

ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES LABORATORIAIS AO PERFIL CLÍNICO EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME DE SALVADOR- BAHIA

LABORATORY MARKERS ASSOCIATED WITH CLINIC ASPECTS ON SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS

Bruno A.V. Cerqueira, Wendell V. Boas, Angela A. D. Zanette, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Gonçalves
Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ); Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brasil; Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA); Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

Os eventos vaso-oclusivos na anemia falciforme envolvem interações entre hemácias, células endoteliais, leucócitos, plaquetas, fatores da coagulação e proteínas plasmáticas. O objetivo deste estudo foi investigar marcadores laboratoriais associados com manifestações clínicas em pacientes portadores de anemia falciforme. Nós estudamos 45 pacientes portadores de anemia falciforme em estado clínico estável, provenientes da Bahia, Brasil. As análises hematológicas foram realizadas utilizando contador eletrônico de células; o perfil de hemoglobinas foi confirmado por cromatografia líquida de alto desempenho e os marcadores de hemólise e lipídicos foram quantificados utilizando técnicas bioquímicas. Os níveis séricos de desidrogenase láctica (LDH) e bilirrubinas apresentaram-se elevados nos pacientes com história de síndrome torácica aguda e úlcera de perna, respectivamente. Além disso, pacientes com história de hepatomegalia e úlcera de perna apresentaram elevação na contagem de leucócitos. Os pacientes que passaram por terapias transfusionais apresentaram elevação sérica da aspartato aminotransferase (AST) e aumento na contagem de reticulócitos. Por outro lado, pacientes que apresentaram eventos de sequestro esplênico e que sofreram esplenectomia apresentaram diminuição nos níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL). Nossos resultados sugerem importante papel dos marcadores laboratoriais como avaliadores e preditores de eventos clínicos graves na anemia falciforme.

Palavras-chave: anemia falciforme, marcadores laboratoriais, manifestações clínicas.

Vaso-occlusive episodes in sickle cell anemia (SCA) involve interactions between sickle red blood cells, endothelial cells, leukocytes, platelets, coagulation factors and plasma proteins. The purpose of the current study was to investigate laboratory markers associating with clinic manifestation on sickle cell anemia patients. We studied 45 steady-state SCA patients from Bahia, Brazil. Hematological analyses were performed by electronic cell counter; hemoglobin profile was confirmed by high performance liquid chromatography and hemolysis and lipid markers by biochemical kits. The increase serum levels of lactate dehydrogenase (LDH) and bilirubins were associated with acute thoracic syndrome and leg ulcer respectively. The clinic aspects like hepatomegaly and leg ulcer were associated with increase number of leucocyte. The blood transfusion therapy was associated positively with aspartate aminotransferase (AST) levels and reticulocytes number. The decreased levels of high density lipoprotein (HDL) were associated with splenic sequestration and splenectomy. Our results suggest an important role of these laboratory markers to evaluate the processes present and future in the SCA pathogenesis as well as for the clinical severity of the disease.

Keywords: Sickle cell anemia, laboratory markers, clinic manifestations.

As alterações vasculares observadas na anemia falciforme (AF) ocorrem pelas disfunções endoteliais associadas ao aumento na expressão de receptores e ligantes na superfície de leucócitos, eritrócitos, reticulócitos e células endoteliais, além do aumento de citocinas pro-inflamatórias⁽⁵⁾. Dessa forma, esse desequilíbrio vascular resulta em dano endotelial, eventos de trombose vascular e disfunções teciduais⁽¹⁰⁾.

A hemólise crônica presente na AF causa desequilíbrio vascular, com diminuição no período de vida dos eritrócitos,

Recebido em 24/6/2010 Aceito em 2/10/2010
 Endereço para correspondência: Profa. Marilda Souza Gonçalves, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia. Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710 Salvador-Bahia, Brazil. C-elo: mari@bahia.fiocruz.br. Fontes de Financiamento: CNPq 3065427/2007-5 e 484457/2007-1; FAPESB 1431040053063 e 9073/2007 e MCD/CNPq/MS-SCTIE-DECIT 409800/2006-6.

refletindo na concentração de hemoglobina, contagem de reticulócitos, alterações nos níveis de bilirrubinas, desidrogenase láctica (DHL) e biodisponibilidade do óxido nítrico (ON)^(3,6).

O óxido nítrico é um radical livre e vasodilatador potente que regula o tônus vascular, sendo importante na patogênese da AF, reduzindo tanto à ativação plaquetária quanto a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular⁽¹⁸⁾.

Durante o processo de hemólise, o ON é exposto diretamente à hemoglobina livre, ocasionando sua degradação. A síntese do ON também se apresenta alterada em decorrência do consumo da L-arginina pela arginase liberada do eritrócito no processo de hemólise, com produção de ornitina, resultando na diminuição do ON intravascular, redução do processo de vasodilatação, ativação transcricional de endotelina e da molécula de adesão vascular (VCAM-1)^(9,19).

Estudo realizado em modelo animal descreveu que a hemólise poderia causar instabilidade vasomotora como

descrito em seres humanos. Além disso, a hemólise induzida em modelo animal resultou em hipertensão pulmonar, disfunção renal e diminuição na disponibilidade vascular do ON⁽¹²⁾. Em pacientes com AF, a hemólise crônica foi associada à gravidade clínica, especialmente naqueles que possuíam história de priapismo e úlcera de perna^(9,15).

Dessa forma, buscamos correlacionar marcadores clássicos hematológicos, hemolíticos e lipídicos com as manifestações clínicas apresentadas por um grupo de pacientes com anemia falciforme.

Material e Métodos

Casuística

Nós desenvolvemos um estudo de corte transversal com a casuística de 45 pacientes com anemia falciforme (21 homens e 24 mulheres; média de idade em anos de 20,49 ± 13,99) acompanhados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), Estado brasileiro com a maior incidência de AF. Todos os pacientes estavam clinicamente estáveis, não usavam terapia transfusional e não houve identificação de qualquer doença sistêmica. Nenhum dos pacientes estava em uso de antibióticos ou corticóides antes da coleta da amostra de sangue para os exames deste estudo - coletada durante a consulta clínica regular do paciente; a história clínica dos pacientes foi extraída dos seus prontuários arquivados na HEMOBA.

Vinte e dois indivíduos saudáveis com idade média de 25 anos foram incluídos no estudo como grupo de comparação, composto por indivíduos atendidos regularmente no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e pareados aos pacientes com AF pelo sexo e a idade. Todas as pessoas do grupo de comparação apresentaram perfil normal de hemoglobina, não tinham história de anemia ou de outras doenças hematológicas.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CAAE 0012.1.225.000-07) e está em acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2000. Todos os sujeitos da pesquisa ou seus responsáveis legais concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Análises hematológicas

As análises hematológicas foram realizadas em contador eletrônico de células (*Coulter Count T890*, CA, USA), e os reticulócitos foram contados em esfregaços sanguíneos corados pelo azul de cresil brilhante. O perfil de hemoglobinas foi estabelecido por análise em cromatografia de alto desempenho (HPLC) (*Bio-Rad Variant*, CA, USA).

Análises bioquímicas

As concentrações séricas das bilirrubinas [bilirrubina direta (BD), Bilirrubina indireta (BI), bilirrubina total (BT)], desidrogenase láctica (DHL), transaminases [alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)] e os lipídios de alta densidade (HDL) foram determinados em soro utilizando kits comerciais, respeitando as especificações

do fabricante (LABTEST, Minas Gerais, Brazil).

Análises estatísticas

As características básicas foram resumidas como médias e proporções de variáveis selecionadas. A distribuição de variáveis quantitativas foi determinada usando o teste Kolmogorov-Smirnov. As médias de variáveis quantitativas entre grupos foi comparada usando o teste t de Student não-pareado para dados de distribuição normal ou o teste de Mann-Whitney para dados com distribuição não-normal. As análises de correlação foram realizadas para determinar associações entre pares de variáveis utilizando os coeficientes de correlação de Pearson's e Spearman's. Todos os testes foram considerados significativos quando o valor de p foi menor que 0,05 (p<0,05). As análises dos dados foram realizadas nos programas STATA 10 (StataCorp, Texas, USA) e *GraphPad Prism 5* (Graphpad Software, San Diego, CA).

Resultados

Perfil laboratorial

As características hematológicas, perfil hemolítico, lipídico e inflamatório estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil laboratorial dos 45 pacientes portadores de anemia falciforme.

Características	Pacientes	
	N	Média ± DP
Idade (Anos)	45	20.49 ± 13.99
Gênero		
Masculino	21	---
Feminino	24	---
Hemoglobina		
SS	45	---
Hemoglobina		
Fetal (%)	45	7.05 ± 4.01
Hemólise		
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	45	2.69 ± 0.67
Hemoglobina (g/dL)	45	8.07 ± 1.60
Hematócrito (%)	45	24.42 ± 5.26
Volume Globular Médio (fL)	45	91.74 ± 9.07
Hemoglobina Globular Média (pg)	45	30.40 ± 3.59
Reticulócitos (%)	45	6.83 ± 3.52
Leucócitos		
(x10 ⁹ /L)	45	11.66 ± 3.82
Plaquetas		
(x10 ⁹ /L)	45	367.98 ± 178.32
Marcadores do Metabolismo		
Lipídico		
Colesterol Total (mg/dL)	45	164.23 ± 44.03
HDL Colesterol (mg/dL)	45	43.34 ± 10.42
LDL Colesterol (mg/dL)	45	92.95 ± 48.49
VLDL Colesterol (mg/dL)	45	28.23 ± 15.80
Triglicerídeos (mg/dL)	45	141.15 ± 79.01
Marcadores Hemolíticos		
Aspartato Aminotransferase (U/L)	45	32.66 ± 14.43
Bilirrubina Total (mg/dL)	45	1.97 ± 1.27
Bilirrubina Direta (mg/dL)	45	0.59 ± 0.25
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	45	1.37 ± 1.12
Lactato Desidrogenase (U/L)	45	730.06 ± 261.81
Marcador Hepático		
Alanina Aminotransferase (U/L)	45	7.21 ± 5.49
Marcador Inflamatório		
Proteína C Reativa (mg/L)	45	10.64 ± 23.72

Aspectos clínicos

Dentre as complicações clínicas mais presentes neste grupo de pacientes as crises de dor foram as mais frequentes, 41/43 (98,3%), seguida pelas infecções, 25/43 (58,1%); pneumonia, 16/43 (37,2%); úlcera de perna, 8/43 (18,6%); colelitíase, 8/43 (18,6%); sequestro esplênico, 7/43 (16,3%); esplenectomia, 6/43 (14,0%); síndrome torácica aguda, 6/43 (14,0%); hepatomegalia, 6/43 (14,0%); necrose avascular, 2/43 (4,7%); osteomielite, 3/43 (7,0%); priapismo, 3/21 (14,3%); dactilites, 3/43 (7,0%); retinopatia, 1/43 (2,3%); AVC, 1/43 (2,3%) e crise aplásica, 1/43 (2,3%).

Os marcadores hemolíticos e o perfil clínico

A concentração sérica de LDH foi elevada nos pacientes com AF e história de síndrome torácica aguda. As concentrações de bilirrubina total e indireta foram elevadas nos pacientes com AF e história de úlcera de perna (Gráfico 1).

Gráfico 1. Marcadores de hemólise e o perfil clínico em pacientes com anemia falciforme.

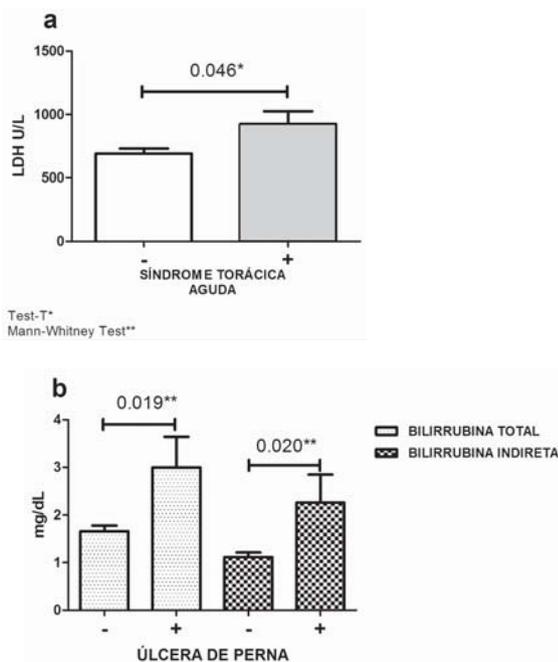


Gráfico 2. Número de Leucócitos e o perfil clínico em pacientes com anemia falciforme.

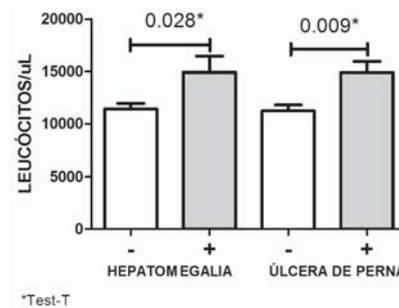


Gráfico 3. Associação entre a utilização da terapia transfusional, marcadores hematológicos e hemolíticos.

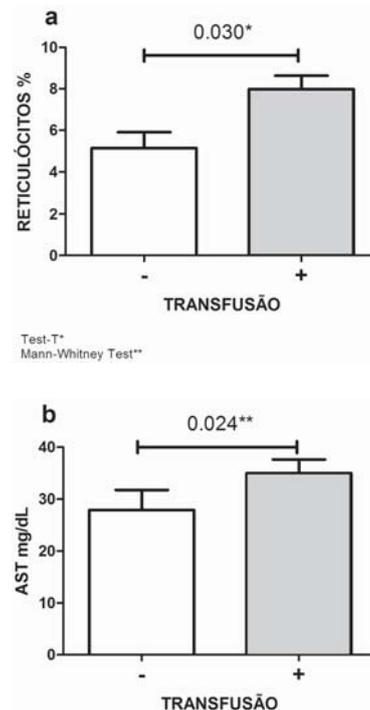
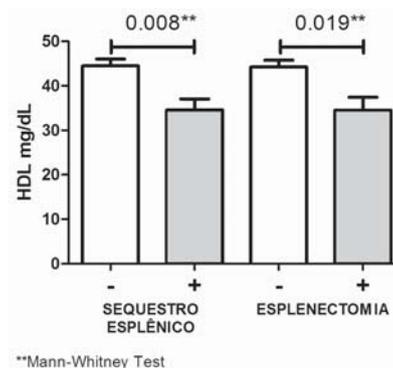


Gráfico 4. Associação entre o metabolismo lipídico e o perfil clínico em pacientes com anemia falciforme.



Leucocitose associada a alterações clínicas

O número de leucócitos foi elevado nos pacientes com AF e história de hepatomegalia e úlcera de perna (Gráfico 2).

O uso de terapia transfusional associado a marcadores hematológicos e hemolíticos

Os pacientes com AF que foram submetidos a terapias transfusionais apresentaram elevação na contagem de reticulócitos e aumento nos níveis séricos de AST (Gráfico 3).

O perfil lipídico e as alterações clínicas

Os pacientes com AF que apresentaram quadro clínico de síndrome torácica aguda e foram submetidos à esplenectomia apresentaram níveis séricos diminuídos de HDL (Gráfico 4).

Discussão

A hemólise é um mecanismo patológico que contribui para a ocorrência de manifestações cardiovasculares, pulmonares, gastrintestinais e renais em diversas doenças⁽¹¹⁾. No presente estudo, propomos que o perfil hemolítico crônico intravascular possa refletir no quadro clínico apresentado pelos pacientes com AF, subdividindo-os em subgrupos com diferentes características fenotípicas. Sendo assim, a avaliação dos marcadores hematológicos, hemolíticos e lipídicos como fatores de prognóstico na SCA poderá contribuir no acompanhamento dos pacientes e no direcionamento de estratégias terapêuticas.

A anemia falciforme é caracterizada pela presença de hemólise crônica com graus diferentes de hemólise por pacientes. Biomarcadores clássicos, tais como concentrações de HbF^(2,20) e a presença de talassemia alfa⁽⁷⁾ estão associados a perfis hemolíticos distintos que contribuem para a fisiopatologia da doença.

A diminuição da expectativa de vida e a presença de manifestações clínicas graves tem sido correlacionada com o quadro de hemólise acentuada nos pacientes com AF⁽²¹⁾. De fato, isso é confirmado em nosso estudo, onde observamos a associação entre os marcadores de hemólise e o fenótipo apresentado pelos pacientes.

Desta forma os pacientes que apresentaram histórico de quadro síndrome torácica aguda e úlcera de perna tiveram aumento nas concentrações séricas de LDH e bilirrubinas, respectivamente (Gráfico 1).

Nos estudos de Nolan et al.^(14,15), alterações fenotípicas como úlcera de perna, priapismo e acidente vascular cerebral (AVC) foram associadas a marcadores de hemólise.

A correlação entre hemólise e os eventos clínicos observados no presente estudo pode ser explicada pela diminuição da biodisponibilidade do ON⁽¹⁸⁾. A hemoglobina liberada na hemólise intravascular associa-se e degrada o ON, reduzindo a sua quantidade e seus efeitos benéficos, como inibição plaquetária, repressão de ligantes nas células endoteliais e vasodilatação, interferindo desta forma na homeostasia vascular⁽⁸⁾.

Além do caráter hemolítico, foi possível observar em nosso estudo a associação entre alterações clínicas como a hepatomegalia e a úlcera de perna com o número aumentado de leucócitos (Gráfico 2). Essa correlação é explicada pela participação dos leucócitos como células que amplificam os fenômenos vaso-oclusivos que são característicos na anemia falciforme e por conta disso a elevação na contagem dos leucócitos associa-se a gravidade e risco aumentado de morte⁽¹⁶⁾.

A terapia transfusional crônica tem sido empregada em pacientes com quadro clínico grave e na prevenção do acidente vascular cerebral⁽¹⁷⁾. Em nosso estudo, os pacientes não estavam em terapia transfusional, mas alguns pacientes receberam concentrado de hemácias ao longo vida em resposta ao quadro hemolítico grave refletindo nas contagens elevadas

de reticulócitos e aumento nas concentrações séricas dos marcadores de hemólise (Gráfico 3). Para explicar esse quadro mais grave, com reflexo no perfil hemolítico, podemos sugerir outro mecanismo que está baseado na liberação da arginase na hemólise intravascular consumindo a L-arginina, substrato para a produção do ON, resultando no desequilíbrio da integridade do endotélio vascular⁽¹³⁾. Além disso, o ON liga-se a guanilato ciclase, que converte GTP em cGMP, causando vasodilatação⁽¹⁷⁾. Outro aspecto importante com relação à disfunção vascular é a elevação dos radicais reativos do oxigênio (RRO) que alteram o equilíbrio do ON em pacientes com AF⁽²²⁾.

Por outro lado, nós observamos que os pacientes que apresentaram sequestro esplênico e pacientes submetidos à esplenectomia apresentaram níveis reduzidos de HDL. Essa lipoproteína de alta densidade reduz modificações oxidativas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) pela ação da enzima paraoxonase 1 (PON 1)⁽⁴⁾. A paraoxonase 1 apresenta atividade anti-inflamatória e anti-aterogênica por conta de sua habilidade de destruir fosfolípidios modificados e prevenir o acúmulo de lípidios oxidados em lipoproteínas⁽¹⁾. Portanto, níveis reduzidos de HDL podem estar associados aos quadros clínicos mais graves na anemia falciforme.

Dessa forma, nós sugerimos que os marcadores hematológicos, hemolíticos e lipídicos devem ser utilizados como fatores de prognóstico em pacientes com AF, visando estratégias de intervenção distintas nos diferentes eventos clínicos. Portanto, agentes terapêuticos que diminuam o quadro hemolítico e restaurem a disponibilidade do ON vascular podem contribuir para a redução da gravidade clínica nos pacientes portadores de subfenótipos onde ocorre o predomínio de eventos hemolíticos.

Referências

1. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101: 1581-1590, 1998.
2. Bailey K, Morris JS, Thomas P, Serjeant GR. Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child* 67: 517-520, 1992.
3. Ballas SK, Marcolina MJ. Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. *Transfusion* 46:105-110, 2006.
4. Banka CL. High density lipoprotein and lipoprotein oxidation. *Curr Opin Lipidol* 7: 139-142, 1996.
5. Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol* 86: 255-261, 2007.
6. De Ceulaer K, Higgs DR, Weatherall DJ, Hayes RJ, Serjeant GR, Serjeant GR. Alpha thalassemia reduces the hemolytic rate in homozygous sickle-cell disease. *N Eng J Med* 309:189-190, 1983.
7. Embury SH, Dozy AM, Miller J, Davis JR Jr, Kleman KM, Preisler H. Concurrent sickle-cell anemia and alpha-thalassemia: effect on severity of anemia. *N Engl J Med* 306: 270-274, 1982.
8. Gladwin MT, Kato GJ. Cardiopulmonary complications of sickle cell disease: role of nitric oxide and hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, p. 51-57, 2005.

9. Hsu LL, Champion HC, Campbell-Lee SA. Hemolysis in sickle cell mice causes pulmonary hypertension due to global impairment in nitric oxide bioavailability. *Blood* 109: 3088-3098, 2007.
10. Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev* 21: 37-47, 2007.
11. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM, Gladwin MT. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood* 107: 2279-2285, 2006.
12. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PS, Star RA, Banks SM, Schechter AN, Natanson C, Gladwin MT, Solomon SB. Hemolysis associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 115: 3409-3417, 2005.
13. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris Jr SM, Gladwin MT. Dysregulated Arginine Metabolism, Hemolysis-Associated Pulmonary Hypertension and Mortality in Sickle Cell Disease. *JAMA* 294: 81-90, 2005.
14. Nolan VG, Adewoye A, Baldwin C, Wang L, Ma Q, Wyszynski DF, Farrell JJ, Sebastiani P, Farrer LA, Steinberg MH. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *Br J Haematol* 133: 570-578, 2006.
15. Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH. Hemolysis associated priapism in sickle cell disease. *Blood* 106:3264-3267, 2005.
16. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease –Lifeexpectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 330:1639-1643, 1994.
17. Platt OS. Prevention and Management of Stroke in Sickle Cell Anemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 54-57, 2006.
18. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon III RO, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Med* 8: 1383-1389, 2002.
19. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *JAMA* 293: 1653-1662, 2005.
20. Steinberg MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 129: 465-481, 2005.
21. Taylor JG, Nolan VG, Mendelsohn L, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vasoocclusive pain. *PLoS ONE* 3: e2095, 2008.
22. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 44: 1506-1528, 2008.