

Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal

Erythrocyte osmotic fragility in cats with hepatic disease and cats with renal failure

Fernanda Elias¹ Sílvia Regina Ricci Lucas² Mítika Kuribayashi Hagiwara³
Márcia Mery Kogika² Regina Mieke Sakata Mirandola⁴

RESUMO

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) avalia a resistência osmótica das células vermelhas em concentrações decrescentes de solução salina. A resistência depende da forma, volume, tamanho, conteúdo de hemoglobina e meia vida dos eritrócitos, e pode ser alterada por vários fatores fisiológicos ou patológicos. Existem poucos relatos sobre a FOE em gatos. O objetivo deste estudo foi avaliar a FOE em gatos hígidos, com enfermidades hepáticas e naqueles com insuficiência renal. Foram estudados 27 animais divididos em três grupos. A hemólise 50% foi notada de forma similar em todos os grupos. Em 100% de hemólise, os eritrócitos de gatos com insuficiência renal e doença hepática mostraram maior fragilidade osmótica, embora esses animais apresentassem maiores níveis de colesterol sérico quando comparados aos gatos saudáveis do grupo controle. O achado de maior FOE mesmo com níveis elevados de colesterol pode estar associado a características metabólicas da espécie.

Palavras-chave: gatos, colesterol, enfermidade hepática, insuficiência renal, eritrócitos.

ABSTRACT

Erythrocyte osmotic fragility (EOF) evaluates the resistance of red blood cells to saline solution of decreasing concentrations. Cells resistance is related to their shape, volume and size, as well as to the hemoglobin content and half life and can be altered by physiologic or pathologic mechanisms. There are few descriptions and little is known about EOF in cats. To clear up this point, EOF of healthy cats, and those with liver disease and cats with renal failure were studied. Twenty-seven adult cats were divided in three groups. Hemolysis 50% occurred similarly in all groups, although relevant differences in relation to 100% hemolysis

were found. Erythrocyte from cats with renal failure and from icteric animals with hepatic disease showed higher osmotic fragility and elevated cholesterol serum levels when compared to those belonging to the control group. These findings may be associated to the metabolic characteristics of this specie.

Key words: cats, cholesterol, liver disease, renal failure, erythrocyte.

INTRODUÇÃO

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) pode ser definida como a resistência dos eritrócitos à hemólise, avaliada pelo uso de soluções tamponadas de NaCl em água destilada em concentrações decrescentes de 0,85% a 0% (JAIN, 1986). O controle do volume celular através da eliminação ativa de solutos é um dos mecanismos pelo qual a lise da membrana eritrocitária é evitada *in vivo* (MAKINDE & BOBADE, 1994). As células, quando suspensas em meio hipotônico, aumentam até atingir um volume crítico de hemólise antes de serem lisadas (Ponder apud JAIN, 1973). Assim sendo, a fragilidade celular varia conforme a concentração de sal e segue uma distribuição normal em animais saudáveis (JAIN, 1973), havendo, entretanto, diferenças entre as espécies (JAIN, 1986).

Vários fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam a fragilidade osmótica dos eritrócitos, ocorrendo diminuição ou aumento desta em condições

¹Médico Veterinário, Ex-Bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

²Médico Veterinário, Professora Dra., Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP). E-mail: srlucas@usp.br Autor para correspondência.

³Médico Veterinário, Professora Titular, Departamento de Clínica Médica, FMVZ, USP.

⁴Farmacêutico/Bioquímico, Departamento de Clínica Médica, FMVZ, USP.

diversas (JAIN, 1986). Segundo PERK et al. (1964), a fragilidade osmótica é influenciada por fatores como a forma, o volume e o tamanho do eritrócito, o tipo e a quantidade de hemoglobina, as diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural das mesmas. Aparentemente, células menores apresentam capacidade limitada de expansão e atingem o volume hemolítico crítico mais precocemente. O tempo de vida da célula também é muito importante já que os eritrócitos senescentes são mais frágeis que os jovens e correspondem a aproximadamente 30% da população eritrocitária. Além disso, segundo JAIN (1973) e MAKINDE & BOBADE (1994), podem ocorrer variações fisiológicas (por exemplo, variações pós-prandiais) ou patológicas (presença de hematozoários, uremia, cirrose, processos auto-ímmunes, etc.).

Em pacientes humanos, o formato da célula é afetado por alterações na composição da membrana celular (WEED & REED, 1966; TELEN & KAUFMAN, 1999). Doenças associadas a alterações metabólicas como a insuficiência renal e a doença hepática, podem modificar a proporção de fosfolípidos e de colesterol na membrana eritrocitária e conseqüentemente afetar a FOE. Os eritrócitos maduros não são capazes de sintetizar lipídios pela ausência da enzima acetil CoA carboxilase (PITTMAN & MARTIN, 1966; TELEN & KAUFMAN, 1999), com isso, a membrana celular sofre alterações em sua composição lipídica de acordo com as alterações dos lipídios circulantes (DIMOPOULLOS & BEDELL, 1962; TELEN & KAUFMAN, 1999).

Em felinos, a FOE é uma técnica pouco empregada, com poucas referências quanto aos seus valores em condições normais e nas diferentes afecções. Nessa espécie, a FOE parece não estar relacionada com o volume globular, nem com a percentagem de eritrócitos com corpúsculos de Heinz, mas sabe-se que ela está aumentada nas anemias hemolíticas auto-ímmunes e na hemobartonelose (CHRISTOPHER, 1989; JAIN, 1986). MAEDE (1980) observou um aumento na fragilidade osmótica eritrocitária de gatos com hemobartonelose. KOHN et al. (2000) observaram aumento da fragilidade osmótica em gatos apresentando anemias imunomediadas e acreditam que a possibilidade de uma predisposição genética à destruição dos eritrócitos não pode ser excluída. As mudanças na concentração de colesterol e fosfolípidos plasmáticos não foram correlacionados à FOE durante o período experimental, porém, durante a fase anêmica da doença, quando os eritrócitos mostraram-se mais frágeis, a concentração de lipídios na membrana celular caiu rapidamente (KOHNET al., 2000).

A observação de alterações presentes em determinadas afecções em pacientes humanos e cães motivou a realização deste estudo com o objetivo de comparar a fragilidade osmótica eritrocitária entre os felinos hígdidos e aqueles acometidos por insuficiência renal ou por doença hepática.

MATERIALE MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de sangue de 27 gatos, sem evidências de anemia infecciosa felina ou anemia imunomediada, distribuídos em três grupos:

Grupo I - Constituído por 10 felinos adultos, machos e fêmeas, clinicamente hígdidos, mantidos no Centro de Estudos de Doenças de Cães e Gatos do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Grupo II - Constituído por oito gatos, machos e fêmeas, com insuficiência renal crônica, provenientes do atendimento do Hospital Veterinário da FMVZ - USP.

Grupo III - Constituído por nove gatos, machos e fêmeas, ictéricos, sem doença hemolítica, acometidos por afecções hepáticas, provenientes do atendimento do Hospital Veterinário da FMVZ - USP.

De cada animal foram colhidos 5,0ml de sangue através de punção da veia jugular, sendo 2,0ml com EDTA sódico a 10% para realização do hemograma e avaliação da fragilidade osmótica eritrocitária e 3,0ml sem anticoagulante para obtenção de soro que foi utilizado nas provas bioquímicas.

Exames laboratoriais

As amostras de sangue e soro sanguíneo obtidas dos animais dos três grupos, foram submetidas aos seguintes exames:

Hemograma: contagem de células sanguíneas em contador automático Sero no Baker 9010.

Análises bioquímicas: as determinações de uréia, creatinina, proteínas séricas totais, albumina, triglicérides, colesterol total, HDL-colesterol, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamyl transferase (GGT) foram realizadas em analisador automático RA-100 – Bayer.

Fragilidade Osmótica Eritrocitária: a análise da fragilidade osmótica eritrocitária foi realizada no período máximo de 24 horas após a colheita do sangue, de acordo com o método de Parpart apud JAIN (1986), que mensura a estabilidade dos eritrócitos em solução de cloreto de sódio em concentrações variando de 0,85 a 0% e que permite definir três parâmetros:

a) a resistência eritrocitária mínima, que representa a concentração em que se inicia a hemólise;
 b) a resistência máxima, ou seja, a concentração de NaCl correspondente à hemólise total (hemólise 100%);
 c) a fragilidade corpuscular média, correspondente à concentração de NaCl em que se observa 50% de hemólise.

Cálculo das curvas de fragilidade osmótica eritrocitária

A análise do probito (MEAD & CURNOW, 1987) foi utilizada para calcular a FOE nas concentrações em que ocorreram as diferentes porcentagens de hemólise (H50 e H100), e foram representadas pelas curvas cumulativas. As curvas derivativas foram obtidas pela aplicação do princípio do “incremento hemolítico”, no qual a quantidade adicional de hemólise que ocorre em cada tubo, seguindo o decréscimo da concentração de solução salina, foi colocada contra a respectiva concentração dessa solução.

Análise Estatística

Foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Dunn, sendo os cálculos processados no programa “Graphpad Instat”.

RESULTADOS

Os resultados obtidos nos exames laboratoriais para avaliação do eritrograma e testes de função hepática e renal estão na tabela 1.

O resultado da análise estatística, em relação aos níveis séricos de triglicérides, mostrou diferença significativa apenas entre os animais do grupo I (controle) e os animais ictericos, que apresentaram níveis de triglicérides mais elevados ($p < 0,01$), não havendo diferença entre os grupos de animais com insuficiência renal e aqueles com doença hepática. Quanto aos níveis de colesterol, observou-se diferença significativa entre os grupos I e II ($p < 0,05$), mas não houve diferença entre os animais ictericos e aqueles com insuficiência renal. Em relação ao HDL-colesterol, detectou-se diferença estatística significativa entre os animais do grupo controle comparativamente aos animais dos grupos II e III ($p < 0,05$).

Os valores médios das concentrações de solução salina tamponada que correspondem a 50% e 100% de hemólise, verificados nos animais dos três grupos estão demonstrados na tabela 2. O resultado da análise estatística não revelou diferença significativa nas concentrações de solução salina em que se

Tabela 1 - Valores da média e desvio padrão dos parâmetros do eritrograma e bioquímica sérica dos animais do grupo I (controle), grupo II (insuficiência renal) e grupo III (doença hepática).

Parâmetros	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Valores normais
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9,39 \pm 1,62	5,38 \pm 1,18	6,93 \pm 1,54	5,0 – 10,0
Hematócrito (%)	43,2 \pm 7,02	25,75 \pm 6,11	32,22 \pm 10,20	25 – 45
Hemoglobina (g/dL)	13,55 \pm 2,10	8,5 \pm 2,5	10,51 \pm 2,95	8,0 – 17,0
VCM (fl)	46,22 \pm 3,89	47,81 \pm 3,50	46,09 \pm 8,46	39,00 – 55,00
CHCM (%)	31,45 \pm 1,71	32,74 \pm 3,49	33,11 \pm 4,06	31 – 36
Uréia (mg/dL)	54,40 \pm 7,38	435,00 \pm 108,89	80,00 \pm 49,61	Até 40
Creatinina (mg/dL)	1,44 \pm 0,40	10,33 \pm 4,91	1,55 \pm 0,47	1,5 – 2,0
Proteínas Totais (g/dl)	7,91 \pm 0,79	8,36 \pm 0,65	7,69 \pm 1,18	5,5 – 8,5
Albumina (g/dl)	3,03 \pm 0,52	3,29 \pm 0,52	2,78 \pm 0,89	2,7 – 4,0
ALT (U/L)	41,50 \pm 18,15	35,00 \pm 25,79	105,89 \pm 103,68	Até 50
AST (U/L)	20,40 \pm 8,60	33,13 \pm 32,76	97,00 \pm 159,80	Até 40
FA (U/L)	48,20 \pm 20,12	27,13 \pm 14,37	256,56 \pm 133,20	Até 70
GGT (U/L)	1,10 \pm 0,31	1,13 \pm 0,35	3,11 \pm 3,02	Até 5
Bilirrubina Total(mg/dL)	-	-	6,66 \pm 4,20	0,15 a 0,20
B. Direta (mg/dL)	-	-	3,89 \pm 2,60	Até 0,20
B. Indireta (mg/dL)	-	-	2,77 \pm 2,49	Até 0,20
Triglicérides (mg/dL)	63,44 \pm 22,24	109,63 \pm 63,30	146,67 \pm 76,55	50 – 100
Colesterol total (mg/dL)	92,63 \pm 21,34	236,38 \pm 123,64	203,00 \pm 121,22	75 – 250
HDL-colesterol (mg/dL)	63,2 \pm 14,21	136,00 \pm 39,31	100,86 \pm 51,32	> 35

VCM – volume corpuscular médio CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

ALT – alanina aminotransferase AST – aspartato aminotransferase FA – fosfatase alcalina GGT – gama glutamiltransferase.

Tabela 2 - Valores da média e desvio padrão das concentrações de solução salina tamponada (% NaCl) correspondentes a 50% e 100% de hemólise, do grupo I (controle), grupo II (insuficiência renal) e grupo III (doença hepática).

Parâmetros	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Hemólise 50%	0,59 ± 0,06 ^a	0,60 ± 0,06 ^a	0,61 ± 0,07 ^a
Hemólise 100%	0,30 ± 0,04 ^b	0,47 ± 0,06 ^c	0,39 ± 0,09 ^c

observou 50% de hemólise entre os três grupos ($p > 0,05$), entretanto, a diferença foi relevante em relação às concentrações de solução salina em que se observou 100% de hemólise. Constatou-se que tanto os eritrócitos de animais ictericos ($p < 0,05$) quanto aqueles dos animais com insuficiência renal ($p < 0,001$) apresentaram maior fragilidade osmótica frente a concentrações decrescentes de solução salina em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre a fragilidade osmótica dos eritrócitos de animais com insuficiência renal e aqueles com doença hepática.

As curvas cumulativas e derivativas médias dos animais dos três grupos estão representadas nas figuras 1 e 2, respectivamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados observados nos três grupos, em relação às concentrações de solução salina em que se observou 50% de hemólise, estão de acordo com os valores obtidos por outros autores, que obtiveram valor médio de 0,54% para gatos saudáveis (JAIN, 1973; KOHN et al., 2000). Em relação a 100% de hemólise, observou-se que, quando comparados ao grupo controle, os eritrócitos dos animais acometidos por insuficiência renal crônica apresentaram maior fragilidade osmótica, seguidos dos eritrócitos dos gatos portadores de afecção hepática. Não existem na literatura relatos de valores para a hemólise total frente a diferentes concentrações de solução salina na espécie felina, impossibilitando qualquer cotejamento.

Acredita-se que a fragilidade osmótica dos eritrócitos felinos, à semelhança do que ocorre em outras espécies, possa também ser influenciada por alterações metabólicas decorrentes de processos mórbidos.

SASAKI (1977) relatou aumento da fragilidade osmótica, decréscimo na quantidade de lipídios e decréscimo da taxa colesterol/fosfolípidos

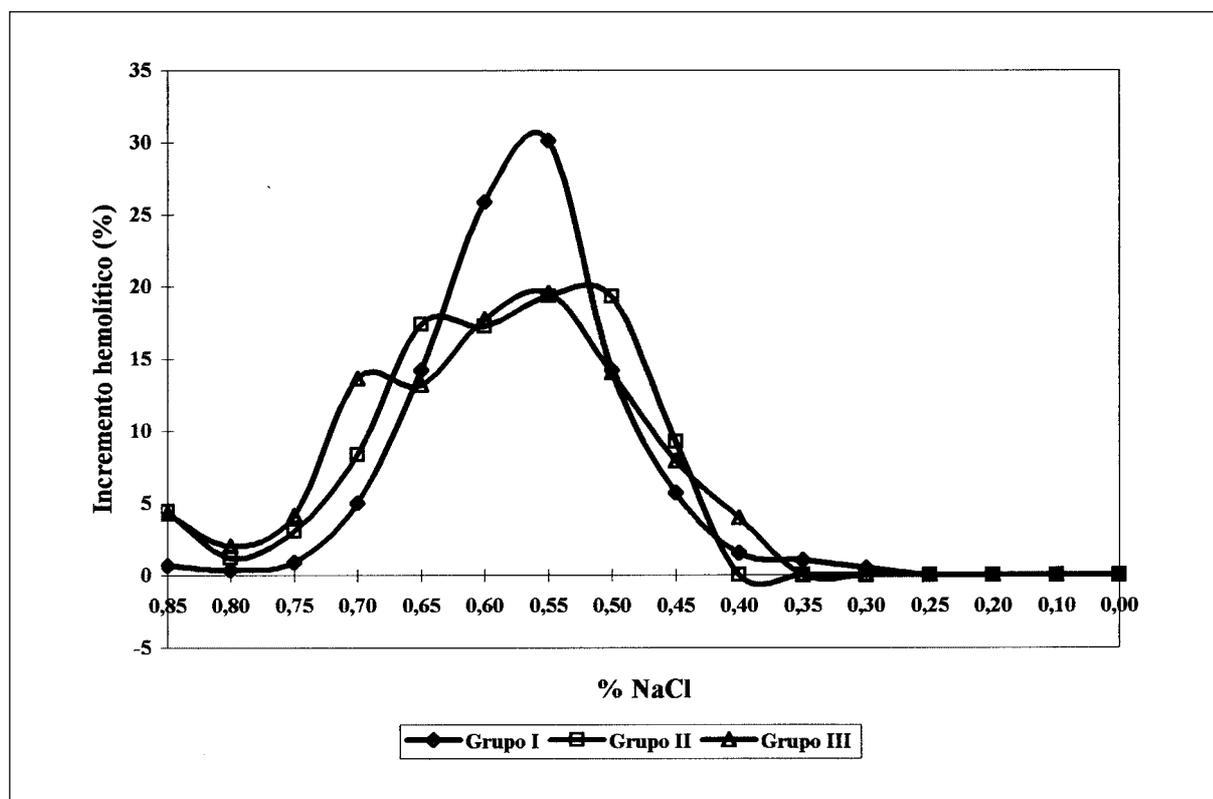


Figura 1 - Curvas cumulativas (médias) da fragilidade osmótica eritrocitária dos gatos do grupo I (controle), grupo II (insuficiência renal) e grupo III (doença hepática).

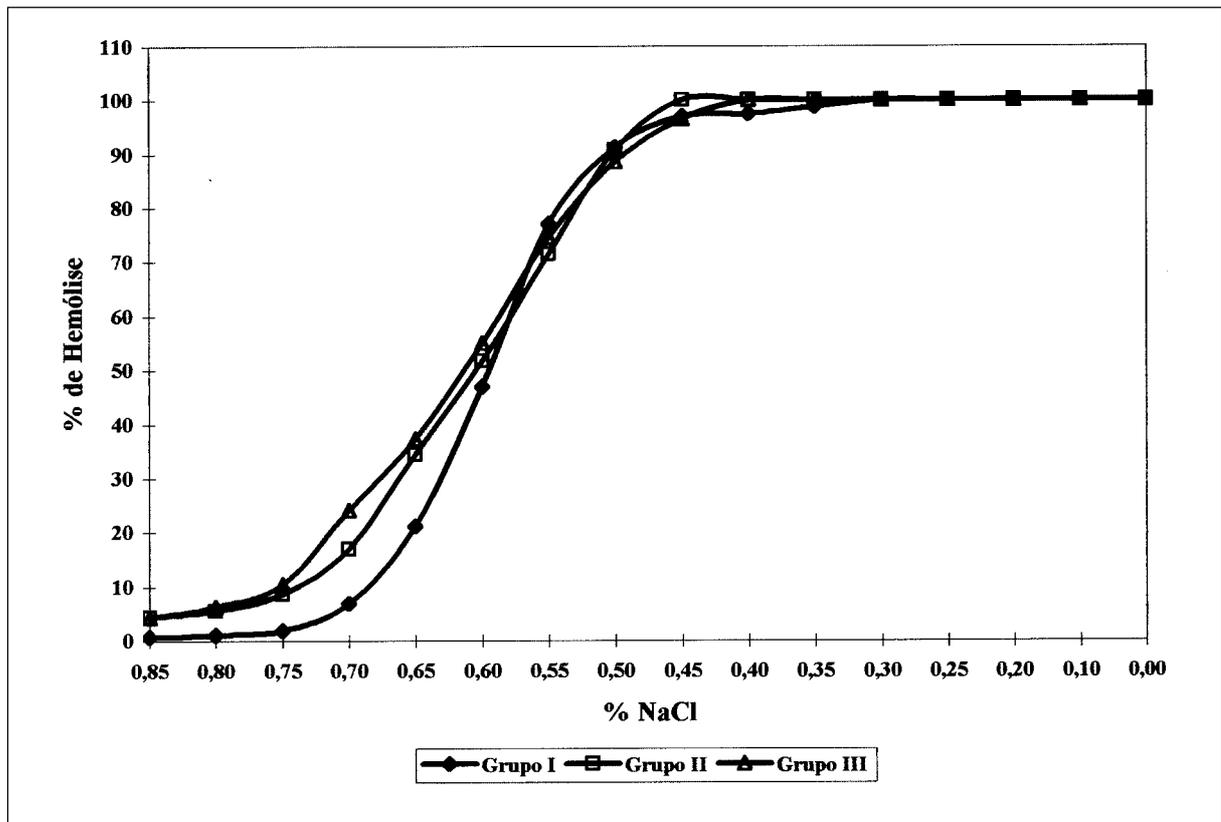


Figura 2 - Curvas derivativas (médias) da fragilidade osmótica eritrocitária dos gatos do grupo I (controle), grupo II (insuficiência renal) e grupo III (doença hepática).

da membrana eritrocitária em pacientes humanos urêmicos submetidos a hemodiálise, à medida que ocorria diminuição do colesterol livre na circulação. O autor observou uma correlação negativa entre a FOE e a taxa de colesterol livre nos eritrócitos. O oposto foi observado em casos de cirrose hepática, nos quais os eritrócitos apresentaram uma taxa de colesterol elevada, possivelmente decorrente da ausência da lecitina colesterol acil-transferase (LCTA) (OYABU et al., 1982).

Em pacientes humanos a fragilidade osmótica eritrocitária é influenciada pela quantidade de colesterol presente na membrana citoplasmática, tornando-se os eritrócitos mais resistentes à medida que aumenta o nível de colesterol sanguíneo (MAEDE, 1980). COOPER et al. (1975) relataram diminuição da FOE durante hepatopatias obstrutivas em pacientes humanos, devido ao aumento na relação superfície/volume do eritrócito conseqüente à presença de colesterol intercalado na membrana eritrocitária e também à diminuição de atividade sérica de LCTA. SANTORO et al. (1994) verificaram um decréscimo na

FOE durante a leptospirose canina, sem a presença de anemia hemolítica, provavelmente relacionado aos distúrbios hepato-renais que ocorrem nessa afecção. No caso de cães, ZANUTTO et al. (1996) observaram alterações no metabolismo lipídico dos animais ictericos, com aumento de colesterol, o que poderia estar relacionado ao decréscimo da FOE nesses animais.

Neste estudo, os níveis séricos de colesterol, triglicérides e HDL-colesterol foram significativamente mais elevados nos grupos de animais doentes, não havendo diferença significativa entre os animais ictericos e aqueles com insuficiência renal.

Quanto aos níveis séricos mais elevados de triglicérides e de colesterol nos animais ictericos, estes podem ser indicativos da diminuição da esterificação dos triglicérides de origem exógena feita pelos hepatócitos e também pela diminuição da enzima LCTA, o que elevaria os níveis de colesterol. A hipercolesterolemia é um achado freqüente em gatos portadores de doença renal crônica, independentemente do tipo de doença renal primária

(DIBARTOLA et al., 1987), ao contrário do que ocorre em outras espécies, inclusive no homem, em que o aumento de colesterol ocorre apenas em algumas condições específicas, como as glomerulopatias. Esses achados podem estar associados às particularidades do gato, de hábitos exclusivamente carnívoros e com seu metabolismo adaptado a um alto consumo de gordura.

Pelos resultados observados, não se pode inferir que, como em outras espécies, o aumento dos níveis de colesterol conduz à maior resistência dos eritrócitos, já que os animais com insuficiência renal e ictericos apresentaram células mais frágeis do que os animais do grupo controle. Em relação aos animais com insuficiência renal, a acidemia observada frequentemente nesses pacientes, pode justificar a menor resistência dos eritrócitos, não havendo nenhuma relação com os níveis séricos de colesterol. Entretanto, o mesmo não se pode afirmar em relação aos animais ictericos. Nestes, a menor resistência dos eritrócitos pode estar relacionada a outras causas que não foram pesquisadas, bem como, em se tratando do gato, às diferenças no metabolismo lipídico, mais especificamente a hipercolesterolemia, atuando de forma única e peculiar sobre a membrana eritrocitária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRISTOPHER, M.M. Relation of endogenous Heinz bodies to disease and anemia in cats: 120 cases (1978-1987). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.194, n.8, p.1089-1095, 1989.
- COOPER, R.A. et al. Modification of red cell membrane structure by cholesterol rich lipid dispersions. A model for the primary spur cell defect. **Journal of Clinical Investigation**, v.55, p.115-126, 1975.
- DIBARTOLA, S. P. et al. Clinicopathologic findings associated with chronic renal disease in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.190, p.1196-1202, 1987.
- DIMOPOULLOS, G.T., BEDELL, D.M. Studies of bovine erythrocytes in anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, v.23, p.813-820, 1962.
- JAIN, N.C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian**, v.63, p.411-423, 1973.
- JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986. 1221p.
- KOHN, B. et al. Anemia, splenomegaly, and increased osmotic fragility of erythrocytes in Abyssinian and Somali cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.217, n.10, p.1483-1491, 2000.
- MAEDE, Y. Studies on feline haemobartonellosis. VI. Changes of erythrocyte lipids concentration and their relation to osmotic fragility. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.42, n.3, p.281-288, 1980.
- MAKINDE, M.O.; BOBADE, P.A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science**, v.57, n.3, p.343-348, 1994.
- MEAD, R.; CURNOW, R.N. **Statistical methods in agriculture and experimental biology**. 3.ed. New York : Chapman & Hall, 1987. 335p.
- OYABU, H.; TSUMOOTO, S.; KAGEYAMA, T. Clinical investigation on the osmotic fragility of erythrocytes in cirrhosis of the liver. **Bulletin of the Osaka Medical School**, v.28, p.33-45, 1982.
- 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.
- PITTMAN, J.G.; MARTIN, D.B. Fatty acid biosynthesis in human erythrocytes: evidence in mature erythrocytes for an incomplete long chain fatty acid synthesizing system. **Journal Clinical Investigation**, v.45, p.165-172, 1966.
- SANTORO, M.L. et al. Decreased erythrocyte osmotic fragility during canine leptospirosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n.36, v.1, p.1-5, 1994.
- SASAKI, S. Red cell lipids in patients with end-stage renal failure: relationship to osmotic fragility. **Osaka City Medical Journal**, v.23, n.1, p.85-98, 1977.
- TELEN, M.J.; KAUFMAN, R.E. The mature erythrocyte. In: LEE, G.R. et al. **Wintrobe's clinical hematology**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1999. Cap.10, p.193-227.
- WEED, R.I.; REED, C.F. Membrane alterations leading to red cell destruction. **American Journal of Medicine**, v.41, p.681-694, 1966.
- ZANUTTO, M.S. et al. Fragilidade osmótica eritrocitária em cães com doenças hepática, renal e hepática e renal concomitante. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 18., 1996, Olinda, PE. **Anais...** Olinda : Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, v.1, p.163, 1996.