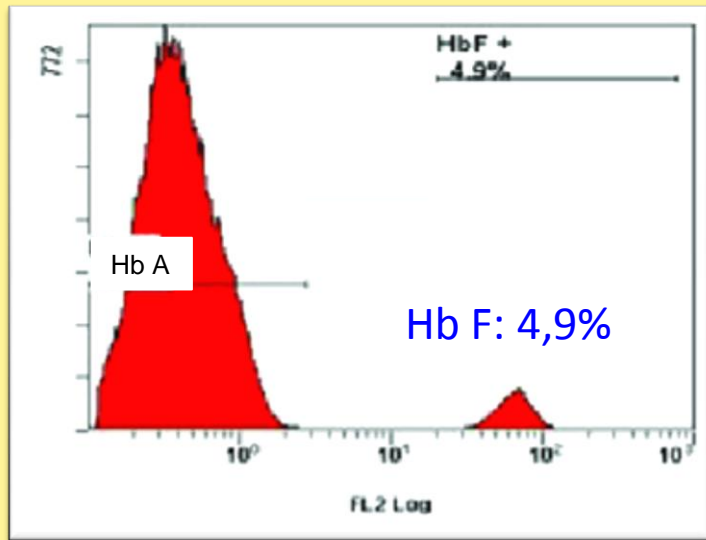


Figura 6.16 – Gráfico emitido por citometria de fluxo de um caso com suspeita de hemorragia materno-fetal. Resultado: 4,9% (Normal: até 5%).

Lauda: Negativo para contaminação por hemácias fetal. Resultado: 4,9%

Descrevemos, a seguir, a técnica de citoquímica descrita por Kleihauer e Betke para corar eritrócitos com Hb F (hemácias fetais).

Reagentes do teste citoquímico de Kleihauer-Betke:

Tampão citrato-fosfato pH 3-3,5 (previamente aquecido a 37°C)

Solução aquosa de eritrosina a 1%, ou azul de metileno a 2%

Solução de etanol a 80%

Procedimento:

1- Faça três esfregaços finos com sangue da gestante;

2- Fixar um dos esfregaços com etanol a 80% por 5 minutos e, em seguida, lave-o cuidadosamente com água e seque-o ao ar;

3- Cobrir o esfregaço com o tampão citrato-fosfato pH 3-3,5 por 5 minutos e, em seguida, lave-o com água e seque-o ao ar.

4- Corar com eritrosina (contraste) a 1%, ou azul de metileno a 2%, por 2 minutos; lave-o em água corrente e seque-o ao ar.

5- Analise microscopicamente no aumento 400X. Faça a contagem do número de eritrócitos corados e relacione-os com não corados, em pelo menos dez campos microscópicos.

6- Calcule a porcentagem de eritrócitos corados (com Hb Fetal).

Use os outros dois esfregaços para repetir o exame em caso de dificuldades técnicas.

Conclusões da pesquisa citológica de eritrócitos com Hb Fetal

O método citológico da técnica de Kleihauer-Betke, que avalia a resistência da Hb F intraeritrocitária diante de soluções de pH abaixo de 4, é o mais fácil de ser executado em qualquer laboratório. Seu custo/benefício é atraente, mas é preciso de treinamento técnico e experiência. Por outro lado, o método automatizado que avalia a quantidade de hemácias fetais (eritrócitos com Hb F) através de reação imunológica com anticorpos anti-Hb F, seguida de leitura por citometria de fluxo é o mais sensível.

De qualquer forma, a interpretação dos resultados deve ser segura, pois implica em procedimentos médicos de importância vital para a paciente.

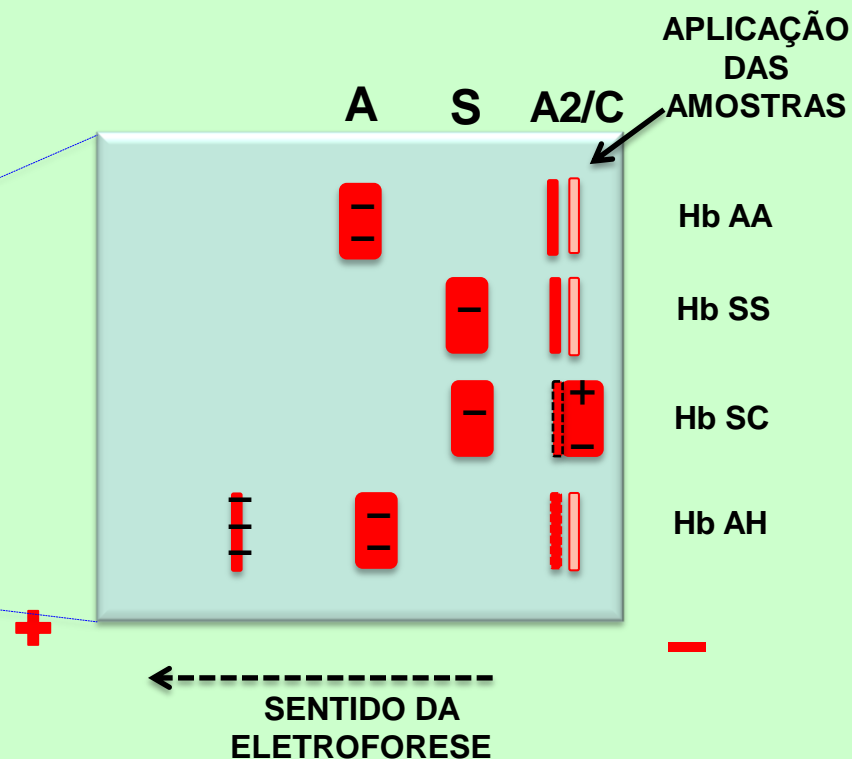
ELETROFORESE E CROMATOGRRAFIA DE HEMOGLOBINAS

IMPORTÂNCIA DE SEU USO

**IDENTIFICAR HEMOGLOBINOPATIAS
(HEMOGLOBINAS VARIANTES E TALASSEMIAS)**

Introdução

Eletroforese é uma metodologia laboratorial que fraciona proteínas por suas cargas elétricas. Para realizar o fracionamento é preciso ter um campo elétrico num gel de agarose, acetato de celulose, ou em gel de sílica. Este campo é delimitado por dois polos, um negativo e outro positivo, e por uma corrente elétrica entre 80 a 500 volts (**figuras abaixo**).



Introdução (continuação)

As eletroforeses de hemoglobinas podem ser feitas por três diferentes procedimentos técnicos:

manual, semiautomático e automático.

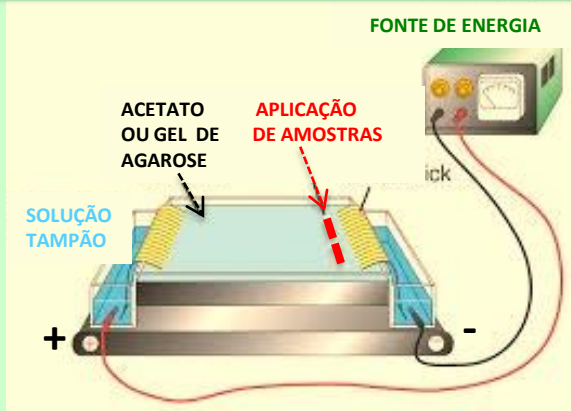
Os procedimentos manuais e semiautomáticos são os mais comuns na rotina de laboratórios clínicos. Estas duas técnicas usam como meio de separação o acetato de celulose e o gel de agarose, ambos com tampões alcalinos (pH 8 a 9).

A eletroforese automatizada, por sua vez, é feita por meio de sistema capilar com registros gráficos, e é mais usada por laboratórios de apoios.

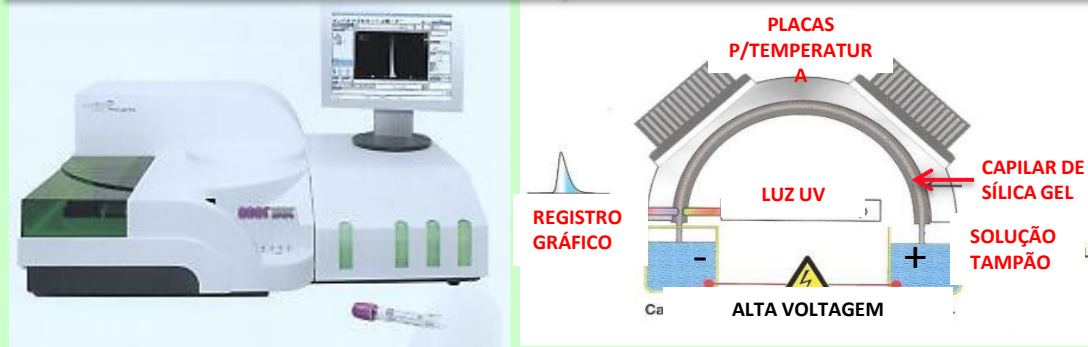
A [figura 6.17](#) mostra os principais meios de fracionamento de hemoglobinas por eletroforese.

Figura 6.17 – Eletroforeses de hemoglobinas

PROCEDIMENTO MANUAL

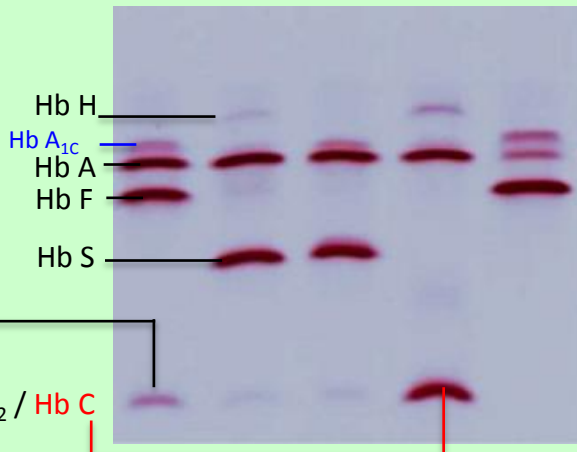


PROCEDIMENTO SEMIAUTOMÁTICO

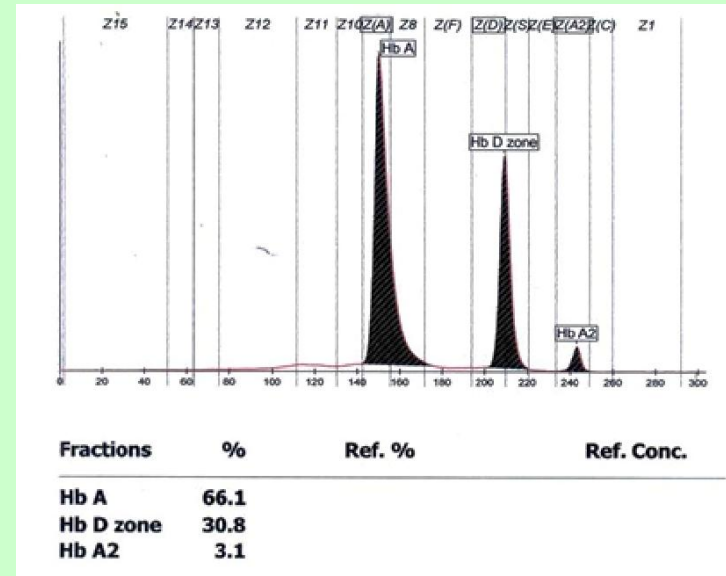


EQUIPAMENTO DE ELETROFORESE CAPILAR

EQUIPAMENTOS USADOS EM ELETROFORESES MANUAL E SEMIAUTOMÁTICA



VISUAL DOS RESULTADOS DE DIFERENTES HEMOGLOBINAS: A, A_{1c}, J,S, F, A₂ E C.



VISUAL DOS RESULTADOS DA ELETROFORESE CAPILAR

Introdução (continuação)

A **cromatografia** é uma metodologia laboratorial que separa proteínas e outros produtos químicos através de suas massas moleculares (pH, peso atômico etc.). As técnicas podem ser manual, semiautomática e automática. Para identificar hemoglobinas normais e anormais usa-se a cromatografia líquida de alta pressão, conhecida por HPLC, que consiste no bombeamento com alta pressão de solventes específicos para os produtos que se desejam separar. Cada componente da amostra analisada (*por ex.: Hb A, Hb S Hb A₂ e Hb F*) reage com seu solvente específico e se move com diferentes velocidades de um extremo ao outro da coluna de cromatografia, e seu desempenho é registrado ([figura 6.18](#)).

Figura 6.18 – Cromatografia de hemoglobinas por HPLC

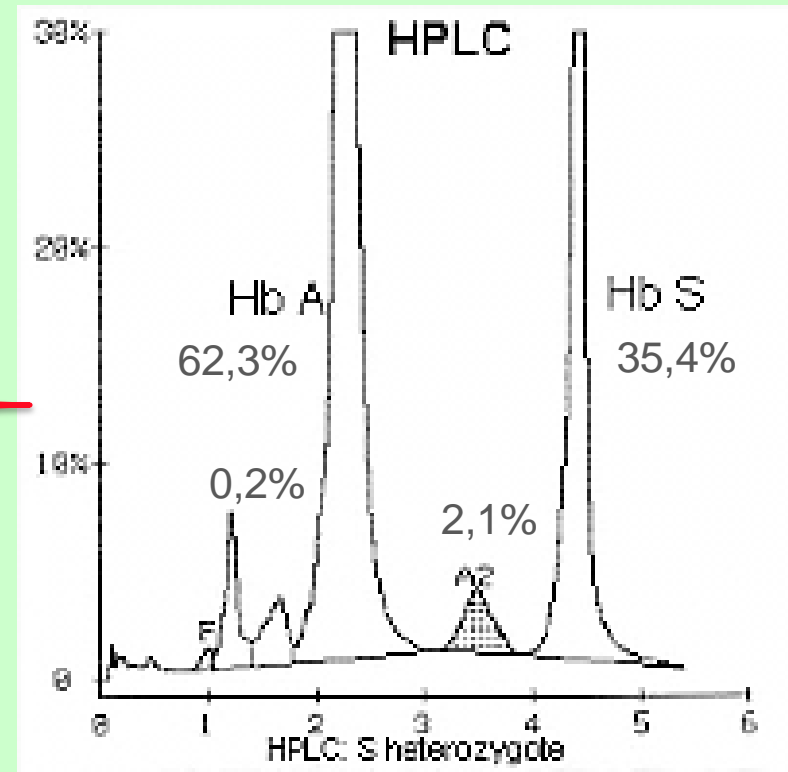
Bomba de alta pressão



Coluna de aço para suportar a alta pressão



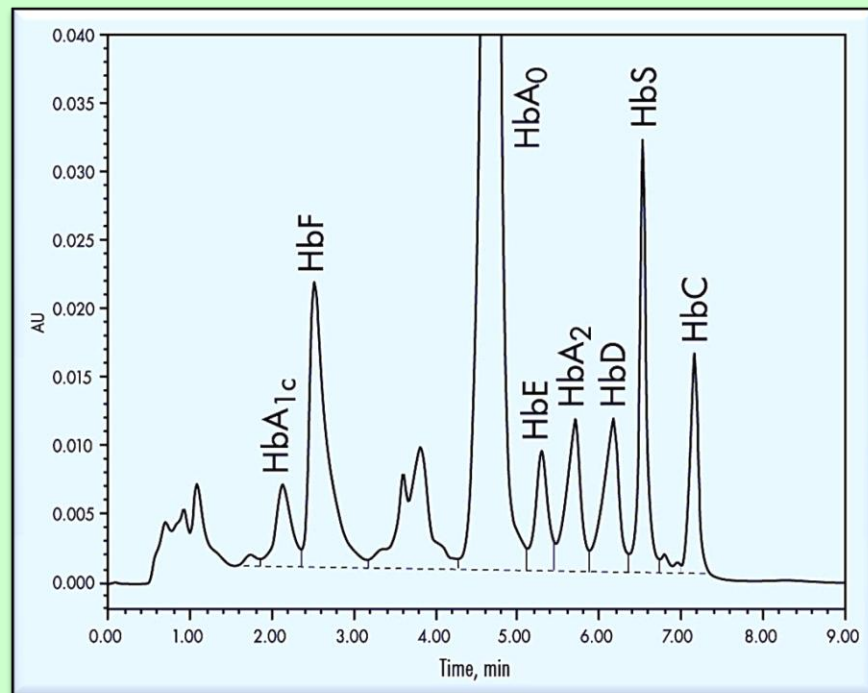
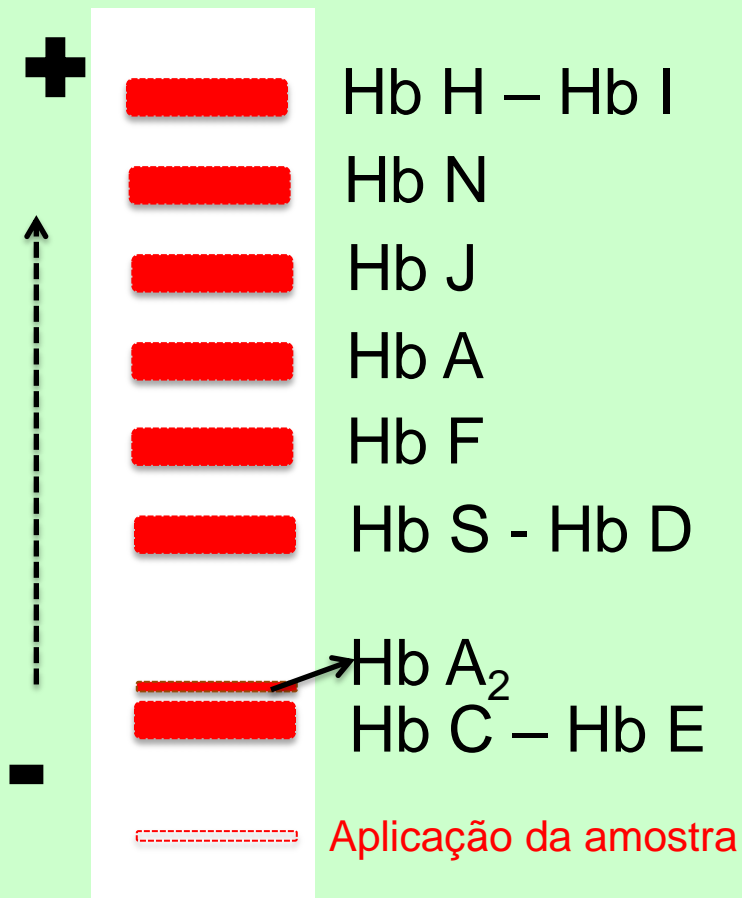
Equipamento principal e seus principais componentes



VISUAL DOS RESULTADOS DE CROMATOLOGRAFIA HPLC DE UMA ANÁLISE DE TRAÇO FALCIFORME, OU Hb AS: (Hb A: 62,3%, Hb S:35,4%,Hb A₂: 2,1% e Hb F: 0,2%)

Interpretação dos resultados

As interpretações dos resultados de eletroforeses e cromatografias são orientadas por meio de mapas de posicionamentos padrões das principais hemoglobinas normais e anormais, conforme mostram as **figuras abaixo**:



CROMATOGRAFIA HPLC

ELETROFORESE ALCALINA

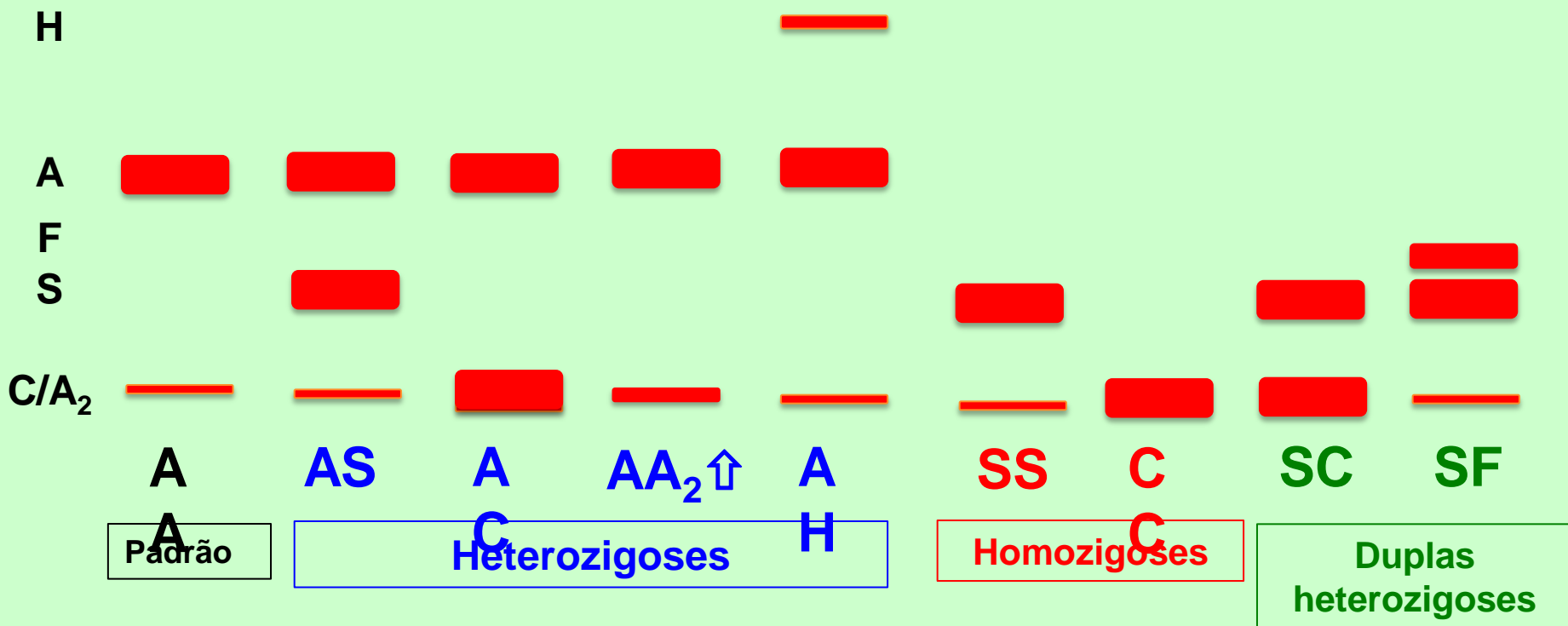
Interpretação dos resultados (continuação)

Independentemente da metodologia usada (eletroforese ou cromatografia), a interpretação inicial está fundamentada na condição genética da hemoglobinopatia, por exemplo:

Heterozigoses: Hb AS, Hb AC, Tal. β menor (Hb AA₂↑), Hb AH etc.

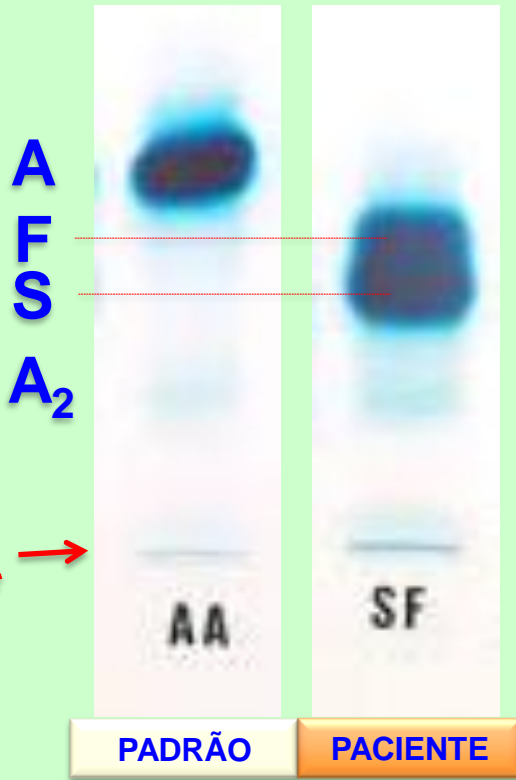
Homozigoses: Hb SS, Hb CC etc.

Duplas heterozigoses: Hb SC, Tal. β /Hb S (Hb SF) etc.



Interpretação dos resultados (continuação)

É necessário que no laudo laboratorial conste, além do genótipo, os valores percentuais de cada hemoglobina.



LAUDO
LHM, 12 anos masculino
Resultado da eletroforese: Hb SF

Hb A = 0,0%

Hb F = 28,2%

Hb S = 66,3%

Hb A₂ = 5,5%

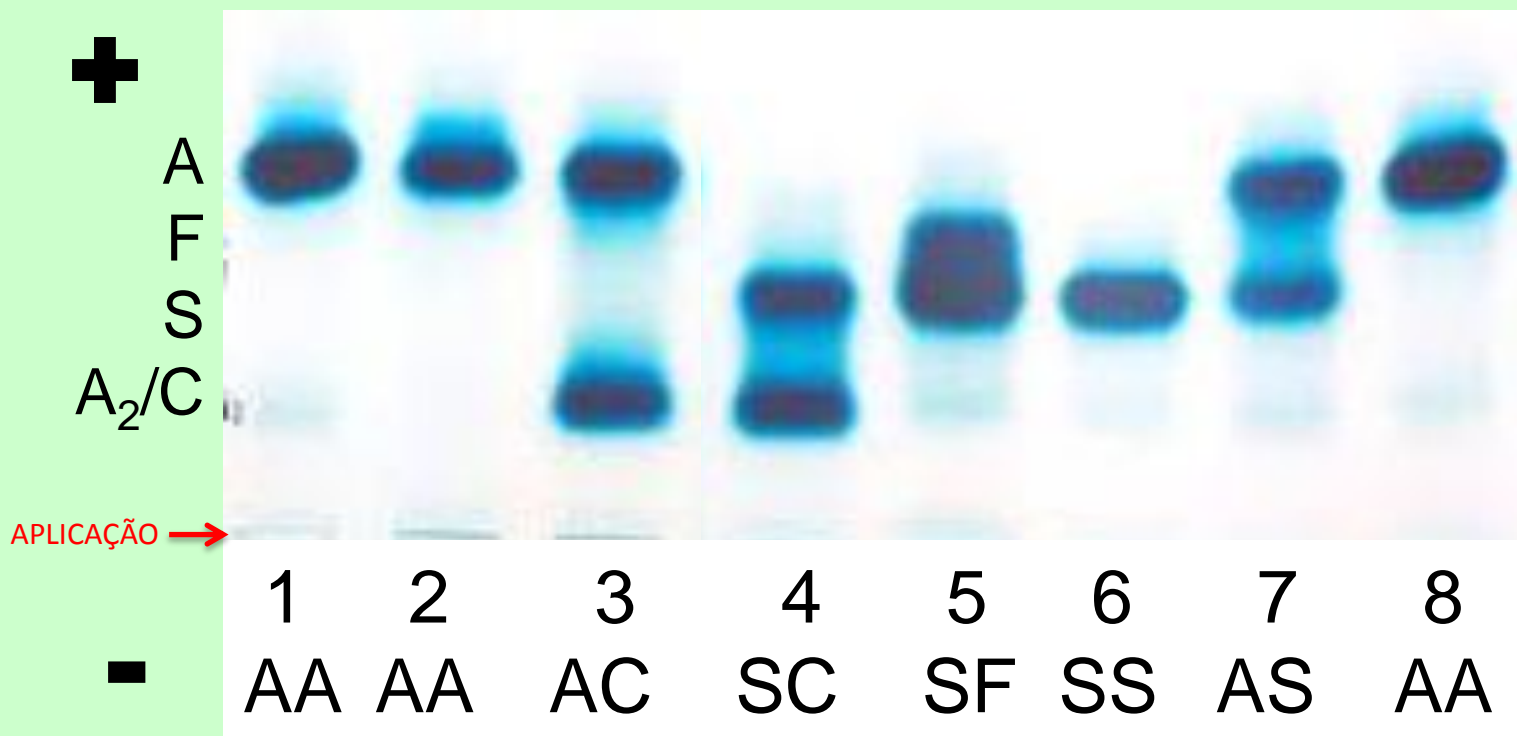
Comentário em relação a este caso

Este é um caso difícil, pois o genótipo Hb SF pode ocorrer na anemia falciforme com Hb F elevada, ou na Talassemia beta/Hb S.

Portanto o diagnóstico final fica sob responsabilidade do médico.

* **Aplicação das amostras**

Exemplo de interpretação de genótipos de Hbpatias



1 e 8 - Hb AA (**Hb NORMAL**)

2 - Hb AA (**COM Hb A₂ DIMINUÍDA**)

3 - Hb AC (**HETEROZIGOSE DE Hb AC**)

4 - Hb SC (**DUPLA HETEROZIGOSE DE Hb ANORMAIS**)

5 - Hb SF (**DOENÇA FALCIFORME COM Hb FETAL ELEVADA**)

6 - Hb SS (**ANEMIA FALCIFORME – HOMOZIGOSE DE Hb S**)

7 - Hb AS (**TRAÇO FALCIFORME – HETEROZIGOSE DE Hb S**)

Reagentes para eletroforese manual de hemoglobinas:

Tampão Tris-EDTA-borato, pH 8,5 a 9,0

Tris-hidroximetil-aminometano10,2 gramas

EDTA(ácido etileno tetracético).... 0,6 gramas

Ácido bórico..... 3,2 gramas

Água destilada q.s.p..... 1,0 litro

Procedimento para gel de agarose e acetato de celulose:

1- Mergulhar o gel ou a fita de acetato de celulose no tampão por 20 a 30 minutos antes do uso.

2- Aplicar as amostras de hemolisados de sangue (100µl de sangue + 100 µl de saponina de alta pureza a 1%).

3- Após colocar o gel de agarose ou o acetato de celulose no suporte da cuba de eletroforese, passar 180 volts (gel) ou 300 volts (acetato de celulose).

4- Acompanhar visualmente a corrida eletroforética (geralmente 40 minutos).Retirar o gel ou acetato e corar com negro de amido ou vermelho ponceau por 15 minutos. Descorar com acido áctico a 5% e analisar o fracionamento.

Conclusões de eletroforese e cromatografia de hemoglobinas

A identificação de hemoglobinas anormais e talassemias somente por resultados de eletroforeses nem sempre oferecem um diagnóstico conclusivo. Haverá sempre a necessidade de conhecer a história clínica dos pacientes, seus eritogramas com morfologias eritrocitárias. No entanto, em situações específicas, por exemplo, Hb Instáveis e talassemias alfa, é preciso pesquisas complementares: citologia de corpos de Heinz e teste de instabilidade térmica para hemoglobinas instáveis, e citologia para presença de Hb H. Não obstante, a eletroforese e a cromatografia de hemoglobinas nos proporcionam possibilidades de direcionar os diagnósticos destas patologias.

TESTE PARA IDENTIFICAR HEMOGLOBINAS INSTÁVEIS

IMPORTÂNCIA DE SEU USO

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE Hb INSTÁVEL

Introdução

As hemoglobinas instáveis são decorrentes de mutações de aminoácidos que ocupam regiões da molécula que dão estabilidade à hemoglobina (figura 6.19a). A troca de um aminoácido por outro diferente provoca lesões na estrutura molecular da hemoglobina, deixando-a extremamente sensível ao aumento da temperatura *in vivo*, em casos de febre, e *in vitro*, quando se faz o teste laboratorial. A maioria das Hb Instáveis desnaturam quando submetidas ao teste térmico de 55 graus centígrados. A desnaturação é vista por meio de floculação após 10 minutos do início do teste, seguida de intensa precipitação aos 20 minutos. As Hb normais, e anormais não instáveis, não se precipitam (figura 6.19b)

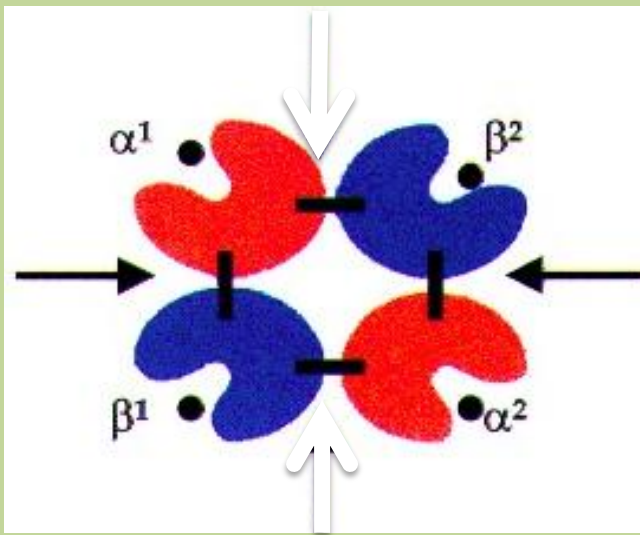


Figura 6.19a – Molécula da Hb. As setas pretas mostram as regiões em que aminoácidos de globinas alfa e beta se posicionam e dão estabilidade à hemoglobina. Mutações nestas regiões causam Hb Instáveis.

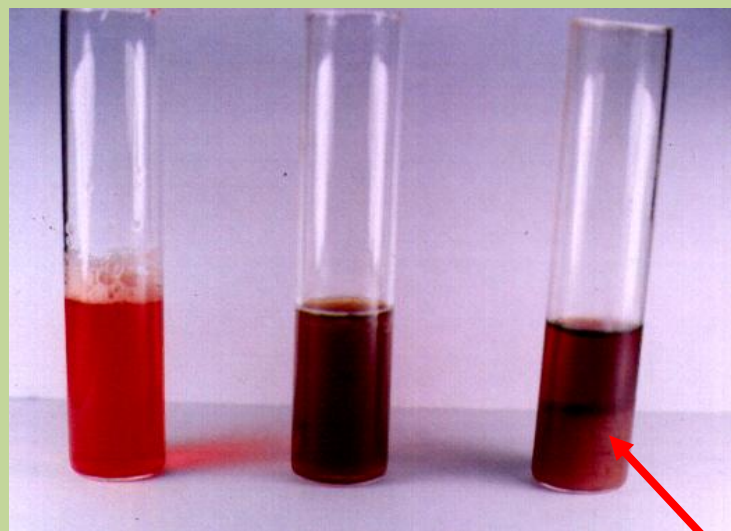


Figura 6.19b – Resultado do teste de instabilidade térmica (55⁰C) para identificar Hb Instáveis. É aconselhável fazê-lo comparando-o com o resultado de uma hemoglobina normal.

Início

10
min

20
min

**Precipitado
da Hb
Instável**

Técnica para teste de instabilidade de Hb

Tampão fosfato pH 7,4 para o teste de instabilidade térmica

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,25 gramas

KH_2PO_4 1,42 gramas

Procedimento técnico

- 1) Colocar em tubo de hemólise 200 ul de sangue total + 100 ul de saponina a 1%. Homogenizar. Adicionar, a seguir, 2 ml do tampão fosfato. Homogenizar e levar ao banho maria a 55°C.
- 2) Verificar o tubo após 10 e 20 minutos de incubação.

Interpretação

As Hb Instáveis floculam com 10 minutos de incubação, e aos 20 minutos se precipitam. As hemoglobinas normais não floculam aos 10 minutos e nem precipitam aos 20 minutos.

TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA

***IMPORTÂNCIA DE SEU USO
CONFIRMAR A ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA***

Princípios da técnica de fragilidade osmótica

Esta técnica se fundamenta na capacidade da permeabilidade dos eritrócitos em resistir a hemólise quando submetidos às diluições em soluções de cloreto de sódio (NaCl) com diferentes concentrações, variáveis entre 0,1 a 0,9% (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9).

Sangue de pessoas **sem esferocitose** tem hemólises intensas entre 0,1 e 0,4% (figura 6.20a).

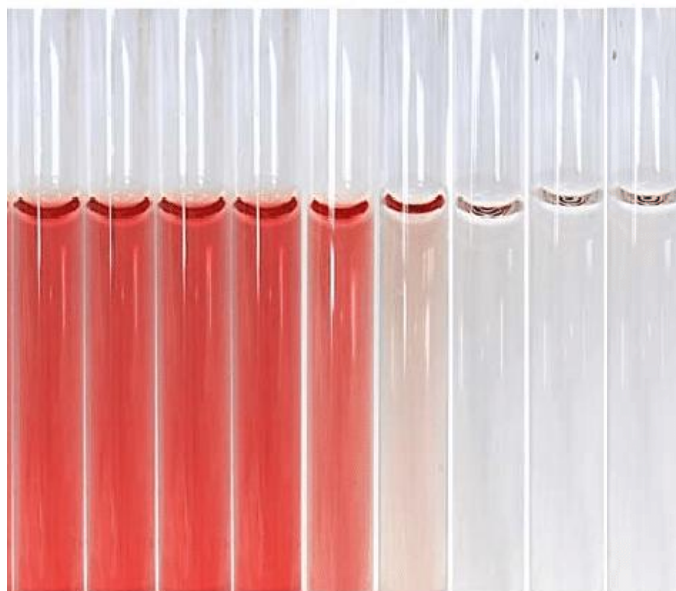
Sangue de pessoas **com esferocitose** tem hemólises intensas até 0,7%, podendo, às vezes, hemolisar em 0,8% (figura 6.20b).

A figura 6.20 mostra dois conjuntos de exames (a e b) com tubos para teste de hemólises em pessoa sem esferocitose e com esferocitose hereditária.

Figura 6.20 – Tubos com diferentes concentrações de NaCl para teste de fragilidade osmótica em teste padrão (sem esferocitose) e em teste para paciente com esferocitose hereditária).

**SEM ESFEROCITOSE
HEREDITÁRIA**

a



Tubos com
soluções de NaCl

0,10 0,20 0,30 0,40 0,50 0,60 0,70 0,80 0,90

INTENSIDADE DEHEMÓLISE



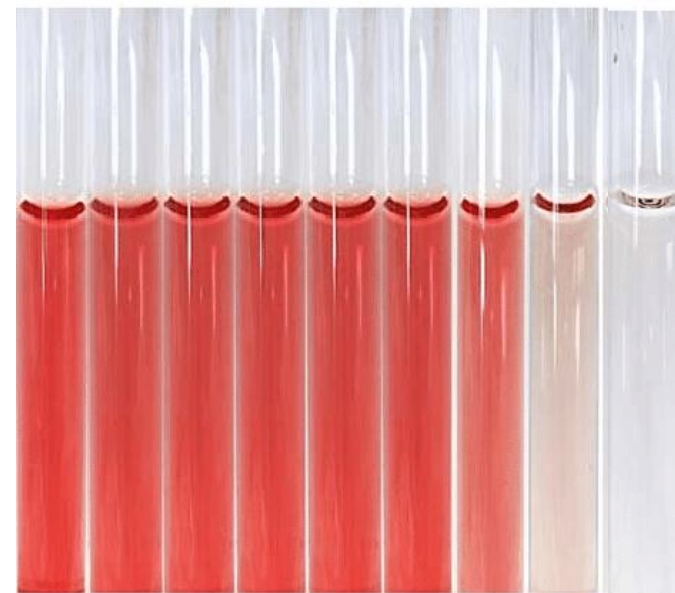
0.1

A

0,6%

**COM ESFEROCITOSE
HEREDITÁRIA**

b



0,10 0,20 0,30 0,40 0,50 0,60 0,70 0,80 0,90

INTENSIDADE DE HEMÓLISE



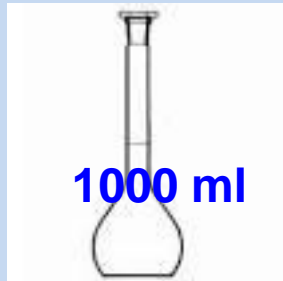
0.1

A

0,8%

Procedimento técnico: preparação das soluções de NaCl

Solução estoque



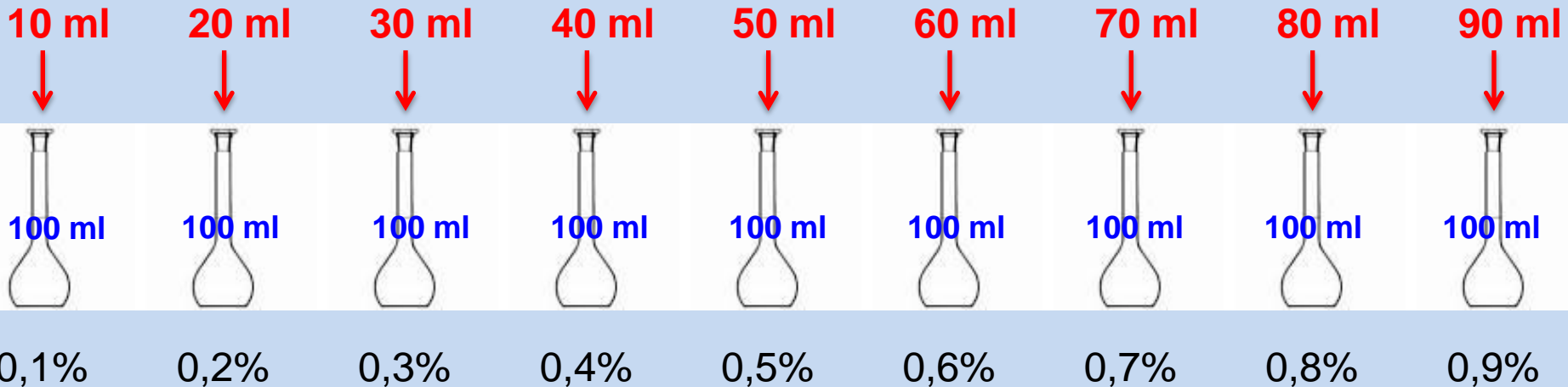
1- Solução estoque de NaCl:

Coloque 10 gramas de sal de NaCl (PA)* em balão volumétrico e dilua para 1000 ml (qsp) com água destilada. Homogenizar e guardar em refrigerador.

PA – Para Análise

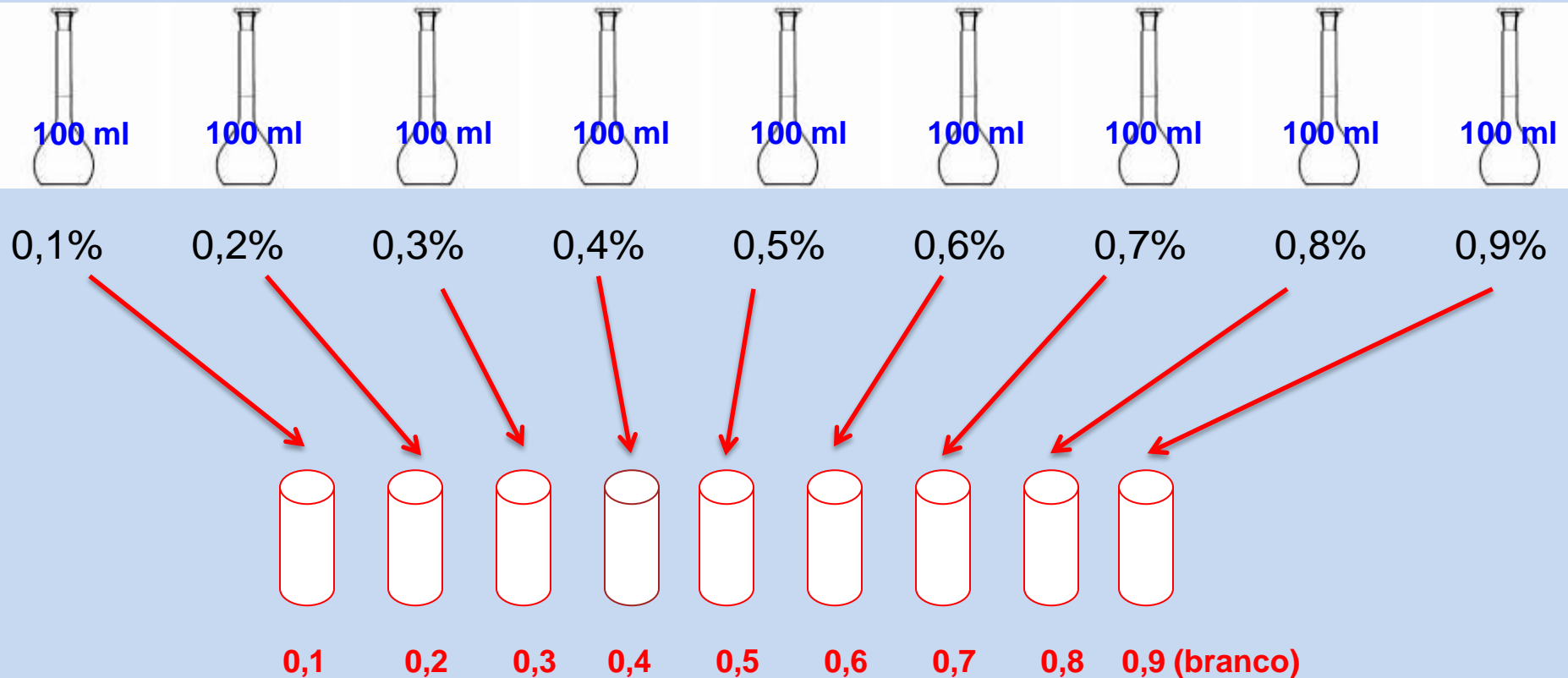
2- Solução trabalho de NaCl:

Em seguida, pipete os volumes abaixo (cor vermelha) para cada concentração e complete para 100 ml (qsp). Por fim, transfira a solução de cada balão para frascos identificados com as concentrações e os mantenha em refrigerador.



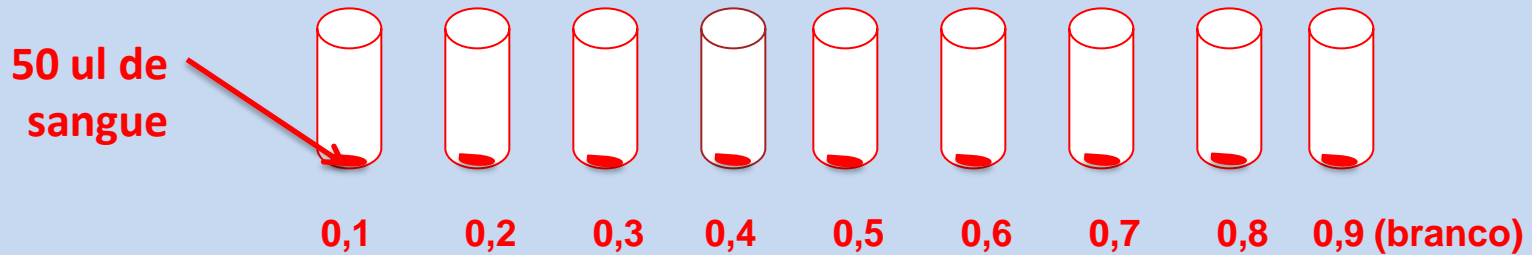
3- Transferência das soluções para tubos de hemólises:

Transfira para cada tubo de hemólise **exatamente 5 ml** de cada solução estoque. Não se esqueça de identificar os tubos com suas respectivas concentrações.



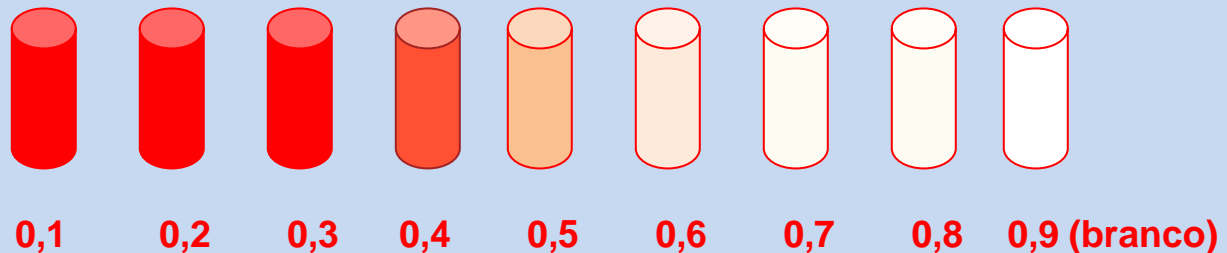
4- Colocação de sangue nos tubos:

Coloque em cada tubo de hemólise, já preenchido com a respectiva solução de NaCl, **exatamente 50 ul** de sangue. Homogenize cada tubo por vez e deixe-o em repouso por 10 minutos para que ocorra o processo de hemólise.



5- O processo de hemólise:

Após os 10 minutos, faça uma análise visual da hemólise e, em seguida, e com o auxílio de uma pipeta, transfira os sobrenadantes de cada tubo para outros limpos e secos para a realização das leituras quantitativas de hemólises. **Não se esqueça de identifica-los.**



6- Leitura dos graus de hemólises:

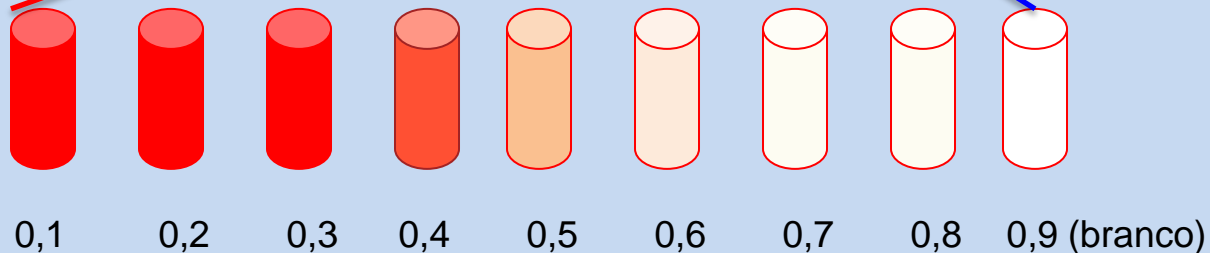
Este processo técnico é feito em fotocolorímetro ou espectrofotômetro.

- Inicialmente calibre o zero da densidade óptica em 540nm (ou filtro verde) com a solução sobrenadante de NaCl 0,9%.
- Em seguida, faça a leitura da densidade óptica (DO) do sobrenadante da solução de NaCl 0,1% para obter o valor referente a 100% de hemólise.
- Faça a leitura das outras soluções de NaCl e anote a DO de cada uma delas.

A leitura da DO do sobrenadante deste tubo representa 100% de hemólise



Com o sobrenadante deste tubo padroniza-se o zero da DO.



No próximo slide exemplicamos a leitura de um caso normal.

7- Resultados das leituras e os graus de hemólises nas diferentes concentrações de NaCl (um exemplo):

EXEMPLO:

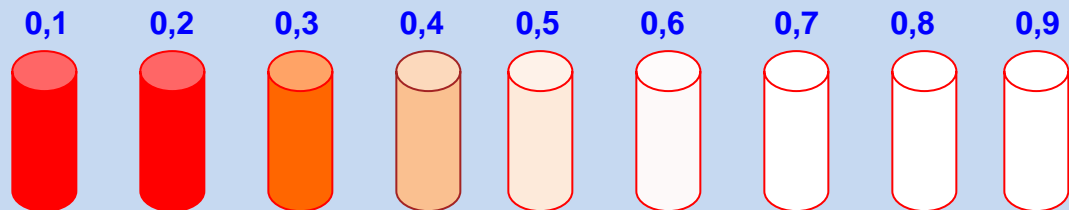
Densidade Óptica do tubo NaCl 0,1% que corresponde a 100% de hemólise foi de: 0,8	
Densidade Óptica do tubo NaCl 0,2% foi de... 0,8 e o valor de hemólise é 100%	
Densidade Óptica do tubo NaCl 0,3% foi de... 0,7	“ 87,5%
Densidade Óptica do tubo NaCl 0,4% foi de... 0,4	” 50%
Densidade Óptica do tubo NaCl 0,5% foi de... 0,2	” 5%
Densidade Óptica do tubo NaCl 0,6% foi de... 0,05	” 2%
Densidade Óptica do tubo NaCl 0,7% foi de... 0,00	” 0,5
Densidade Óptica do tubo NaCl 0,8% foi de... 0,00	” 0

AO APLICARMOAS A REGRA DE TRÊS

NaCl 0,1% : 0,8-----100%
 NaCl 0,2%: 0,8-----X **X= 100%**

NaCl 0,1% : 0,8-----100%
 NaCl 0,3%: 0,7-----X **X= 87,5%**
 Assim por diante.....

Tubos com concentrações de NaCl:



Resultados dos graus de hemólises

*100% 100% 87,5% 50% 5% 2% 0,5% 0% Branco

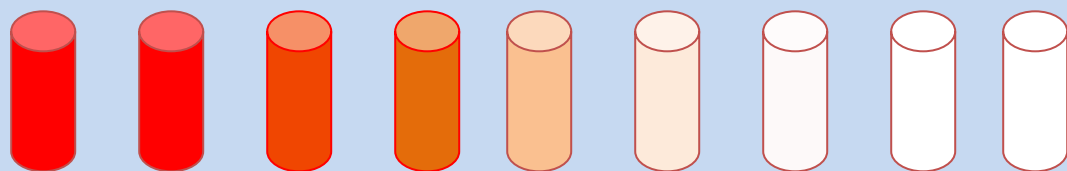
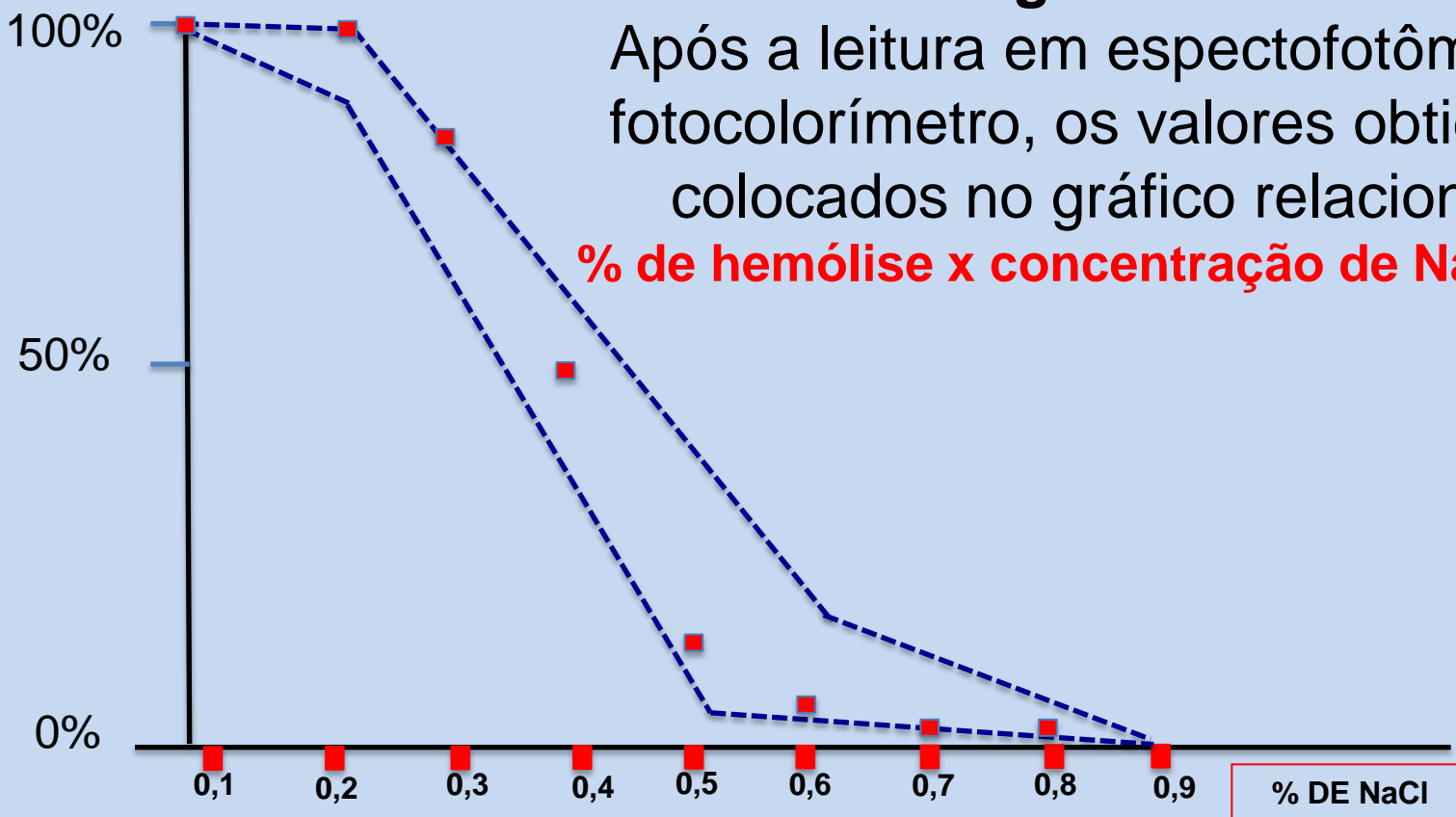
*Referência de 100% de hemólise

% DE HEMÓLISE

8- Curva de fragilidade osmótica (FO):

Após a leitura em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, os valores obtidos são colocados no gráfico relacionando

% de hemólise x concentração de NaCl.



0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0,8 0,9 (branco)

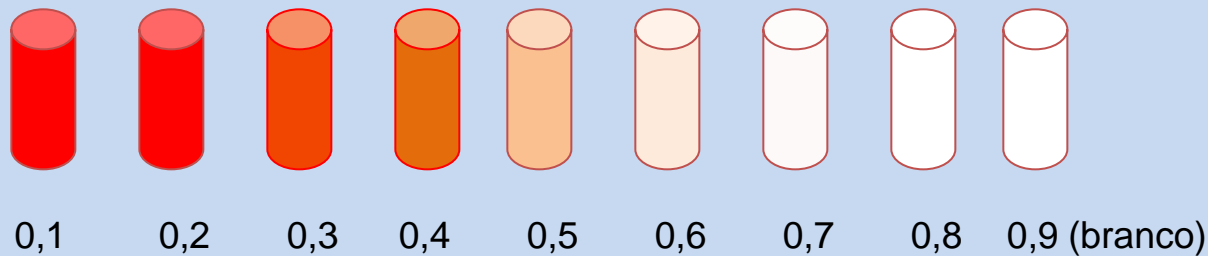
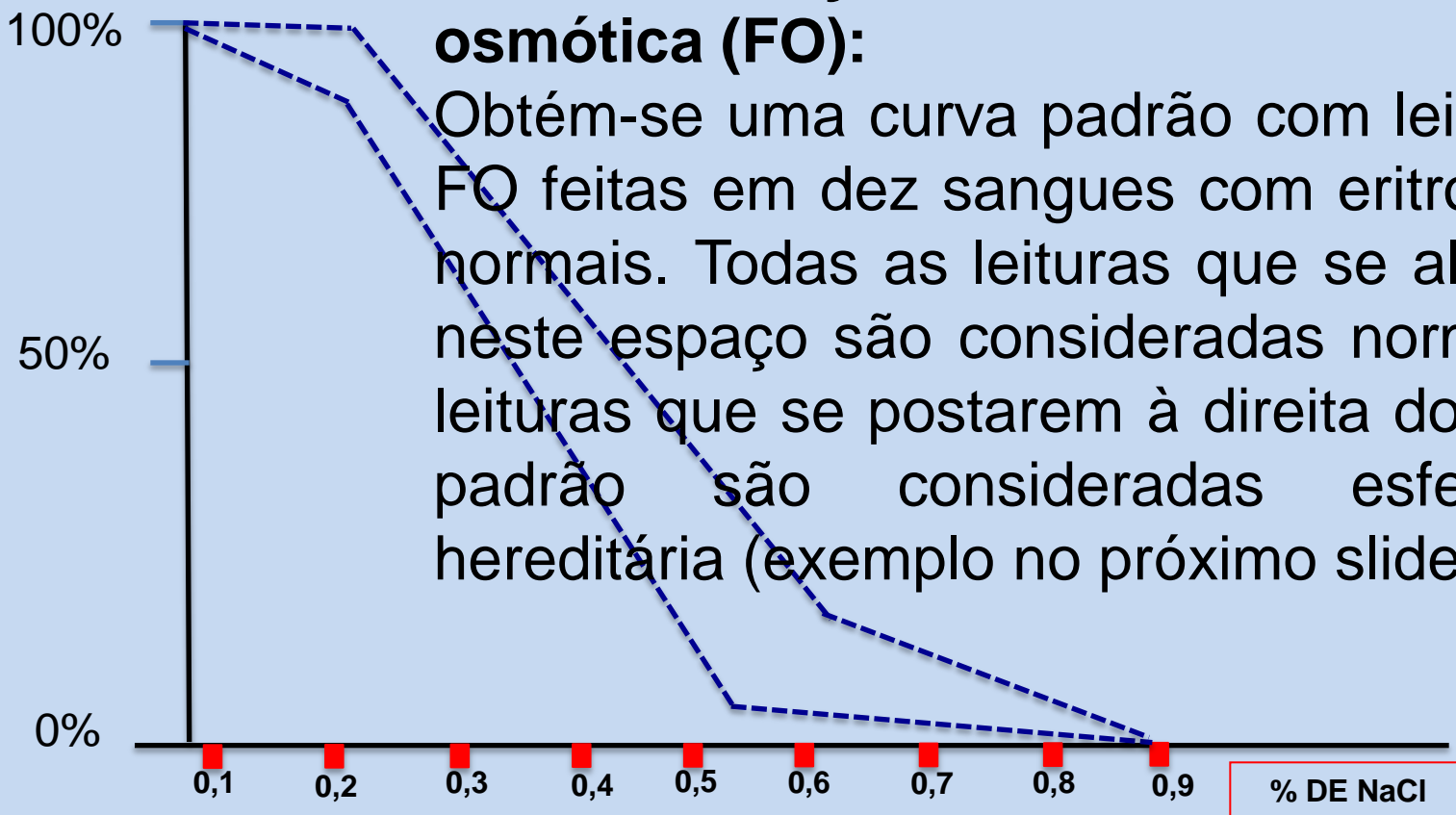
100	100	90	75	30	10	5	0	0
100	100	70	30	10	5	0	0	0

VALORES MÁXIMOS E MÍNIMOS DE HEMÓLISES (%) EM SANGUE PADRÃO

% DE HEMÓLISE

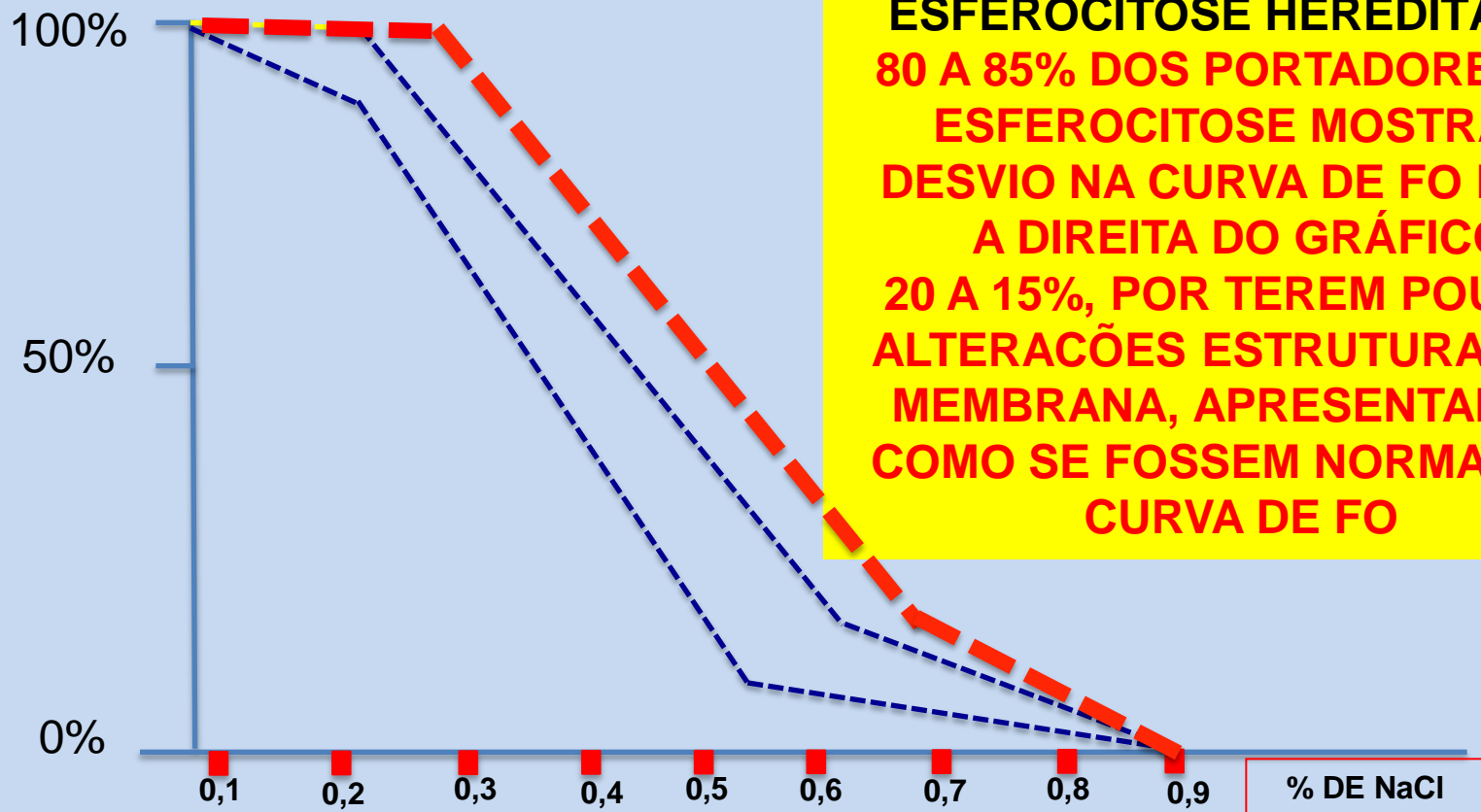
9- Padronização da curva de fragilidade osmótica (FO):

Obtém-se uma curva padrão com leituras de FO feitas em dez sangues com eritogramas normais. Todas as leituras que se alinharem neste espaço são consideradas normais. As leituras que se postarem à direita do espaço padrão são consideradas esferocitose hereditária (exemplo no próximo slide).

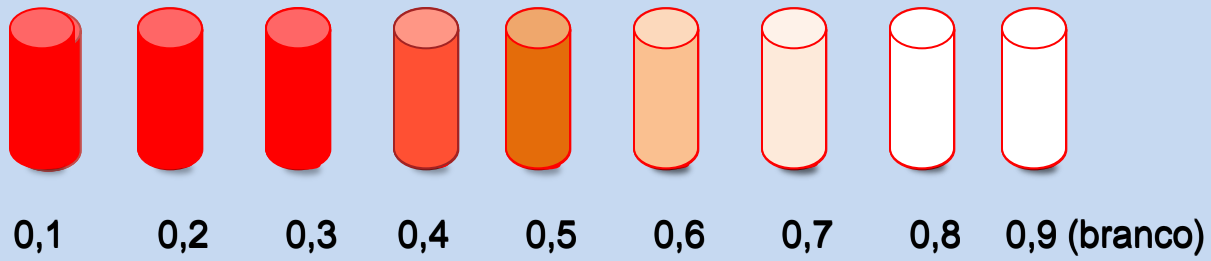


100	100	90	75	25	10	5	0	0
100	100	70	30	10	5	0	0	0
VALORES MÁXIMOS E MÍNIMOS DE HEMÓLISES (%) EM SANGUE PADRÃO								

% DE HEMÓLISE

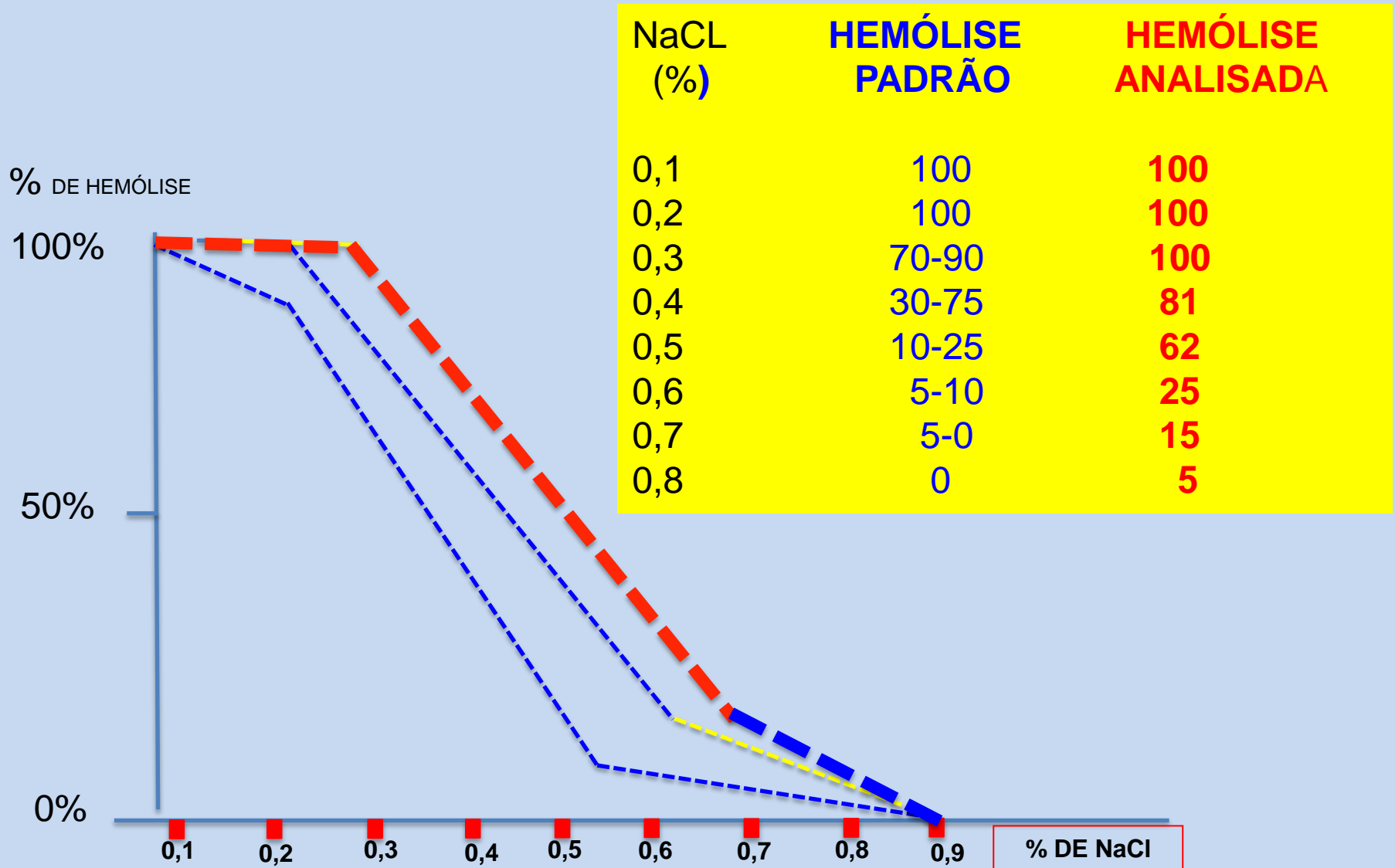


EXEMPLO DE UM CASO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA. 80 A 85% DOS PORTADORES DE ESFEROCITOSE MOSTRAM DESVIO NA CURVA DE FO PARA A DIREITA DO GRÁFICO. 20 A 15%, POR TEREM POUCAS ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE MEMBRANA, APRESENTAM-SE COMO SE FOSSEM NORMAIS NA CURVA DE FO



100	100	100	81	62	25	15	5	Branco
-----	-----	-----	----	----	----	----	---	--------

10 – Como emitir o laudo do teste de fragilidade osmótica (valores de hemólise e curva de FO)



DOSAGEM DE METAHEMOGLOBINA

IMPORTÂNCIA DE SEU USO

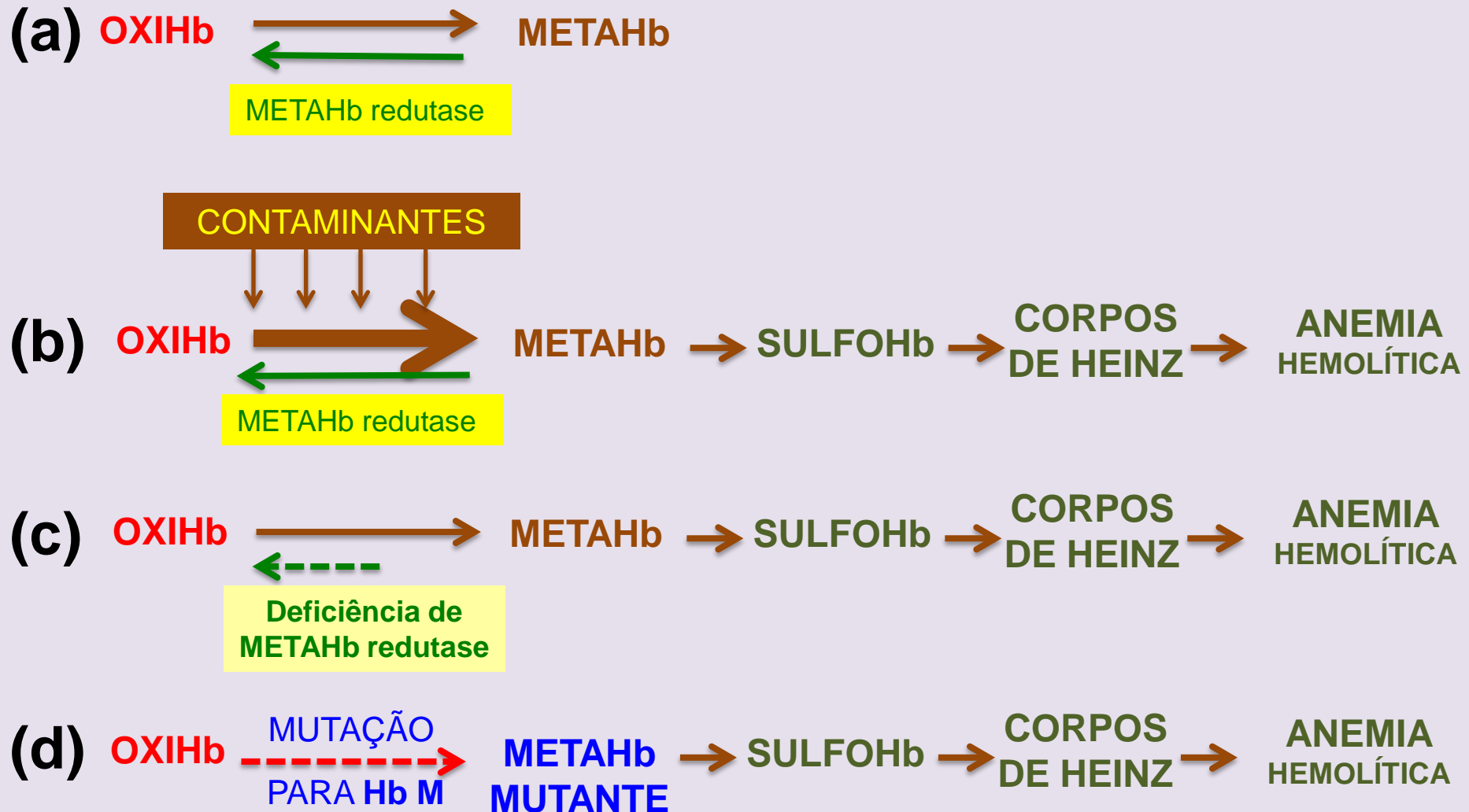
***TRIAGEM DE Hb INSTÁVEL, DEFICIÊNCIA DE
G6PD E OXIDAÇÕES DE HEMOGLOBINAS***

Introdução

Metahemoglobina (metaHb) é uma hemoglobina anormal resultante da oxidação do ferro (Fe^{++}) presente na oxihemoglobina (oxiHb) que se transforma em Fe^{+++} . O Fe^{+++} dá origem à metaHb, que não consegue se ligar ao oxigênio. A concentração normal de metaHb no sangue é de 0,0 e 4%*, e sua elevação ocorre principalmente por contaminação de oxidantes (ex.: anilina, sulfas, nitratos, nitritos, e gases de nitrogênios ou de enxôfre). Quando supera 4% pode causar mal estar, cianose e anemia hemolítica. Acima de 70% a metaHb é letal. É importante destacar que a metaHb até 4% se reverte naturalmente em oxiHb através da ação da enzima metaHb redutase. Acima de 4% a reversão se realiza com auxílio de procedimento terapêutico. Outras duas causas de elevações de metaHb se devem à mutação da Hb A em Hb M e à deficiência da enzima metaHb redutase. Ambas são muito raras na população. A figura 6.21 resume a fisiopatologia da metaHb.

* Este valor é variável entre 3 e 5% conforme o método usado para avaliação de metahemoglobina.

Figura 6.21 – Causas de elevação de metaHb. (a) normal; (b) contaminantes oxidantes; (c) deficiência de metaHb redutase; (d) mutação de Hb A para Hb M (metaHb M).



Técnica de doasgem de metahemoglobina

Tampão fosfato pH 7,4 para o teste de instabilidade térmica

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,25 gramas

KH_2PO_4 1,42 gramas

Procedimento técnico

1) Tube A: Colocar em tubo de hemólise 100 ul de sangue total e 100 ul de saponina a 1%. Homogenizar e aguardar 5 minutos para ocorrer a hemólise. Adicionar, a seguir, 6 ml do tampão fosfato. Homogenizar.

2) Tube B: Transferir para este tubo 300 ul da solução do Tube A e adicionar 3 ml do tampão fosfato. Homogenizar e aguardar 5 minutos.

3) Leitura dos Tubos A e B: Usar espectrofotômetro em comprimento de onda ajustado para **630 nm**. Calibrar o zero da absorbância (ou densidade óptica) com o tampão fosfato e, a seguir, fazer a leitura do Tube A.

Técnica de dosagem de metahemoglobina (continuação)

Procedimento técnico (continuação)

4) Leitura dos Tubos A e B (continuação): Ajustar o espectrofotômetro para o comprimento de onda **540 nm**. Calibrar o zero da absorbância (ou densidade óptica) com o tampão fosfato e, a seguir, fazer a leitura do tubo B.

5) Cálculo:

$$\% \text{ de metaHb} = \text{Tubo A} \times 100 / \text{Tubo B} + (\text{Tubo A} \times 10^*)$$

- O coeficiente 10 se deve à diluição realizada no Tubo B (300 ul do Tubo A para 3 ml do Tubo B)

Interpretação

A leitura do Tubo A em 630 nm avalia a absorbância da metaHb obtida da hemólise dos eritrócitos e diluída em solução tamponada. A leitura do Tubo B, sob as mesmas condições, avalia em 540 nm a absorbância da oxihemoglobina.

Valores normais desta técnica: 0 a 4%

Conclusões

Todos os exames apresentados neste capítulo fazem parte do roteiro de pesquisas para avaliar origens e causas de anemias, condições básicas para o direcionamento terapêutico. No entanto, nem todos são necessários para a rotina laboratorial. Apenas a contagem de reticulócito é o exame que todos os laboratórios clínicos devem ter à disposição. Os outros exames, entretanto, são necessários para os laboratórios especializados em hematologia. Para quem tem dificuldades em incluir estes exames em sua rotina de trabalho, há os laboratórios de apoio, excetuando-se a curva de fragilidade osmótica, que deve ser realizada no próprio laboratório, pois a mesma tem de ser executada no dia da coleta.

Referências bibliográficas deste capítulo

Glencross H, Ahmed N, Wang Q. – Biomedical science practice.

Oxford University Press, Oxford, 2011, 573 pg.

Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH – Essential haematology. Blackwell Science, Oxford, 2012, 348 pg.

Moore G, Knight G, Blann A – Haematology. Institute Biomedical Science, Oxford, 2010, 659 pg.

Naoum PC – Hemoglobinopatias e Talassemias. Editora Sarvier, São paulo, 1997, 171 pg.

Naoum PC – Eletroforeses. GEN-Grupo Editorial Nacional, 2ª edição, São Paulo, 2012, 300 pg.

Ormerod MG – Flow cytometry, 4rd edition. Oxford University Press, 2008, 276.

Rowan RM, Assendelft OW, Preston FE – Advanced laboratory methods in haematology. Arnold Publishers, Londres, 2002, 433pg.