

4^{as} JORNADAS DE INICIAÇÃO À INVESTIGAÇÃO CLÍNICA
Centro Hospitalar do Porto, 29 de Junho de 2012



Poster 23. TESTE DA EOSINA-5-MALEIMIDA (EMA) PARA O DIAGNÓSTICO DE ESFEROCITOSE HEREDITÁRIA: EXPERIÊNCIA DO LABORATÓRIO DE CITOMETRIA DE FLUXO DO CENTRO HOSPITALAR DO PORTO.

Maria Luís Queirós^{1,2,6}, Paulo Antas^{1,2}, Susana Rocha², Magdalena Leander^{1,6}, Inês Freitas^{3,6}, Esmeralda Cleto^{4,6}, José Barbot^{5,6}, João Rodrigues^{1,6}, Marta Gonçalves^{1,6}, Marlene Santos^{1,6}, Ana Helena Santos^{1,6}, Lurdes Oliveira^{1,6}, Sónia Fonseca^{1,6}, Catarina Lau^{1,6}, Maria Anjos Teixeira^{1,6}, Luciana Pinho^{1,6}, Alice Santos-Silva², Margarida Lima^{1,6}

¹Laboratório de Citometria, Serviço Hematologia Clínica, Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

²Serviço de Bioquímica, Faculdade de Farmácia e Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), da Universidade do Porto.

³Serviço de Hematologia Laboratorial, Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto.

⁴Serviço de Pediatria, Hospital Santo António e Hospital Maria Pia, Centro Hospitalar do Porto

⁵Unidade de Hematologia Pediátrica, Hospital Maria Pia, Centro Hospitalar do Porto

⁶Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

Introdução

A esferocitose hereditária (EH) é uma doença da membrana do eritrócito provocada por mutações em genes que codificam para proteínas da membrana do eritrócito (PME), como a proteína banda 3, a espectrina, a anquirina e a proteína 4.2. A deficiência destas proteínas condiciona a formação de esferócitos por vesiculação da membrana. Os esferócitos são células mais pequenas e com maior concentração de hemoglobina, e a sua destruição prematura resulta em anemia hemolítica. Os métodos de referência para o rastreio de EH são o esfregaço de sangue periférico (presença de esferócitos) e o teste de fragilidade osmótica (aumento da fragilidade), sendo a confirmação do diagnóstico feita por electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), uma técnica demorada, laboriosa e que exige muita experiência do operador. A marcação das membranas dos eritrócitos com a eosina-5-maleimida (EMA), um corante fluorescente com afinidade para a proteína banda 3, permite a deteção dos eritrócitos deficientes nesta proteína por citometria de fluxo (CF) e apresenta-se como uma alternativa para o rastreio desta patologia.

Objetivos

Apresentar a experiência do Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto no diagnóstico de EH, por CF.

Material e Métodos

Foram estudadas por CF amostras de sangue periférico de 80 indivíduos adultos normais (doadores benévolos de sangue) e de 30 doentes com EH previamente diagnosticados no Serviço de Hematologia Laboratorial do Centro Hospitalar do Porto e no Serviço de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelos métodos convencionais, incluindo SDS-PAGE. Para tal recorreu-se à marcação dos eritrócitos com EMA, avaliando-se a sua ligação às PME através da mediana da intensidade de fluorescência (IMF) das 200.000 células analisadas por amostra. Para além disso, procedeu-se à avaliação do tamanho dos eritrócitos através da dispersão frontal da luz (FSC, *forward scatter*). As amostras foram adquiridas no citómetro NaviosTM (Beckman Coulter) e analisadas com o *software* Infinicyt (Cytognos). Para a análise estatística dos dados recorreu-se ao PASW Statistics18.



Resultados

Foram calculadas as médias, desvios padrão (DP), mínimo e máximo da mediana do FSC e da IMF dos eritrócitos marcados com EMA, nos doentes e nos controlos. A deficiência em proteínas de membrana (DPME) e a diminuição do tamanho (DT) dos eritrócitos foi calculada comparando a IMF (EMA) e o FSC dos eritrócitos dos doentes com a dos eritrócitos normais processados em paralelo. Os resultados obtidos são apresentados na tabela seguinte:

		Média ± SD	Mínimo - Máximo
IMF (EMA)	Normais	295,18 ± 16,15	257,13 - 349,12
	Doentes com EH	222,72 ± 35,98	170,01 - 296,93
	DPME (%)	24,79 ± 12,76	-5,54 - 41,31
FSC	Normal	2120,35 ± 69,99	1928,22 - 2267,09
	Doentes com EH	1957,19 ± 127,8	1730,94 - 2246,79
	DT (%)	7,67 ± 6,12	-6,02 - 15,61

Discussão e Conclusões

Os eritrócitos dos doentes com EH apresentavam diminuição do FSC (tamanho) ($p < 0,001$) e da IMF (EMA) ($p < 0,001$), quando comparados com os eritrócitos normais. Apenas dois dos doentes estudados (6,7%) não foram identificados por CF, o que revelou uma sensibilidade de 93,3%, que está de acordo com os resultados descritos na literatura (sensibilidade 92,7% e especificidade 99,1%). Desta forma a análise dos eritrócitos por CF após marcação com EMA parece ser uma excelente alternativa para o rastreio de EH, devido à grande sensibilidade e rapidez de execução, quando comparada com os métodos de referência.

Apresentador

Maria Luís Queirós, Técnica Superior de Saúde, ramo Laboratório; Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do CHP; Aluna de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas, FFUP

mlisqueiros@gmail.com