

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

Rebeca Xavier da Cunha¹; Vera Lúcia de Menezes Lima²

¹Estudante do curso de Biomedicina –CCB-UFPE; E-mail: rebeca_xavier@live.com, ²Docente/pesquisador do Departamento de Bioquímica-CCB-UFPE. E-mail: vlml@ufpe.br

Sumário: A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hemolítica crônica herdada onde a cadeia da beta- globina sofre uma mutação de ponto. Há dois subfenótipos o hemolítico (AH) e o vaso-oclusivo (VO) que são distinguidos por aspectos clínicos e em neste estudo alguns indivíduos por possuírem características clínicas de ambos os fenótipos foram enquadrados em um terceiro subfenótipo denominado superposição (SP). O objetivo deste trabalho foi investigar as diferenças na permeabilidade ao glicerol nos diferentes subfenótipos da AF. 60 indivíduos foram selecionados na fundação HEMOPE e foram divididos em quatro grupos: um grupo controle (n=15), um grupo subfenótipo vaso-oclusivo (n=15), um grupo subfenótipo hemolítico (n=15) e um grupo de superposição destes fenótipos (n=15). A distinção entre HbS ou HbA foi realizada na fundação HEMOPE. As amostras foram centrifugadas e os eritrócitos submetidos a lavagens com solução salina. Foi realizado o teste de permeabilidade ao glicerol onde na primeira etapa foram realizadas nove diluições de alíquotas da solução de eritrócitos não hemolisados em tampão fosfato salina e da solução de eritrócitos hemolisados em tampão fosfato contendo glicerol admitindo-se um volume final de 5 mL e lidas em espectrofotômetro. Na segunda etapa foi adicionado tampão fosfato contendo glicerol 0,3M (pH 7,4) em eritrócitos diluídos após homogeneizado foi lido em espectrofotômetro. Os resultados mostram que o tempo médio de hemólise aumentou progressivamente para os grupos VO, AH e SP, respectivamente. Os resultados indicam que os eritrócitos de pacientes com subfenótipos clínicos VO, AH e SP são mais resistentes á hemólise em presença do glicerol. Estes achados conduzem a um futuro promissor no que diz respeito ao entendimento dos subfenótipos desta patologia em nível de membrana dos eritrócitos, assim como também oferece bases para estudos posteriores visando um tratamento específico para cada uma destas manifestações clínicas o que contribui para um melhor prognóstico desta condição.

Palavras-chave: anemia falciforme; glicerol; hemólise; permeabilidade; subfenótipos.

INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma enfermidade monogênica hereditária que geneticamente é descrita como uma mutação pontual na sexta posição do gene da beta globina onde o códon GAG que codifica um ácido glutâmico é substituído pelo códon GTG que codifica uma valina. A beta globina alterada deste modo produz uma hemoglobina anormal denominada hemoglobina S (HbS) (MANFREDINI et al., 2007). A hemoglobina anormal em presença de sangue desoxigenado se polimeriza e danifica a membrana do eritrócito deixando-o em forma de foice. A falcilização dos eritrócitos é reversível conforme o teor de oxigênio na hemoglobina aumenta (BARABINO; PLATT; KAUL, 2010). Importante na patologia da AF é também a desorganização dos lipídios que ocorre nos eritrócitos falcilizados com perda da assimetria destes lipídios de membrana (KUYPERS, 2008). Com relação aos lipídios de membrana dos eritrócitos ainda é relatado um aumento do

colesterol de membrana e isto está diretamente relacionado a alterações da fluidez da membrana do eritrócito (MARZOUKI; KHOJA, 2003). Estudo sobre a relação entre os subfenótipos clínicos vaso-oclusivo e hemolítico da AF com a permeabilidade ao glicerol pode vir a contribuir em futuros estabelecimentos de terapêutica específica visando à melhora da qualidade de vida dos indivíduos com AF subfenótipos vaso-oclusivo e hemolítico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística: 45 pacientes com anemia falciforme e 15 indivíduos saudáveis objeto deste estudo 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). Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Fundação HEMOPE / Hospital de Hematologia segundo parecer 050/2011. **Diagnóstico de anemia falciforme ou confirmação de sua ausência:** Este foi realizado através de eletroforese de hemoglobinas seguida por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) na Fundação HEMOPE (OU & ROGNERUD, 1993) que possibilitou verificar a presença de HbS ou de HbA. **Obtenção e processamento das amostras sanguíneas:** A coleta de sangue foi realizada após 12 horas de jejum e utilizando tubos a vácuo com anticoagulante o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Em seguida estas foram centrifugadas a 2.500 x g, a 4°C por 15 minutos. Nesta primeira centrifugação foi obtido o precipitado contendo eritrócitos (SANTOS et al., 2009). Os eritrócitos foram submetidos a 4 lavagens com solução salina gelada (0,9%) seguidas por centrifugações a 2. 500 xg, a 4°C por 5 minutos. **Teste de permeabilidade ao glicerol:** Para a realização do teste foram preparadas uma solução de eritrócitos diluídos, uma solução de eritrócitos não hemolisados em tampão fosfato salina e uma solução de eritrócitos hemolisados em tampão fosfato contendo glicerol. Na primeira solução, foi adicionado 20 mL de tampão fosfato salina 0,01M em pH 7,4 em 0,2 mL de eritrócitos lavados. Na segunda solução adicionou-se 45 mL de tampão fosfato salina 0,01M em pH 7,4 em 0,3 mL de eritrócitos diluídos. A amostra foi lida em espectrofotômetro para comprovar ausência de hemólise. Na terceira solução foi adicionado 45 mL de tampão fosfato contendo glicerol 0,3M em pH 7,4 em 0,3 mL de células diluídas e foi realizada leitura em espectrofotômetro para a comprovação da hemólise. O teste de permeabilidade ao glicerol foi dividido em duas etapas, na primeira etapa foram feitas nove diluições de alíquotas da segunda solução e da terceira solução admitindo-se um volume final de 5 mL para cada tubo (MOORE, 1968) em seguida foram homogeneizadas e lida imediatamente em espectrofotômetro. Na segunda etapa foi adicionado 3 mL de tampão fosfato contendo glicerol 0,3M (pH 7,4) em 0,2 mL de eritrócitos diluídos. A amostra foi imediatamente homogeneizada por inversão e lida em espectrofotômetro (675 nm) a cada 10 segundos por aproximadamente 3 minutos. **Análises estatísticas:** A análise estatística foi feita com o Teste “t” de Student para comparar as amostras, e para análise das variâncias foi utilizado o Teste de Fisher. O intervalo de confiança adotado foi de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os eritrócitos de todos os pacientes apresentaram aumento na resistência à hemólise decorrente da presença do glicerol a 0,3M, conforme mostrado na Figura 1. Houve um aumento progressivo nos 50% tempo de hemólise para os grupos VO, AH e SP, respectivamente. Sendo que os que apresentavam uma superposição dos fenótipos tiveram valores significativamente maiores em relação ao grupo VO.

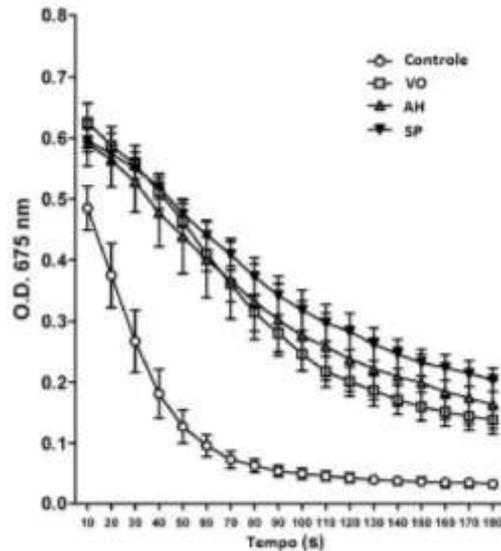


Figura 1. Hemólise em paciente controle e com anemia falciforme em eritrócitos a 0,3M de glicerol. Dados expressos como média \pm erro padrão. VO: vaso-oclusivo, AH: anemia hemolítica e SP: superposição.

Kuypers (2014) tem enfatizado que mudanças na permeabilidade da membrana das células falciformes devem-se a alterações que estes eritrócitos sofrem em nível de membrana levando a perda da assimetria de membrana que tem como consequências mudanças na hidratação da célula, bem como tendência à hemólise. De acordo com os testes de permeabilidade ao glicerol 50% do tempo médio de hemólise mostra que os grupos SP e AH tiveram valores de resistência à hemólise significativamente maiores em relação aos grupos VO e controle. Sendo que os grupos SP e AH tiveram valores de resistência à hemólise significativamente maior em relação ao grupo controle, já o grupo SP teve valores de resistência à hemólise significativamente maiores em relação ao grupo VO, conforme mostrado na Figura 2.

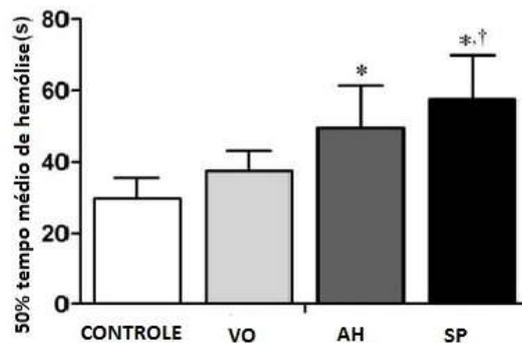


Figura 2. 50% do tempo médio de hemólise em paciente controle e com anemia falciforme em eritrócitos a 0,3 M de glicerol. Dados expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ vs. Controle; † $p < 0,05$ vs. VO. VO: vaso-oclusivo, AH: anemia hemolítica e SP: superposição.

Passos (2013) em seu estudo relata que o grupo AH apresentou maiores níveis de colesterol em suas membranas, o que leva a um aumento na resistência à hemólise. Moore (1968) reporta que a resistência à hemólise está envolvida com alterações na estrutura e conteúdo das membranas eritrocitárias. Dentre estas alterações, está o aumento da quantidade de colesterol e fosfolipídios além desta resistência poder estar associada ao tamanho do eritrócito, tipo e quantidade de hemoglobina. Outros estudos também dão

suporte à hipótese de que a hemólise está particularmente envolvida com o teor de colesterol nas membranas lipídicas dos eritrócitos. Marzouki e Khoja (2003) relatam também aumento do colesterol de membrana em pacientes com anemia falciforme e relacionam esses achados com a alteração na fluidez da membrana. Harisa e Badran (2015) também descreve que eritrócitos ricos em colesterol têm alterações como aumento da hemólise, diminuição da permeabilidade e aumento da rigidez.

CONCLUSÕES

Verificou-se que a permeabilidade osmótica ao glicerol é alterada em indivíduos portadores de anemia falciforme. Em particular observou-se que grupo AH e SP tiveram os maiores índices de resistência à hemólise em comparação com os grupos controle e VO. Por essas diferenças acredita-se que modificações na estrutura e composição nas membranas eritrocitárias podem estar relacionadas com as diferentes manifestações clínicas entre os subfenótipos da anemia falciforme. Estudos sobre a relação entre os subfenótipos da AF e a permeabilidade ao glicerol podem vir a contribuir em futuros estabelecimentos de terapêutica específica visando à melhora da qualidade de vida dos indivíduos com AF.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, pela bolsa e auxílio financeiro. A CAPES e a FACEPE. A fundação HEMOPE e a minha orientadora Prof^a Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima chefe do Laboratório de Lipídios e Aplicação de Biomoléculas em Doenças Prevalentes e Negligenciadas do Departamento de Bioquímica, pelo apoio e incentivo.

REFERÊNCIAS

- BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle cell biomechanics. **Annual review of biomedical engineering**, v. 12, p. 345-367, 2010.
- HARISA, G. I.; BADRAN, M. M. Simvastatin nanolipid carriers decreased hypercholesterolemia induced cholesterol inclusion and phosphatidylserine exposure on human erythrocytes. **Journal of Molecular Liquids**, v. 208, p. 202-210, 2015.
- KUYPERS, F. A. Red cell membrane lipids in hemoglobinopathies. **Current molecular medicine**, v. 8, n. 7, p. 633-638, 2008.
- KUYPERS, F. A. Hemoglobin s polymerization and red cell membrane changes. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 155-179, 2014.
- MANFREDINI, V. et al. A fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 19, n. 1/2, p. 3-6, 2007.
- MARZOUKI, Z. M.; KHOJA, S. M. Plasma and red blood cells membrane lipid concentration of sickle cell disease patients. **Saudi medical journal**, v. 24, n. 4, p. 376-379, 2003.
- MOORE, T. J. Glycerol permeability of human fetal and adult erythrocytes and of a model membrane. **Journal of lipid research**, v. 9, n. 5, p. 642-646, 1968.
- OU, C.; ROGNERUD, C. L. Rapid analysis of hemoglobin variants by cation-exchange HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 820-824, 1993.
- PASSOS, P. P. **Alterações metabólicas em plasma e eritrócitos de portadores de anemia falciforme (HbSS): subfenótipos com predomínio vaso-oclusivo ou hemolítico**. 173f. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2013.
- SANTOS, B. S. et al. Análise comparativa do perfil lipídico de homens do estado de Pernambuco em relação às III e IV diretrizes brasileiras sobre dislipidemias. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, p. 295-297, 2009.