



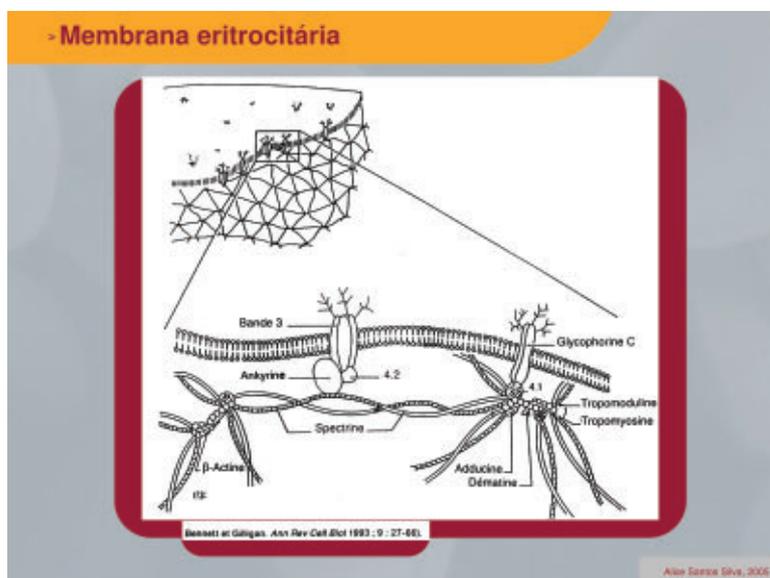
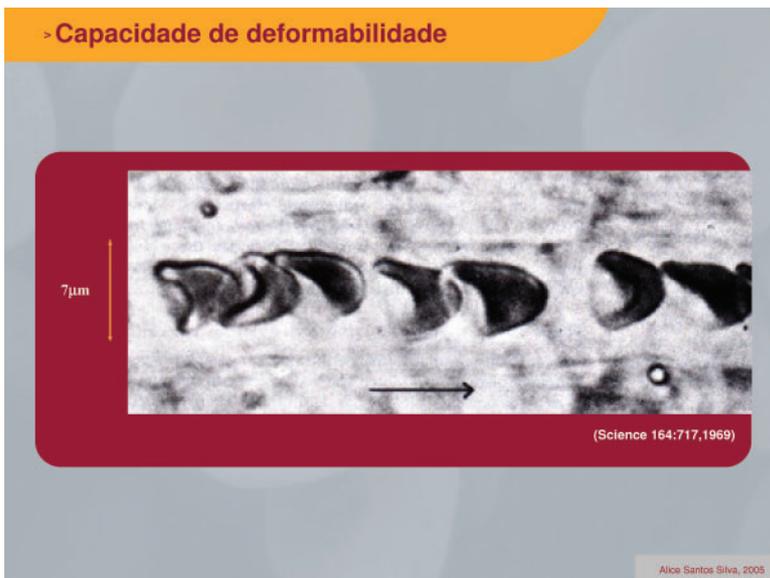
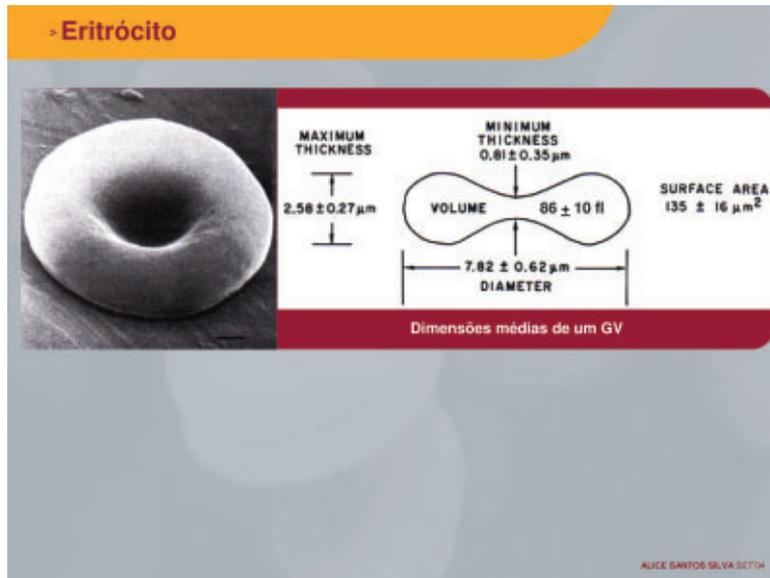
XVI Reunião da Sociedade Portuguesa de Hemorreologia e Microcirculação

“HEMORREOLOGIA, MICROCIRCULAÇÃO E *STRESS* OXIDATIVO”

26 de Novembro de 2005
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Alice Santos Silva



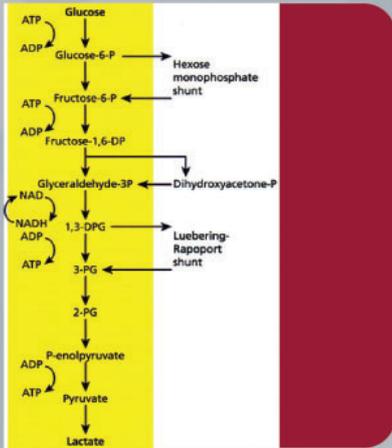


> Metabolismo eritrocitário

- » dependente da glucose
- » dirigido no sentido de manter
 - Hb no estado funcional
 - Integridade e capacidade de deformabilidade da membrana

Alice Santos Silva, 2006

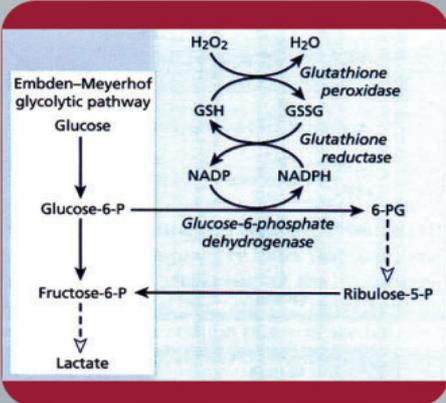
> Via de Embden-Meyerhoff (EM)



The diagram illustrates the Embden-Meyerhoff pathway (glycolysis) starting with Glucose. It is divided into two main stages: the preparatory phase and the payoff phase. Key steps include the conversion of Glucose to Glucose-6-P (consuming ATP), Fructose-6-P (consuming ATP), and Fructose-1,6-DP (consuming ATP). Branching points include the Hexose monophosphate shunt (from Glucose-6-P), the Luebering-Rapoport shunt (from 1,3-DPG), and the conversion of Dihydroxyacetone-P to Glyceraldehyde-3P. The payoff phase involves the conversion of Glyceraldehyde-3P to 1,3-DPG (producing NADH), 1,3-DPG to 3-PG (consuming ATP), 3-PG to 2-PG, 2-PG to P-enolpyruvate (consuming ATP), and finally P-enolpyruvate to Pyruvate (consuming ATP), which can be converted to Lactate (consuming ATP).

- » Via metabólica principal
- » 90% do metabolismo do GV
- » fonte de ATP e NADH

> Via das PMF e metabolismo do glutatião



The diagram shows the Embden-Meyerhoff glycolytic pathway on the left, with Glucose being converted to Glucose-6-P, then Fructose-6-P, and finally Lactate. On the right, the glutathione redox cycle is depicted, involving the conversion of H₂O₂ to H₂O by Glutathione peroxidase (consuming GSH and producing GSSG), and the reduction of GSSG back to GSH by Glutathione reductase (consuming NADPH and producing NADP). The connection between the two pathways is shown by the conversion of Glucose-6-P to 6-PG by Glucose-6-phosphate dehydrogenase (consuming NADP and producing NADPH), and the conversion of Ribulose-5-P to Fructose-6-P.

- » Via metabólica acessória
- » 10% do metabolismo do GV
- » Fonte de NADPH

> Oxidação da hemoglobina

desoxiHb / Fe²⁺; 6 e⁻ na camada exterior, 4 deles desemparelhados

Hb (d⁶) + O₂ → Hb (d⁵) O₂⁻

Hb (d⁵) O₂⁻ → Hb (d⁶) + O₂

Hb (d⁵) O₂⁻ → Hb (d⁵) + O₂⁻ (0.5-3% Hi) → Hb (d⁶) Hi redútase

O₂⁻ + O₂⁻ + 2H⁺ $\xrightarrow{\text{SOD}}$ H₂O₂ + O₂ H₂O₂ $\xrightarrow{\text{GSH / GPx}}$ H₂O

Alice Santos Silva, 2005

> Metabolitos de oxigénio no eritrócito

» Origem endógena

- Autoxidação da Hb
- Incapacidade do sistema redutor

» Origem exógena

- Activação do metabolismo celular
- Activação de células inflamatórias

- Eritrócito

Activação do metabolismo celular e de células inflamatórias

O₂⁻ → Hb (d⁵) + O₂⁻

H₂O₂ → H₂O₂

proteases → H₂O₂

H₂O₂ → H₂O₂

banda 3

Desintoxicação de metabolitos de oxigénio

↓

Sacrifício fisiológico?

Indicador cumulativo de stress oxidativo?

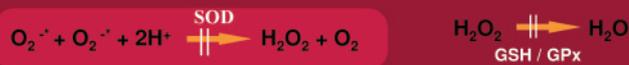
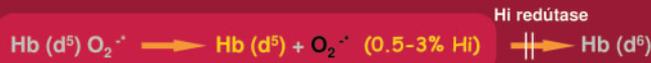
↑

Acumulação de modificações oxidativas

Alice Santos Silva, 2005

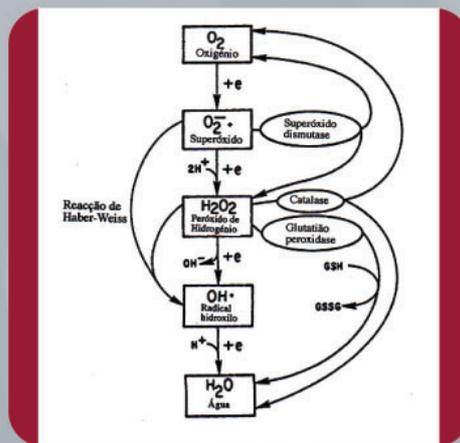
> Oxidação da hemoglobina

desoxiHb / Fe²⁺: 6 e⁻ na camada exterior,
4 deles desemparelhados

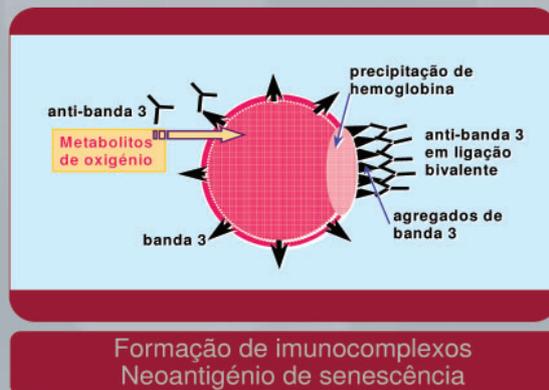


Alice Santos Silva, 2005

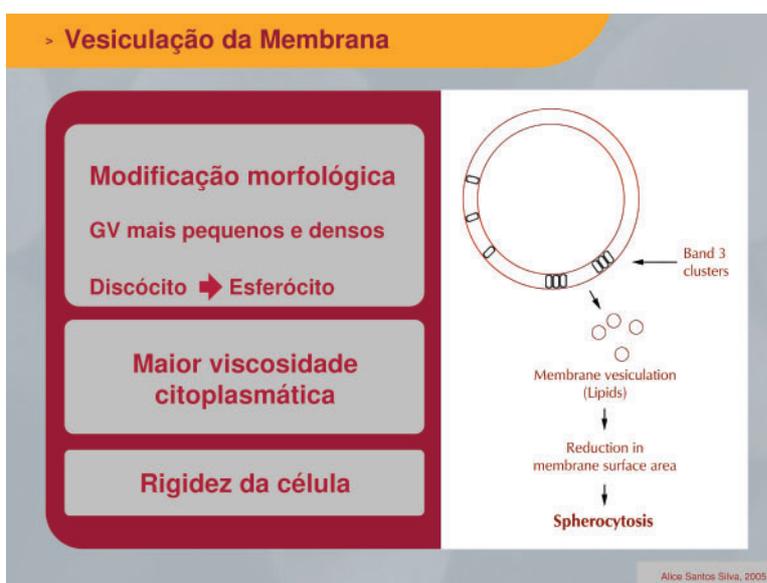
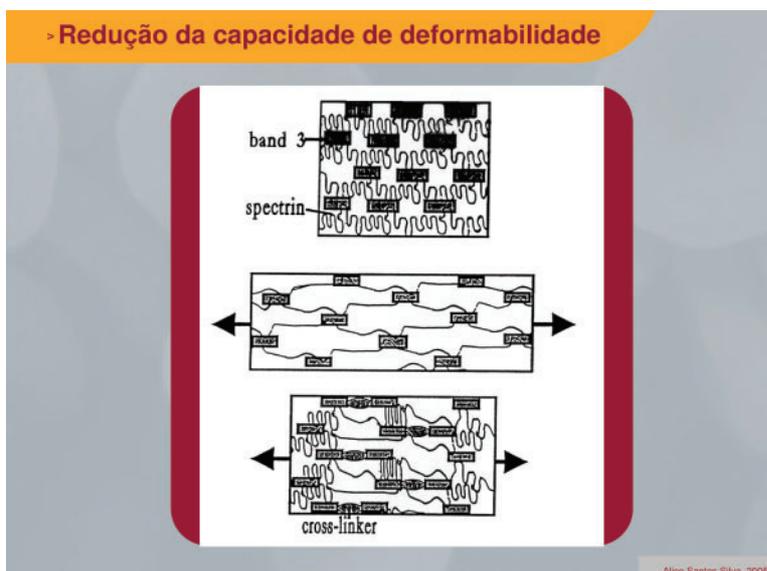
> Stress oxidativo no GV



> Redução dos sistemas de defesa antioxidante
oxidação da hemoglobina



Alice Santos Silva, 2005



> **Stress oxidativo**

> n° neutrófilos
 > n° GV mais rígidos
 > Viscosidade plasmática

Modificações hemorreológicas
 Zonas de estase e de turbulência

Alice Santos Silva, 2005

> **Eritrócito**

Hb (d⁵) + O₂⁻
 H₂O₂
 banda 3 MBH

banda 3 MBH

Alterações hemorreológicas:
 menor capacidade de deformabilidade

Indicador de risco?

> **Doenças Cardiovasculares**

- » **HT** (n = 12): com hipertensão
- » **EMA** (n = 24): com história de enfarte de miocárdio antigo (mais de 3 meses)
- » **pEMR** (n = 22): pós enfarte de miocárdio recente (com menos de 48 horas)
- » **Controlo** (n = 29): indivíduos aparentemente saudáveis, com hemograma e perfil lipídico normais

Alice Santos Silva et al.
 Atherosclerosis 116 (1995) 189-209

Alice Santos Silva, 2006

> **Protocolo experimental**

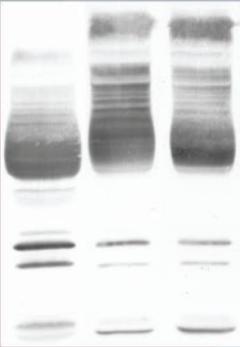
- » Hemograma
- » Avaliação da actividade enzimática da G6PD eritrocitária
- » Perfil lipídico convencional (Col, TG, HDLc, LDLc, Apo A-I, Apo B)
- » Estudo da membrana eritrocitária
 - Percentagem de hemoglobina ligada à membrana (%HbLM)
 - Perfil da proteína banda 3 (SDS-PAGE; Western blotting; densitometria)

Alice Santos Silva, 2005

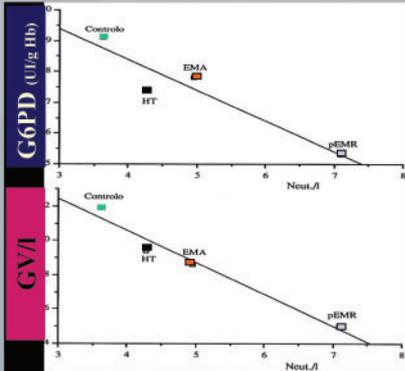
> **Resultados (Controlo/HT/EMA/pEMR)**

» **Membrana eritrocitária**

- Aumento significativo da %HbLM
- Perfil da proteína banda 3
 - Modificações significativas no perfil da banda 3
 - Aumento dos AgEPM
 - Redução da banda 3
 - Redução dos fragmentos proteolíticos



Alice Santos Silva, 2005



Correlação entre os valores médios das concentrações de neutrófilos com os valores médios da actividade enzimática da G6PD eritrocitária ($R = 0,900$) e do número de GV/I ($R = 0,963$), observada na população controlo, HT, EMA e pEMR.

Alice Santos Silva, 2005

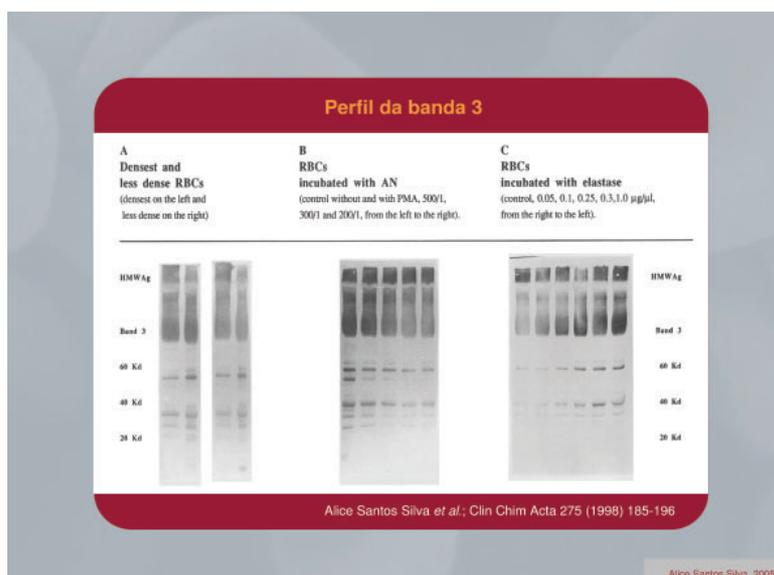
> **Testes in vitro**
 envelhecimento eritrocitário / neutrófilo activado

- » GV de densidade crescente
- » GV / PMN activados, em concentrações crescentes
- » GV / elastase neutrofilica em concentrações crescentes

- » Perfil da banda 3
- » HbLM
- » G6PD

Alice Santos Silva *et al.*
 Clin Chim Acta 275 (1998) 185-196

Alice Santos Silva, 2005



> **Acidente cerebrovascular isquémico (AVC)**

- » **AVC diagnosticado** (n = 21)
- » **Controlo** (n = 29): indivíduos aparentemente saudáveis, com hemograma e perfil lipídico normais

Alice Santos Silva *et al.*
 Clinica Chimica Acta 2002, 320 : 29-35

Alice Santos Silva, 2005

» Resultados (Controlo/AVC)

- » **aumento significativo de neutrófilos (2x)**
 - aumento significativo de elastase neutrofílica (2x)
 - aumento significativo de lactoferrina (2x)
- » **redução significativa de GV**
- » **lesão eritrocitária**
 - aumento significativo de HbLM (4x)
 - perfil da banda 3:
 - aumento significativo dos AgEPM (2x)
 - redução significativa dos fragmentos proteolíticos

Alice Santos Silva, 2005

> Exercício físico



- » aumento do metabolismo celular
- » aumento do ritmo respiratório e cardíaco
- » perda de líquidos
- » leucocitose neutrofílica
- » aumento da temperatura fisiológica

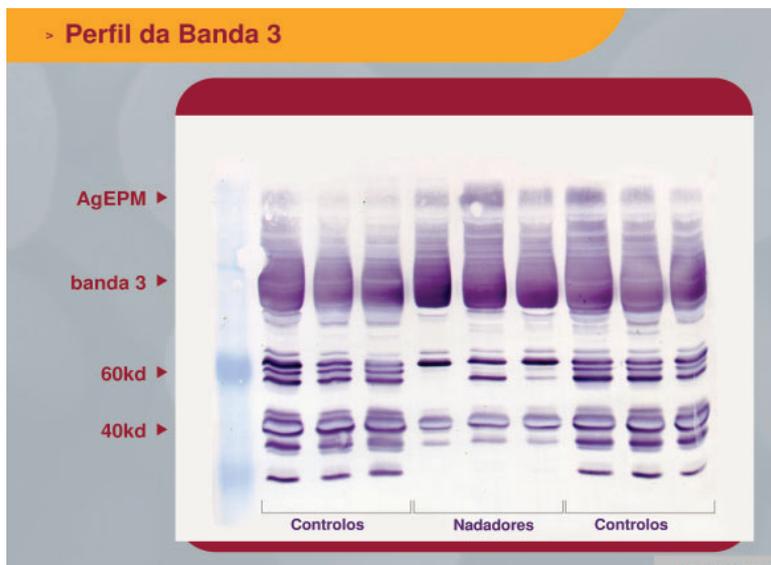
Alice Santos Silva, 2005

- » **90 adolescentes**
12-16 anos; IMC semelhantes;
repouso; jejum de 12 h;
48 h após exercício
- 41 nadadores de alta competição**
20 h treino/semana
- 49 adolescentes**
2-4 h exercício/semana

- » **Hemograma**
- » **Lesão eritrocitária**
Perfil da proteína banda 3
%HbLM
- » **Activação leucocitária**
Elastase
Lactoferrina
- » **Perfil lipídico**
TG, Col, HDLc, LDLc, Apo A-I,
Apo B, Lp (a)
- » **Stress oxidativo**
TBA; TAS
TBA/TAS

Alice Santos Silva *et al.*
Clin Chim Acta 306 (2001) 119-126

Alice Santos Silva, 2005



> Estudo leucocitário



	exercício moderado	alta competição	P
GB (x10 ⁹ /l)	6.30 ± 1.22	6.35 ± 1.29	ss
Gran. (x10 ⁹ /l)	4.04 ± 1.15	3.53 ± 1.31	ss
Linf. (x10 ⁹ /l)	1.87 ± 0.52	2.52 ± 0.68	< 0.001
Mon. (x10 ⁹ /l)	0.43 ± 0.15	0.41 ± 0.09	ss
Elastase (mg/l)	44.95 ± 19.92	73.09 ± 68.50	< 0.05
Lactoferrina (ng/l)	555.5 ± 147.2	621.8 ± 380.5	ss

Alice Santos Silva, 2005

> Psoríase



- » Psoríase inactiva (PASI < 3) (n = 30)
- » Psoríase activa (PASI > 3) (n = 30)
- » Controlo (n = 30)

P Rocha-Pereira, A Santos Silva *et al.*
Brit J Dermatol 2004, 150 : 232-244

P Rocha-Pereira, A Santos Silva *et al.*
Brit J Dermatol 2004, 150 : 917-928

> Psoríase

- » **Aumento significativo de neutrófilos com a gravidade da psoríase**
 - aumento da elastase neutrofilica (2x: PI; 4x: PA)
- » **Redução significativa de GV com a gravidade da psoríase**
- » **Lesão eritrocitária**
 - aumento significativo de %HbLM (2x: PI; 3x: PA)
 - perfil da banda 3:
 - aumento significativo dos AgEPM
 - redução significativa dos fragmentos proteolíticos

Alice Santos Silva, 2005

> Gravidez normal
Estudo longitudinal (1º, 2º e 3º trimestre) de 23 grávidas



- MBH estável
- Perfil Bd3
 - Redução dos HMWAg e Bd3
 - Aumento dos Frag
- Aumento do RDW, GPx e Bb

Luís Belo, Alice Santos Silva *et al.*
Eur J Haematology 69 (2002) 145-151

Alice Santos Silva, 2005



Envelhecimento/lesão do GV



Modificação na morfologia e na capacidade funcional

Alice Santos Silva, 2005



Lesão eritrocitária
em situações
de *stress oxidativo*

Alice Santos Silva
Elisabeth Castro
Patronila Rocha Pereira
Irene Rebelo
Cristina Catarino
Luís Belo
Natércia Teixeira
Frederico Teixeira
Alexandre Quintanilha

Universidade do Porto
Serv. Bioquímica/Faculdade Farmácia
Instituto de Biologia Molecular e Celular
Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar

Universidade de Coimbra
Instituto de Farmacologia Experimental, Faculdade de Medicina

Universidade Beira Interior
Departamento de Química

XVI Reunião da SPHM
"Hemorreologia, microcirculação e stress oxidativo", Coimbra 2005

