

# ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA ANGIOGRAFIA COM FLUORESCEÍNA BISSÓDICA NOS PARÂMETROS HEMORREOLÓGICOS DE DOENTES COM DIABETES MELLITUS\*

LUIS SARGENTO, LEYRE ZABALA, TERESA GOMES, CARLOTA SALDANHA,  
J. MARTINS-SILVA, PAULO SOUZA-RAMALHO

Instituto de Bioquímica, Faculdade Medicina de Lisboa. Dep. Oftalmologia, Hosp. Santa Maria, Fac. Med. Lisboa, Lisboa.

## RESUMO

A angiografia retiniana com fluoresceína é um método auxiliar de diagnóstico de rotina em Oftalmologia que nos permite estudar quer a interface sangue/humor aquoso quer a interface sangue/retina/coroideia. A presença em circulação de uma substância estranha ao organismo poderá influenciar a homeostasia do fluxo sanguíneo. Com o objectivo de estudar a influência da fluoresceína na reologia sanguínea colheu-se sangue antes, imediatamente após e ao fim de 30 min. da injeção de fluoresceína em doentes com Diabetes Mellitus (n=10) com ou sem antecedentes de retinopatia diabética; estudou-se a fluidez sanguínea (hematócrito, agregação eritrocitária e viscosidade sanguínea total) e a análise das características funcionais da membrana eritrocitária. Após a injeção da fluoresceína observou-se hiperagregação eritrocitária (37,7%,  $p=0,004$ ), diminuição da concentração de hemoglobina ( $p=0,039$ ) e do hematócrito ( $p=0,013$ ) e houve duplicação da concentração de metahemoglobina ( $p<0,001$ ). A viscosidade sanguínea total manteve-se inalterada. A camada hidrofóbica da membrana eritrocitária tornou-se mais rígida ( $p=0,016$ ). Estas alterações normalizaram ao fim de 30 minutos. Em conclusão, a angiografia retiniana com fluoresceína interfere com as características hemorreológicas dos doentes com Diabetes Mellitus, conduzindo a uma hiperagregação eritrocitária que poderá interferir com a microcirculação destes doentes.

## SUMMARY

### Sodium Fluorescein Angiography Influence on Diabetes Mellitus Hemorheological Profile

Chorioretinal angiography with fluorescein is an auxiliary method widely used in Ophthalmology which enables us to study the blood/humour and blood/retina/choroideia interface. The presence of a strange compound in circulation may interfere with blood flow homeostasis. With the aim of studying fluorescein influence in blood rheology, blood samples were drawn before, immediately after and 30 minutes after fluorescein bolus injection; from 10 patients with diabetes mellitus, with or without retinopathy, blood fluidity (hematocrit, erythrocyte aggregation and whole blood viscosity) and erythrocyte membrane functional properties were determined. After fluorescein injection there was erythrocyte hyperaggregation (37.7%,  $p=0.004$ ), was detected,

\* Apresentado em parte sob forma de comunicação livre no VI European Congress on Clinical Hemorheology, Junho 1995.

hemoglobin concentration ( $p=0.039$ ) and hematocrit ( $p=0.013$ ) decrease, and a double time increase of methemoglobin concentration ( $p<0.001$ ) the erythrocyte membrane hydrophobic region became more rigid ( $p=0.016$ ). All these abnormalities normalized after 30 minutes. In conclusion, fluorescein angiography interferes acutely with the hemorheological parameters of patients with diabetes mellitus, with erythrocyte hyperaggregation which could interfere with the microcirculation of these patients.

## INTRODUÇÃO

Em 1960, Novotny e Alvis descreveram um método de visualização dos vasos retinianos, mediante a injeção endovenosa de fluoresceína bissódica. A circulação de fluoresceína pelos vasos retinianos pôde ser observada e fotografada com luz azul e através de um filtro de interferência<sup>1</sup>. A fluoresceína bissódica é uma substância relativamente inócua, utilizada no estudo das barreiras oculares, quer da interface sangue/humor aquoso quer da interface sangue/retina, sendo um método de rotina em Oftalmologia.

O fluxo sanguíneo é uma variável multifactorial, essencial para o normal funcionamento e sobrevivência de órgãos e tecidos. As propriedades do fluxo sanguíneo dependem das características e do estado dos vasos sanguíneos, do regime de pressões intravasculares e da fluidez sanguínea. A presença em circulação de uma substância estranha ao organismo durante a realização da angiografia poderá influenciar a homeostasia do fluxo sanguíneo e os factores influentes na reologia sanguínea. Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* têm revelado a interferência dos meios de contraste radiopacos nos parâmetros hemorreológicos<sup>2</sup> e em células endoteliais<sup>3</sup>, provavelmente com maior incidência de efeitos, logo após a injeção de um bolus endovenoso de contraste nos grandes vasos, e na microcirculação após injeções selectivas e durante os procedimentos da angioplastia.

O objectivo do nosso estudo é o de verificar se a angiografia com fluoresceína bissódica interfere com o fluxo sanguíneo, nomeadamente através da determinação da fluidez sanguínea (hematócrito, agregação eritrocitária e viscosidade sanguínea total) e da análise das características funcionais da membrana eritrocitária (fluidez de membrana e actividade da acetilcolinesterase eritrocitária) em doentes com Diabetes Mellitus Insulino Independente (DMII).

## MATERIAL E MÉTODOS

### População Estudada (Quadro 1):

Grupo de 10 doentes (5H e 5M) com DMII foram submetidos a angiografia com fluoresceína bissódica (F).

Quadro 1 – Perfil Clínico dos doentes

AMOSTRA	N = 10
SEXO	5 H; 5 M
IDADE (anos)	61,5 ± 7,8
Hb A1c	9,4±2,4 g/dL
GRAU DE RETINOPATIA	5 grau 0; 5 grau 1

### Amostras de Sangue:

As amostras de sangue foram obtidas por meio de um cateter (21-24G) colocado na arcada venosa do dorso da mão, através do qual também se fez a injeção endovenosa de fluoresceína bissódica.

As colheitas das amostras de sangue para tubos com heparina sódica (12,5 UI/mL) foram realizadas antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 minutos (T30) da injeção do bolus endovenoso de uma solução (5mL) aquosa de fluoresceína bissódica a 20%.

A fluoresceína bissódica é uma molécula orgânica, C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>Na<sub>2</sub>, com o peso molecular de 376,3 Da. É uma substância vermelho-laranja, solúvel em água conferindo fluorescência de tonalidade verde.

## PARÂMETROS HEMORREOLÓGICOS

### I - Viscosidade Interna do Eritrócito:

As concentrações de hemoglobina (Hb) e a de metahemoglobina (metaHb) foram avaliadas em hemoxímetro (Hemoximeter-OSM3). O hematócrito (Ht) foi determinado por microcentrifugação. Considera-se a concentração média de hemoglobina globular (CMHG=Hb/Ht) como um índice de viscosidade interna globular.

### II - Parâmetros Hemorreológicos:

#### Agregação Eritrocitária:

O índice de agregação eritrocitária (AE) foi avaliado em amostras de sangue total (20 µl) pipetadas para a câmara de um agregómetro Myrenne MA 1 e submetidas a uma razão de cisalhamento de 600 s<sup>-1</sup>, de acordo com o método de Schmidt-Schonbein<sup>4</sup>.

#### Viscosidade Sanguínea Total (V.S.T):

A V.S.T. foi determinada num viscosímetro Brookfield, tendo-se utilizado duas forças de cisalhamento: 22,5s<sup>-1</sup> e 225s<sup>-1</sup>.

### III - Comportamento Funcional da Membrana Eritrocitária

O comportamento funcional da membrana eritrocitária foi avaliado através da determinação da fluidez de membrana das zonas hidrofóbica e polar externa, e da determinação da actividade enzimática de uma proteína transmembranar do eritrócito, a acetilcolinesterase eritrocitária (AChE):

#### Determinação da Polarização de Fluorescência:

A fluidez dos fosfolípidos de membrana foi determinada nas regiões hidrofóbica e hidrofílica utilizando-se o método de polarização de fluorescência com as sondas 1,6-dife-

Quadro 2 – Média  $\pm$  desvio padrão dos valores dos parâmetros estudados antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 minutos (T30) da injeção de fluoresceína no grupo de doentes estudados.

	T0	T1	T30	VARIAÇÃO COM TEMPO
Hemoglobina (g/dL)	13,94 $\pm$ 1,00	13,24 $\pm$ 1,24	13,97 $\pm$ 1,03	p=0,009
Hematócrito (%)	43,3 $\pm$ 3,4	40,5 $\pm$ 4,7	43,3 $\pm$ 3,0	p=0,013
CMHG (g/dL)	32,19 $\pm$ 0,03	32,69 $\pm$ 0,03	32,26 $\pm$ 0,04	p= N.S.
Metahemoglobina (g/dL)	0,49 $\pm$ 0,13	0,90 $\pm$ 0,34	0,55 $\pm$ 0,10	p<0,001
Agregação Eritrocitária (s.d.)	9,44 $\pm$ 3,20	13,0 $\pm$ 4,9	9,24 $\pm$ 2,70	p=0,004
V.S.T. a 22,5 s-1 (mPa.s.)	7,39 $\pm$ 1,09	7,28 $\pm$ 0,83	7,63 $\pm$ 0,78	p= N.S.
V.S.T. a 225 s-1 (mPa.s.)	4,42 $\pm$ 0,43	4,28 $\pm$ 0,39	4,51 $\pm$ 0,38	p= N.S.
TMA-DPH (p)	0,320 $\pm$ 0,01	0,330 $\pm$ 0,01	0,322 $\pm$ 0,01	p= N.S.
DPH (p)	0,294 $\pm$ 0,02	0,310 $\pm$ 0,02	0,323 $\pm$ 0,02	p=0,016
AChE (UI/mg Hb)	326,5 $\pm$ 53,5	314,1 $\pm$ 51,6	313,8 $\pm$ 33,5	p=N.S

Abreviaturas: Viscosidade sanguínea total (V.S.T.), Fluidez da camada polar externa (TMA-DPH) e hidrofóbica (DPH) da membrana eritrocitária; actividade de acetilcolinesterase eritrocitária (AChE), concentração média de hemoglobina globular (CMHG); não significativo (N.S.)

nil-1,3,5- hexatrieno (DPH) e 1,4 (trimetil amino fenil)-6-fenilhexa-1,3,5-trieno (TMA-DPH), respectivamente<sup>5</sup>.

#### Determinação da actividade enzimática da Acetilcolinesterase Eritrocitária (AChE):

A actividade da AChE foi determinada pelo método espectrofotométrico de Kaplan modificado<sup>6</sup>, considerando-se o seu valor um índice de integridade da membrana celular.

#### Análise Estatística:

Na avaliação do estudo da variação dos parâmetros hemorreológicos na experiência realizada foi utilizada a análise de MANOVA *repeated measures* e o teste t-Student emparelhado (*two-tailed*). No cálculo dos coeficientes de correlação foi utilizado o método de Pearson, com cálculo de p, tipo *two tailed probability*.

A hipótese nula imposta (não há variação dos parâmetros estudados ao longo do tempo) foi rejeitada para um nível de significância inferior a 0,05.

## RESULTADOS

Os resultados dos parâmetros estudados apresentam-se agrupados de acordo com as características funcionais da membrana celular e dos meios intra e extra-globular.

### I- Viscosidade Interna Eritrocitária e Metahemoglobina

Os valores das concentrações de Hb (Fig. 1) e de metaHb (Fig. 2) variaram de forma inversa ( $r = -0,5210$ ;  $p=0,001$ ) ao longo do tempo estudado. A Hb variou significativamente ( $p=0,009$ ) ao longo do estudo, tendo ocorrido diminuição ( $p=0,039$ ) da sua concentração após a injeção de F, que normalizou em T30.

A concentração de metaHb também variou significativamente ( $p=0,001$ ) ao longo do tempo estudado, duplicando a sua concentração após a injeção de F (T0:  $0,49 \pm 0,13$ ; T1:  $0,90 \pm 0,34$ ;  $p=0,008$ ), retornando ao seu valor inicial em T30 ( $0,55 \pm 0,10$ ).

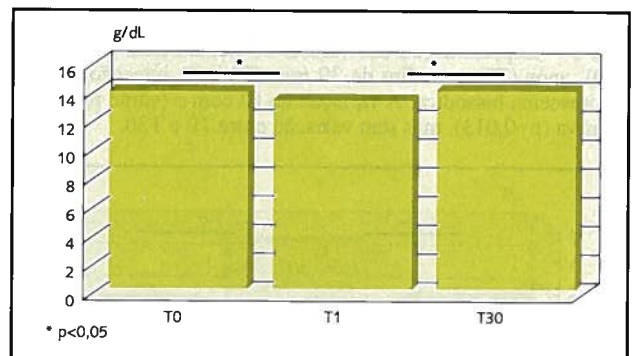


Fig. 1 – Representação da variação dos valores da concentração de hemoglobina (Hb), antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 min (T30) da injeção e.v. de fluoresceína bissódica. A variação da Hb com o tempo foi significativa ( $p=0,009$ ), mas sem variação entre T0 e T30.

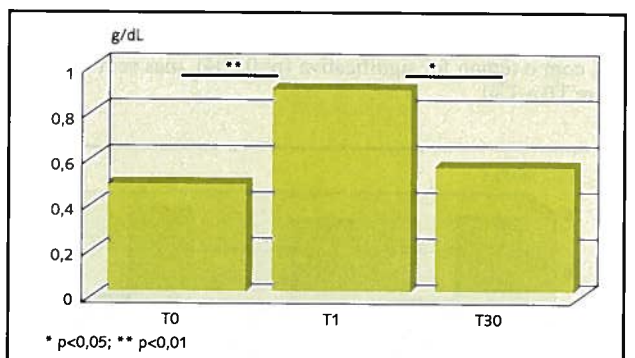


Fig. 2 – Representação dos valores da metahemoglobina (metaHb), antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 min (T30) da injeção e.v. de fluoresceína bissódica. A variação da metaHb com o tempo foi significativa ( $p=0,001$ ), mas sem variação entre T0 e T30.

A CMHG não variou significativamente ao longo dos intervalos de tempo ensaiados, como verificado pela relação directa ( $r=0,9451$ ;  $p<0,001$ ) entre a Hb e Ht.

## II - Fluidez Sanguínea

A injeção de F endovenosa induziu alterações significativas nos valores do hematócrito ( $p=0,013$ ; Fig. 3) e da AE ( $p=0,004$ ; Fig. 4), sem afectar significativamente a V.S.T. (Fig. 5).

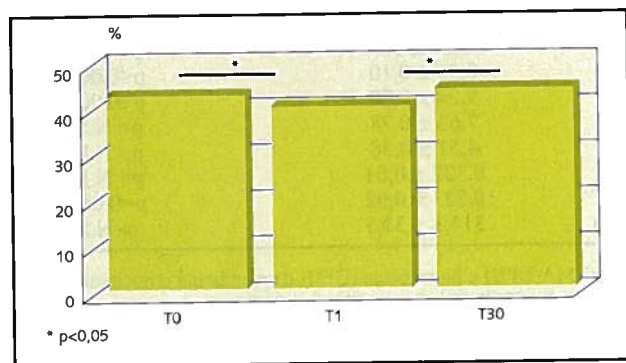


Fig. 3 – Representação dos valores do hematócrito (Ht), antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 min (T30) da injeção e.v. de fluoresceína bissódica. A variação do Ht com o tempo foi significativa ( $p=0,013$ ), mas sem variação entre T0 e T30.

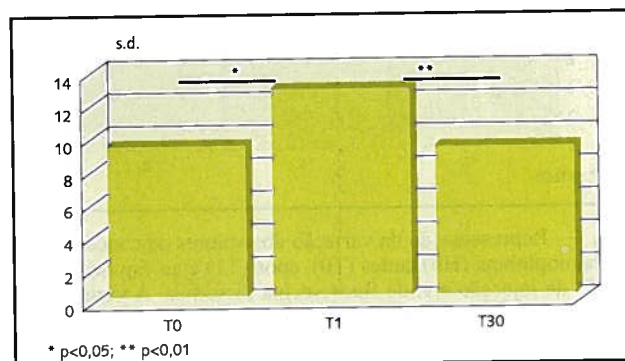


Fig. 4 – Representação da variação dos valores da agregação eritrocitária (AE), antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 min (T30) da injeção e.v. de fluoresceína bissódica. A variação da AE com o tempo foi significativa ( $p=0,004$ ), mas sem variação entre T0 e T30.

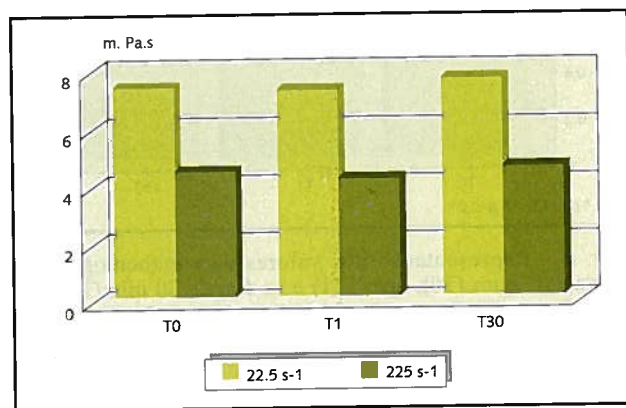


Fig. 5 – Representação dos valores da viscosidade sanguínea total (VST), antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 min (T30) da injeção e.v. de fluoresceína bissódica. Não se observou qualquer variação significativa da VST com o tempo.

Após a injeção do bolus de F ocorreu aumento significativo ( $p=0,014$ ) dos valores da AE e diminuição significativa dos valores do Ht ( $p=0,043$ ), normalizando estas alterações ao fim de 30 minutos. A inexistência de repercussão destas variações nos valores da V.S.T. poderá resultar da dependência desta dos valores do Ht e da AE, que a influenciam variando de modo inverso entre si ( $r=-0,6406$ ,  $p<0,001$ ).

## III - Comportamento Funcional da Membrana Eritrocitária

As duas subcamadas fosfolipídicas da membrana eritrocitária apresentaram comportamentos diferentes, após a injeção de F.

Na camada polar (Fig. 6) não se determinou variação significativa dos valores de polarização (p.), enquanto que na região hidrofóbica (Fig. 6) ocorreu aumento da p ( $p=0,016$ ), tendo apenas significado estatístico a comparação entre os valores obtidos nos tempos T1 e T30 ( $p=0,005$ ). Os resultados indicam que a região hidrofóbica da membrana eritrocitária se tornou mais rígida, após a injeção e.v. de F e o tempo de exposição à F.

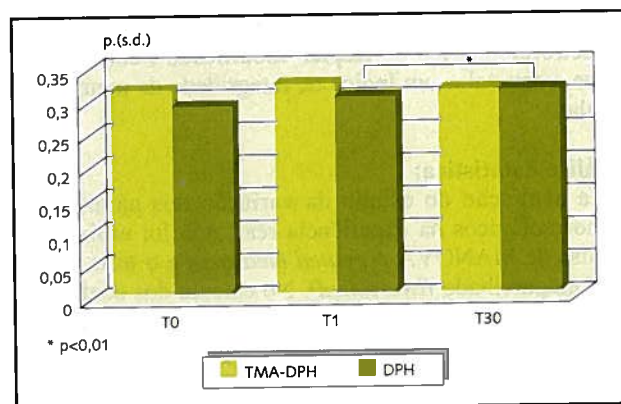


Fig. 6 – Representação da variação dos valores da fluidez da membrana eritrocitária, camada polar externa (TMA-DPH) e camada hidrofóbica (DPH) antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 min (T30) da injeção e.v. de fluoresceína bissódica. Na camada polar externa não houve qualquer variação, enquanto que a camada hidrofóbica se tornou mais rígida ( $p=0,016$ ) com o tempo.

A actividade da AChE (Fig. 7) decresceu, sem se registar, no entanto, significado estatístico. Determinou-se relação directa significativa ( $r=0,4492$ ;  $p=0,013$ ) entre os valores de actividade enzimática e os de p da região polar da membrana eritrocitária, sugerindo modulação da actividade da enzima pelo estado de fluidez dos fosfolípidos de membrana.

## DISCUSSÃO

A injeção endovenosa de fluoresceína bissódica durante a realização da angiografia retiniana induziu alterações significativas nas características funcionais da membrana eritrocitária, na fluidez sanguínea e na concentração de metahemoglobina.

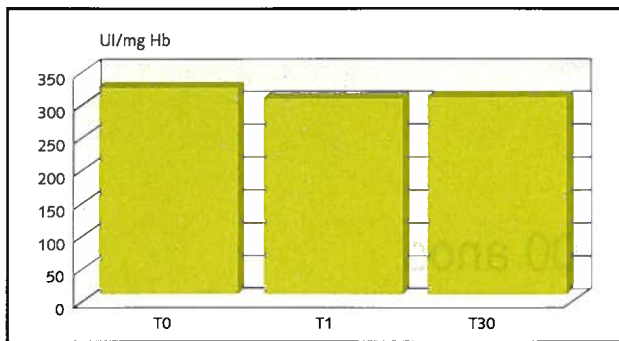


Fig. 7 – Representação dos valores da variação da actividade da Acetilcolinesterase Eritrocitária (AChE), antes (T0), após (T1) e ao fim de 30 min (T30) da injeção e.v. de fluoresceína sódica. Não se observou qualquer variação significativa da AChE com o tempo.

Após a injeção de fluoresceína ocorreu aumento da agregação eritrocitária (+37,7%), normalizando ao fim de 30 minutos. A agregação eritrocitária é um processo reversível dependente de factores plasmáticos (ex. concentração plasmática de proteínas) e eritrocitários, nomeadamente o potencial zeta de membrana. O perfil de variação da agregação eritrocitária foi observado em 8 dos 10 doentes estudados.

A metahemoglobina é a forma oxidada da hemoglobina (reação em que ocorre a libertação de anião superóxido). Esta forma de hemoglobina é regenerada em hemoglobina por acção do cit b5. Em condições normais este ciclo funciona mantendo-se a concentração de metahemoglobina mais ou menos estável. Após a injeção de fluoresceína a concentração de metahemoglobina duplicou, mas ao fim de 30 min o seu valor normalizou. Esta oscilação na concentração de metahemoglobina dever-se-á relacionar com uma inibição temporária do sistema de anti-oxidação da hemoglobina, ou com um aumento abrupto da concentração de metahemoglobina, logo após a injeção de fluoresceína, mantendo-se o sistema de anti-oxidação a funcionar. Em ambas as hipóteses o sistema de protecção celular recuperou a homeostasia celular ao fim de 30 min..

A CMHG não variou significativamente ao longo do estudo, pelo que o perfil de variação da hemoglobina e da agregação eritrocitária não resultará de variações na viscosidade do meio interno.

O comportamento funcional da membrana eritrocitária foi avaliada através da fluidez de membrana e da activi-

dade da acetilcolinesterase eritrocitária. Após a injeção de fluoresceína a camada polar externa manteve-se inalterada, enquanto que a camada hidrofóbica se tornou mais rígida com o tempo de exposição à fluoresceína.

A rigidificação da camada hidrofóbica poderá resultar da: (i) interacção da fluoresceína com a membrana eritrocitária, uma vez que cerca de 10 % das suas moléculas aderem à membrana<sup>7</sup>, ou (ii) de alterações bioquímicas no meio interno (ex. alterações da interacção hemoglobina-membrana devido à formação de metahemoglobina).

Diversas hipóteses se colocam para explicar as variações observadas nos parâmetros analisados durante a realização da angiografia retiniana<sup>8</sup>. A fluoresceína e/ou seus metabolitos poderão interactuar directamente ou, após formação de complexos com a albumina, com a membrana celular do eritrócito, induzindo assim modificações transitórias na agregação eritrocitária. A fluoresceína também parece interferir com o estado de oxidação da hemoglobina, induzindo inibição temporária do sistema superóxido dismutase (SOD).

As alterações verificadas nos parâmetros estudados poderão resultar de alterações do pH e da osmolalidade sistémica após a injeção de fluoresceína, no entanto tal será improvável visto o volume de solução injectada ser diminuta.

Em conclusão, a angiografia retiniana com fluoresceína no grupo de doentes estudado conduz a uma hiperagregação eritrocitária temporária, que poderá interferir a nível da microcirculação nestes doentes.

## BIBLIOGRAFIA

1. D VAUGHAN, T ASBURY: General Ophthalmology. 10th Edition Lange medical publications, 1983
2. P NGUYGN et al: Influence des produits de contraste sur l'aggregation et deformabilité erythrocytaire in vitro. J. Maladies Vasculaire 1990; 15: 347-352
3. K HIRANO: Influences of contraste media upon erythrocytes and endothelium cells. Clin. Hemorheol. 1994; 14(6): 861-864
4. SCHMIDT-SCHONBEIN H et al: New hemorheological techniques for routine laboratory. Clin Hemorheol 1982; 2:93
5. SCHILIRO G et al: Fluorescence studies on erythrocyte membranes from normal and thalassemic subjects. IRCS Med. Science 1981; 9: 599
6. KAPLAN E et al: Erythrocyte acethylcholinesterase activity in ABO hemolytic disease of the newborn. Pediatrics 1964; 33: 205
7. Delori F.C. Fluorescence characteristics of sodium fluorescein in plasma and whole blood. Exp Eye Res. 1987; 27: 417-425
8. F. Jung et al Influence of sodium fluorescein on erythrocyte aggregation in patients with cerebral microangiopathy. Microvasc Research 1995; 49: 246-250