



Serviço Público Federal  
Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas (PPGAC)



## **NOTA TÉCNICA**

**VANTAGENS DO TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA COM  
AMOSTRAS ANALISADAS APÓS INCUBAÇÃO POR 24H A 37<sup>o</sup> C EM  
BANHO-MARIA.**

**ALENE DE OLIVEIRA QUADROS  
LACY CARDOSO DE BRITO JUNIOR**

# **05**

**BELÉM (PA), 2022.**



© Reprodução autorizada pelo autor somente para uso privado de atividades de pesquisa e ensino, não sendo autorizada sua reprodução para quaisquer fins lucrativos. Na utilização ou citação de partes do documento é obrigatório mencionar os autores.

**Ficha Catalográfica**  
**Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas**  
**Universidade Federal do Pará**

Q1v

Quadros, Alene de Oliveira

Nota técnica n. 05/2022/UFPA/PPGAC : vantagens do teste de fragilidade osmótica com amostras analisadas após incubação por 24h a 37° c em banho-maria / Alene de Oliveira Quadros, Lacy Cardoso de Brito Junior. — 2022  
07 f.

Nota técnica - Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas (PPGAC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2022.

1. Análise osmótica. 2. Técnicas de laboratório clínico. I. Brito Junior, Lacy Cardoso de.  
II. Título

CDD 616.1507561



## VANTAGENS DO TESTE DE FRAGILIDADE OSMÓTICA COM AMOSTRAS ANALISADAS APÓS INCUBAÇÃO POR 24H A 37<sup>o</sup> C EMBANHO-MARIA.

### NOTA TÉCNICA Nº 05/2022/UFGA/PPGAC

#### 1. INTRODUÇÃO

O Teste de Fragilidade Osmótica (F.O.) ou Curva de Fragilidade Osmótica ainda hoje é um método de triagem laboratorial muito utilizado para avaliar a resistência ou fragilidade (lise) dos eritrócitos quando submetidos à variações de concentrações osmóticas em cloreto de sódio<sup>1,2,3,4,5</sup>. Principalmente quando outros métodos mais modernos, como o de citometria de fluxo<sup>6,7,8,9</sup>, não estão disponíveis de forma ampla em todo o território nacional. Entretanto, esse teste de F.O. tradicional, ao longo das últimas décadas, vem sendo deixado de ser ofertado no rol de exames por muitos laboratórios de análises clínicas brasileiros<sup>5,10,11,12</sup>, principalmente por apresentar diversas limitações que vão desde erros operacionais na diluição das soluções de cloreto de sódio até a transferência de amostras trocadas no momento da leitura em espectrofotômetro. Além do tempo de execução da técnica que é exclusivamente manual e exige operador dedicado<sup>1,2,3,4</sup>.

Essa conduta de descontinuidade do exame de F.O., porém, tem como consequência grave a falta de assistência diagnóstica a uma parcela importante de pacientes<sup>4,5,10,12</sup> portadores de anemias de caráter genético (esferocitose hereditária, epilicose hereditária, estomatocitose hereditária e piroplasmocitose hereditária)<sup>10,11,13,14,15,16</sup> que estão associadas a deficiências, qualitativas ou quantitativas, de proteínas de ligação membrana celular e citoesqueleto (complexo juncional). Como por exemplo as anemias por deficiência das proteínas: banda 3, espectrina alfa, espectrina beta, anquirinas, banda 4.1, banda 4.2, demantina, actina, aducina, banda 6 e banda 7<sup>10,11,13,14,17</sup>, que interferem na integridade, flexibilidade, permeabilidade e/ou deformidade dos eritrócitos quando submetidos a concentrações osmolares diferentes<sup>10</sup>.

Essas anemias hereditárias, por deficiência de proteínas do complexo juncional membrana celular e citoesqueleto, embora sejam mais frequentemente diagnosticadas na primeira infância por vezes podem ser motivo de investigação em indivíduos adultos ou mesmo idosos, isso porque alguns desses pacientes podem passar parte da vida como assintomáticos ou portadores de quadros leves de anemia em um primeiro momento e em outro apresentarem episódios





Quanto ao diagnóstico realizada através da técnica de F.O. convencional que se baseia na análise de uma amostra de sangue periférico processada à fresco e outra processada após incubação por 24h em banho-maria à 37°C se observou que a análise das amostras após incubação à 37°C por 24h foi mais assertiva que a análise das amostras à fresco para o teste de fragilidade osmótica, embora não tenha havido diferença estatística entre essas duas formas de processamento.

Vários autores<sup>10,11,13,14,15,16</sup> também já têm sugerido que esses melhores resultados, na caracterização da hemólise em pacientes portadores de esferocitose hereditária ou de outras formas de anemia hemolíticas por alteração de proteínas do complexo juncional membrana celular e citoesqueleto, acontece quando as amostras são analisadas após incubação por 24h à 37°C em banho-maria por expor os eritrócitos deficientes da amostra à estresse metabólico por 24h, em condições extracorpóreas, o que acentua as deficiências proteicas dos eritrócitos e facilita a interpretação da curva.

El Gendy, Hassab, Ghanem, Lewis e Nawar<sup>8</sup>, por exemplo, em seus estudos com portadores de esferocitose hereditária (ES), confirmados por citometria de fluxo, observaram que 20% das amostras processadas pelo teste de F.O. convencional a fresco não apresentaram fragilidade osmótica dos eritrócitos ao teste, enquanto que quando as amostras desses mesmos pacientes foram testadas após incubação de 24 horas todas foram positivas para a presença de fragilidade osmótica dos eritrócitos, comprovando a importância da realização da incubação para melhorar a sensibilidade do teste.

Essa maior assertividade do teste de fragilidade osmótica para amostra analisadas após incubação por 24h em banho-maria à 37°C, contudo, ganha ainda maior importância quando esses resultados são analisados em associação com o histórico familiar<sup>6,7,8,9</sup> do paciente e indicadores hemantimétricos do paciente como: a concentração de hemoglobina, o volume corpuscular médio (VCM), o coeficiente de hemoglobina corpuscular médio (CHCM) e o reticulócitos<sup>7,8,18,19</sup>. Principalmente quando ocorrem discordâncias entre os resultados do teste de F.O. para amostras analisadas à fresco ou após incubação por 24h à 37°C.

Assim, entendemos que mesmo o teste de F.O. convencional apresentando limitações em relação a metodologia por citometria de fluxo, ainda assim, isso não diminui a sua importância na triagem e diagnóstico de portadores de anemias por deficiência de proteínas do complexo membrana celular/citoesqueleto<sup>4,5,10,11,13,14,15,16</sup>, principalmente quando as amostras são analisadas após incubação por 24h à 37°C.

## 2. OBJETIVO

Orientar outros operadores e laboratórios quanto ao tipo de processamento de amostras para o teste de fragilidade osmótica, a fresco ou após incubação a 37°C por 24h, é mais eficiente para uso na rotina de laboratórios de análises clínicas.



### 3. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a construção dessa nota técnica foram analisadas 20 amostras de sangue periférico de indivíduos com idades entre 3 meses e 75 anos que foram referenciados para realizar teste de Fragilidade Osmótica (F.O.) após consulta com médico hematologista que, diante das condições clínico-laboratoriais apresentadas em consulta, deliberou pela complementação diagnóstica com a solicitação do teste de F.O. convencional e hemograma.

O teste de F.O. convencional foi realizado com 5ml de soluções de NaCl nas concentrações de 0,90%; 0,80%; 0,75%; 0,65%; 0,60%; 0,55%; 0,50%; 0,45%; 0,40%; 0,35%; 0,30%, 0,20%; e 0,10%, mais a adição de 20µl da amostra por tubo de cada paciente tanto para as amostras à fresco como para as amostras processadas após incubação a 37°C em banho-maria por 24h. E posteriormente esses tubos foram postos em repouso por 30 minutos e centrifugados por 5 minutos a 3.000rpm. O sobrenadante de cada tubo foi lido em espectrofotômetro de luz com filtro de 540nm de comprimento de onda. Já as análises do hemograma foram realizadas pela utilização do equipamento BC6000 (Mindray) e as análises dos esfregaços sanguíneos foi feita por microscopia de luz.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através software Bioestat 5.0 pela aplicação dos testes de estatística descritiva para determinação de média, desvio padrão, mediana e valores de mínimo e máximo, além de teste não paramétrico, teste Extato de Fisher. Sendo adotados como nível de significância  $p \leq 0,05$ .

### 4. CONCLUSÃO

Nessa nota técnica tentamos mostrar que o teste de fragilidades osmótica convencional com o processamento das amostras após a incubação por 24h à 37° C em banho-maria pode não somente agilizar o teste como também melhorar a sua sensibilidade. E como sugestão para os laboratório de análises clínicas que não dispõem do teste de fragilidade osmótica por citometria de fluxo entendemos que o teste de F.O. convencional deveria se limitar a análise de amostras processadas somente após a incubação por 24h à 37° C em banho-maria.

### 5. REFERÊNCIAS

1. Caire AC, Gileno MC. Padronização e aplicação da curva de fragilidade osmótica auxílio diagnóstico de anemias. Rev. Bras. Multidisciplinar. 2012; 15(2):49-58. doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2012.v15i2.88.
2. Walski T, Chludzinska L, Komorowska M, Witkiewicz W. Individual osmotic fragility distribution: A new parameter for determination of the osmotic properties of human blood cells. Biomed Res Int, 2014, 2014:1-6. doi: 10.1155/2014/162102.



3. Bactor FN, Dorion RP. Malaria and hereditary elliptocytosis. *Am. J. Hematol.* 2008;83(9):753.
4. Duarte AE, Waczuk E, Roversi K, da Silva MA, Barros LM, da Cunha FA, de Menezes IR, da Costa JG, Boligon AA, Ademiluyi AO, Kamdem JP, Rocha JB, Burger ME. Polyphenolic composition and evaluation of antioxidant activity, osmotic fragility and cytotoxic effects of *Raphiadenon echinus* (Ness & Mart.) Schauer. *Molecules.* 2016;21(1):2. doi.org/10.3390/molecules21010002
5. Rodrigues HG, Batista MTA, Fonseca LC, Aversi-Ferreira TA. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. *Biotemas.* 2009;22(1):7-16.
6. Warang P, Gupta M, Kedar P, Ghosh K, Colah R. Flow cytometric osmotic fragility --- An effective screening approach for red cell membranopathies. *Cytometry Part B* 2011; 80B: 186–90. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20583>
7. Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis---2011 update. *Br J Haematol.* 2012;156(1):37-49. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08921.x.
8. El Gendy W, Hassab HM, Ghanem AM, Lewis IM, Nawar SM. The application of eosin maleimide-binding test in the diagnosis of hereditary spherocytosis among undiagnosed cases of chronic hemolytic anemia in children. *Egypt J Haematol* 2014; 39: 109-13. DOI: 10.4103/1110-1067.148229.
9. Park, SH, Park, CJ, Lee, BR, et al. Comparison study of the eosin-5-maleimide binding test, flow cytometric osmotic fragility test, and cryohemolysis test in the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Am J Clin Pathol*, 2014;142:474-484. doi: 10.1309/AJCPO7V4OGXLIIPP.
10. Zaidi AU, Buck S, Gadgeel M, Herrera-Martinez M, Mohan A, Johnson K, Bagla S, Johnson RM, Ravindranath Y. Clinical Diagnosis of Red Cell Membrane Disorders: Comparison of Osmotic Gradient Ektacytometry and Eosin Maleimide (EMA) Fluorescence Test for Red Cell Band 3 (AE1, SLC4A1) Content for Clinical Diagnosis. *Front Physiol.* 2020. 19;11:636. doi: 10.3389/fphys.2020.00636.
11. An X, Mohandas AND. Disorders of red cell membrane. *British J. Haematol.* 2008;141(3):367-75.
12. Penman BS, Gupta S, Weatherall DJ. Epistasis and the sensitivity of phenotypic screens for beta thalassaemias. *British J. Haematol.* 2015;169(1):1117-1128.
13. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2013;27(4):167-78.
14. Barcellini W, Bianchi P, Fermo E, Imperiali FG, Marcello AP, Vercellati C, Zaninoni A, Zanella A. Hereditary red cell membrane defects diagnostic and clinical aspects. *Blood Transfus.* 2011;9(3):274-77.
15. Narla J, Mohandas N. Red cell membrane disorders. *Int. J. Lab. Hem.* 2017;39(1):47-52.



doi: 10.1111/ijlh.12657.

16. Denadai R, CapellupPi-Tófano VA. Eliptocitose hereditária diagnosticada em paciente idosa. Relato de caso. Rev. Soc. Bras. Clin. Med. 2012;10(5):450–454.
17. Pinto WJ, Marialva JE, Cardoso SMG, Areas MA. Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário. Rev. Ciênc. Med. Biol. 2013;12(1):106-120.
18. King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. Int J Lab Hematol 2013; 35: 237-43
19. Crisp RL, Gammella D, Solari L, Rapetti MC, Schwartzman G, Donato H. Utilización de sangre capilar: Un aporte para el diagnóstico precoz de esferocitosis hereditaria. Hematología 2013; 17: 8-14.

## 6. COLABORAÇÃO

Laboratório de Patologia Clínica Dr. Paulo C. Azevedo

## 7. AGRADECIMENTO

Ao Laboratório de Patologia Clínica Dr Paulo C. Azevedo pelo apoio logístico das Dras Camila Brito e Monyque Ribeiro pelas contribuições durante a realização deste estudo.

## 8. AUTOR PARA CORRESPÊNCIA

Lacy Cardoso de Brito Junior  
Universidade Federal do Pará.  
Instituto de Ciências Biológicas.  
Lab. de Patologia Geral --- Imunopatologia e Citologia  
Av. Augusto Corrêa, 01  
Bairro Guamá.  
CEP: 66075-900. Belém (PA), Brasil.  
lcdbrito@ufpa.br  
lcdbrito2@gmail.com