

CAMILA SANTOS NOBRE

FRAGILIDADE OSMÓTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ERITRÓCITOS NA ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA: UM ESTUDO CASO-CONTROLE AVALIANDO O ANTICOAGULANTE, O PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA E A CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO PARA UMA TRIAGEM

BRASÍLIA, 2018

CAMILA SANTOS NOBRE

FRAGILIDADE OSMÓTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE ERITRÓCITOS NA ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA: UM ESTUDO CASO-CONTROLE AVALIANDO O ANTICOAGULANTE, O PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA E A CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO PARA UMA TRIAGEM

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 15 de março de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Barra (Presidente)
Laboratório Sabin e Universidade de Brasília

Prof. Dr. Flavia Dias Xavier
Universidade de Brasília

Dr. Felipe Magalhães Furtado
Laboratório Sabin

*À Deus.
Aos meus pais Soraya, Marcos e irmã Julianna Nobre.
Aos meus avôs Francisca e Pedro.
Ao meu tio amado Paulo e tia Glediana.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Gustavo, sem dúvidas foram os melhores anos de enriquecimento acadêmico, profissional, e evolução como ser humano. Com ele aprendi o quanto podemos ser forte e superar cada desafio que a vida e experimentos nos oferece de uma forma SIMPLES. Obrigada por todas as experiências (que não foram poucas), por confiar, por escutar e sempre me colocar de pé nos momentos certos. Um amigo pra toda vida. Você sem dúvidas não só ensinou uma aluna mas ensinou construir/mudar minhas visões de mundo. Obrigada!

Ao meu parceiro, Guilherme, como sempre ao meu lado...Meu parceiro de toda vida..na monografia aprende sobre o teste do pezinho e agora sobre esferocitose hereditária..rsrs . te amo! Obrigada pela paciência .

Dani , minha parceira de mestrado! Meu muito obrigada pelo carinho, palavras, e motivação, irmandade, foram dois anos de muito aprendizado, desafios, provas, e superações que tivemos juntas.

Tici, obrigada por tudo! Pelas conversas, incentivos, orientações, palavras de conforto no momento que o bicho pegava! Sua alegria contagia todos , a começar pela risada!!

Ao doc. Rafael e prof. Silvana Fahel que sempre estiveram ao meu lado, me ajudando nas minhas decisões. Vocês são os meus mestres! Tenho uma eterna gratidão.

Ao Laboratório Sabin, obrigada pelas oportunidades e investir na ciência. Especialmente a Fernanda Resende, que sempre foi flexível aos horários e dias para que pudesse realizar as aulas, ao excelente gerenciamento de reagentes e insumos pois nunca faltou nada para realizar os experimentos, pela parceria e compreensão em tudo. A Helena Sassa, que me ajudou a realizar as curvas de fragilidade osmótica tradicional. Jeo, com sua paciência e sabedoria em me ajudar a diferenciar um esferócito de uma hemácia normal.

*“Senhor, conceda-me a **serenidade** para aceitar aquilo que não posso mudar, a **coragem** para mudar o que me for possível e a **sabedoria** para saber discernir entre as duas. Vivendo um dia de cada vez, apreciando um momento de cada vez, e recebendo as dificuldades como um caminho para paz”*

Reinhold Niebuhr (1892-1971)

RESUMO

O teste de fragilidade osmótica por citometria de fluxo foi recentemente introduzido na prática clínica. No entanto, o teste ainda encontra-se em desenvolvimento. Algumas variáveis importantes para o teste de fragilidade osmótica tradicional ainda não foram totalmente testadas na citometria de fluxo. Neste estudo, avaliou-se a fragilidade osmótica de indivíduos com esferocitose hereditária (casos) e indivíduos saudáveis (controles) por citometria de fluxo usando uma série de tubos contendo concentrações decrescentes de NaCl. As análises foram executadas em amostras de sangue frescas e incubadas (37°C por 24h) colhidos em EDTA e heparina como anticoagulante. As percentagens de hemácias residuais em cada concentração de NaCl foram utilizadas para traçar as curvas de fragilidade osmótica. As curvas de fragilidade osmótica de cada condição testada foram comparadas por meio da fragilidade corpuscular mediana. Curvas ROC foram empregadas para avaliar as concentrações de NaCl com maior acurácia na diferenciação entre casos e controles saudáveis. Como resultado, as curvas de fragilidade osmóticas por citometria de fluxo assumiram um formato de dose-resposta típico e a fragilidade corpuscular mediana dos casos e dos controles foram diferentes em todas as condições pré-analíticas testadas. A comparação das fragilidades corpuscular mediana revelou que a incubação e o anticoagulante têm efeitos maior e menor sobre a fragilidade osmóticas por citometria de fluxo, respectivamente. Cem por cento de sensibilidade e especificidade foram obtidos de 5,5 a 6 g/L de NaCl no sangue fresco-EDTA, de 6 a 8 g / L de NaCl em sangue incubado-EDTA e em nenhuma das concentrações de NaCl testadas no sangue heparinizado. Assim, o EDTA é o anticoagulante de escolha para o ensaio. A incubação à 37°C para 24h aumenta sua capacidade de diagnóstica. A concentração de NaCl mais confiável para a discriminação entre casos e controles foi de 6 g/L de NaCl em sangue fresco EDTA e 7,5 g/L de NaCl no sangue incubado-EDTA.

Palavras-chave: Eritrócitos, Esferocitose Hereditária, Fragilidade Osmótica, Citometria de Fluxo

ABSTRACT

Background: The flow cytometric osmotic fragility test (FC-OFT) was recently introduced. However, the test is still under development and some variables were not fully tested. **Methods:** The osmotic fragility of hereditary spherocytosis (HS) cases and healthy controls were evaluated by FC-OFT using a series of tubes containing decreasing concentrations of NaCl. The analyses were executed in fresh and incubated (37°C for 24h) blood samples anticoagulated with EDTA and heparin. The percentages of residual red blood cells were used to plot the osmotic fragility curves. The OF curves of each tested condition were compared using the median corpuscular fragility (MCF). ROC curve analyses revealed the most accurate NaCl concentrations for differentiation between HS cases and healthy controls. **Results:** FC-OFT curves assumed a sigmoidal dose-response shape and the MCF of cases and controls were different in all instances. MCF comparisons revealed that incubation and the anticoagulant have a major and a minor effect over the FC-OFT, respectively. One hundred percent of sensitivity and specificity were obtained from 5.5 to 6.0 g/L of NaCl in EDTA-treated fresh blood, from 6.0 to 8.0 g/L of NaCl in EDTA-treated incubated blood and in none of the tested NaCl concentration in heparinized blood. **Conclusions:** EDTA is the anticoagulant of choice for the assay. Incubation at 37°C for 24h increased its diagnostic capability. The most reliable NaCl concentration for the discrimination of HS case from controls was 6.0 g/L of NaCl in fresh EDTA-treated blood and was 7.5 g/L of NaCl in incubated EDTA-treated blood.

Key words: Erythrocytes, Hereditary Spherocytosis, Osmotic Fragility, Flow Cytometry

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros demográficos e laboratoriais para casos e controles.

Tabela 2 - Parâmetros da curva ROC para o teste de fragilidade osmótica por citometria de fluxo nas concentrações de NaCl selecionadas nas diferentes condições pré-analítica.

Tabela 3 - Comparação entre os parâmetros diagnósticos dos diferentes formatos de execução do FO-CF disponível na literatura (sangue fresco – EDTA) com os achados do presente estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Alofococianina
AUC	Área sob a curva
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
Dp	Desvio padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EH	Esferocitose hereditária
FCM	Fragilidade Corpuscular Mediana
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FO	Fragilidade Osmótica
FO-CF	Teste de Fragilidade Osmótica por Citometria de Fluxo
FO-T	Teste de Fragilidade Osmótica Tradicional
FSC	Dispersão frontal
Hb	Hemoglobina
MFI	Intensidade média de fluorescência
NaCl	Cloreto de Sódio
PE	Ficoeritrina
RDW	Varição da Distribuição das Hemácias
SSC	Dispersão lateral
TAD	Teste de Antiglobulina Direta
VCM	Volume Corpuscular Média

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - “Template” de análise para a fragilidade osmótica por citometria de fluxo.
- Figura 2** -Localização da células com expressão imunofenotípica positiva para o antígeno de superfície CD235a no “template” de análise.
- Figura 3** - Localização da células com expressão imunofenotípica positiva para os antígenos de superfície CD41a (B), CD42b (C), CD42b (D) e CD61 (E) por citograma.
- Figura 4** - Curvas de fragilidade osmótica para casos com esferocitose hereditária (círculos cinzas) e controles (círculos pretos) para sangue fresco e incubado (37°C por 24 horas) colhidos em EDTA e heparina como anticoagulante.
- Figura 5** - Fragilidade corpuscular mediana de casos com esferocitose (círculos cinzas) e controles saudáveis (círculos pretos) submetidos a diferentes condições pré-analíticas: sangue fresco e incubado colhidos em EDTA e heparina como anticoagulante.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	16
3	MÉTODOS	17
3.1	TIPO DE ESTUDO	17
3.2	PARTICIPANTES E PAREAMENTO	17
3.3	TAMANHO DO ESTUDO	17
3.4	VIÉSES	17
3.5	VARIÁVEIS	18
3.6	AMOSTRAS	18
3.7	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, MORFOLOGIA E OUTROS TESTES LABORATORIAIS	18
3.8	CONTROLE DE QUALIDADE DA CITOMETRIA DE FLUXO	19
3.9	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE HEMÁCIAS VERSUS CONCENTRAÇÃO DE SALINA	19
3.10	VALIDAÇÃO DO TEMPLATE DE ANÁLISE	21
3.10.1	Localização dos eritrócitos no template de análise	21
3.10.2	Inspeção visual da região de hemácias no citograma (Região de Q2)	22
3.10.3	Localização das plaquetas no template de análise	22
3.11	CÁLCULOS DAS VARIÁVEIS QUANTITATIVAS	24
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
3.13	COMITÊ DE ÉTICA	25
4	RESULTADOS	26
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
	ANEXO I – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	39

1 INTRODUÇÃO

A esferocitose hereditária (EH) é uma anemia hemolítica de causa genética que ocorre em todos os grupos étnicos sendo mais comum em pessoas com ascendência do Norte Europeu (1 em 3000) (1). Na maioria dos casos a EH apresenta um padrão de herança dominante (75%), mas a herança não-dominante, caracterizada pelas mutações de novo e pelo padrão de herança recessiva, não é incomum (25%) (2).

A EH é uma condição causada pela deficiência ou disfunção de uma ou mais proteínas do citoesqueleto das hemácias (exemplo: Banda 3, anquirina, alfa e beta espectrina, proteína 4.2 e outras) (3). Como consequência, há uma diminuição na área de superfície de membrana em relação ao volume intracelular, alterando o formato discóide da hemácia e a sua propriedade de deformabilidade acaba sendo comprometida. Assim, a célula assume um formato de esfera (2). Outra consequência destas alterações de membrana é o influxo de sódio devido a desregulação da bomba de sódio e potássio, que contribui ainda mais para turgidez da célula aumentando sua fragilidade. No baço, os esferócitos são retidos na polpa esplênica e fagocitados pelo sistema reticulo-endotelial resultando em anemia, esplenomegalia e icterícia (4). Por fim, a manifestação clínica da EH é variável, desde pacientes assintomáticos a pacientes com anemia severa (5).

O diagnóstico é baseado na combinação de histórico familiar, histórico clínico, exames físicos e achados laboratoriais como: diminuição do nível de hemoglobina e do volume corpuscular médio (VCM), aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), da amplitude da distribuição das hemácias ("RDW"), dos níveis de bilirrubina, presença de esferócitos em lâmina, teste de antiglobulina direta (TAD) negativo (para excluir a anemia hemolítica autoimune), e teste de fragilidade osmótica alterado (6).

O teste de fragilidade osmótica tradicional (FO-T) se destaca no rastreamento inicial da EH. Este teste avalia a habilidade da célula vermelha em incorporar água quando exposta a uma solução hipotônica (com menos de 9 g/L de cloreto de sódio (NaCl)). Eritrócitos normais suportam certo influxo de água sem romper. No entanto, os esferócitos possuem pouca habilidade/resistência a este influxo, devido a sua menor área de superfície de membrana, e se lisam com mais facilidade do que os eritrócitos normais em soluções hipotônicas (7).

No FO-T, a lise das células sanguíneas vermelhas é mensurada colorimetricamente em quatorze ou dezessete (8) concentrações diferentes de NaCl (10 g/L a 1 g/L), dependendo do protocolo considerado, tornando sua execução laboriosa. Em seguida, a percentagem de lise é plotada em relação a cada concentração de NaCl testada resultando em uma curva de fragilidade osmótica. A fragilidade corpuscular mediana (FCM) corresponde à concentração de NaCl em que 50% das células foram lisadas sendo um dos parâmetros usados para mensurar a fragilidade osmótica, pois captura o deslocamento da curva de fragilidade osmótica para esquerda ou para direita em relação ao padrão considerado normal. Estes deslocamentos são secundários a uma maior ou menor fragilidade eritrocítica (9).

Adicionalmente, o anticoagulante mais utilizado para a execução do FO-T é a heparina, e o pré-tratamento da amostra com incubação a 37°C por 24 horas aumenta a sensibilidade do ensaio. Esta maior sensibilidade é decorrente da turgência prévia da célula associada ao estresse metabólico causado pela escassez de glicose no meio e, por consequência, falha dos mecanismos ativos de bombeamento de cátions. A falha destes mecanismos resulta em acúmulo intracelular de sódio (9, 10).

Recentemente, o teste de fragilidade osmótica por citometria de fluxo (FO-CF) foi reportado na literatura (11). No ensaio, os eritrócitos são suspensos em salina normal (9 g/L) e contados por citometria de fluxo antes e depois da adição de água destilada. Para a adição de água destilada é necessária a remoção deste tubo do citômetro e em seguida continuar o ensaio. Após a adição de água, a concentração de NaCl se altera para 5.0 g/L e a fragilidade osmótica é mensurada pela razão da contagem de hemácias residuais na salina hipotônica (5.0 g/L de NaCl - após a adição de água) pela contagem de hemácias na salina isotônica (9 g/L de NaCl - antes da adição de água). A razão indica a percentagem de hemácias residuais e revela se a fragilidade osmótica está aumentada ou diminuída. O tempo total de aquisição citométrica neste caso foi de 120 segundos. Assim, o FO-CF é consideravelmente mais prático, rápido, e de baixo custo quando comparado ao FO-T (11, 12).

As condições pré-analíticas mais utilizadas no FO-CF são o uso do anticoagulante EDTA e do sangue fresco, sem incubação à 37°C por 24 horas. Os autores Won e Suh demonstraram que a incubação diminui o poder de discriminação entre casos de EH e controles, pois na concentração final de NaCl

testada (5,0 g/L) os glóbulos vermelhos tanto de casos e quanto dos controles lisavam quase que completamente (11). Consequentemente, os estudos posteriores não consideraram a incubação do sangue como uma variável importante. Além disso, como as primeiras descrições do ensaio utilizaram apenas o EDTA como anticoagulante esta prática se perpetuou e o uso da heparina no FO-CF ainda não foi avaliado (11-15).

Assim, evidencia-se que o FO-CF é um ensaio que ainda está em desenvolvimento [Exemplo: Ciepiela e colaboradores descreveram uma maior sensibilidade do ensaio em relação a descrição original quando aumentaram o tempo de aquisição citométrica total para 300 segundos (13)]. Neste sentido, como FO-CF é similar a FO-T, porém realizado com apenas duas concentrações (9 g/L e 5 g/L de NaCl), dados sobre a FO-CF envolvendo concentrações decrescentes de NaCl como a diluição seriada em vários tubos feita no FO-T não se encontram disponíveis na literatura. Nesse contexto, essa informação se faz importante para avaliar se a concentração de 5 g/L de NaCl é a que melhor distingue os pacientes com EH dos saudáveis, ou para definir a melhor concentração de NaCl para tal.

Ademais, alguns citômetros de fluxo (ou seus “softwares” de análise) não permitem a remoção do tubo ou pausa da leitura para adição de água deionizada e continuação da análise na mesma linha do tempo. Assim, o teste se torna restrito aos citômetros com esta capacidade (conhecida como sobreposição de leituras). A execução do FO-CF com leituras independentes (15) ou com uma sobreposição de leitura virtual (14) (feita com o uso de softwares) do mesmo tubo antes e depois da adição de água resolve esta restrição possibilitando a realização do teste em qualquer citômetro de fluxo. Isto mantém as vantagens do FO-CF em relação ao FO-T (menos laboroso e mais rápido). Todas as variações do FO-CF descritas até o momento usam a concentração final de 5 g/L de NaCl para distinguir os pacientes com EH dos indivíduos saudáveis. A questão referente a sobreposição de leituras também poderia ser resolvida com a execução do teste em dois tubos independentes, um com salina isotônica e outro com salina hipotônica.

Ademais, algumas variáveis pré-analíticas que sabidamente influenciam a capacidade diagnóstica do FO-T, como o anticoagulante (16) e a incubação à 37°C por 24 horas (17), não foram extensivamente avaliadas no FO-CF, especialmente em diferentes concentrações de NaCl (11). O conhecimento sobre a influência

dessas variáveis sobre o FO-CF poderá preencher lacunas de conhecimentos importantes que resulte no aprimoramento do teste.

Portanto, neste estudo será realizada a análise da fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes com EH (casos) e de indivíduos saudáveis (controles) por citometria de fluxo utilizando-se 17 tubos com diferentes concentrações de NaCl iniciando-se em 10 g/L até 1 g/L. Os objetivos são construir curvas de fragilidade osmótica por citometria de fluxo e investigar a melhor concentração de NaCl para a execução do ensaio usando dois tubos independentes. As análises serão realizadas no sangue anticoagulado com EDTA e heparina, sem incubação (sangue fresco) e com incubação (sangue incubado à 37°C por 24 horas) com a finalidade de se investigar também a influência destas variáveis pré-analíticas sobre a fragilidade osmótica no contexto da citometria de fluxo.

2 OBJETIVOS

1 - Construir curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos de pacientes com esferocitose hereditária (casos) e de indivíduos saudáveis (controles) por citometria de fluxo utilizando protocolo similar ao do teste de fragilidade osmótica tradicional (17 tubos com diferentes concentrações de NaCl iniciando-se em 10 g/L até 1 g/L).

2 - Definir o anticoagulante (EDTA *versus* heparina), o pré-tratamento da amostra (sangue fresco *versus* sangue incubado) e a faixa de concentração de NaCl (entre 10 g/L e 1 g/L) que permita uma discriminação confiável entre os casos de esferocitose hereditária e controles saudáveis na fragilidade osmótica por citometria de fluxo.

3 - Investigar a capacidade diagnóstica de concentrações específicas de NaCl no rastreio da EH por citometria de fluxo utilizando dois tubos independentes com concentrações distintas de cloreto de sódio (isotônica e hipotônica).

3 MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental caso-controle pareado 1:1.

3.2 PARTICIPANTES E PAREAMENTO

Os participantes deste estudo são pacientes adultos advindos de um laboratório clínico privado, localizado em Brasília (Laboratório Sabin). O período de recrutamento foi de Junho a Dezembro de 2016. Os casos inclusos apresentavam a curva de fragilidade osmótica tradicional alterada (teste executado no sangue heparinizado com incubação à 37°C por 24 horas) e diagnóstico prévio de EH. Informações sobre o histórico familiar, transfusões sanguíneas recentes e esplenectomia foram colhidas por entrevista.

Os controles eram voluntários saudáveis sem diagnóstico de EH, sem indicação clínica para execução do teste de fragilidade osmótica. Os casos e controles foram pareados por idade (± 2 anos) e gênero.

3.3 TAMANHO DO ESTUDO

Casos de esferocitose hereditária (n=20) e controles (n=20) foram consecutivamente selecionados por ordem de aparecimento (amostragem de conveniência). O cálculo do tamanho da amostra não foi realizado.

3.4 VIÉSES

Todos os participantes foram submetidos a testes laboratoriais para mensurar/identificar os índices hematimétricos, morfologia e lise das hemácias, a fim de avaliar a condição da esferocitose hereditária, excluir outras anemias (anemia hemolítica auto imune), e confirmar o estado saudável dos controles. Os testes executados foram: hemograma completo, bilirrubina total, contagem de reticulócitos, contagem de esferócitos e o TAD (usado para excluir outras anemias, por exemplo, anemia hemolítica auto-imune).

3.5 VARIÁVEIS

As variáveis avaliadas no estudo foram a percentagem de hemácias residuais, a fragilidade corpuscular mediana (FCM), sensibilidade e especificidade do teste, e valores do ponto de corte para células residuais em concentrações específicas de NaCl (selecionadas a partir das curvas de fragilidade).

3.6 AMOSTRAS

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa da fossa cubital e os tubos utilizados foram: Vacuette EDTA K3 4 mL, Vacuette Heparina 4 mL e Vacuette Soro com ativador de coágulo 4 mL (todos do fabricante Greiner-bio-one).

3.7 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, MORFOLOGIA E OUTROS TESTES LABORATORIAIS

Parâmetros hematológicos (contagem completa, CHCM, “RDW”, VCM, e contagem de reticulócitos) foram determinados nos XE ou XN10 analisadores automatizados hematológicos (Sysmex). Bilirrubina dosada no Advia 2400 (Siemens). TAD realizado no AutoVue® Innova (Ortho). Um (01) especialista avaliou o esfregaço sanguíneo para confirmar os esferócitos em lâmina, calculou-se a mediana e o número mínimo e máximo de esferócitos por 100 glóbulos vermelhos em cinco campos no aumento de 400x. As curvas de fragilidade osmótica tradicional foram executadas de acordo com a literatura (17). Os casos foram classificados como esplenectomizados e não esplenectomizados porque a remoção do baço pode restaurar alguns parâmetros laboratoriais para faixa normal e a evidência da doença será a presença de esferócitos no esfregaço sanguíneo e a fragilidade osmótica aumentada.

3.8 CONTROLE DE QUALIDADE DA CITOMETRIA DE FLUXO

Neste estudo utilizou-se o citômetro FACSCANTO II (BD Bioscience) com os lasers azul (488nm), vermelho (633nm) e violeta (405nm). Para o controle de qualidade de tamanho de partículas, fluorescência e alinhamento do sistema óptico e de fluidos utilizou-se o “*Cytometer Setup and Tracking Beads*” (BD Bioscience), conforme orientação do fabricante. A intensidade média de fluorescência (MFI) destes “*beads*” foram inseridas diariamente em gráfico de “*Levey-Jennings*” com a finalidade de analisar a performance do citômetro (Dados não mostrados).

3.9 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DE HEMÁCIAS *VERSUS* CONCENTRAÇÃO DE SALINA

A suspensão de hemácia foi preparada em dois passos sequenciais utilizando tubos de citometria. Para a primeira suspensão: foram adicionados 25 μL de sangue total em 1,1 mL de solução de NaCl a 10 g/L (salina 1%). Em seguida, 10 μL desta solução primária foram transferidos para os 17 diferentes tubos de citometria contendo 1,0 mL (volume final) de solução com concentração específica de NaCl, variando de 10 g/L a 1 g/L (10, 9, 8,50, 8, 7,50, 7, 6,50, 6, 5,50, 5, 4,50, 4, 3,50, 3, 2,50, 2 e 1 g/L de NaCl). As suspensões secundárias foram posicionadas no carrossel do citômetro de fluxo da BD FACS CANTO II (BD Bioscience) para aquisição automática do número de eventos citométricos. A sequência de aquisição foi do tubo de menor concentração de NaCl para a de maior. O volume inicial de amostra (22,2 a 37,5 μL) e o tempo para leitura após a indução da hemólise tem pouca influência sobre o resultado do teste (11).

O “*software*” utilizado para análise dos dados foi o BD FACSDIVA versão 6.1.3. O gráfico de citograma na escala logarítmica com tamanho e complexidade foi dividido em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4) usando como ponto de corte 10^4 e 10^3 (figura 1), respectivamente, para padronizar a área mensurada. A população de hemácias localizou-se no quadrante superior à direita (Q2), e a aquisição para cada concentração durou 100 segundos com a taxa de fluxo configurada para o modo “*low*” e sem compensação aplicada, pois esse experimento não utiliza fluorescência. Os dados foram avaliados no gráfico tempo *versus* tamanho, em escala logarítmica.

Para mensurar as hemácias residuais, a linha do tempo (o gráfico tempo *versus* tamanho) foi dividida em seis regiões de 14 segundos (figura 1). Os 10 primeiros segundos do gráfico foram desconsiderados. A média de contagem dos eventos dessas seis regiões foi considerada no cálculo para encontrar a percentage de hemácias residuais para cada concentração de NaCl testada.

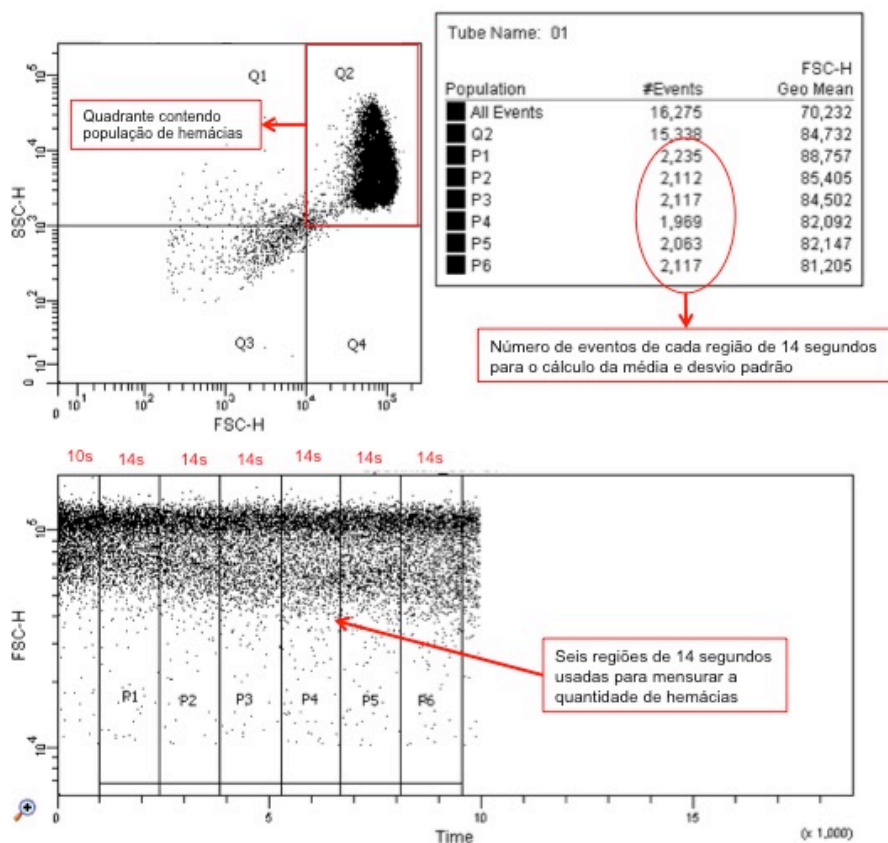


Figura 1- Template de análise para a fragilidade osmótica por citometria de fluxo. Citograma demonstrando a localização das hemácias usadas no estudo (indivíduo saudável e 10 g/L de NaCl). Acima - gráfico tamanho por complexidade em destaque o quadrante superior à direita contendo a população de hemácias. Abaixo - gráfico de tempo por tamanho, aquisição em 100 segundos divididos em seis quadrantes de 14 segundos depois dos primeiros 10 segundos, os quadrantes de 14 segundos foram usados para o cálculo da média e desvio padrão (dp) das hemácias residuais em cada concentração de salina testada. “Software” de análise BD FACSDIVA versão 6.1.3.

3.10 VALIDAÇÃO DO TEMPLATE DE ANÁLISE

Para validar a localização da população de hemácias no quadrante Q2 (quadrante superior direito) foram feitos dois experimentos: um com anticorpos fluorescentes específicos para eritrócitos e plaquetas e outro baseado na avaliação dos eventos citométricos juntamente com indução da hemólise nas baixas concentrações de NaCl.

3.10.1 Localização dos eritrócitos no template de análise

Utilizou-se o mesmo “template” da fragilidade osmótica por citometria de fluxo para avaliar a expressão imunofenotípica da glicoforina-A (CD235a). Para isto, marcou-se as células com glicoforina-A isotiocinato de fluoresceína (FITC) (Clone: HIR-2, BD) (figura 2) de acordo com o protocolo descrito por AlGhasdam e colaboradores (18). Neste caso, houve compensação de cores. Conclui-se que as eritrócitos estão predominantemente na região Q2.

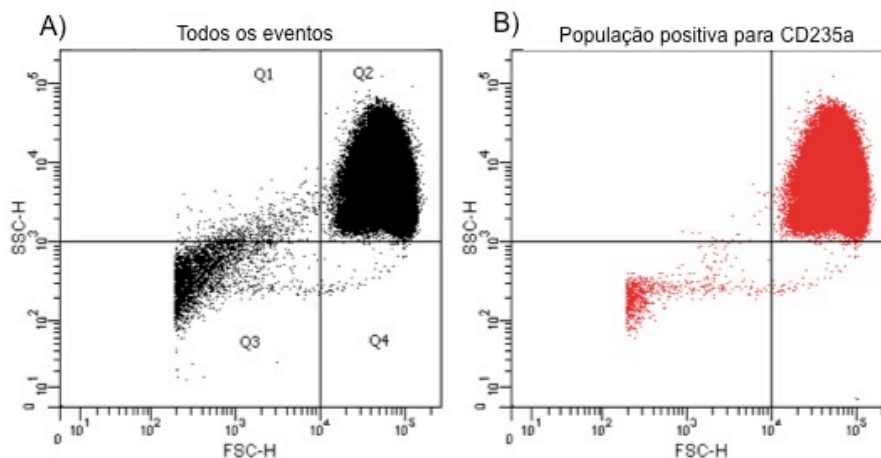


Figura 2 – Localização da células com expressão imunofenotípica positiva para o antígeno de superfície CD235a no “template” de análise. Citograma à esquerda (A) corresponde ao total de eventos. O citograma à direita (B) corresponde aos eventos com expressão positiva para o CD235a, demonstrando que a população estudada na FO-CF (na região de Q2) são hemácias (Paciente controle). Conclui-se que os eritrócitos estão predominantemente na região Q2.

3.10.2 Inspeção visual da região de hemácias no citograma (Região de Q2)

Experimentos preliminares demonstraram que a região denominada de Q2 apresentava a população de células que perdia tamanho e complexidade com a diminuição da concentração de NaCl, ou seja, se lisavam.

3.10.3 Localização das plaquetas no template de análise

Utilizou-se o mesmo “template” da fragilidade osmótica por citometria de fluxo para avaliar a expressão imunofenotípica de marcadores específicos para plaquetas CD41a FITC (Clone:HIP8,BD), CD42a ficoeritrina (PE) (Clone: ALMA.16,BD) e CD42b alofocianina (APC) (Clone: HIP1,BD) e CD61 FITC (Clone: VI-PL2,BD) utilizando o protocolo descrito por Velzen e colaboradores (19). Neste caso, houve compensação de cores (figura 3). Conclui-se que as plaquetas estão predominantemente na região Q3 e Q4. Utilizou-se valor de bula para a marcação imunofenotípica.

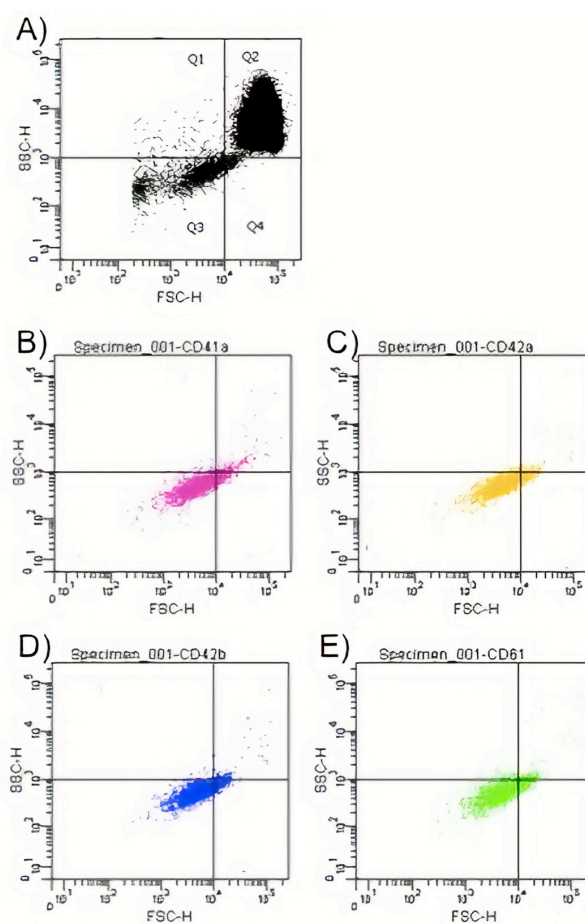


Figura 3 - Localização da células com expressão imunofenotípica positiva para os antígenos de superfície CD41a (B), CD42b (C), CD42b (D) e CD61 (E) por citograma. No citograma A, corresponde a todos os eventos. A finalidade deste experimento foi demonstrar a localização das plaquetas dentro do citograma da FO-CF (Paciente controle). Conclui-se que as plaquetas estão predominantemente na região Q3 e Q4.

3.11 CÁLCULOS DAS VARIÁVEIS QUANTITATIVAS

A percentagem de hemácias residuais é a razão entre a média das hemácias residuais das seis regiões de 14 segundos da linha do tempo de Q2 em uma concentração de NaCl específica e a média de hemácias residuais das seis regiões equivalentes no tubo 1 (com concentração de 10 g/L) multiplicado por 100.

Fórmula:

$$\% \text{Hemácias residuais} = \frac{\text{média das seis regiões de 14 segundos da concentração específica}}{\text{média das seis regiões de 14 segundos da concentração de 10 g/L}} \times 100$$

Esse cálculo foi realizado para todas as concentrações de NaCl em todas as condições pré-analíticas avaliadas. Esses valores foram usados para traçar as curvas de fragilidade osmótica por citometria de fluxo (construídas com concentração de NaCl no eixo das abscissas (x) e a percentagem de hemácias residuais no eixo das ordenadas (y)).

A fragilidade corpuscular mediana (FCM) para cada curva de fragilidade osmótica por citometria de fluxo foi obtida pela interpolação do ponto equivalente a cinquenta por cento de hemólise do eixo das ordenadas (y) com a concentração de NaCl no eixo das abscissas (x) utilizando o “software” GraphPad Prism 6 (GraphPad). FCM foi o parâmetro da curva de fragilidade osmótica usado para comparar casos e controles em cada condição pré-analítica testada.

A sensibilidade e a especificidade do ensaio nas concentrações de NaCl selecionadas foram calculadas pela análise das curvas de característica de operação do receptor (ROC - Receiver Operating Characteristic) usando a percentagem de hemácias residuais como dados de entrada e descrito juntamente com a área sob a curva, valor de corte e o valor de p.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após execução do teste de normalidade de D'Agostino & Pearson, os valores (média e desvio padrão ou mediana e “*range*” - mínimo e máximo) dos parâmetros demográficos e laboratoriais para controles, casos de EH esplenectomizados e casos de EH não-esplenectomizados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn, quando apropriado.

As curvas de fragilidade osmótica de citometria de fluxo foram inspecionadas visualmente para definir os intervalos de concentração de NaCl onde o início e final da hemólise puderam ser observadas (regiões mais íngremes das curvas, excetuando-se os platôs) - nenhum teste estatístico foi aplicado.

Os valores de FCM foram comparados por Kruskal-Wallis, seguidos dos testes de comparação múltiplas de Dunn.

As curvas ROC foram calculadas usando a percentagem de hemácias residuais do caso EH e controles em concentrações selecionadas de NaCl. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para todas as análises estatísticas. Todos os gráficos, cálculos e análises estatísticas foram realizadas no “*software*” GraphPad Prism 6 (GraphPad).

3.13 COMITÊ DE ÉTICA

O comitê de ética em pesquisa do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB) aprovou este estudo (registro: CAAE 51112215.0.0000.0023) e o termo de consentimento livre esclarecido foi obtido de cada participante.

4 RESULTADOS

Os dados demográficos e laboratoriais para controles, casos esplenectomizados e casos não esplenectomizados estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros demográficos e laboratoriais para casos e controles.

Parâmetros	Controles	Casos não esplenectomizados	Casos esplenectomizados
n	20	12	8
	10	8	2
Sexo feminino - n			
Idade (anos) - Média (dp)	37,50 (12,8)	37,92 (16,28)	37,63 (8,55)
Hemoglobina (g/dL) - Mediana (min-máx)	14,2 (12,4/17,2)	12,1 (8,5/18,40) ^{ac}	16,2 (12,9/18,3)
CHCM - (g/dL) - Mediana (min-máx)	34,3 (32/35,8)	35,2 (32,6/36)	35,9 (35,3/37,8)
RDW - (%) - Média (dp)	12,76 (0,61)	18,60 (3,08) ^{bc}	12,66 (0,64)
VCM - (fL) - Média (dp)	85,04 (3,02)	90,47 (4,25) ^b	88,66 (3,61) ^a
Contagem de Reticulócitos(%) - Média (dp)	1,37 (0,32)	9,50 (3,88) ^{bc}	2,96 (1,04)
Contagem de Esferócitos* - Mediana (min-máx)	0	32 (11/38) ^b	27 (20/34) ^b
Bilirrubina total (mg/dL) - Mediana (min-máx)	0,58 (0,26/2,1)	2,12 (0,64/5,2) ^b	0,87 (0,62/2,3)
TAD positive - n (%)	2 (9,5)	0 (0)	0 (0)

Legenda: casos e controles foram pareados por idade e sexo. Variáveis com distribuição normal e não normal foram apresentadas como média (desvio-padrão - dp) e mediana (máximo e mínimo), respectivamente. ^ap<0,05 *versus* controles; ^bp<0,0005 *versus* controles; ^cp<0,0005 *versus* esplenectomizados, *número de esferócitos por 100 células vermelhas em 5 (cinco) campos no aumento de 400x. Todos os casos e nenhum dos controles apresentaram curva de fragilidade osmótica tradicional aumentada.

Não houve relato de transfusão sanguínea nos 3 meses anteriores à coleta de sangue de sangue e 13 (treze) casos tinham histórico familiar de EH.

Os casos não esplenectomizados mostraram baixa hemoglobina, aumento do RDW, VCM, bilirrubina, reticulócitos e contagem de esferócitos comparado aos controles, sugerindo que esses voluntários tinham doença ativa. Os casos esplenectomizados tinham resultados/níveis dos testes hematológicos e bioquímicos similares aos controles (com exceção do VCM e contagem de esferócitos) sugerindo doença controlada. Os controles demonstraram ausência de esferócitos no esfregaço sanguíneo, índices hematimétricos normais, ausência de hemólise e anemia, curva de fragilidade osmótica tradicional normal - o que indicava ausência de EH. Em resumo, todos os indivíduos elegíveis para o estudo foram incluídos e analisados.

A mediana (mínimo e máximo) da percentagem de hemácias residuais para cada tubo de todos os participantes foram computadas e plotadas contra a concentração de NaCl nas quatro diferentes condições testadas e podem ser

visualizadas na figura 4, sendo estas as curvas de fragilidade osmótica por citometria de fluxo obtida para cada condição.

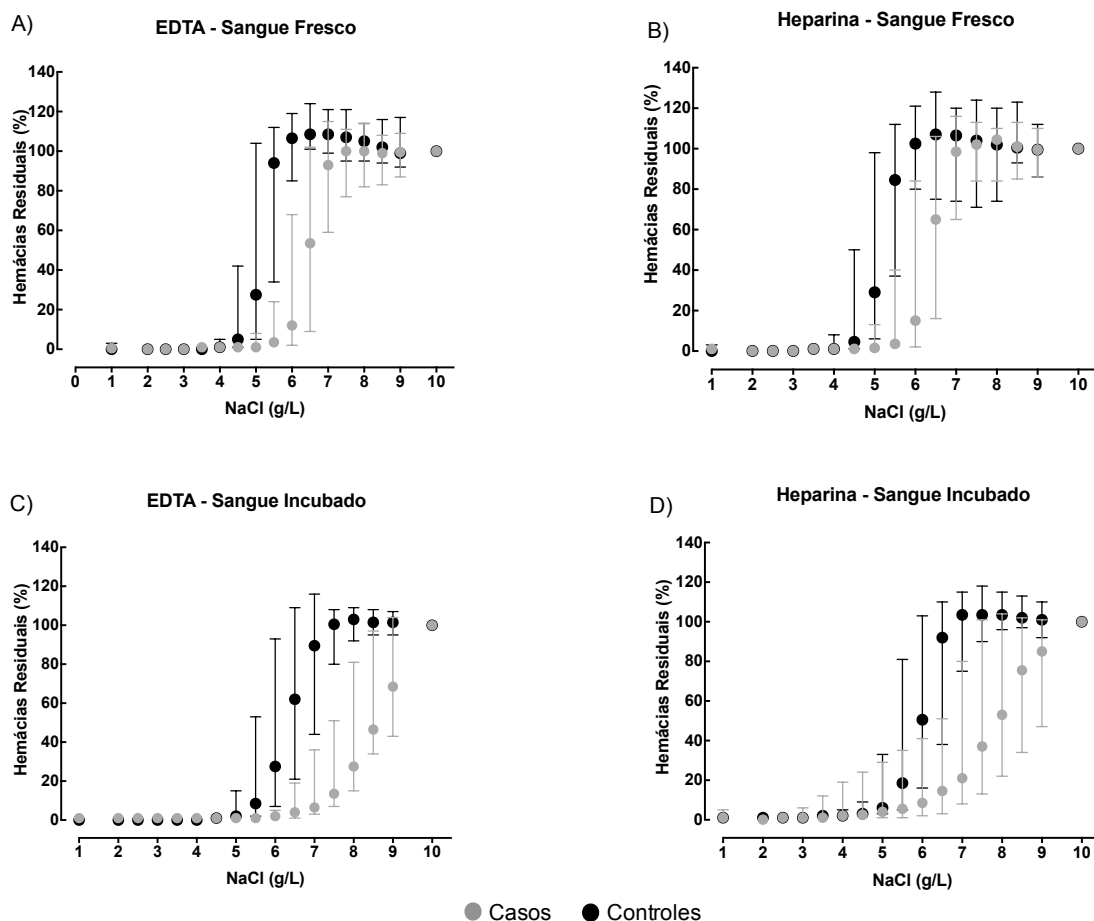


Figura 4 – Curvas de fragilidade osmótica para casos com esferocitose hereditária (círculos cinzas) e controles (círculos pretos) para sangue fresco e incubado (37°C por 24 horas) colhidos em EDTA e heparina como anticoagulante. Círculos e barras de dispersão representam a mediana com mínimo e máximo das percentagens de hemácias residuais de todos participantes de cada grupo em cada concentração de NaCl.

Para casos e controles, as concentrações de NaCl que compreende a parte mais íngreme das curvas dose-resposta (região entre o início e fim da hemólise) foi de 4,5 a 7 g/L no sangue fresco e de 5,5 a 9 g/L no sangue incubado, independente do tipo de anticoagulante.

Os valores dos FCM [mediana (mín-máx)] observados para os casos de EH *versus* controles são diferentes em todas as instâncias: 6,47 (5,84 – 6,85) g/L *versus* 5,18 (4,53 – 5,69) g/L de NaCl no sangue fresco-EDTA ($p < 0,0001$); 6,37 (5,62 – 6,81) g/L *versus* 5,14 (4,49 – 5,64) g/L de NaCl no sangue fresco-heparina ($p = 0,0001$); 8,66 (7,49 – 10,71) g/L *versus* 6,34 (5,47 – 7,05) g/L de NaCl no sangue incubado-EDTA ($p = 0,0004$) e 8,16 (6,51 – 11,58) g/L *versus* 6,01 (5,19 – 6,61) g/L de NaCl no sangue incubado-heparina ($p < 0,0001$), respectivamente. A representação gráfica destes resultados podem ser visualizados na figura 5.

No EDTA, a incubação de 37°C por 24h aumentou os valores do FCM nos casos [sangue fresco 6,47 (5,84 – 6,85) g/L *versus* sangue incubado 8,66 (7,49 – 10,71) g/L, $p = 0,015$] e nos controles [sangue fresco 5,18 (4,53 – 5,69) g/L *versus* sangue incubado 6,34 (5,47 – 7,05) g/L, $p = 0,0016$]. No sangue heparinizado, a incubação à 37°C por 24 horas também aumentou os valores do FCM dos casos [sangue fresco 6,37 (5,62 – 6,81) g/L *versus* sangue incubado 8,16 (6,51 – 11,58) g/L, $p = 0,04$], mas esse efeito não foi observado nos controles [sangue fresco 5,14 (4,49 – 5,64) *versus* sangue incubado 6,01 (5,19 – 6,61) g/L, $p = 0,22$] (Figura 5).

No sangue fresco, os anticoagulantes não influenciaram do FCM nos casos [EDTA 6,47 (5,84 – 6,85) g/L *versus* heparina 6,37 (5,62 – 6,81) g/L, $p = 0,99$] e nos controles [EDTA 5,18 (4,53 – 5,69) g/L *versus* heparina 5,14 (4,49 – 5,64) g/L, $p = 0,99$]. O mesmo resultado foi observado no sangue incubado. Neste caso, os valores do FCM foram similares nos casos [EDTA 8,66 (7,49 – 10,71) g/L *versus* heparina 8,16 (6,51 – 11,58) g/L, $p = 0,99$] e nos controles [EDTA 6,34 (5,47 – 7,05) g/L *versus* heparina 6,01 (5,19 – 6,61) g/L, $p = 0,99$] (Figura 5).

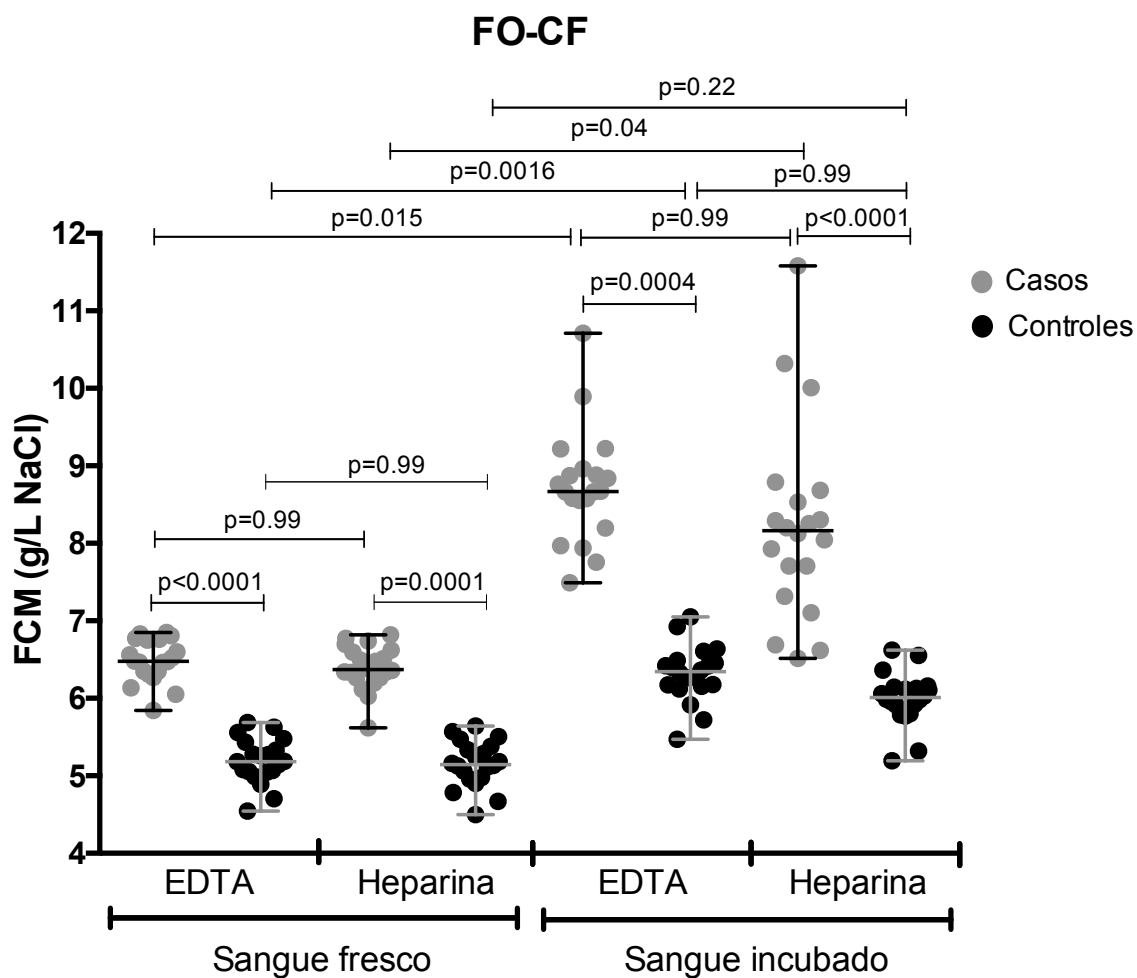


Figura 5 – Fragilidade corpuscular mediana (FCM) de casos com esferocitoses (círculos cinzas) e controles saudáveis (círculos pretos) submetidos a diferentes condições pré-analíticas: sangue fresco e incubado colhidos em EDTA e heparina como anticoagulante. A barra e os limites representam a mediana e os valores mínimos e máximos de cada grupo, respectivamente.

As análises das percentagem de hemácias residuais por meio das curvas ROC revelaram que, no sangue fresco-EDTA, duas concentrações de NaCl foram capazes de discriminar casos e controles com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (5,5 e 6 g/L) e no sangue incubado-EDTA cinco concentrações de NaCl foram capazes de discriminar casos e controles com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (6, 6,5, 7, 7,5 e 8 g/L). Por outro lado, no sangue fresco-heparina e também no incubado-heparina, nenhuma das concentrações testadas apresentaram, ao mesmo tempo, capacidade de discriminar casos e controles com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros da curva ROC para o teste de fragilidade osmótica por citometria de fluxo em concentrações de NaCl selecionadas considerando as diferentes condições pré-analíticas avaliadas.

	Sensibilidade	Especificidade	AUC	Ponto de corte*	P
Sangue fresco-EDTA					
4,5 g/L NaCl	95%	70%	0,93	2,5%	<0,0001
5,0 g/L NaCl	95%	95%	0,99	5,5%	<0,0001
5,5 g/L NaCl	100%	100%	1	29%	<0,0001
6,0 g/L NaCl	100%	100%	1	76,5%	<0,0001
6,5 g/L NaCl	95%	100%	0,97	97,5%	<0,0001
7,0 g/L NaCL	65%	95%	0,87	99,5%	0,001
Sangue fresco-heparina					
4,5 g/L NaCl	70%	95%	0,91	1,5%	<0,0001
5,0 g/L NaCl	95%	100%	0,99	5,5%	<0,0001
5,5 g/L NaCl	95%	100%	0,99	23,5%	<0,0001
6,0 g/L NaCl	95%	100%	0,99	63,5%	<0,0001
6,5 g/L NaCl	65%	100%	0,96	74,0%	<0,0001
7,0 g/L NaCL	45%	95%	0,72	92,5%	0,036
Sangue incubado-EDTA					
5,5 g/L NaCl	100%	95%	0,98	2,5%	<0,0001
6,0 g/L NaCl	100%	100%	1	6%	<0,0001
6,5 g/L NaCl	100%	100%	1	20%	<0,0001
7,0 g/L NaCL	100%	100%	1	40%	<0,0001
7,5 g/L NaCL	100%	100%	1	65,5%	<0,0001
8,0 g/L NaCL	100%	100%	1	86,5%	<0,0001
8,5 g/L NaCL	95%	90%	0,99	96%	<0,0001
Sangue incubado-heparina					
5,5 g/L NaCl	70%	75%	0,78	11,5%	0,0020
6,0 g/L NaCl	80%	95%	0,95	23,5%	<0,0001
6,5 g/L NaCl	85%	100%	0,99	35,5%	<0,0001
7,0 g/L NaCL	95%	100%	0,99	72,0%	<0,0001
7,5 g/L NaCL	95%	100%	0,98	92,5%	<0,0001
8,0 g/L NaCL	95%	90%	0,97	97,5%	<0,0001
8,5 g/L NaCL	85%	90%	0,95	97,5%	<0,0001

Legenda: *- % de células residuais

5 DISCUSSÃO

Neste estudo analisou-se o efeito da concentração decrescente de NaCl (de 10 a 1 g/L) sobre a hemólise em pacientes com EH e em indivíduos saudáveis considerando quatro diferentes condições pré-analíticas (sangue total fresco/incubado e anticoagulado com heparina/EDTA) por meio da contagem das hemácias residuais por citometria de fluxo. Em outras palavras, realizou-se um protocolo similar ao teste de fragilidade osmótica tradicional mas, ao invés de mensurar a hemoglobina livre, que é um efeito secundário a lise de eritrócitos, realizou-se a contagem de hemácias residuais usando citometria de fluxo. Os objetivos foram construir curvas de fragilidade osmótica por citometria de fluxo e definir o anticoagulante, o pré-tratamento da amostra e as concentrações de NaCl que permitissem a melhor discriminação entre casos com EH e controles. Além de avaliar se o teste pode ser executado no formato de dois tubos independentes.

Considerando todos os voluntários inclusos no estudo, os ensaios laboratoriais sugeriram doença ativa nos casos não esplenectomizados, doença controlada nos casos esplenectomizados e ausência de doença nos controles (Tabela 1). É importante ressaltar que os casos tinham aumento na fragilidade osmótica tradicional e diagnóstico prévio da doença para serem inclusos no estudo. Em conjunto, essas observações indicam a correta atribuição dos participantes para cada grupo, o que diminui o viés de classificação do estudo.

Em relação ao “template” de análise proposto, é possível inferir que a maioria das células da região de Q2 são hemácias, pois expressam o antígeno de superfície CD235a (glicoforina A). A glicoforina A é a maior proteína transmembranária nas hemácias, abrangendo de 2% a 4% das proteínas de membrana (20) e quando adicionado o agente indutor de hemólise (água destilada) (11) esta população diminui ou desaparece a depender da osmolaridade da solução final. Ademais, a população das regiões de Q3 e Q4 expressam antígenos de superfície como as glicoproteínas CD42 e CD42b e os receptores de agregação plaquetária CD41 e CD61, assim, pode-se inferir que os eventos citométricos nestas regiões são plaquetas (19).

As curvas de fragilidade osmótica por citometria de fluxo - considerando a percentagem de hemácias residuais *versus* concentração de NaCl - assumiram uma forma dose-resposta sigmóide similar as observadas nas curvas de fragilidade

osmótica tradicional. Entretanto, elas são invertidas, pois a fração de hemácias residuais é mensurada pelo citômetro de fluxo e considerada para o cálculo (figura 4). No FO-T os valores plotados correspondem as hemácias lisadas. Estes resultados sugerem que a citometria de fluxo usando decréscimo de concentrações de NaCl pode ser usadas para avaliar a fragilidade osmótica das hemácias. Além disso, pois as curvas obtidas para casos e controles são distintas.

O FCM (que é semelhante ao ponto em que se observa metade do efeito máximo nas curvas dose-resposta, ou seja, o EC50) captura o deslocamento à esquerda ou à direita da curva e foi usado para comparar as curvas de fragilidade entre casos e controles. Assim, observou-se que o FCM dos casos foi diferente do FCM dos controles em todas as condições testadas. Este resultado demonstra que a curva proposta foi capaz de reportar o aumento da fragilidade osmótica dos casos.

O valores da FCM também foram usados para comparar todas as condições pré-analíticas testadas. O FCM do sangue fresco foi diferente do FCM do sangue incubado em todas as instâncias, exceto para os controles no sangue heparinizado, indicando que a incubação à 37°C por 24 horas influencia o FO-CF. Por outro lado, o sangue fresco com os anticoagulantes heparina e EDTA tiveram valores de FCM similares. O mesmo resultado foi observado no sangue incubado. Em suma, os resultados sugerem que à incubação e o anticoagulante, tem um maior e um menor, efeito sobre o FO-CF, respectivamente.

Para encontrar a condição pré-analítica e as concentrações de NaCl que permitissem uma maior acurácia no rastreio de EH por FO-CF, realizou-se à análise da curva ROC das concentrações de NaCl no qual os casos e controles foram claramente distintos nos valores das percentagens de hemácias residuais. Cem por cento de sensibilidade e especificidade foram obtidos com 5,5 e 6,0 g/L de NaCl no sangue fresco-EDTA; 6, 6,5, 7, 7,5, e 8 g/L no sangue incubado-EDTA e em nenhuma das concentrações de NaCl no sangue heparinizado. Estes resultados indicam que o EDTA é o anticoagulante de escolha para a fragilidade osmótica por citometria de fluxo e as concentrações de NaCl capazes de discriminar os casos dos controles, é maior no sangue incubado à 37°C por 24 horas do que no sangue fresco. Então, a incubação do sangue-EDTA aumenta a faixa de concentração de NaCl capaz de distinguir casos e controles por citometria de fluxo. Isto pode resultar em uma maior acurácia diagnóstica.

As concentrações de 5,5 e 6 g/L de NaCl demonstraram, respectivamente, valores de ponto de corte de hemácias residuais de 29% e 76,5% no sangue fresco-EDTA. As concentrações de 6, 6,5, 7, 7,5, e 8 g/L de NaCl apresentaram ponto de corte de hemácias residuais de 6%, 20%, 40%, 65,5%, e 86,5% no sangue incubado-EDTA, respectivamente. Estes seriam os pontos da curva de fragilidade osmótica por citometria de fluxo ideais para o rastreamento de EH.

Estes resultados sugerem que o rastreamento poderia ser realizado por citometria de fluxo usando duas concentrações de NaCl (configuração de dois tubos distintos). Depois da incubação do sangue colhido em EDTA à 37°C por 24h, a suspensão de hemácias é contada na concentração de 10 g/L de NaCl e em outra concentração com um estresse osmótico adequado (ex. 7,5 g/L de NaCl). O aumento da fragilidade osmótica seria detectado se a percentagem de hemácias residuais for menor que 65,5%.

Na configuração de dois tubos distintos não seria necessário a interrupção da aquisição para adição de água, preservando as vantagens FO-CF sobre a FO-T (menos laboriosa e mais rápida) e permitindo que a execução do teste seja realizada em qualquer citômetro de fluxo e “*software*” de análise.

É importante ressaltar que as melhores concentrações de cloreto de sódio para o rastreamento de EH usando sangue fresco são diferentes do material incubado. Todos os métodos de fragilidade osmótica por citometria de fluxo descritos na literatura utilizam sangue fresco-EDTA, e realizaram o protocolo de análise partindo da concentração de salina normal (9 g/L) e alcançam a concentração de 5 g/L após a adição de água destilada. No presente estudo, 5 g/L não foi a melhor concentração para distinguir pacientes com EH dos indivíduos saudáveis. Para sangue fresco-EDTA sugere-se que a fragilidade osmótica por citometria de fluxo seja realizada com salina hipotônica à 6 g/L de NaCl. No entanto, a maior capacidade discriminatória foi obtida no sangue incubado-EDTA. Neste caso, recomenda-se o uso de 7,5 g/L de NaCl como salina hipotônica pois as concentrações (6 g/L – sangue fresco-EDTA e 7,5 g/L no sangue incubado –EDTA) possuem uma maior faixa de separação entre a menor percentagem de hemácias residuais do controle com a maior percentagem de hemácias residuais do caso.

A única investigação sobre o efeito da incubação presente na literatura usa 5 g/L, nesta concentração houve uma piora na diferenciação entre casos e controles quando comparado ao sangue fresco-EDTA. Os achados do presente estudo

corroborar com este resultado: para 5 g/L de NaCl obteve-se sensibilidade = 95%, especificidade = 80%, AUC = 0,89 ($p < 0,0001$), e ponto de corte de 1,5% (números piores que os obtidos no sangue fresco-EDTA). Este estudo acrescenta que a capacidade diagnóstica de outras concentrações de NaCl (6, 6,5, 7, 7,5, e 8 g/L) são melhores que 5 g/L, comparáveis ou superiores aos obtidas no sangue fresco-EDTA (Tabela 2). Assim, recomenda-se que outros estudos re-investiguem a questão de incubar ou não o sangue para se obter uma definição sobre o assunto.

A tabela 3 compara os parâmetros diagnósticos e protocolo deste trabalho com os de outros estudos da literatura. Fica claro que um protocolo definitivo deve ser proposto de forma que compreenda todas as possíveis configurações para o ensaio. Os achados deste estudo alertam, principalmente, para que outras concentrações de NaCl e a incubação sejam consideradas.

Tabela 3 - Comparação entre os parâmetros diagnósticos dos diferentes formatos de execução do FO-CF disponível na literatura (sangue fresco – EDTA) com os achados do presente estudo.

Referência	Sensibilidade	Especificidade	Ponto de corte	Concentração inicial de NaCl	Concentração final de NaCl	Formato do teste
Warang et al. ¹²	100%	98%	23,59%	9 g/L	5 g/L	1 tubo e sobreposição de leituras
Won e Suh ¹¹	100%	96%	23%	9 g/L	5 g/L	1 tubo e sobreposição de leituras
Park et al. ¹⁵	97%	95,8%	10,8%	9 g/L	5 g/L	1 tubo e duas leituras
Manivannan et al. ¹⁴	92,5%	98,3%	16,29%	9 g/L	5 g/L	1 tubo e sobreposição virtual das leituras
Ciepiela et al. ¹³ aquisição por 214s	83,3%	87,6%	23,34%	9 g/L	5 g/L	1 tubo e sobreposição de leituras
Ciepiela et al. ¹³ aquisição por 300s	90%	84,6%	17,3%	9 g/L	5 g/L	1 tubo e sobreposição de leituras
Este estudo	95%	95%	5,5%	10 g/L	5 g/L	2 tubos duas leituras
Este estudo	100%	100%	29%	10 g/L	5,5 g/L	2 tubos duas leituras
Este estudo	100%	100%	76,5%	10 g/L	6 g/L	2 tubos duas leituras

Finalmente, a principal limitação do estudo é o tamanho pequeno da amostra. Recomenda-se a replicação deste trabalho para confirmação dos seus achados, bem como a determinação local dos valores críticos para execução do ensaio, como o ponto de corte de hemácias residuais e concentração de NaCl.

6 CONCLUSÃO

A citometria de fluxo é capaz de gerar curvas de fragilidade osmótica ao se expor hemácias à concentrações decrescentes de NaCl. O EDTA é o anticoagulante de escolha para a FO-CF. A incubação à 37°C por 24h pode aumentar a acurácia diagnóstica do teste. A concentração de NaCl mais confiável para a discriminação entre casos e controles foi de 6 g/L de NaCl no sangue fresco-EDTA e 7,5 g/L de NaCl no sangue incubado-EDTA. Estas concentrações propiciaram a execução do ensaio na configuração de dois tubos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939-48.
2. Iolascon A, Avvisati RA. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis. *Haematologica*. 2008;93(9):1283-8.
3. Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Alloisio N, Morle L, Delaunay J. Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects. *Haematologica*. 1998;83(3):240-57.
4. Comité Nacional de H, Donato H, Crisp RL, Rapetti MC, Garcia E, Attie M. [Hereditary spherocytosis: Review. Part I. History, demographics, pathogenesis, and diagnosis]. *Archivos argentinos de pediatría*. 2015;113(1):69-80.
5. King MJ, Zanella A. Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *International journal of laboratory hematology*. 2013;35(3):237-43.
6. Bolton-Maggs PH, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King MJ, General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in H. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis--2011 update. *British journal of haematology*. 2012;156(1):37-49.
7. Farias MG. Advances in laboratory diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2017;55(7):944-8.
8. King MJ, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *International journal of laboratory hematology*. 2015;37(3):304-25.
9. Bain BJ, Dacie JV. *Dacie and Lewis practical haematology 2011*. Available from: https://nls.lids.org.uk/welcome.html?ark:/81055/vdc_100045247749.0x000001.
10. Christensen RD, Yaish HM, Gallagher PG. A pediatrician's practical guide to diagnosing and treating hereditary spherocytosis in neonates. *Pediatrics*. 2015;135(6):1107-14.
11. Won DI, Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2009;76(2):135-41.
12. 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, Clinical cytometry*. 2011;80(3):186-90.

13. Ciepiela O, Adamowicz-Salach A, Zgodzinska A, Lazowska M, Kotula I. Flow cytometric osmotic fragility test: Increased assay sensitivity for clinical application in pediatric hematology. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2018;94(1):189-95.
14. Manivannan P, Tyagi S, Chandra D, Mishra P, Pati HP, Saxena R. Flow cytometric analysis of patients with hereditary spherocytosis - an Indian scenario. *Hematology*. 2017:1-6.
15. Park SH, Park CJ, Lee BR, Cho YU, Jang S, Kim N, 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. *American journal of clinical pathology*. 2014;142(4):474-84.
16. Kafka M, Yermiahu T. The effect of EDTA as an anticoagulant on the osmotic fragility of erythrocytes. *Clinical and laboratory haematology*. 1998;20(4):213-6.
17. Parpart AK, Lorenz PB, Parpart ER, Gregg JR, Chase AM. The Osmotic Resistance (Fragility) of Human Red Cells. *The Journal of clinical investigation*. 1947;26(4):636-40.
18. AlGhasham N, Abulkhair Y, Khalil S. Flow cytometry screening for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: A single-center experience in Saudi Arabia. *Cytometry Part B, Clinical cytometry*. 2015;88(6):389-94.
19. van Velzen JF, Laros-van Gorkom BA, Pop GA, van Heerde WL. Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. *Thrombosis research*. 2012;130(1):92-8.
20. Murador P. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Rev Bras Hematol Hemoter [online]*. 2007;29(2):168-78.

ANEXO I – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação de um ensaio para fragilidade osmótica de eritrócitos baseado em citometria de fluxo que independa da capacidade do equipamento fazer sobreposição de leituras antes e após a adição do agente indutor de hemólise.

Pesquisador: Gustavo Barcelos Barra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51112215.0.0000.0023

Instituição Proponente: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

Patrocinador Principal: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.377.274

Apresentação do Projeto:

Este projeto tem como título: "Validação de um ensaio para fragilidade osmótica de eritrócitos baseado em citometria de fluxo que independa da capacidade do equipamento fazer sobreposição de leituras antes e após a adição do agente indutor de hemólise". A esferocitose hereditária é a causa mais comum de hemólise crônica hereditária na população ocidental, com prevalência de 1 em 5.000 indivíduos. Suas manifestações clínicas variam amplamente, sendo que as mais típicas são: sinais de hemólise com anemia, reticulocitose, esplenomegalia, icterícia e cálculos biliares. A presença de esferócitos no sangue periférico resulta de alterações quantitativas e/ou qualitativas das proteínas da membrana do eritrócito. Estas proteínas são responsáveis por manter a forma discóide bicôncava da célula, permitindo a sua deformabilidade no trânsito da microvasculatura. A deficiência dessas proteínas de membrana resulta em perda de resistência osmótica, elasticidade e capacidade de deformação. Assim, o defeito celular primário é a perda de área relativa entre superfície de membrana e volume intracelular o que resulta na forma esferoidal. O teste de fragilidade osmótica convencional, que utiliza uma série de soluções hipotônicas, é o método diagnóstico para esferocitose hereditária mais utilizado na rotina laboratorial. O princípio do novo método é ressuspender as hemácias em uma solução de salina isotônica (0.9%), mensurar a quantidade de eritrócitos, induzir a hemólise pela adição de água deionizada e medir a quantidade

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (51)3985-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

Continuação do Parecer: 1.377.274

de células residuais ao longo do tempo no citômetro de fluxo. Por fim, a porcentagem de células residuais é calculada a partir da relação entre a quantidade inicial e final de células. Este novo método tem muitas vantagens sobre o teste convencional: (1) menos laborioso, (2) mais rápido, (3) não necessita de pré-incubação das amostras de sangue, (4) baixo custo e (5) tem maior sensibilidade. O objetivo primário será desenvolver um ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo que independa da sobreposição de leituras (overlay) definindo: a) Se as curvas dose-respostas % de salina versus % de células lisadas no ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo é equivalente ao ensaio convencional; b) A concentração de salina que permita distinguir os três grupos de estudo: fragilidade osmótica aumentada, normal e diminuída. Serão recrutados 60 indivíduos de ambos os sexos com idade superior aos 18 anos que serão divididos em 3 grupos: grupo 1 – fragilidade osmótica normal, controles (n=20), grupo 2 – fragilidade osmótica aumentada, esferocitose hereditária (n=20); e grupo 3 – fragilidade osmótica diminuída, talassemia ou anemia deficiência de ferro (n=20). Os participantes da pesquisa serão recrutados a partir de clientes de um laboratório privado do Distrito Federal que procurarem o exame de fragilidade osmótica, contagens de células sanguíneas (hemograma), eletroforese de hemoglobina e que atendam os critérios descritos em cada grupo. A metodologia consiste na coleta de sangue venoso do voluntário por punção de veia braquial periférica em quatro tubos de 4 mL: (2) Vacuette K2 EDTA, (1) Vacuette heparina e (1) Vacuette SiO2 com gel separador. Serão realizados os testes de fragilidade osmótica tradicional, fragilidade osmótica comparativo. A porcentagem de células residuais em cada tubo será calculada pela razão entre o números de eventos do tubo em questão e o número de eventos do tubo número 1 (concentração em que todas as células estão inteiras). Em seguida, os valores obtidos dos ensaios serão convertidos em porcentagem de células lisadas pelo subtração de 100%. Este valor será representado graficamente de acordo com a concentração salina. Na metodologia de análise de dados, as curvas dose-resposta serão construídas com auxílio do software Prism 6 (GraphPad) utilizando o modelo "log (agonist) vs. normalized response – Variable slope". A comparação entre as curvas dose-resposta utilizará o método "Extra sum-of – squares F test" e os parâmetros comparados serão "LogEC50" e "HillSlope", estas análises serão executadas no software Prism 6 (GraphPad). As medias e o desvios padrões da porcentagem de células lisadas nos diferentes tubos e nos diferentes grupo serão comparadas pelo teste one-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, ambos implementados no software Prism 6 (GraphPad). O nível de significância considerado para este estudo será de 5%. Os Critérios de Inclusão foram definidos a seguir pelos pesquisadores: Grupo 1 - voluntários com fragilidade osmótica normal (n = 20) Hemoglobina maior que 11 g/dL,

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 8, sala 8.110, 1º andar
 Bairro: Setor Universitário CEP: 70.790-075
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (51)3968-1511 E-mail: oep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.377.274

percentagem de reticulócitos menor que 2,2, bilirrubina total menor que 1 mg/dL, ausência de esferócitos. Hemograma com volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCV) e índice de anisocitose (RDW) normais. Fragilidade osmótica, ferritina, desidrogenase láctica e antiglobulina normais. Grupo 2 - Voluntários com fragilidade osmótica aumentada (esferocitose hereditária) (n = 20) Hemoglobina menor que 10,9 g/dL, percentagem de reticulócitos maior que 2,2, bilirrubina total maior que 1 mg/dL, presença de esferócitos e fragilidade osmótica aumentada. Ferritina, lactato desidrogenase e antiglobulina normais. Grupo 3 - Voluntários com fragilidade osmótica diminuída (Anemia por deficiência de ferro ou talassemia) (n = 20) Hemograma com parâmetros hematológicos sugestivos de anemia ferropriva (volume corpuscular médio - VCM e hemoglobina corpuscular média - HCV reduzidos, Índice de anisocitose - RDW elevado, lâmina de extensão sanguínea (esfregaço de sangue) com elevada percentagem de hemácias hipocrômicas), ferritina alterada, lactato desidrogenase e antiglobulina normais [10] ou parâmetros hematológicos sugestivos de talassemia (VCM e hemoglobina reduzidos, número de hemácias aumentadas, dentre outros) e eletroforese de hemoglobina alterada e fragilidade osmótica diminuída. O Critério de Exclusão foi definido como: "Indivíduos com anemia hemolítica caracterizados por antiglobulina ou lactato desidrogenase alterados".

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo Primário será desenvolver um ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo que independa da sobreposição de leituras (overlay) definindo:a)

Se as curvas dose-respostas % de salina versus % de células lisadas no ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo é equivalente ao ensaio convencional. b) A concentração de salina que permita distinguir os três grupos de estudo: fragilidade osmótica aumentada, normal e diminuída. Não há descrição de Objetivo Secundário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os Riscos foram definidos pelos pesquisadores, são os mesmos associados a coletas de material para exames bioquímicos tradicionais, considerados risco mínimo aos participantes, definido como aquele geralmente encontrado na vida cotidiana ou durante a realização e avaliações físicas de rotina, incluindo coleta de espécimes por punção venosa, procedimentos não-invasivos empregados rotineiramente em práticas clínicas.

E os Benefícios foram descritos pelos pesquisadores como sendo: "Este trabalho fornecerá evidências se um método para detecção de fragilidade osmótica baseada em citometria de fluxo, que independa do "overlay" ou sobreposição de leituras. As vantagens dos métodos baseados em citometria de fluxo sobre o convencional são: (1) menos laborioso, (2) mais rápido, (3) não

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 8, sala 8.110, 1º andar
 Bairro: Setor Universitário CEP: 70.790-075
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (51)3966-1511 E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

Continuação do Parecer: 1.377.274

necessita de pré-incubação das amostras”.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esse projeto relata a respeito da "Validação de um ensaio para fragilidade osmótica de eritrócitos baseado em citometria de fluxo que independa da capacidade do equipamento fazer sobreposição de leituras antes e após a adição do agente indutor de hemólise". O objetivo primário será desenvolver um ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo que independa da sobreposição de leituras (overlay) definindo: a)

Se as curvas dose-respostas porcentagem de salina versus porcentagem de células lisadas no ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo é equivalente ao ensaio convencional. b) A concentração de salina que permita distinguir os três grupos de estudo: fragilidade osmótica aumentada, normal e diminuída. Na metodologia serão recrutados 60 participantes da pesquisa de ambos os sexos com idade superior aos 18

anos que serão divididos em 3 grupos: grupo 1 – fragilidade osmótica normal, controles (n=20), grupo 2 – fragilidade osmótica aumentada, esferocitose hereditária (n=20); e grupo 3 – fragilidade osmótica diminuída, talassemia ou anemia deficiência de ferro (n=20). Será feita a coleta de sangue venoso do voluntário por punção de veia braquial periférica em quatro tubos de 4 mL. Serão realizados os testes de fragilidade osmótica tradicional, fragilidade osmótica comparativo. Haverá metodologia de análise dos dados. Foram definidos os critérios de inclusão e exclusão, assim como, foram descritos os riscos e os benefícios da pesquisa. O projeto apresenta mérito científico e segue os pressupostos preconizados na resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos e elementos: 1) Folha de rosto devidamente assinada tanto pelo pesquisador responsável quanto pelo responsável pela instituição proponente; 2) Informações básicas do projeto; 3) Documento de autorização para a realização da pesquisa no laboratório Sabin; 4) Projeto de pesquisa; 5) TCLE, mas ainda que necessita acréscimos; 6) Critérios de inclusão e exclusão; 7) Riscos e benefícios; 8) Termo de responsabilidade; 9) Cronograma com previsão de início de coleta de dados em fevereiro de 2016 e encerramento da pesquisa em dezembro de 2016; 10) Orçamento.

Recomendações:

O CEP-UniCEUB ressalta a necessidade de desenvolvimento da pesquisa, de acordo com o protocolo avaliado e aprovado, bem como, atenção às diretrizes éticas nacionais quanto aos

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco E, sala E.110, 1º andar
 Bairro: Setor Universitário CEP: 70.790-075
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (51)3068-1511 E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.377.274

incisos XI.1 e XI.2 da Resolução nº 466/12 CNS/MS concernentes às responsabilidades do pesquisador no desenvolvimento do projeto:

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Observação: Ao final da pesquisa enviar Relatório de Finalização da Pesquisa ao CEP. O envio de relatórios deverá ocorrer pela Plataforma Brasil, por meio de notificação de evento. O modelo do relatório encontra-se disponível na página do UnICEUB

http://www.uniceub.br/instituicao/pesquisa/fns030_pesquisacomitebio.aspx, em Relatório de Finalização e Acompanhamento de Pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa está em condições de ser iniciada, entretanto, algumas correções devem ser realizada no protocolo de pesquisa, e enviadas ao CEP, sob a forma de emenda:

- 1) Acrescentar no TCLE o e-mail do CEP UnICEUB e os dados do pesquisador (telefone e e-mail) logo abaixo do local de assinatura;
- 2) Retirar da Folha de Rosto o Laboratório Sabin como Patrocinador Principal, o mesmo é proponente, instituição de vínculo do pesquisador principal e executora do estudo. Patrocinadora seria outra instituição que contribui para o desenvolvimento da pesquisa, principalmente com o custo financeiro, mas não é a executora.
- 3) Substituir na Folha de Rosto, a assinatura do responsável pela Instituição Proponente, pois foi assinada pelo pesquisador responsável. Da mesma forma, uma mesma pessoa não pode ser o pesquisador e autorizar a si próprio realizar a pesquisa.

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 6, sala 6.110, 1º andar	
Bairro: Setor Universitário	CEP: 70.790-075
UF: DF	Município: BRASÍLIA
Telefone: (51)3968-1511	E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 1.377.274

2) Retirar da Folha de Rosto o Laboratório Sabin como Patrocinador Principal, o mesmo é proponente, instituição de vínculo do pesquisador principal e executora do estudo. Patrocinadora seria outra instituição que contribui para o desenvolvimento da pesquisa, principalmente com o custo financeiro, mas não é a executora.

3) Substituir na Folha de Rosto, a assinatura do responsável pela Instituição Proponente, pois foi assinada pelo pesquisador responsável. Da mesma forma, uma mesma pessoa não pode ser o pesquisador e autorizar a si próprio realizar a pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo avaliado ad referendum pelo CEP-UniCEUB, com parecer N° 1.373.181/2015, tendo sido homologado pela coordenadora em 17 de dezembro de 2015.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_627384.pdf	11/12/2015 22:59:05		Aceito
Folha de Rosto	Folhadestostofragilidade.pdf	11/12/2015 22:51:29	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_fragilidade.pdf	10/12/2015 14:12:04	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_fragilidade.pdf	16/11/2015 15:10:43	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Declaração do Patrocinador	Termo_de_concordancia_fragilidade.pdf	16/11/2015 15:10:15	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP_fragilidade_v1.docx	16/11/2015 11:53:58	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_assistente2.pdf	16/11/2015 11:49:45	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_assistente1.pdf	16/11/2015 11:48:22	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Pesquisador_principal.pdf	16/11/2015 11:47:44	Gustavo Barcelos Barra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 8, sala 8.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3068-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



Continuação do Parecer: 1.077.274

BRASILIA, 20 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Marília de Queiroz Dias Jacome
(Coordenador)

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 8, sala 8.110, 1º andar
Bairro: Setor Universitário CEP: 70.790-075
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (51)3068-1511 E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Validação de um ensaio para fragilidade osmótica de eritrócitos baseado em citometria de fluxo que independa da capacidade do equipamento fazer sobreposição de leituras antes e após a adição do agente indutor de hemólise.

Pesquisador: Gustavo Barcelos Barra

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 51112215.0.0000.0023

Instituição Proponente: LABORATORIO SABIN DE ANALISES CLINICAS LTDA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.496.436

Apresentação do Projeto:

Título: Este projeto tem como título: "Validação de um ensaio para fragilidade osmótica de eritrócitos baseado em citometria de fluxo que independa da capacidade do equipamento fazer sobreposição de leituras antes e após a adição do agente indutor de hemólise".

Introdução = A esferocitose hereditária é a causa mais comum de hemólise crônica hereditária na população ocidental, com prevalência de 1 em 5.000 indivíduos. Suas manifestações clínicas variam amplamente, sendo que as mais típicas são: sinais de hemólise com anemia, reticulocitose, esplenomegalia, icterícia e cálculos biliares. A presença de esferócitos no sangue periférico resulta de alterações quantitativas e/ou qualitativas das proteínas da membrana do eritrócito. Estas proteínas são responsáveis por manter a forma discóide bicôncava da célula, permitindo a sua deformabilidade no trânsito da microvasculatura. A deficiência dessas proteínas de membrana resulta em perda de resistência osmótica, elasticidade e capacidade de deformação. Assim, o defeito celular primário é a perda de área relativa entre superfície de membrana e volume intracelular o que resulta na forma esferoidal. O teste de fragilidade osmótica convencional, que utiliza uma série de soluções hipotônicas, é o método diagnóstico para esferocitose hereditária mais utilizado na rotina laboratorial. O princípio do novo método é ressuspender as hemácias em uma solução de salina isotônica (0.9%), mensurar a quantidade de eritrócitos, induzir a hemólise pela adição de água deionizada e medir a quantidade de células residuais ao longo do tempo no

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco B, sala 8.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (51)3988-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



Continuação do Parecer: 2.495.436

citômetro de fluxo. Por fim, a porcentagem de células residuais é calculada a partir da relação entre a quantidade inicial e final de células. Este novo método tem muitas vantagens sobre o teste convencional: (1) menos laborioso, (2) mais rápido, (3) não necessita de pré-incubação das amostras de sangue, (4) baixo custo e (5) tem maior sensibilidade.

Objetivo = O objetivo primário será desenvolver um ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo que independa da sobreposição de leituras (overlay) definindo: a) Se as curvas dose-respostas % de salina versus % de células lisadas no ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo é equivalente ao ensaio convencional; b) A concentração de salina que permita distinguir os três grupos de estudo: fragilidade osmótica aumentada, normal e diminuída.

Metodologia = Serão recrutados 60 indivíduos de ambos os sexos com idade superior aos 18 anos que serão divididos em 3 grupos: grupo 1 – fragilidade osmótica normal, controles (n=20), grupo 2 – fragilidade osmótica aumentada, esferocitose hereditária (n=20); e grupo 3 – fragilidade osmótica diminuída, talassemia ou anemia deficiência de ferro (n=20). Os participantes da pesquisa serão recrutados a partir de clientes de um laboratório privado do Distrito Federal que procurarem o exame de fragilidade osmótica, contagens de células sanguíneas (hemograma), eletroforese de hemoglobina e que atendam os critérios descritos em cada grupo. A metodologia consiste na coleta de sangue venoso do voluntário por punção de veia braquial periférica em quatro tubos de 4 mL: (2) Vacuette K2 EDTA, (1) Vacuette heparina e (1) Vacuette SiO2 com gel separador. Serão realizados os testes de fragilidade osmótica tradicional, fragilidade osmótica comparativo. A porcentagem de células residuais em cada tubo será calculada pela razão entre o número de eventos do tubo em questão e o número de eventos do tubo número 1 (concentração em que todas as células estão inteiras). Em seguida, os valores obtidos dos ensaios serão convertidos em porcentagem de células lisadas pelo subtração de 100%. Este valor será representado graficamente de acordo com a concentração salina.

Metodologia de análise de dados = Na metodologia de análise de dados, as curvas dose-resposta serão construídas com auxílio do software Prism 6 (GraphPad) utilizando o modelo "log (agonist) vs. normalized response – Variable slope". A comparação entre as curvas dose-resposta utilizará o método "Extra sum-of – squares F test" e os parâmetros comparados serão "LogEC50" e "HillSlope", estas análises serão executadas no software Prism 6 (GraphPad). As médias e o desvios padrões da porcentagem de células lisadas nos diferentes tubos e nos diferentes grupo serão comparadas pelo teste one-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, ambos implementados no software Prism 6 (GraphPad). O nível de significância considerado para

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco B, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3068-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

Continuação do Parecer: 2.495.436

este estudo será de 5%.

Acréscimo metodológico = a) Coleta de material biológico. Dois tubos de sangue periférico contendo 4 mL serão colhidos da veia do braço por técnico especializado em coleta. As amostras da primeira etapa foram descartadas. Para a análise genômica haverá um novo recrutamento e aplicação do TCLE específico para esta etapa. Não haverá formação de biorepositório. **b) Obtenção de ácidos nucleicos = DNA genômico** será extraído utilizando o extrator de DNA automatizado Magna Pure 96 (Roche) com o kit "DNA and Viral NA small volume" seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído será quantificado no equipamento "Agilent 4200 TapeStation System" (Agilent Technologies). **c) Preparo da amostra para sequenciamento =** O exoma dos pacientes será enriquecido com o uso do kit "SureSelect sequencing Human All Exon" V5 Post (Agilent technologies) seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. A qualidade da fragmentação enzimática, ligação dos adaptadores e captura do exoma será avaliada também no "Agilent 4200 TapeStation System" (Agilent Technologies). **d) Especificação do tipo de NGS feito =** Amplificação clonal e sequenciamento do "pool" de bibliotecas dos pacientes será feita no equipamento "NextSeq 500 sequencer" com o kit NextSeq 500/550 V2 Mid output kit - 150 ciclos (ambos Illumina). A análise de bioinformática envolverá: análise das métricas de qualidade feitas no aplicativo FastQC (Babraham Bioinformatics), alinhamento contra o genoma de referência humano (hg19) com o uso do algoritmo "Burrows-Wheeler Aligner - BWA", seguindo da remoção de duplicatas, realinhamento de Indels, recalibração da qualidade da base e chamada de variante usando o "Genome Analysis Toolkit - GATK". A anotação das variantes será feito por meio da análise do arquivo VCF na plataforma "variant interpreter" (Illumina). As variantes identificadas serão confirmadas por sequenciamento Sanger e/ou PCR alelo específico. **e) Local onde serão executada as análises =** As análises serão executadas na instituição proponente deste projeto. No entanto, um equipamento necessário para a conclusão da pesquisa ainda não encontra-se disponível no laboratório (NextSeq 500 sequencer). Assim, não se pode descartar a necessidade do auxílio de empresa especializada, a ser definida, para completude ágil do projeto mas esta seria a última opção. **f) Alvos genômico analisados =** Os genes relacionados a esferocitose hereditária (ANK1, SPTA1, SPTB, EPB42, SLC4A1) terão prioridade na investigação por variantes genéticas. Na ausência de mutações nestes 5 genes, a análise será expandida para os genes envolvidos com anemias hemolíticas hereditárias (ADA, AKA1, ALDOA, CYB5R3, EPB41, G6PD, GCLC, GPI, GSR, GSS, HK1, NT5C3A, PFKL, PFKM, PGK1, PIEZO1, PKLR, SLCO1B1, SLCO1B3, TPI1, UGT1A1, UGT1A6, UGT1A7). O exoma completo somente será visualizado e analisado na ausência de mutação patogênica nos genes supracitados.

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco E, sala 6.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (51)3968-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

Continuação do Parecer: 2.495.436

Crítérios de Inclusão = foram definidos a seguir pelos pesquisadores: Grupo 1 - Voluntários com fragilidade osmótica normal (n = 20) Hemoglobina maior que 11 g/dL, percentagem de reticulócitos menor que 2,2, bilirrubina total menor que 1 mg/dL, ausência de esferócitos. Hemograma com volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCV) e índice de anisocitose (RDW) normais. Fragilidade osmótica, ferritina, desidrogenase láctica e antiglobulina normais. Grupo 2 - Voluntários com fragilidade osmótica aumentada (esferocitose hereditária) (n = 20) Hemoglobina menor que 10,9 g/dL, percentagem de reticulócitos maior que 2,2, bilirrubina total maior que 1 mg/dL, presença de esferócitos e fragilidade osmótica aumentada. Ferritina, lactato desidrogenase e antiglobulina normais. Grupo 3 - Voluntários com fragilidade osmótica diminuída (Anemia por deficiência de ferro ou talassemia) (n = 20) Hemograma com parâmetros hematológicos sugestivos de anemia ferropriva (volume corpuscular médio - VCM e hemoglobina corpuscular média - HCV reduzidos, índice de anisocitose - RDW elevado, lâmina de extensão sanguínea (esfregaço de sangue) com elevada percentagem de hemácias hipocrômicas), ferritina alterada, lactato desidrogenase e antiglobulina normais [10] ou parâmetros hematológicos sugestivos de talassemia (VCM e hemoglobina reduzidos, número de hemácias aumentadas, dentre outros) e eletroforese de hemoglobina alterada e fragilidade osmótica diminuída.

Crítério de Exclusão = foi definido como: "Indivíduos com anemia hemolítica caracterizados por antiglobulina ou lactato desidrogenase alterados".

Acréscimos dos critérios a esse emenda = Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa quanto ao novo item de estudo.

Crítério de inclusão = Ter se voluntariado como caso de esferocitose hereditária para primeira etapa da pesquisa, e condição clínica ter sido confirmada pelos ensaios bioquímicos e hematológicos previamente executados.

Crítério de exclusão = Se recusar a participar desta segunda etapa da pesquisa (análise genômica).

Objetivo da Pesquisa:

O Objetivo Primário será desenvolver um ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo que independa da sobreposição de leituras (overlay) definindo: a)

Se as curvas dose-respostas % de salina versus % de células lisadas no ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo é equivalente ao ensaio convencional. b) A concentração de salina que permita distinguir os três grupos de estudo: fragilidade osmótica aumentada, normal e diminuída.

Não há descrição de Objetivo Secundário.

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco E, sala 6.110, 1º andar
 Bairro: Setor Universitário CEP: 70.790-075
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (51)3988-1511 E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 2.495.408

Objetivo geral e específico (se houver) quanto à análise genômica dos participantes da pesquisa = Identificar as variantes genéticas causadoras da condição - Esferocitose Hereditária - nos pacientes do estudo supracitado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os Riscos foram definidos pelos pesquisadores, são os mesmos associados a coletas de material para exames bioquímicos tradicionais, considerados risco mínimo aos participantes, definido como aquele geralmente encontrado na vida cotidiana ou durante a realização e avaliações físicas de rotina, incluindo coleta de espécimes por punção venosa, procedimentos não-invasivos empregados rotineiramente em práticas clínicas.

E os Benefícios foram descritos pelos pesquisadores como sendo: "Este trabalho fornecerá evidências se um método para detecção de fragilidade osmótica baseada em citometria de fluxo, que independa do "overlay" ou sobreposição de leituras. As vantagens dos métodos baseados em citometria de fluxo sobre o convencional são: (1) menos laborioso, (2) mais rápido, (3) não necessita de pré-incubação das amostras". Riscos e benefícios associados à análise genética adicionados à emenda = Riscos - Não identificação da variante genética (possível causa da condição) e isto gerar ansiedade no voluntário. A descoberta de uma variante genética na família impactar indiretamente outro membro que não desejava receber esta informação. Achados secundários não relacionados a doença (caso seja necessária a análise do exoma completo).

Benefícios - Científicos: Identificação das mutações causadoras de esferocitose hereditária na população brasileira. Descoberta de novos genes associados à condição. Para o voluntário: Confirmação final do diagnóstico e caracterização da etiologia genética da sua condição; informação útil no aconselhamento genético dos participantes; informação útil na tomada decisão sobre as intervenções clínicas relacionadas à condição, caso necessário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esse projeto relata a respeito da "Validação de um ensaio para fragilidade osmótica de eritrócitos baseado em citometria de fluxo que independa da capacidade do equipamento fazer sobreposição de leituras antes e após a adição do agente indutor de hemólise". O Objetivo Primário será desenvolver um ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo que independa da sobreposição de leituras (overlay) definindo: a)

Se as curvas dose-respostas % de salina versus % de células lisadas no ensaio para fragilidade osmótica baseado em citometria de fluxo é equivalente ao ensaio convencional. b) A concentração de salina que permita distinguir os três grupos de estudo: fragilidade osmótica aumentada, normal

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco E, sala 6.110, 1º andar
 Bairro: Setor Universitário CEP: 70.790-075
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (51)3988-1511 E-mail: oep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 2.495.436

e diminuída. Na metodologia serão recrutados 60 participantes da pesquisa de ambos os sexos com idade superior aos 18

anos que serão divididos em 3 grupos: grupo 1 – fragilidade osmótica normal, controles (n=20), grupo 2 – fragilidade osmótica aumentada, esferocitose hereditária (n=20); e grupo 3 – fragilidade osmótica diminuída, talassemia ou anemia deficiência de ferro (n=20). Será feita a coleta de sangue venoso do voluntário por punção de veia braquial periférica em quatro tubos de 4 mL. Serão realizados os testes de fragilidade osmótica tradicional, fragilidade osmótica comparativo. Haverá metodologia de análise dos dados. Foram definidos os critérios de inclusão e exclusão, assim como, foram descritos os riscos e os benefícios da pesquisa. O projeto apresenta mérito científico e segue os pressupostos preconizados na resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

A essa emenda será feita a análise do exoma dos participantes da pesquisa e não haverá armazenamento do material genético dos participantes da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos e elementos: 1) Folha de rosto devidamente assinadas pelos respectivos responsáveis; 2) Informações básicas do projeto; 3) Documento de autorização para a realização da pesquisa no laboratório Sabin; 4) Projeto de pesquisa; 5) TCLE; 6) Critérios de inclusão e exclusão; 7) Riscos e benefícios; 8) Termo de responsabilidade; 9) Cronograma; 10) Orçamento; 11) Declarações informando o não armazenamento dos ácidos nucleicos.

Recomendações:

O CEP-UniCEUB ressalta a necessidade de desenvolvimento da pesquisa, de acordo com o protocolo avaliado e aprovado, bem como, atenção às diretrizes éticas nacionais quanto aos incisos XI.1 e XI.2 da Resolução nº 466/12 CNS/MS concernentes às responsabilidades do pesquisador no desenvolvimento do projeto:

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

- c) desenvolver o projeto conforme delineado;
- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco B, sala 6.110, 1º andar
 Bairro: Setor Universitário CEP: 70.790-075
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3988-1511 E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB**



Continuação do Parecer: 2.496.436

- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Observação: Ao final da pesquisa enviar Relatório de Finalização da Pesquisa ao CEP. O envio de relatórios deverá ocorrer pela Plataforma Brasil, por meio de notificação de evento. O modelo do relatório encontra-se disponível na página do UnICEUB

http://www.uniceub.br/instituicao/pesquisa/ins030_pesquisacomitebio.aspx, em Relatório de Finalização e Acompanhamento de Pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam às solicitações e o projeto encontra-se apto para aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo aprovado ad referendum pelo CEP-UnICEUB, com parecer N° 2.496.412x/18, tendo sido homologado pela coordenação em 15 de fevereiro de 2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1042657_E1.pdf	01/02/2018 09:32:09		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	emenda.docx	26/01/2018 16:40:00	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_de_nao_reposicao_de_repositorio_pesquisador.pdf	26/01/2018 16:36:02	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_de_nao_formacao_de_biorepositorio_instituicao.pdf	26/01/2018 16:35:43	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLENGS2.docx	26/01/2018 16:35:09	Gustavo Barcelos Barra	Aceito
Folha de Rosto	Folho_de_rosto_NGS_2_assinada.pdf	26/01/2018 16:34:24	Gustavo Barcelos Barra	Aceito

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 8, sala 8.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3968-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
BRASÍLIA - UNICEUB



Continuação do Parecer: 2.495.406

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 15 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
Marília de Queiroz Dias Jacome
(Coordenador)

Endereço: SEPN 707/907 - Bloco 8, sala 8.110, 1º andar

Bairro: Setor Universitário

CEP: 70.790-075

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (51)3968-1511

E-mail: cep.uniceub@uniceub.br