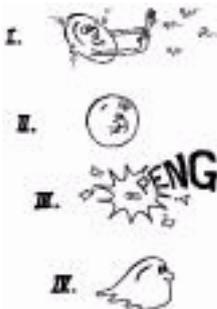




Prática: Resistência Globular e Hemólise

Revisado e atualizado por Renato Moreira Rosa em março de 2007

Resistência globular e provas de fragilidade osmótica: fundamentação teórica



A resistência globular refere-se ao fenômeno biológico em que as células sanguíneas, notadamente a série vermelha, possuem em resistir ao rompimento em meio hipotônico. Essa propriedade é fundamental para evitar a ruptura dos glóbulos vermelhos (hemólise) devido a desvios osmolares do plasma que ocorrem normalmente durante o dia. Em uma série de patologias, a resistência globular dos eritrócitos apresenta-se alterada, adquirindo importante valor diagnóstico.

O princípio básico dos testes que avaliam essa propriedade biológica é submeter uma amostra de sangue a soluções hipotônicas, geralmente preparadas usando cloreto de sódio, glicose ou sacarose, e quantificar a porcentagem de hemácias que rompem (% de hemólise) por meio de contagem em câmara de Neubauer (hemocítmetro), com o uso de contadores automatizados de hemograma ou pela determinação espectrofotométrica da liberação de hemoglobina. Em situações de hemólise parcial é importante notar que as populações celulares podem possuir diferentes resistências (resistência globular mínima e máxima), em virtude da sua idade ou de seu estado metabólico.

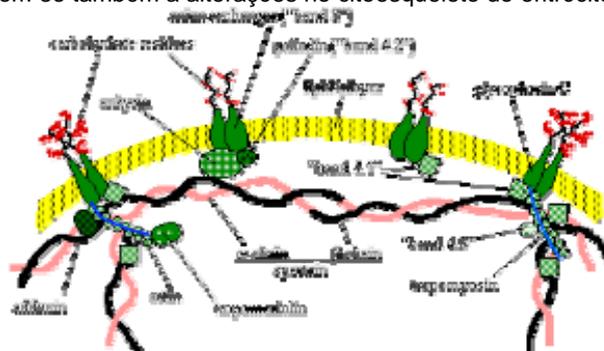
As situações patológicas que reduzem a quantidade de eritrócitos circulantes em função de uma ruptura na circulação originam anemias hemolíticas. Quando a resistência globular encontra-se reduzida (e portanto a fragilidade osmótica encontra-se aumentada), o quadro de anemia hemolítica pode ser desencadeado por estímulos simples que levem a uma variação de volume. Várias situações patológicas afetam a resistência globular, tais como:

1. Esferocitose hereditária

A esferocitose hereditária (também conhecida como doença de Minkowski-Chauffard) é uma doença genética autossômica dominante (1/5000 nascimentos nos EUA) causada por mutações em genes que codificam para proteínas componentes do citoesqueleto do eritrócito tais como a espectrina, anquirina, banda 4.1, glicoforina e banda 4.2 (a actina também constitui o citoesqueleto da hemácia mas não está envolvida nesse grupo de patologias). No entanto, a maior parte dos casos dessa doença deve-se a mutações na espectrina. A espectrina é uma proteína periférica de membrana do lado citossólico e confere maleabilidade do eritrócito. Na ausência de espectrina perfeita, o eritrócito perde sua flexibilidade e ao passar pela rede intrincada de canículos do baço, o cisalhamento causa a hemólise; quando não causa, o glóbulo fica retido na microcirculação esplênica e é removido pela rede macrocitária. Nessa condição, o paciente desenvolve um quadro grave de anemia hemolítica (é a anemia hemolítica mais comum nos caucasóides) e esplenomegalia.

Outros sintomas estão associados e o tratamento pode envolver exsanguíneo transfusões no período neonatal, múltiplas transfusões de sangue e até esplenectomia (remoção cirúrgica do baço; somente após os 4 anos de idade).

O diagnóstico laboratorial é feito em função da presença dos esféricitos na circulação (a hemácia perde sua forma bicôncava e adquire forma esférica) e da redução da resistência globular (não há maleabilidade que permita que a célula agüente um aumento de volume em função da entrada de água em condições hipotônicas). Outros achados laboratoriais inespecíficos tais como icterícia e hemoglobinúria também estão presentes. Outras doenças tais como a eliptocitose (eritrócitos ovais mas ainda bicôncavos) ou estomatocitose (eritrócitos côncavos em apenas uma face) são mais raras ou menos graves, mas devem-se também a alterações no citoesqueleto do eritrócito

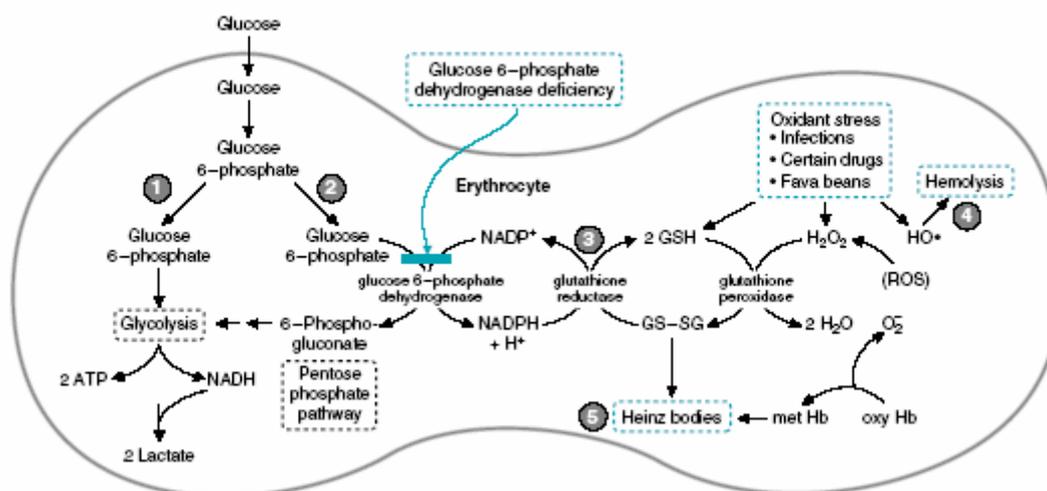


2. Deficiência de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PD)

A deficiência de G-6-PD é a enzimopatia eritrocitária mais comum e bem estudada, podendo afetar cerca de 7% da população brasileira (2-3% da população mundial). É de fácil manejo, desde que sejam evitadas drogas de natureza oxidante e a ingestão de feijão de fava. A deficiência de G6PD é uma doença genética associada ao cromossomo X e, ao contrário do que se esperaria, afeta igualmente indivíduos dos dois sexos. A maior incidência ocorre em pessoas com ancestrais provenientes do Mediterrâneo, como Itália e Oriente Médio, da África Equatorial e de algumas regiões do Sudeste Asiático. Foi descoberta em soldados negros americanos durante a guerra da Coréia, em função de episódios de dores, anemia severa e escurecimento da urina.

O ciclo das pentoses é uma via metabólica muito ativa em diversos tipos celulares, com o objetivo de produzir NADPH (utilizado nas biossínteses redutoras, tais como na síntese de ácidos graxos e isoprenóides; por exemplo, muito ativa em células das glândulas mamárias na produção de leite), ribose-5-P (utilizada na síntese de ácidos nucleicos, especialmente em tecidos em proliferação) e além disso, em situações de necessidade de geração de energia, a ribulose-5-P pode ser transformada em xilulose-5-P e então em gliceraldeído 3-P e ainda posteriormente em frutose-6-P; ou pode ser convertida em ribose-5-P e posteriormente em frutose-6-P. Enfim, de nosso interesse é a geração de NADPH.

Na primeira reação do ciclo das pentoses, a enzima G-6PD converte glicose-6-P em 6-fosfogluconolactona com geração de NADPH. Essa lactona é posteriormente convertida em ribulose-5-P para encerrar a etapa oxidativa do ciclo. No eritrócito, o metabolismo bem como o transporte de oxigênio produzem radicais livres, os quais podem lesar os lipídios e proteínas celulares. Para proteção contra esses radicais livres, a célula os faz reagir com um peptídeo denominado glutatona, o qual encontra-se no seu estado reduzido. Quando os radicais livres atacam a glutatona, ela passa ao seu estado oxidado, mas o radical livre agora foi neutralizado. Para continuar podendo se defender dos radicais livres, a célula passa a glutatona do estado oxidado para reduzido usando uma enzima denominada glutatona redutase; mas essa enzima necessita consumir NADPH nessa reação. Em pacientes que não possuem uma alta atividade de G-6-PD, os níveis de NADPH são reduzidos, portanto a regeneração da glutatona é prejudicada e a célula fica indefesa contra esses radicais livres. Dessa forma, essas espécies químicas atacam os lipídios de membrana, peroxidando suas caudas de ácidos graxos e com isso perturbando a estrutura da membrana. Essa lesão reduz a resistência globular do eritrócito.



(Retirado de Marks e Marks; Basic Medical Biochemistry- A practical approach)

O diagnóstico laboratorial é feito pelo teste de resistência globular, pela presença dos corpos de Heinz (hemoglobina precipitada pelo ataque dos radicais livres) e pela determinação da atividade da G-6PD.

3. Uso de certos fármacos

Em pacientes afetados pela deficiência de G-6-PD, a administração de fármacos que reduzem os níveis de NADPH não é recomendada. Dentre as principais substâncias com essa propriedade encontramos as sulfas, os animaláricos (primaquina, cloroquina, quinidina, artemisina), a dipirona, penicilinas, cefalosporinas, e a alfa-metildopa.

Em pacientes provenientes de região malarígena, a administração de antimaláricos deve ser realizada apenas após o teste de resistência globular. Evolutivamente, nas regiões em que a malária

prevalece, as pessoas possuem resistência globular reduzida para tornarem-se menos suscetíveis a infecção. Uma vez que o parasita causador da malária passa parte de seu ciclo no interior do eritrócito, a resistência globular reduzida faz com que haja hemólise no momento da penetração e assim não há progressão no ciclo.

4. Hemoglobinúria paroxística noturna

A doença conhecida como hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) é a única das anemias hemolíticas com manifestações clínicas tardias. Nessa doença, as hemácias tem a resistência globular reduzida e além disso são atacadas pelo sistema imune. Essa doença decorre da sensibilização afetada do sistema complemento (um componente da resposta imunológica) que geralmente tem sua atividade aumentada durante as horas de repouso (noite, sem festa) pela discreta acidose respiratória fisiológica causada pelo sono. A hemólise pode ocorrer continuamente ou em crises, mas sempre após o sono. A HPN não tem cura. O tratamento consiste em transfusão periódica de hemácias lavadas quimicamente para remoção de um componente do sistema complemento. Infelizmente essa doença evolui para leucose grave e anemia aplástica (no qual a medula óssea vai atrofiando e no local desenvolve-se tecido adiposo)

5. Outras situações em que a resistência globular está reduzida

Lupus eritematoso sistêmico, anemias hemolíticas secundárias a leucemias linfocíticas crônicas (teste da sacarose)

6. Situações que aumentam a resistência globular

Talassemias e anemia ferropriva (ou ferropênica)

7. Valores normais

As provas de fragilidade osmótica compreendem diversos ensaios e métodos. O paciente deve estar em jejum de 4 horas; coletam-se 3mL de sangue heparinizado com 0,06 mL de heparina ou 3 ml de sangue com EDTA como anticoagulante

- a) Teste de hemólise por ácido (Teste de Ham-Dacie) negativo
- b) Teste de hemólise pelo frio (Donath-Landsteiner)negativo
- c) Prova da sacarose a 0,36% (para leucemia).....negativo
- d) Fragilidade osmótica imediata dos eritrócitos
 - 10% de lise em NaCl 0,45-0,50%
 - 50% de lise em NaCl 0,40-0,45%
 - 90% de lise em NaCl 0,35-0,42%
- d) Fragilidade osmótica após 24 horas de incubação
 - 10% de lise em NaCl 0,57-0,66%
 - 50% de lise em NaCl 0,47-0,60%
 - 90% de lise em NaCl 0,28-0,50%
- e) Método de Creed: hemólise inicial a NaCl 0,44% e hemólise final a 0,32%

8. *Exercício:* Uma criança é encaminhada ao pediatra do plantão apresentando um quadro de anemia grave, icterícia, aumento do baço (esplenomegalia), febre e úlceras nas pernas, em especial nas extremidades. O pediatra suspeita de esferocitose hereditária solicita um teste de resistência globular, cujo resultado é mostrado na tabela a seguir.

Solução	Porcentagem de hemólise de uma pessoa sadia	Porcentagem de hemólise do paciente
NaCl 0,9%	0 %	0 %
NaCl 0,5%	10%	25%
NaCl 0,45%	10%	60%
NaCl 0,4%	50%	100%
NaCl 0,3%	100%	100 %

- a) Por que o pediatra solicitou o teste de resistência globular para confirmar o diagnóstico de esferocitose hereditária (defeito na espectrina) ?
- b) O que vc pode afirmar a respeito da resistência globular desse paciente?Explique.
- c) Por que não há hemólise na solução de NaCl 0,9% ?
- d) Por que a hemólise aumenta no mesmo sentido em que a concentração de NaCl diminui ?
- e) Por que a hemólise da pessoa sadia e do paciente são idênticos na concentração de NaCl 0,3%?
- f) Não estando disponível NaCl, quais seriam as soluções de glicose que poderiam ser usadas?

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL : Aula Prática - Resistência Globular

Nome do aluno:

Data:

1. Prepare os tubos contendo soluções hipotônicas, isotônicas e hipertônicas de cloreto de sódio por diluição da solução concentrada a 1,17%. Após a preparação, homogenize os tubos por inversão.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
H ₂ O destilada (ml)	9	8	7	6	5	4	2,5	0
NaCl 1,17g% (ml)	1	2	3	4	5	6	7,5	10
Gramas %								
Molaridade								
Osmolaridade								

2. Coloque em cada tubo uma gota de sangue de cachorro. Após, tape o tubo com o papel alumínio e homogenize por inversão. Leve ao professor, monitor ou técnico do laboratório para a centrifugação.

3. Calcule as concentrações em %, molaridade e osmolaridade de cada tubo e responda o questionário a seguir com base na análise da sua estante de tubos.

QUESTIONÁRIO

1) Em que tubos de ensaio a solução é:

- Hipertônica ? _____
- Isotônica ? _____
- Hipotônica ? _____

2) Entre os tubos nos quais a hemólise é máxima, qual contém a solução de maior concentração de NaCl?

3) Em que tubo a hemácia permanece inalterável? Por quê?

4) Se a resistência globular está diminuída, a hemólise iniciaria numa solução mais ou menos concentrada de cloreto de sódio em relação à concentração na qual normalmente ocorre hemólise?