

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA

GABRIEL MARCOS BARBOSA
AMANDA CAPELOTO MASTRO

FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA EM
PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM
HEMODIÁLISE EM CLÍNICA DE RIO BRANCO, ACRE,
BRASIL

RIO BRANCO

2023

GABRIEL MARCOS BARBOSA
AMANDA CAPELOTO MASTRO

**FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA EM
PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM
HEMODIÁLISE EM CLÍNICA DE RIO BRANCO, ACRE,
BRASIL**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
APRESENTADO AO CURSO DE
GRADUAÇÃO DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE**

**ORIENTADOR: Dr. MIGUEL JUNIOR SORDI
BORTOLINI**

RIO BRANCO

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

B238f Barbosa, Gabriel Marcos, 1997 -

Fragilidade osmótica eritrocitária em pacientes com doença renal crônica a hemodiálise em clínica de Rio Branco, Acre, Brasil / Gabriel Marcos Barbosa e Amanda Capeloto Mastro; orientador: Dr. Miguel Junior Sordi Bortolini. – 2023. 8 f.: il.; 30 cm.

Artigo Científico (Graduação) – Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências da Saúde e do Desporto, Bacharel em Medicina, Rio Branco, 2023. Inclui referências bibliográficas.

1. Hemodiálise. 2. Eritrócitos. 3. Fragilidade osmótica. I. Mastro, Amanda Capeloto. II. Bortolini, Miguel Junior Sordi (Orientador). III. Título.

CDD: 610.73

1 **FRAGILIDADE OSMÓTICA ERITROCITÁRIA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL**
2 **CRÔNICA A HEMODIÁLISE EM CLÍNICA DE RIO BRANCO, ACRE, BRASIL**

3

4 Gabriel Marcos Barbosa¹, Amanda Capeloto Mastro¹, Miguel Junior Sordi Bortolini³

5

6 ¹Acadêmico de Medicina da Universidade Federal do Acre, ³Centro de Ciências da Saúde e do
7 Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC, Brasil-

8

9 Contato

10 E-mail: miguel.bortolini@ufac.br

11 Celular: (68) 9 8102-4525

12 Endereço: Estrada da Floresta, 1893, Bloco Violeta 8, apartamento 203, Rio Branco, AC, CEP
13 69.912-452

14

15 **CONFLITO DE INTERESSE**

16 Os autores declaram não ter conflito de interesse.

17

18 **FINANCIAMENTO**

19 Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
20 (CNPq) através de bolsas de iniciação científica concedidas a GMB e ACM.

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30 RESUMO

31 A doença renal crônica é uma enfermidade com elevada prevalência no Brasil. Na maioria dos
32 pacientes, ela é controlada por meio das terapias substitutivas renais, em especial a hemodiálise. Este
33 estudo tem como objetivo analisar a existência de danos aos eritrócitos causados pelo processo de
34 hemodiálise por meio da verificação da fragilidade osmótica eritrocitária. A pesquisa foi realizada a
35 partir da coleta de sangue dos voluntários (n=20) antes e depois de uma sessão de hemodiálise.
36 Comparou-se a fragilidade de eritrócitos através da análise de lise osmótica, utilizando-se o teste t de
37 Student, com a ajuda do software GraphPad Prism 5.0, com valores de $P < 0,05$ indicando diferenças
38 significantes. Não se encontrou diferença estatisticamente significativa ($P=0,2591$) ~~de~~ entre os valores
39 de H_{50} antes ($0,466 \pm 0,122$) comparados com aqueles obtidos após ($0,4537 \pm 0,123$) a hemodiálise. Em
40 suma, o presente estudo não encontrou diferença entre as fragilidades eritrocitárias antes e após a
41 hemodiálise, corroborando com análises anteriores sobre o tema. Futuros estudos similares a esse
42 devem ser realizados no norte do Brasil, em especial no pós-Covid-19.

43 **PALAVRAS CHAVES:** Hemodiálise; Eritrócitos; Fragilidade Osmótica.

44

45 INTRODUÇÃO

46 A lesão renal com consecutiva perda de função orgânica progressiva e irreversível é denominada
47 como doença renal crônica (DRC) (1). Seja por sequela da pandemia de COVID-19 seja por outros
48 fatores (e.g., hipertensão, diabetes, etc.), o número de casos de DRC tem crescido consideravelmente
49 nos últimos anos(2) problema de saúde pública cada vez mais relevante. Uma pesquisa Nacional de
50 Saúde de 2019 analisou 85.854 brasileiros e constatou uma prevalência de doença renal crônica de
51 1,4%, com maior prevalência entre os indivíduos com hipertensão, hipercolesterolemia (3,3% para
52 ambos os grupos) e diabetes (4,1%)(3).

53 A DRC, em seus estágios finais, demanda cuidados intensos de saúde, seja pela promoção das terapias
54 substitutivas renais (TSR) ou pelos transplantes renais(4). Dados da Sociedade Brasileira de
55 Nefrologia (SBN) mostram que, em julho de 2021, o número total estimado de pacientes em diálise
56 foi 148.363 e as taxas estimadas de prevalência e incidência de pacientes por milhão da população
57 foram 696 e 224, respectivamente(5). Dos pacientes prevalentes, 94,2% estavam em hemodiálise
58 (HD) e 5,8% em diálise peritoneal (DP), sendo que 21% desses, estavam na lista de espera para
59 transplante(5). A taxa de incidência de COVID-19 confirmada entre janeiro e julho de 2021 foi
60 1.236/10.000 pacientes em diálise e as taxas estimadas de mortalidade bruta anual geral e por COVID-
61 19 foram de 22,3% e 5,3%, respectivamente(5).

62 O processo de hemodiálise consiste na passagem do sangue do paciente através de membranas semi-
63 permeáveis, a fim de retirar produtos de degradação produzidos pelo corpo e o volume intravascular
64 excedente, em um processo que mimetiza as funções do rim saudável (1).

65 Acredita-se que a passagem do sangue por esse sistema extra-corpóreo produza, inevitavelmente,
66 danos aos eritrócitos(6). As células vermelhas podem sofrer danos por fatores mecânicos, osmóticos,
67 químicos ou pelo conjunto desses fatores, causando hemólise imediata ou diminuindo a vida útil
68 dessas células em médio prazo(6–8).

69 Ao longo de sua vida útil, que em média é de 120 dias, os eritrócitos vão sofrendo um processo de
70 envelhecimento, decorrente de microdanos em sua membrana celular. Ademais, a membrana
71 submetida a tensão por cisalhamento ou por algum outro estresse mecânico, osmótico e/ou químico,
72 deforma-se até atingir seu ponto de cedência, o que a torna mais vulnerável à lise sob menor nível de
73 agressão. Desse modo, eritrócitos com menor resiliência são mais precocemente lisados frente a
74 aqueles agentes estressores(9).

75 A fragilidade osmótica eritrocitária pode ser mensurada a partir da lise dessas células em soluções
76 com concentrações decrescentes de cloreto de sódio (10). A estabilidade de membrana é a propriedade
77 desse complexo biológico em manter a sua estrutura diante de condições ou agentes que favoreçam
78 sua desintegração (9–11). Os agentes que promovem essa desorganização são chamados de agentes
79 caotrópicos, dentre eles podemos citar o estresse hipotônico, os extremos de pH, o calor e uma série
80 de solutos como o etanol e a ureia, dentre outros (12). A estrutura da membrana eritrocitária e sua
81 reologia refletem, em alguma extensão, processos que também estariam ocorrendo em diversos
82 lugares do organismo (10,12). Por essa razão e sua ampla disponibilidade, os eritrócitos têm sido
83 frequentemente usados como modelo de estudo de processos fisicoquímicos, fisiológicos e
84 patológicos (9–12).

85 Assim, o presente estudo visa estudar a influência da hemodiálise sobre a fragilidade osmótica
86 eritrocitária em pacientes com falência renal crônica em atendimento no Hospital do Rim, em Rio
87 Branco, AC.

88

89 **MÉTODOS**

90 Inicialmente aderiram à pesquisa 21 pacientes renais crônicos com mais de 18 anos, provindos da
91 Hospital do Rim da cidade de Rio Branco, Acre. A amostragem foi feita por conveniência. Um
92 paciente desistiu da pesquisa, restando 20 voluntários, sendo 7 mulheres e 13 homens. Amostras de
93 sangue foram coletadas antes da hemodiálise (HD), assim que o paciente é conectado a máquina e no
94 fim da hemodiálise através do acesso que acoplava a fistula arteriovenosa ao dialisador. Os

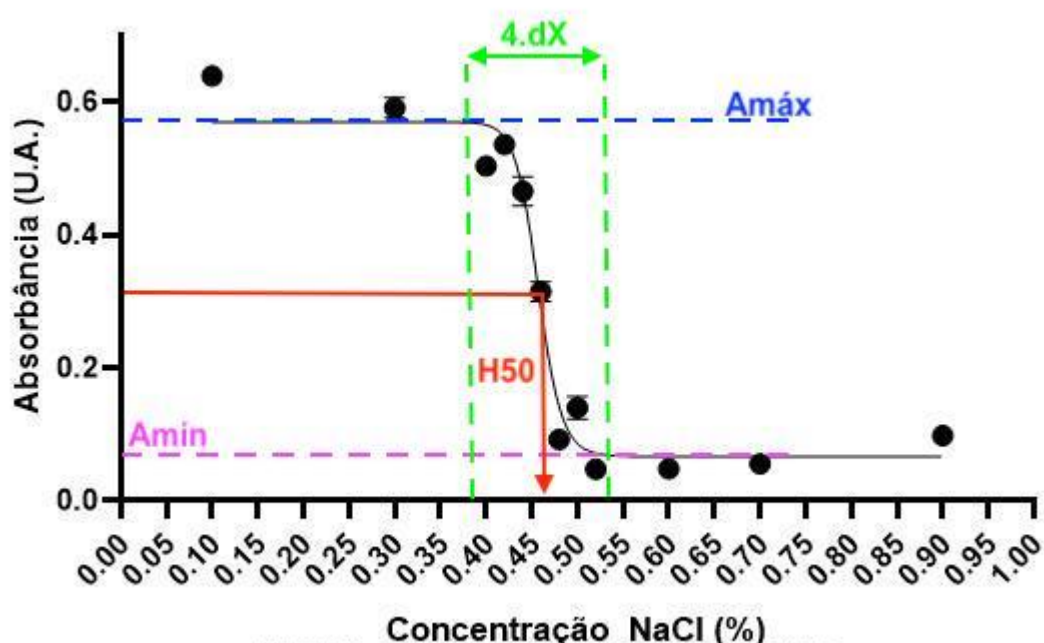
95 voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo
96 Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Acre (Nº 009556/2020).

97 Durante os procedimentos experimentais foi utilizado NaCl com grau de pureza de 99,5%, o qual foi
98 devidamente corrigido para o preparo das soluções.

99 Os ensaios foram realizados em uma série duplicada de 12 minitubos (*Eppendorf*) com 1,5 mL de
100 volume, contendo 1 mL de solução de NaCl a 0.10; 0.30; 0.40; 0.42; 0.44; 0.46; 0.48; 0.50; 0.52;
101 0.60; 0.70; e 0.90 g/dL. Após preincubação em banho termostatizado de água (SOLISDTEEL, SSDc-
102 20L, Brasil) por 10 minutos à 37 °C, cada minitubo recebeu 10 µL de sangue. Após agitação suave
103 para homogeneização da mistura, os mitubos foram incubados em banho termostarizados de água
104 por 30 minutos à 37 °C. Após esse período, os mintubos foram centrifugados (DAKI, DTR-16000-
105 BI, China) por 10 minutos a 1.600 x g. Aliquotas de cerca de 800 µL do sobrenadante de cada tubo
106 foram transferidas para a placa de leitura do espectrofotômetro (KASUAKI, DR-200-BI, China) para
107 aferição da absorbância de cada solução a 540 nm.

108 A curva de lise hipotônica de eritrócitos humanos foi obtida a partir da curva de regressão sigmoidal,

109 dada pela equação de Boltzmann, $A_{540} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_{50})/dx}} + A_2$, entre os valores de absorbância a 540
110 nm e a concentração de NaCl de cada solução (Figura 1). Nesta curva, A_{max} representa a **absorbância**
111 **média máxima** associada à hemólise total; A_{min} representa a **absorbância média mínima** associada
112 à hemólise basal; H_{50} representa a **concentração de NaCl necessária para promover lise de 50%**
113 da população de eritrócitos; e dX representa a **variação na concentração de NaCl** necessária para
114 levar os eritrócitos do estado íntegro (A_{min}) ao estado lisado (A_{max}) (10,12).



115
Figura 1 - Fonte: imagem produzida pelos autores

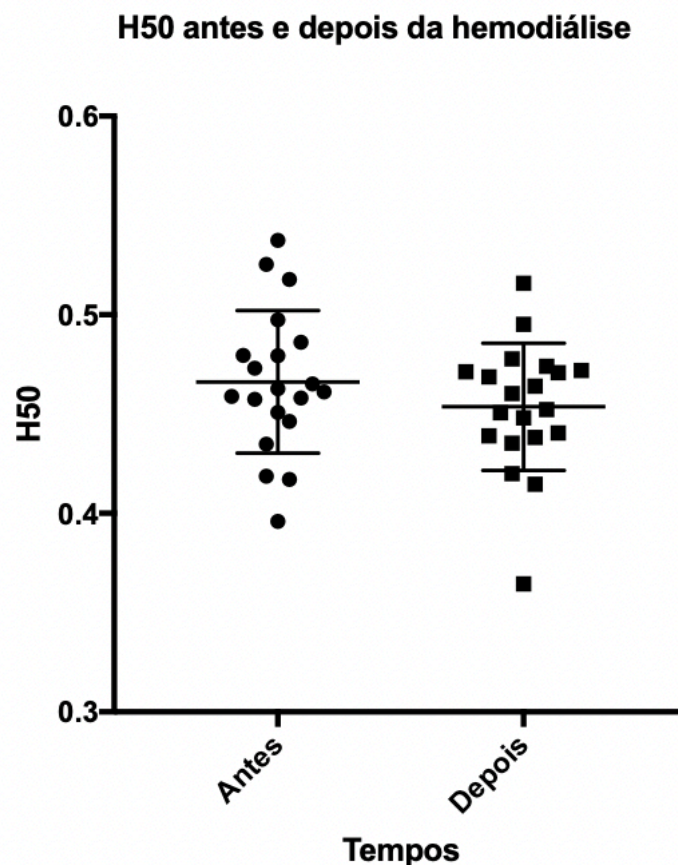
116

117 O teste t de Student foi utilizado para comparar as amostras antes e depois, com a ajuda do software
118 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

119

120 RESULTADOS

121 Após análise das 40 amostras, chegou-se aos valores de H50 determinados antes e depois da
122 hemodiálise. Os valores de H50 antes e depois da hemodiálise foram de $0,466 \pm 0,122$ e $0,4537 \pm 0,123$,
123 respectivamente.



124

125

126 A comparação estatística, realizada com base no teste t de Student, gerou um valor de P maior que
127 0,05 (0,2591), indicando que a diferença observada não tem relevância estatística quando utilizamos
128 o intervalo de confiança de 95%. Em suma, os valores de H₅₀ dos eritrócitos obtidos após a sessão de
129 hemodiálise não foi significativamente diferente dos valores de H₅₀ dos eritrócitos obtidos antes da
130 sessão de hemodiálise na amostra estudada.

131

132 DISCUSSÃO

133 Sabe-se que a segurança do tratamento com máquinas que mimetizam as funções do rim, as máquinas
134 de hemodiálise, foram motivo de preocupação para os pioneiros desse tratamento. Com o passar dos
135 anos foram criados comitês de padronização para desenvolver requisitos mínimos para segurança do
136 uso dessa terapia. Tais comitês são até hoje formados por indústrias, laboratórios, comunidades
137 científicas e agências reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos
138 da América (9). Essas autoridades no assunto trabalham para definir limites seguros na intervenção
139 dos parâmetros fisiológicos da reologia do sangue. A maioria desses limites são baseados em dados
140 fisiológicos, já outros ainda são baseados em suposições históricas, que são corroboradas pela
141 experiência prática (6). O presente estudo não encontrou diferença entre fragilidade eritrocitária antes
142 e depois da hemodiálise.

143 No processo de hemodiálise, existem inúmeras variáveis acerca dos materiais utilizados, o fluxo
144 sanguíneo, o calibre dos acessos e até mesmo os modelos de máquinas de HD. Estudos anteriores,
145 demonstraram um valor de hemólise inferior à 2% nos pacientes com doenças renais crônicas,
146 inferindo em uma hemólise subclínica e passível de compensação pelo próprio organismo. Importante
147 ressaltar que diferentes métodos de acesso como uso de apenas uma ou duas agulhas, o calibre dos
148 jelcos empregados e o fluxo programado da diálise influenciam em uma maior ou menor hemólise,
149 sendo a maior taxa de ruptura de hemácias encontrada no uso de dupla agulha, dupla bomba em seu
150 fluxo máximo (7,13)

151 Sabe-se que o processo de hemodiálise impõe estresse oxidativo sobre os eritrócitos, porém não se
152 encontra relevância estatística entre esse mecanismo e a anemia apresentada pelos doentes. Trata-se,
153 portanto, de uma interferência mais sutil do estresse oxidativo na produção da anemia nos renais
154 crônicos (14).

155 É possível encontrar uma fragilidade eritrocitária maior em pacientes em terapia dialítica quando
156 comparados a pessoas saudáveis (15). Porém, essa relação é percebida no início da hemodiálise, tendo
157 até um pequeno aumento da resistência dos glóbulos vermelhos ao final do procedimento, podendo
158 corresponder a uma normalização dos parâmetros bioquímicos por meio da retirada de escórias pela
159 máquina de diálise (16).

160 Ademais, em pacientes urêmicos, grande parte dos doentes renais crônicos, é possível ver uma maior
161 sensibilidade dos eritrócitos frente ao estresse osmótico, provavelmente pela diminuição da
162 deformabilidade dessas células (17). Entretanto, quando comparadas as sensibilidades osmóticas pré
163 e pós-hemodiálise não existe significância estatística, sendo um indicativo de que a diálise isolada
164 não possui efeito direto na deformabilidade e, portanto, na fragilidade dos eritrócitos (17). Outrossim,
165 a hemodiálise pode melhorar a fragilidade osmótica, o mecanismo subjacente a essa melhora pode

166 ser a remoção de toxinas urêmicas de baixo peso molecular, resultando na normalização da
167 osmolaridade sérica (16).

168 Em contrapartida, há perda sanguínea durante as sessões de hemodiálise por meio do sequestro de
169 parte do conteúdo dentro do circuito por onde o fluido passa. Dessa forma, é possível prever uma
170 instalação de quadro anêmico com o passar dos anos (6).

171 No processo da HD, sabe-se que o sangue pode sofrer danos mecânicos, por meio das interações com
172 os acessos vasculares, os circuitos e as bombas presentes, quimicamente, por interações osmóticas,
173 termicamente, pelo calor produzido pela máquina de hemodiálise e por uma combinação desses
174 fatores (9,10). Esses danos podem levar a uma destruição imediata das células vermelhas do sangue,
175 chamada de hemólise aguda, ou causar comprometimento funcional nesse glóbulo vermelho,
176 resultando em sua hemólise subaguda. Ambos os processos viabilizam a instalação de uma possível
177 anemia clínica ou subclínica, a depender do status basal dos pacientes (9,10).

178 Portanto, entende-se que hemodíálises frequentes, longas e com altos fluxos são candidatas a causar
179 mais danos a estrutura das hemácias. Em um aspecto mais amplo de análise, a mortalidade e a
180 morbidade em pacientes com doença renal crônica são altas quando comparadas com a população
181 geral e é possível que danos nos eritrócitos ocasionados no circuito extracorpóreo possa contribuir
182 para essa métrica (14). Ademais, é verificado em pacientes renais crônicos eritrócitos com vida média
183 reduzida, essa condição possui firme orientação sobre acompanhamento regular dos níveis
184 hematimétricos e até da reposição de ferro, B12 e eritropoetina (7,13).

185 Logo, pode-se inferir que essa pesquisa se comportou também como averiguadora da qualidade do
186 serviço de hemodialise, pois como já citado pelos trabalhos anteriores discutidos (7,13,14), as
187 indicações erroneas em relação a quantidade, tempo de hemodialise e marca das máquinas usadas
188 são variáveis que alteram a reologia da membrana plasmática do eritrócito podendo fazer com que
189 esses tenham prejuízo funcional levando a lise precoce dessa estrutura.

190 O presente trabalho apresenta limitações quanto ao quantitativo de pacientes envolvidos, no entanto,
191 se torna original pela iniciativa de realizá-lo dentro de um estado do Norte do Brasil e em um
192 momento tão crítico da humanidade (pandemia COVID -19) que impacta diretamente a doença renal
193 crônica.

194 Em suma, os resultados desse trabalho corroboram com estudos prévios (7,13,15–17). Além dos
195 resultados obtidos, o projeto foi instrumento para otimização e experimentação do protocolo de lise
196 eritrocitário, o qual poderá servir para futuras pesquisas de reologia das células sanguíneas.

197

198

- 200 1. Xavier A de S, Oliveira AKR, Brasileiro ME. Evolução histórica da hemodiálise e dos
201 acessos vasculares para a assistência ao doente renal crônico. *Revista Eletrônica de*
202 *Enfermagem do Centro de Estudos de Enfermagem e Nutrição*. 2012;4:1–15.
- 203 2. Jdiaa SS, Mansour R, El Alayli A, Gautam A, Thomas P, Mustafa RA. COVID–19 and
204 chronic kidney disease: an updated overview of reviews. Vol. 35, *Journal of Nephrology*.
205 Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 69–85.
- 206 3. Gouvêa E de CDP, Szwarcwald CL, Damacena GN, Moura L de. Autorrelato de diagnóstico
207 médico de doença renal crônica: prevalência e características na população adulta brasileira,
208 Pesquisa Nacional de Saúde 2013 e 2019. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*.
209 2022;31(spe1).
- 210 4. Almeida OAE de, Santos WS, Rehem TCMSB, Medeiros M. Envolvimento da pessoa com
211 doença renal crônica em seus cuidados: revisão integrativa. *Cien Saude Colet*. 2019
212 May;24(5):1689–98.
- 213 5. Nerbass FB, Lima H do N, Thomé FS, Vieira Neto OM, Sesso R, Lugon JR. Brazilian
214 Dialysis Survey 2021. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2022 Nov 4;
- 215 6. Polaschegg HD. Red Blood Cell Damage from Extracorporeal Circulation in Hemodialysis.
216 *Semin Dial*. 2009 Sep;22(5):524–31.
- 217 7. Sakota R, Lodi CA, Sconziano SA, Beck W, Bosch JP. In Vitro Comparative Assessment of
218 Mechanical Blood Damage Induced by Different Hemodialysis Treatments. *Artif Organs*.
219 2015 Dec 15;39(12):1015–23.
- 220 8. Terra F de S, Costa AMDD, Figueiredo ET, Morais AM de, Costa MD, Costa RD. As
221 principais complicações apresentadas pelos pacientes renais. *Rev Bras Clin Med*. 2010;92–
222 187.
- 223 9. Orbach A, Zelig O, Yedgar S, Barshtein G. Biophysical and Biochemical Markers of Red
224 Blood Cell Fragility. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2017;44(3):183–7.
- 225 10. Cunha LM. INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE CINÉTICA DE LISE EM
226 ERITRÓCITOS HUMANOS, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS.
227 Uberlândia; 2013.
- 228 11. da Silva Garrote-Filho M, Bernardino-Neto M, Penha-Silva N. Influence of Erythrocyte
229 Membrane Stability in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017 Apr 27;19(4):17.
- 230 12. Chagas C da CA. INFLUÊNCIA DE COMBINAÇÕES DE DIFERENTES CAOTRÓPICOS
231 NO ESPECTRO VISÍVEL DA HEMOGLOBINA E NA ESTABILIDADE DE
232 MEMBRANA DE ERITRÓCITOS HUMANOS Estudante. Uberlândia; 2011.
- 233 13. Yang MC, Lin CC. Influence of Design of the Hemodialyzer Inlet Chamber on Red Blood
234 Cell Damage During Hemodialysis. *ASAIO Journal*. 2001 Jan;47(1):92–6.
- 235 14. Ruskovska T, Bennett SJ, Brown CR, Dimitrov S, Kamcev N, Griffiths HR. Ankyrin is the
236 major oxidised protein in erythrocyte membranes from end-stage renal disease patients on
237 chronic haemodialysis and oxidation is decreased by dialysis and vitamin C supplementation.
238 *Free Radic Res*. 2015 Feb 23;49(2):175–85.
- 239 15. Gwoździński K, Janicka M, Brzeszczyńska J, Luciak M. Changes in red blood cell
240 membrane structure in patients with chronic renal failure. *Acta Biochim Pol*. 1997;44(1):99–
241 107.
- 242 16. Wu SG, Jeng FR, Wei SY, Su CZ, Chung TC, Chang WJ, et al. Red Blood Cell Osmotic
243 Fragility in Chronically Hemodialyzed Patients. *Nephron*. 1998;78(1):28–32.
- 244 17. Peuchant E, Salles C, Vallot C, Wone C, Jensen R. Increase of erythrocyte resistance to
245 hemolysis and modification of membrane lipids induced by hemodialysis. *Clinica Chimica*
246 *Acta*. 1988 Dec;178(3):271–82.