

INVESTIGAÇÃO DA FRAGILIDADE OSMÓTICA DE ERITRÓCITOS DE PACIENTES PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME – SUBFENÓTIPOS VASO-OCCLUSIVO E HEMOLÍTICO

Hassan de Holanda Albuquerque¹; Vera Lúcia de Menezes Lima²

¹Estudante do Curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: hhalbuquerque@gmail.com, ²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: vlml@ufpe.br.

Sumário: O objetivo deste trabalho foi investigar a fragilidade osmótica entre os subfenótipos da anemia falciforme. A anemia falciforme é uma patologia que induz alterações morfológicas dos eritrócitos, que passam a ter formato de foice e pode ser dividida em dois subfenótipos: vaso-oclusivo (VO) e anemia hemolítica (AH) e neste estudo alguns indivíduos por possuírem características clínicas de ambos os fenótipos foram enquadrados em um terceiro subfenótipo denominado superposição (SP). Quatro grupos foram selecionados: um grupo controle, grupo subfenótipo vaso-oclusivo, grupo subfenótipo hemolítico e um grupo superposição. Amostras foram obtidas através de venopunção, foram centrifugadas para separação dos eritrócitos e centrifugadas quatro vezes com adição de solução salina. Em seguida, uma solução de células diluídas foi preparada com eritrócitos lavados em tampão salina. Teste de fragilidade osmótica foi feito a partir de aplicação de amostras de eritrócitos diluídos em sete concentrações de solução salina. Com os dados obtidos por espectrofotometria, construiu-se a curva de hemólise, utilizada para análises estatísticas. Notou-se um aumento da resistência entre indivíduos VO e AH, respectivamente. Indivíduos SP mostraram fragilidade osmótica intermediária entre VO e AH. Eritrócitos de pacientes AH mostraram um aumento significativo da resistência à hemólise em relação ao grupo controle. Assim, o aumento da resistência hemolítica em indivíduos com subfenótipo AH pode estar associada a mudanças estruturais e no conteúdo lipídico dos eritrócitos desta doença.

Palavras-chave: anemia falciforme; fragilidade osmótica; lipídios.

INTRODUÇÃO

A Anemia falciforme (AH) é uma doença monogênica que reflete a expressão clínica do gene da Hemoglobina (Hb) S em homozigose, no lugar da Hb normal – HbA (Rees et al., 2010). A HbS é formada devido à uma mutação de ponto, causada pela substituição de adenina por timina (GAG > GTG), que ocasiona a codificação de valina em vez de ácido glutâmico na posição 6 da cadeia β da globina, sendo esta a Hb variante de maior frequência mundial é a HbS (Martins et al., 2010; Hannemann et al., 2011). De acordo com Zago et al. (2007) os eritrócitos falciformes expressam maior número de moléculas de adesão (PS, CD36, CD47, CD49d e BCAM/LU) na superfície externa da membrana celular do que eritrócitos normais. Essas moléculas favorecem a interação com o endotélio e com outras células, propagando o processo de vaso-oclusão. A morfologia do eritrócito dos pacientes apresenta o formato de foice que facilita a oclusão da microvasculatura, causando obstrução vascular, e inviabilizando a oxigenação tecidual, que causa isquemia tecidual (ANVISA, 2002; Martins et al., 2010; Strypulkowski & Manfredini, 2010; Ikuta et al., 2011). Doenças ligadas a alterações no metabolismo, como insuficiência renal e doença hepática, que podem ocorrer na AF, geram modificações na proporção de fosfolipídios e de

colesterol da membrana eritrocitária e, como consequência, afetam a fragilidade osmótica (Passos, 2013). A fragilidade osmótica é influenciada por fatores como o tamanho, o volume e a forma do eritrócito, o tipo e a quantidade de hemoglobina, as diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural das mesmas (Perk et al., 1964). Clinicamente, a anemia falciforme é dividida em dois subfenótipos – um com predomínio vaso-oclusivo e outro com anemia hemolítica (Rees et al., 2010). Porém, estudos que investigam alterações nas resistências à hemólise dos subfenótipos, separadamente, são escassos. Esta divisão de fenótipos, um dependente de hemólise e outro de vaso-oclusão, indica que os tratamentos poderão ser direcionados preferencialmente contra aspectos distintos da fisiopatologia e possivelmente as alterações de hemólise na fisiopatogenia da doença possam vir a contribuir para subsidiar e eliciar a realização de estudos posteriores neste sentido, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida e indivíduos com anemia falciforme.

MATERIAIS E MÉTODOS

45 pacientes com anemia falciforme e 15 indivíduos saudáveis foram selecionados na Fundação HEMOPE e foram divididos em quatro grupos: um grupo controle (n=15), um grupo com o subfenótipo vaso-oclusivo (n=15), um grupo com o subfenótipo hemolítico (n=15); e como alguns indivíduos apresentaram manifestações clínicas de ambos os subfenótipos foi criado um terceiro grupo denominado superposição (n=15). Todos os indivíduos e pacientes assinaram por escrito um termo de consentimento para a participação da pesquisa. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Fundação HEMOPE / Hospital de Hematologia – Parecer 050/2011. A detecção de HbS ou de HbA foi realizada no HEMOPE (metodologia rotineira para pacientes e indivíduos saudáveis) através de eletroforese de hemoglobinas seguida por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), segundo método de Ou & Rognerud (1993). Amostras de sangue periférico foram coletadas após 12 horas de jejum, por punção venosa, em tubos a vácuo contendo EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) 1mg/mL., como anticoagulante. As amostras foram transportadas para o Laboratório de Lipídios e Aplicações de Biomoléculas em Doenças Prevalentemente Negligenciadas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, respeitando-se os princípios de biossegurança, de acondicionamento e de transporte de material biológico. As amostras foram centrifugadas a 2500 x g, a 4° C, durante 15 minutos, para separação dos eritrócitos (Santos et al., 2009), as amostras foram novamente centrifugados, por mais 4x (com acréscimo de Solução Salina 0,9%), nas mesmas condições de centrifugação, com exceção do tempo, que passa para 5 minutos por lavagem. Em seguida, uma solução de células diluídas foi preparada com 0,2 mL de eritrócitos lavados em 20 mL de tampão salina. Teste de fragilidade osmótica, foi feito a partir de aplicação de amostras de eritrócitos diluídos em sete concentrações diferentes de solução salina (na faixa de 0,3% a 0,9%), como descrito em trabalhos anteriores (Moore, 1968). A partir dos dados obtidos por espectrofotometria (675 nm), foi construído a curva de hemólise para cada indivíduo, a que foi utilizada para análises estatísticas da fragilidade osmótica dos eritrócitos. A comparação entre todas as variáveis da anemia falciforme foi realizada através de Testes “t” de Student e Análises de Variância (Teste de Fisher). O intervalo de confiança adotado foi de 95%.

RESULTADOS

No estudo foi observado um aumento de lise da membrana eritrocitária causado pela variação de osmolaridade. Notou-se ainda um aumento progressivo da resistência entre indivíduos VO e AH, respectivamente quando comparados ao controle. Os indivíduos com subfenótipo SP mostraram fragilidade osmótica intermediária entre VO e AH conforme

mostrado na Figura 1 (A). Eritrócitos de pacientes AH apresentaram um aumento significativo de resistência à hemólise em relação ao grupo controle conforme mostrado figura 1 (B).

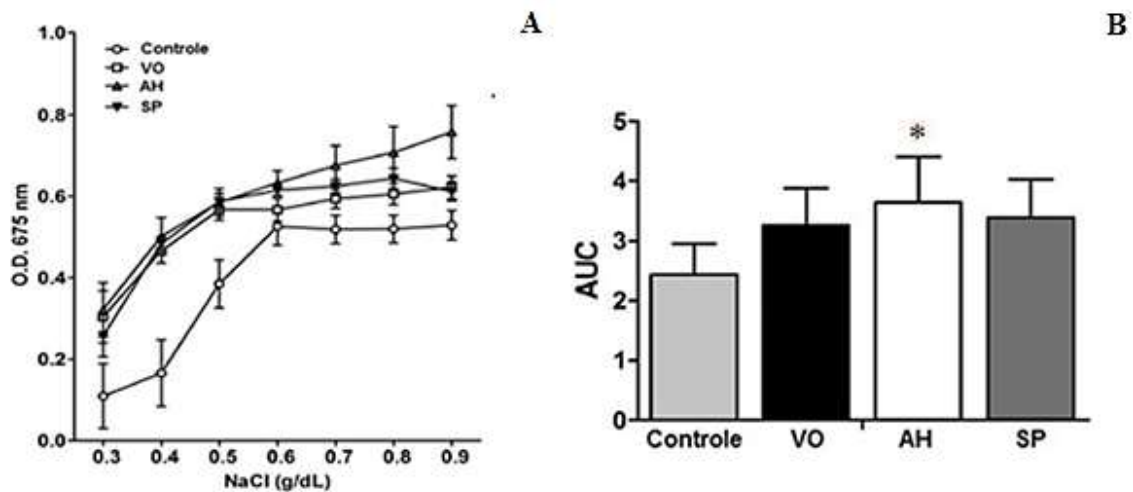


Figura 1 (A). Hemólise de pacientes com anemia falciforme em eritrócitos com diferentes concentrações de NaCl. **(B)** Gráfico de área sob a curva (AUC). Dados expressos como média \pm erro padrão. VO: vaso-oclusivo, AH: anemia hemolítica e SP: superposição.

DISCUSSÃO

De acordo com Elias et al. (2004), a fragilidade osmótica pode ser influenciada por diversos fatores como a forma, volume e o tamanho do eritrócito, bem como o tipo e a quantidade de hemoglobina, diferenças na viscoelasticidade das membranas e composição químico-estrutural das mesmas. Elias et al. (2004) também têm enfatizado que o formato da célula é afetado por alterações na composição da membrana celular. Doenças associadas a alterações metabólicas, podem modificar a proporção de fosfolípidos e de colesterol na membrana dos eritrócitos e assim afetar a fragilidade osmótica. Eritrócitos maduros são incapazes de realizar síntese de lipídios, devido à ausência da enzima acetil CoA carboxilase, com isso, a membrana celular sofre mudanças em sua composição lipídica de acordo com as alterações dos lipídios na circulação (Barabino et al., 2010).

CONCLUSÕES

Assim, conclui-se que o aumento da resistência hemolítica é alterado em indivíduos com anemia falciforme. Em particular observou-se que houve um aumento significativo da resistência hemolítica no subfenótipo AH em comparação com o grupo controle. O subfenótipo AH pode estar associado a mudanças estruturais e no conteúdo lipídico dos eritrócitos desta doença. Sendo assim, esse estudo fornece subsídios para novas pesquisas que possam elucidar cada vez mais as manifestações clínicas da anemia falciforme, permitindo assim um direcionamento adequado no tratamento da doença de acordo com os seus subfenótipos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CNPq, FACEPE, CAPES pelo auxílio financeiro e pela bolsa de iniciação científica, bem como a fundação HEMOPE por ter colaborado com o trabalho. Também agradeço à professora Vera Menezes por ter me aceitado como seu aluno e a todos da equipe que sempre se mostraram disponíveis a ajudar.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília; 2002.
- Barabino, G.A.; Platt, M.O.; Kaul, D.K. Sickle cell biomechanics, **Annual Review of Biomedical Engineering**. **12**. p.345-367; 2010.
- Elias, F.; Lucas, S.R.R.; Hagiwara, M.K.; Kogica, M.M.; Mirandola, R.M.S.; Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal, **Ciência Rural**, v.34, p.413-418; 2004.
- Hannemann, A.; Weiss, E.; Rees, D.C.; Dalibalta, S.; Ellory, J.C.; Gibson, J.S. The Properties of Red Blood Cells from Patients Heterozygous for HbS and HbC (HbSC Genotype). **Anemia**. p.248; 2011.
- Ikuta, T.; Thatte, H.S.; Tang, J.X.; Mukerji, I.; Knee, K.; Bridges, K.R.; Wang, S.; Montero-Huerta, P.; Joshi, R.M.; Head, C.A. Nitric oxide reduces sickle hemoglobin polymerization: Potential role of nitric oxide-induced charge alteration in depolymerization. **Archives of Biochemistry Biophysics**. v.510, n.1: p.53-61; 2011.
- Martins, P.R.J.; Moraes-Souza, H.; Silveira, T.B. Morbimortalidade em doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.32, n.5: p.378-383; 2010.
- Passos, P.P. Alterações metabólicas em plasma e eritrócitos de portadores de anemia falciforme (HbSS): subfenótipos com predomínio vaso-oclusivo ou hemolítico. **Tese de Doutorado**; Recife; p. 207; 2013.
- Perk, K.; Frei, Y.F.; Herz, A.; Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals, **American Journal Veterinary Research**, v.25, p.1241-1248; 1964.
- Rees, D.C.; Williams, T.N.; Gladwin, M.T. Sickle-cell disease. **Lancet**. v.376, n.9757: p.2018-31. Epub 2010.
- Stypulkowski, J. B.; Mnfredini, V.; Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.32, n.1: p. 56-62; 2010.