

MICHELE ANA FLORES CHAVES

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E NO PROCESSO OXIDATIVO EM
ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE HEMOGOBINA S**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências
da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José do
Nascimento

Co-orientadora: Prof^ª. Tit. Maria Suely Soares
Leonart

CURITIBA

2007

AO ERITRÓCITO...

Elegante, rápido, diferente
por entre tantas outras células
da gente indiferente
vives e viajas e realizas
a mais bela das funções
a de manter a vida.

Rubens Leonart

Aos meus pais, Noeli e Jaime, por sempre acreditarem no meu sucesso e terem me dado como herança, o estudo.

Ao meu marido Donny, pelo amor, paciência e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Aginaldo Jose do Nascimento, pela amizade, bom humor, entusiasmo e disponibilidade. Seus conhecimentos em bioquímica, estatística e informática foram inestimáveis na elaboração desse trabalho.

A minha co-orientadora Prof^a. Tit. Maria Suely Soares Leonart, pelo carinho maternal e por seus conhecimentos, que me incentivaram em todas as horas, a dedicação e acima de tudo, a sua preciosa amizade.

Ao meu marido, Donny, pelo apoio irrestrito, amor, compreensão e auxílio. A você Murilo, que representará muito na minha vida, embora mereça todo amor, atenção e carinho, permitiu que a mamãe concluísse tranquilamente este trabalho antes da sua chegada a este mundo.

Aos meus pais, Jaime Flores e Noeli Schmidt Flores, por me haverem dado vida e vontade de lutar. A minha irmã Sheila, meu cunhado André e aos meus lindos sobrinhos Raul e Miguel, pela força e amizade.

À amiga e irmã na ciência Jacqueline Plewka, pela amizade, companheirismo, entusiasmo e alegria.

À Irene Ermelindo Santos, amiga e funcionária do Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica do Curso de Farmácia da UFPR, pela linda presença amiga, companheirismo e cooperação no decorrer dos trabalhos.

À Regina Montrezol, secretária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela atenção dispensada durante a realização do curso.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, em especial, Fagner Salmazo Neiva, Christian Siebra, Melissa Pires de Lima, Fernanda Mattana, Luciane Tuchoski, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas e amigos Daniel Krukoski e Lígia Maria Claro Siebra, pela disposição e cooperação na realização dos experimentos.

À amiga Maria da Graça Toledo pela amizade e constante disposição no auxílio nas análises espectrofotométricas.

À Prof. Dra. Sônia Haracemiv pelos ensinamentos e incentivo nessa pesquisa científica.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), por manter as portas abertas, permitindo a coleta do material e doação das amostras utilizadas neste trabalho.

Aqueles que, por acreditarem nos caminhos da pesquisa científica, doaram seu sangue para que este trabalho fosse realizado.

Aos colegas do Curso de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, por me apoiarem de forma irrestrita e possibilitarem o meu afastamento das atividades didáticas para a realização do Curso de Mestrado, em especial ao Prof. Marcelo Alessandro Rebecca, pela compreensão e apoio.

A DEUS, que me deu forças para continuar e vencer mais esse desafio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 ERITRÓCITO HUMANO MADURO.....	05
2.1.1 Membrana Eritrocitária.....	06
2.1.2 Hemoglobina.....	07
2.1.3 Metabolismo Energético.....	08
2.1.4 Metabolismo Oxidativo dos Eritrócitos e Hemólise.....	11
2.1.5 Sistema Antioxidante do Eritrócito.....	13
2.2 DOENÇAS HEMOLÍTICAS.....	15
2.2.1 Doença Falciforme.....	18
2.2.2 Doença Falciforme e Estresse Oxidativo.....	19
2.3 PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS PARA EMPREGO EM HEMOTERAPIA.....	21
2.3.1 Sangue Total e Hemocomponentes.....	21
2.3.2 Soluções Aditivas.....	22
2.3.3 Unidades de Eritrócitos Pobres em Leucócitos.....	23
2.3.4 Emprego de Eritrócitos.....	24
2.3.5 Eritrócitos Portadores Heterozigóticos de Hemoglobina S.....	24
2.3.6 Emprego de Eritrócitos AS em Hemoterapia.....	26
2.4 AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS OXIDATIVAS.....	27
2.4.1 Substâncias oxidantes usadas como modelo experimental.....	27
2.5 AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....	29
2.5.1 Vitamina C.....	29
2.5.2 Vitamina E.....	31
2.5.3 Interações entre vitaminas C e E.....	32
2.5.4 Uso das Vitaminas C e E para a Prevenção e Tratamento de Doenças Humanas.....	33
3 OBJETIVO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 MATERIAL.....	38
4.1.1 Seleção de Doadores.....	38
4.1.2 Seleção de Pacientes.....	38
4.2 MÉTODOS.....	39
4.2.1 Coleta de Material.....	39
4.2.2 Isolamento de Eritrócitos.....	39
4.2.2.1 Lavagem de eritrócitos.....	39
4.2.3 Tratamento das Amostras com Substâncias Antioxidantes.....	40
4.2.3.1 Incubação de eritrócitos com vitamina C.....	40
4.2.3.2 Incubação de eritrócitos com vitamina E.....	40
4.2.3.3 Incubação de eritrócitos com vitamina C e vitamina E.....	41
4.2.4 Tratamento das Amostras com Substância Oxidante <i>terc</i> - Butilhidroperóxido.....	41

4.2.4.1	Amostras tratadas com vitamina C ou Vitamina E.....	41
4.2.4.2	Amostras tratadas com vitamina C e vitamina E.....	42
4.2.4.3	Amostras controle tratadas com <i>terc</i> -butilhidroperóxido.....	42
4.2.5	Contagem de Corpos de Heinz.....	42
4.2.6	Determinação da Concentração da Metahemoglobina.....	43
4.2.7	Determinação Espectrofotométrica da Concentração de Glutaciona Reduzida (GSH).....	44
4.2.7.1	Preparo do hemolisado.....	45
4.2.7.2	Dosagem da concentração de hemoglobina.....	45
4.2.7.3	Dosagem da concentração de glutaciona reduzida.....	45
4.2.7.4	Cálculos e valores de referência.....	45
4.2.8	Determinação das Porcentagens de Hemólise.....	47
4.2.9	Determinação da Atividade de Enzimas do Sistema Antioxidante Eritrocitário.....	48
4.2.9.1	Preparo de hemolisados.....	48
4.2.9.2	Dosagem da hemoglobina do hemolisado.....	48
4.2.9.3	Determinação da atividade enzimática de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6-PD).....	49
4.2.9.4	Determinação de atividade enzimática de glutaciona redutase (GR).....	50
4.2.10	Análise Estatística dos Resultados Obtidos.....	51
5	RESULTADOS	52
6	DISCUSSÃO	100
7	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	116
	ANEXO	131

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSE E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS.....	09
FIGURA 2	- OXIDAÇÃO NO ERITRÓCITO.....	13
FIGURA 3	- ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA C.....	31
FIGURA 4	- ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA E.....	32
FIGURA 5	- FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	54
FIGURA 6	- CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	57
FIGURA 7	- CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	60
FIGURA 8	- ATIVIDADE DA ENZIMA GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6-PD) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	63
FIGURA 9	- ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	66
FIGURA 10	- PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	69
FIGURA 11	- FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	72

FIGURA 12	- CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	75
FIGURA 13	- CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	78
FIGURA 14	- ATIVIDADE DA ENZIMA GLUCOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6-PD) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	81
FIGURA 15	- ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	84
FIGURA 16	- PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.....	87
FIGURA 17	- FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).....	91
FIGURA 18	- FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).....	92
FIGURA 19	- CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).....	94
FIGURA 20	- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).....	95

FIGURA 21	- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GR EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).....	97
FIGURA 22	- PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).).....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AA SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	55
TABELA 2	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AA SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	58
TABELA 3	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AA SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	61
TABELA 4	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE G6-PD EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AA SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	64
TABELA 5	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE GR EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AA SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	67
TABELA 6	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AA SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	70
TABELA 7	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AS SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	73
TABELA 8	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AS SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	76

TABELA 9	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AS SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	79
TABELA 10	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE G6PD EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AS SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	82
TABELA 11	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE GR EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AS SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	85
TABELA 12	- MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AS SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP.....	88
TABELA 13	- EFEITO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP E ANTIOXIDANTE DE VITAMINA C e E EM ERITRÓCITOS CONTENDO HEMOGLOBINA AA E AS, DURANTE 42 DIAS DE ARMAZENAMENTO.....	89
TABELA 14	- EFEITO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP E ANTIOXIDANTE DE VITAMINA C e E EM ERITRÓCITOS CONTENDO HEMOGLOBINA AA, AS E SS. AMOSTRAS RECÉM-COLHIDAS (TEMPO ZERO).....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD	-	ácido cítrico-citato-dextrose
ADP	-	adenosina 5' difosfato
ADSOL	-	adenina, dextrose, cloreto de sódio e manitol
ATP	-	adenosina 5' trifosfato
2,3-BPG	-	2,3-bisfosfoglicerato
BPGM	-	bifosfogliceromutase
BPGP	-	bifosfoglicerato fosfatase
BTHC	-	butiril-n-triexil-citrato
CMV	-	Citomegalovírus
CO₂	-	dióxido de carbono
CPD	-	citrato-fosfato-dextrose
CPDA	-	citrato-fosfato-dextrose-adenina
DEHP	-	2-etil-exil-ftalato
DNA	-	ácido desoxirribonucléico
DTNB	-	ácido 2-nitrobenzóico
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético
EDTA K₃	-	ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
FAD	-	flavina adenina dinucleotídeo
FADH	-	flavina adenina dinucleotídeo reduzido
Fe	-	Ferro
Fe⁺⁺	-	ferro, forma ferrosa
Fe⁺⁺⁺	-	ferro, na forma férrica
GAPD	-	gliceraldeído 3 – fosfato desidrogenase
G6-P	-	glicose 6-fosfato
G6-PD	-	glicose 6-fosfato desidrogenase
GR	-	glutaciona redutase
GSH	-	glutaciona reduzida
GSH-Px	-	glutaciona peroxidase
GSSG	-	glutaciona oxidada
H₂O	-	dióxido de hidrogênio (água)

H₂O₂	-	peróxido de hidrogênio
Hb	-	Hemoglobina
Hb A	-	hemoglobina A
Hb e	-	hemoglobina extracelular
Hb S	-	hemoglobina S
HCl	-	ácido clorídrico
Hx	-	Hexoquinase
HLA	-	antígenos leucocitários humanos
HTLV	-	vírus linfotrópico de células T
IgG	-	imunoglobulina G
K₃[Fe(CN)₆]	-	ferricianeto de potássio
KH₂PO₄	-	fosfato dihidrógeno de potássio
LDH	-	lactato desidrogenase
LDL	-	lipoproteína de baixa densidade
MDA	-	Malonildialdeído
MetaHb	-	Metahemoglobina
MgCl₂	-	cloreto de magnésio
μl	-	Microlitro
μmol	-	Micromol
mg/dl	-	miligramas por decilitro
ml	-	Mililitro
mmol	-	Milimol
mmol/l	-	Milimol por litro
NaCl	-	cloreto de sódio
NaCN	-	cianeto de sódio
NAD	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	-	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NA₂HPO₄	-	fosfato monohidrógeno dissódico
nm	-	Nanômetro
O₂		Oxigênio

O₂^{•-}		Ânion superóxido
OH[•]	-	radical hidroxila
PBS	-	tampão fosfato salino
PFK	-	Fosfofrutoquinase
pH	-	potencial hidrogeniônico
PGI	-	fosfoglicose isomerase
PGK	-	fosfoglicerato quinase
PGM	-	fosfogliceratomutase
PK	-	piruvato quinase
PVC	-	cloreto de polivinil
RFHN	-	reação febril não-hemolítica
SAG	-	salina-adenina-glicose
SAGM	-	salina-adenina-glicose-manitol
SDS-PAGE	-	eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de duodecil sódico
SOD	-	superóxido dismutase
TBHP	-	terc-butil hidroperóxido
TPI	-	Triose fosfato isomerase
vit. C	-	vitamina C
vit. E	-	vitamina E
6-PGD	-	6-Fosfogliconato desidrogenase

RESUMO

A compreensão dos mecanismos que levam ao estresse oxidativo tem esclarecido muitos dos processos que levam à lesão e morte celular, especialmente os relacionados às doenças hemolíticas. A anemia falciforme, as talassemias e a deficiência de G6-PD estão entre as anomalias genéticas mais freqüentes que apresentam estresse oxidativo. Nas células falciformes, um dos fatores que predispõe ao processo hemolítico é a degradação oxidativa da hemoglobina S pela sua desoxigenação com formação de hemicromos e precipitação na forma de corpos de Heinz. O estresse oxidativo contribui no processo de falcização e encurtamento da sobrevivência do eritrócito. Indivíduos heterozigotos, apesar de apresentarem cerca de 35% de hemoglobina S, são considerados como potenciais doadores de sangue, com ressalvas apenas para receptores com anóxia, inclusive no Brasil. Entretanto, os eritrócitos AS frequentemente falcizam e ocluem os filtros, resultando em leucorredução demorada e ineficiente e não são recomendados para transfusão em alguns países. Neste estudo foram utilizadas unidades de sangue de doadores do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), sendo 6 unidades de indivíduos normais portadores de hemoglobina A (AA), seis unidades de indivíduos heterozigotos para hemoglobinas A e S (AS) e foram coletados sangue venoso de 3 pacientes com anemia falciforme, portadores homozigotos de hemoglobina S (SS). Afim de avaliar a ação protetora das vitaminas C e E em estresse oxidativo por armazenamento e ação de pró-oxidante, alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos foram tratadas com substâncias antioxidantes, vitamina C, vitamina E e vitamina C + E, nas concentrações de 0,5 a 20 mmoles/l, e homogeneizadas por inversão em homogeneizador durante 60 min. Em seguida foram tratadas com substância oxidante *tert*-butilhidroperóxido (TBHP) nas concentrações de 1 a 5 mmoles/l e incubadas sob constante homogeneização por inversão em homogeneizador durante 30 min e armazenadas a 4°C durante 42 dias. Foi observada a ação oxidante de *tert*-butil hidroperóxido (TBHP, 1 a 5 mmoles/l) em eritrócitos AA, AS e SS, proporcional à concentração de TBHP na avaliação de formação de corpos de Heinz, metahemoglobina, hemólise, níveis de GSH e atividade das enzimas G6-PD e GR. As ações protetoras das vitaminas C e E para o estresse oxidativo durante o armazenamento e ação do TBHP foram observadas para os eritrócitos AA e AS para a formação de corpos de Heinz, metahemoglobina e hemólise. Não foi observado recuperação nos níveis de GSH. As atividades das enzimas G6-PD e GR foram parcialmente recuperadas em eritrócitos AS, mas não nos AA, pela ação das vitaminas. Nos estudos do estresse oxidativo provocado apenas pelo TBHP (tempo zero de armazenamento) foram observadas as ações protetoras das vitaminas C e E para a formação de corpos de Heinz, metahemoglobina, GSH e hemólise em eritrócitos SS. Os resultados obtidos confirmam achados de diversos pesquisadores em relação à exacerbação do processo oxidativo em eritrócitos SS e mostram que eritrócitos AS são mais suscetíveis à oxidação, especialmente durante o estoque para transfusão, o que sugere precaução quanto a sua adequabilidade para transfusão. Por outro lado, o efeito protetor das vitaminas C e E sobre o estresse oxidativo observado em eritrócitos AS e SS abre perspectivas para o seu emprego, tanto no tratamento de pacientes de anemia falciforme, quanto na preservação de unidades transfusionais de eritrócitos AS.

ABSTRACT

The understanding of the mechanisms that take to the oxidative stress help to explain many of the processes that take to the cellular lesion and death, especially those related to the hemolytic diseases. The sickle cell anemia, thalassemias and G6-PD deficiency are among the more frequent genetic anomalies that cause oxidative stress. In the sickle cells, one of the factors that predisposes to the hemolytic process is the oxidative degradation of the hemoglobin S due to its deoxygenation leading to hemicrome formations and precipitations as Heinz bodies. The oxidative stress contributes to the sickle process and shortening of the erythrocyte survival. Heterozygote Individuals, in spite of they present about 35% of hemoglobin S, they are considered as potentials blood donors except for receivers with anoxia, also in Brazil. However, the erythrocytes frequently acquire sickle shapes and occlude the filters, resulting in slow and inefficient leukocytes reduction, and so they are not recommended for any transfusion in some countries. It was used units of blood bag donors' of the Center of Hematology and Hemoterapy of Paraná (HEMEPAR), being 6 units of normal individuals having AA hemoglobin, 6 units of heterozygote individuals for AS hemoglobins and it were collected venous blood of 3 patient with sickle cell anemia having SS homozygote hemoglobins. In order to evaluate the protective action of the vitamins C and E in oxidative stress caused by storage and pro-oxidizer action, aliquots of 1 ml of erythrocytes suspension were treated with antioxidant substances, vitamin C, vitamin E and vitamin C + E, in the concentrations of 0,5 to 20 mmoles / l, and homogenized by inversion in homogenizer during 60 min. Then they were treated with the oxidant terc-Butilhydroperoxide (TBHP) in the concentrations of 1 to 5 mmoles/ l and incubated under constant homogenization by inversion in homogenizer during 30 min and stored at 4°C during 42 dias. The oxidative action of terc-butilhydroperoxide (TBHP, 1 to 5 mmoles / l) was observed in erythrocytes AA, AS and SS, proportional to the concentration of TBHP in the evaluation of formation of Heinz bodies, methemoglobin, hemolysis, levels of GSH and activity of the enzymes G6-PD and GR. The protecting actions of the vitamins C and E for the oxidative stress during storage and oxidative action of TBHP were observed for the erythrocytes AA and AS for the formation of Heinz bodies, methemoglobin and hemolysis. Recovery was not observed in the levels of GSH. The activities of the enzymes G6-PD and GR were partially recovered in erythrocytes AS, but not in AA, under the vitamin actions. Studies on oxidative stress due to TBHP only (time storage zero) showed the protective actions of the vitamins C and E in the formation of Heinz bodies, methemoglobin, GSH and hemolysis in eritrócitos SS. The results obtained confirm several researchers' discoveries in relation to the exacerbation of the oxidative process in erythrocytes SS and they showed that erythrocytes AS are more susceptible to the oxidation, especially during the stock for transfusion, which suggests precaution as for its adequacy for transfusion. On the other hand, the protecting effect of the vitamins C and E over the oxidative stress observed in erythrocytes AS and SS open perspectives for their use for treatment of patients with sickle cell anemias, as well as in the preservation of transfusional erythrocyte bag units.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As oxidações biológicas tem um papel relevante na patologia humana. A muitas condições degenerativas. A compreensão dos mecanismos que levam ao estresse oxidativo no eritrócito tem esclarecido muitos dos processos que levam à lesão e morte celular, especialmente os relacionados às doenças hemolíticas. A anemia falciforme, as talassemias e a deficiência de G6-PD estão entre as anomalias genéticas mais freqüentes que apresentam aumento do estresse oxidativo e, como conseqüência, encurtamento da sobrevida destes eritrócitos (DHALIWHAL et al., 2004).

A doença falciforme ocasiona uma anemia hemolítica crônica causada por uma mutação pontual no gene responsável pela produção da globina β (beta), originando uma hemoglobina anômala, denominada hemoglobina S, que substitui a hemoglobina A. Nesta condição genética, o heterozigoto, chamado portador do traço falciforme, apresenta eritrócitos com hemoglobinas A e S (AS); enquanto o homozigoto forma apenas hemoglobina S (SS), expressando sintomatologia clínica grave (LEE et al., 1999).

Nas células falciformes, um dos fatores que predispõe ao processo hemolítico é a degradação oxidativa da hemoglobina S pela sua desoxigenação com formação de hemicromos e precipitação na forma de corpos de Heinz (DAS, 1990; WINTERBOURN, 1990). Nestes eritrócitos, ocorre um desequilíbrio entre a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio e o baixo conteúdo de antioxidantes, como a glutatona reduzida, principal protetora contra os danos intracelulares de radicais livres (KLINGS; FARBER, 2001). O estresse oxidativo contribui para o processo de falcização e encurtamento da sobrevida do eritrócito.

Indivíduos heterozigotos, apesar de apresentarem cerca de 35% de hemoglobina S, são considerados como potenciais doadores de sangue, com ressalvas apenas para receptores suscetíveis a apresentarem anóxia. Tal conduta é adotada em muitos países, inclusive no Brasil (MOLLISON et al., 1972; OLSKI, NAIMAN et al., 1972). Entretanto, os eritrócitos AS frequentemente falcizam e ocluem os filtros, resultando em leucorredução demorada e ineficiente e não são recomendados para transfusão em alguns países (BEARD et al., 2000 e 2004).

O uso de antioxidantes para prevenção e tratamento de doenças humanas tem sido objeto de estudo há mais de duas décadas (HALLIWELL, 2000). O emprego de vitaminas C e E e de outros antioxidantes pode inibir a hemólise oxidativa em eritrócitos. A vitamina E é conhecida como o mais potente antioxidante da membrana eritrócitária. A vitamina C tem reconhecido papel como antioxidante e coletora de radicais livres. Essas vitaminas podem interagir através da capacidade da vitamina C em reciclar a vitamina E. Alguns estudos demonstram que a suplementação com vitamina E pode melhorar os sintomas clínicos de indivíduos portadores de anemias hereditárias, que apresentam aumento do estresse oxidativo, como a anemia falciforme (CHAN et al., 1999).

Desta forma, considerou-se, para este trabalho, a importância de se estudar o processo oxidativo em eritrócitos AS durante a sua preservação para uso em hemoterapia, aliada à pertinência de se aprofundar a compreensão sobre o efeito de antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E sobre eritrócitos AS e SS, no sentido de se contribuir tanto no campo da hemoterapia quanto da farmacologia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERITRÓCITO HUMANO MADURO

O eritrócito humano, antes de tornar-se uma célula madura, passa por vários estágios de desenvolvimento, antes de sua liberação da medula óssea para o sangue circulante. Durante a diferenciação o eritrócito passa por alguns eventos, como a perda do núcleo e de organelas e diminui o seu tamanho em relação aos precursores mais jovens, tornando-o cada vez mais hábil para exercer sua principal função no organismo, o transporte de gases (LEE et al., 1999). Os eritrócitos realizam de forma brilhante esta função na circulação durante o seu tempo de vida, ou seja, por cerca de 120 dias (DACIE; LEWIS, 1995).

O papel fisiológico do eritrócito depende de suas características morfológicas, reológicas e de uma relação perfeita entre superfície e volume, que o tornam ideal para manter a vida através do transporte de oxigênio (O₂) aos tecidos (HANDIN et al., 1995). Esta importância aliada à relevância de estudos sobre patologia eritrocitária e preservação de eritrócitos *in vitro*, bem como à facilidade de obtenção dos eritrócitos, estimula o seu emprego como modelo experimental para vários estudos, e tem despertado o interesse de muitos pesquisadores (CICCOLI et al., 1999).

A morfologia, fisiologia e metabolismo eritrocitários têm sido estudados em diversas áreas de conhecimento, com vários fins, em campos como a hemoterapia, o controle de qualidade em hematologia, a farmacologia, a bioquímica, a imunologia e a patologia clínica (BEUTLER, 1984; OLIVIERI et al., 1990; LIU et al., 1992; SIGNORINI et al., 1995; SILVA et al., 2000).

A compreensão dos mecanismos que levam ao estresse oxidativo, bem como suas possíveis conseqüências para o organismo, têm esclarecido muitos dos processos que levam à lesão e morte celular (GRIMES, 1980), o que justifica os investimentos feitos nesta área no intuito de esclarecer os mecanismos responsáveis por doenças genéticas eritrocitárias, como as hemoglobinopatias e as eritroenzimopatias (NAOUM, 1997).

2.1.1 Membrana Eritrocitária

A membrana tem um papel chave na manutenção da forma do eritrócito, sendo constituída por uma bicamada lipídica com 42% de lipídeos, 52% de proteínas e 7% de carboidratos (HARRIS, 1991). A organização destes componentes é crítica para a função da membrana. Os lipídeos são compostos principalmente por colesterol não esterificado e fosfolipídeos, em concentrações equimoleculares. Os fosfolipídeos estão arrançados na bicamada com suas cabeças polares voltadas para fora, onde interagem com o ambiente aquoso dos meios intra e extracelular, enquanto as cadeias hidrofóbicas estão orientadas para o interior da bicamada (ALBERTS et al., 1999; LEE et al., 1999).

As ligações hidrofóbicas fracas, que se estabelecem pela proximidade entre as cadeias de ácidos graxos, permitem maior fluidez e mobilidade lateral entre as duas camadas. Pode haver trocas espontâneas de posição entre fosfolipídeos internos e externos da bicamada, processo denominado *flip-flop*. A peroxidação lipídica leva à rigidez da membrana, diminui a deformabilidade e induz à desidratação celular (JAIN et al., 1983).

As proteínas presentes na membrana do eritrócito são classificadas em integrais e periféricas. Essas proteínas podem ser identificadas por números crescentes, de acordo com a sua mobilidade em eletroforese em gel de poliácridamida com sulfato de duodecil sódico (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970; HARRIS, 1991). As proteínas integrais estão imersas na forma de blocos, enquanto as proteínas periféricas, que constituem o citoesqueleto, encontram-se fixadas à face interna da bicamada, interligando-se entre si e à bicamada lipídica (HANDIN et al., 1995; LEE et al., 1999). As proteínas periféricas são representadas pelas espectrinas, anquirinas, bandas 4.1, 4.2, 4.9, 5, aducina, bandas 6 e 7. O citoesqueleto forma uma rede de proteínas filamentosas e globulares, sobre a qual se apóia a bicamada lipídica, estrutura esta que, através de sua interação com o citoesqueleto e com as proteínas integrais da membrana, é também responsável pela flexibilidade e pela deformabilidade do eritrócito (HARRIS, 1991; MOHANDAS; CHASSIS, 1993).

As proteínas integrais, representadas pela banda 3, glicoforinas e banda 4.5, promovem interações entre o meio interno e externo do eritrócito. A banda 3, proteína trocadora de ânions, tem também outras funções, como transporte de antígenos e ancoragem do citoesqueleto à membrana, além de servirem como locais de ligação para uma variedade de enzimas e de componentes da membrana citoplasmática, como também para a hemoglobina e os hemicromos (HANDIN et al., 1995; LEE et al., 1999).

Modificações na forma normal do eritrócito – de discócito – podem indicar a diminuição da eficiência metabólica ou a ação de certos compostos, resultando em uma alteração na tensão existente entre o gel protéico do citoesqueleto e a bicamada lipídica (BEUTLER et al., 1995). Quando ocorre uma expansão da porção externa da bicamada lipídica, o resultado é a formação do equinócito. A expansão da porção interna, por sua vez, forma o estomatócito. Tais formas são reversíveis e interconvertíveis (CHAILLEY et al., 1973). Entretanto, no caso do aumento da viscosidade e rigidez da membrana, as formas anteriores podem transformar-se em uma célula danificada irreversivelmente e altamente suscetível à hemólise, o esferócito (SIMMONS, 1997).

2.1.2 Hemoglobina

A hemoglobina, proteína transportadora de oxigênio, íons hidrogênio (H^+) e outros gases como o dióxido de carbono (CO_2), constitui cerca de 95% da fração proteica presente no citosol do eritrócito. As outras proteínas são enzimas requeridas para a produção de energia e para a manutenção da hemoglobina na forma reduzida, seu estado funcional (LEE et al., 1999).

A molécula de hemoglobina é composta por quatro cadeias polipeptídicas, as globinas, arranjadas de forma tetraédrica. A hemoglobina A, presente em maior quantidade no adulto é constituída por cadeias do tipo α e β . Cada uma dessas quatro cadeias contém um grupo prostético, o heme, o qual está localizado em fendas apolares próximas da face externa da molécula, uma em cada subunidade. O grupamento heme é constituído de um átomo de ferro (Fe) e um anel tetrapirrólico, a protoporfirina. O Fe, na sua forma ferrosa (Fe^{2+}), é capaz de ligar-se a uma molécula

de O₂ e de liberá-lo aos tecidos quando há aumento do pH, da temperatura e da concentração de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Este último é um fosfato orgânico produzido no ciclo de Luebering-Rapoport, um desvio da via glicolítica exclusivo do eritrócito (STRYER, 1995; LEE et al., 1999).

Algumas doenças hematológicas são devidas a defeitos hereditários na síntese de hemoglobinas, e estes são determinados por alterações nos genes responsáveis pela produção das globinas. A anemia falciforme é um exemplo clássico da produção de uma hemoglobina com uma alteração mínima em sua estrutura, porém, capaz de determinar sob certas circunstâncias, uma singular interação molecular com drástica redução em sua solubilidade (LEE et al., 1999).

2.1.3 Metabolismo Energético

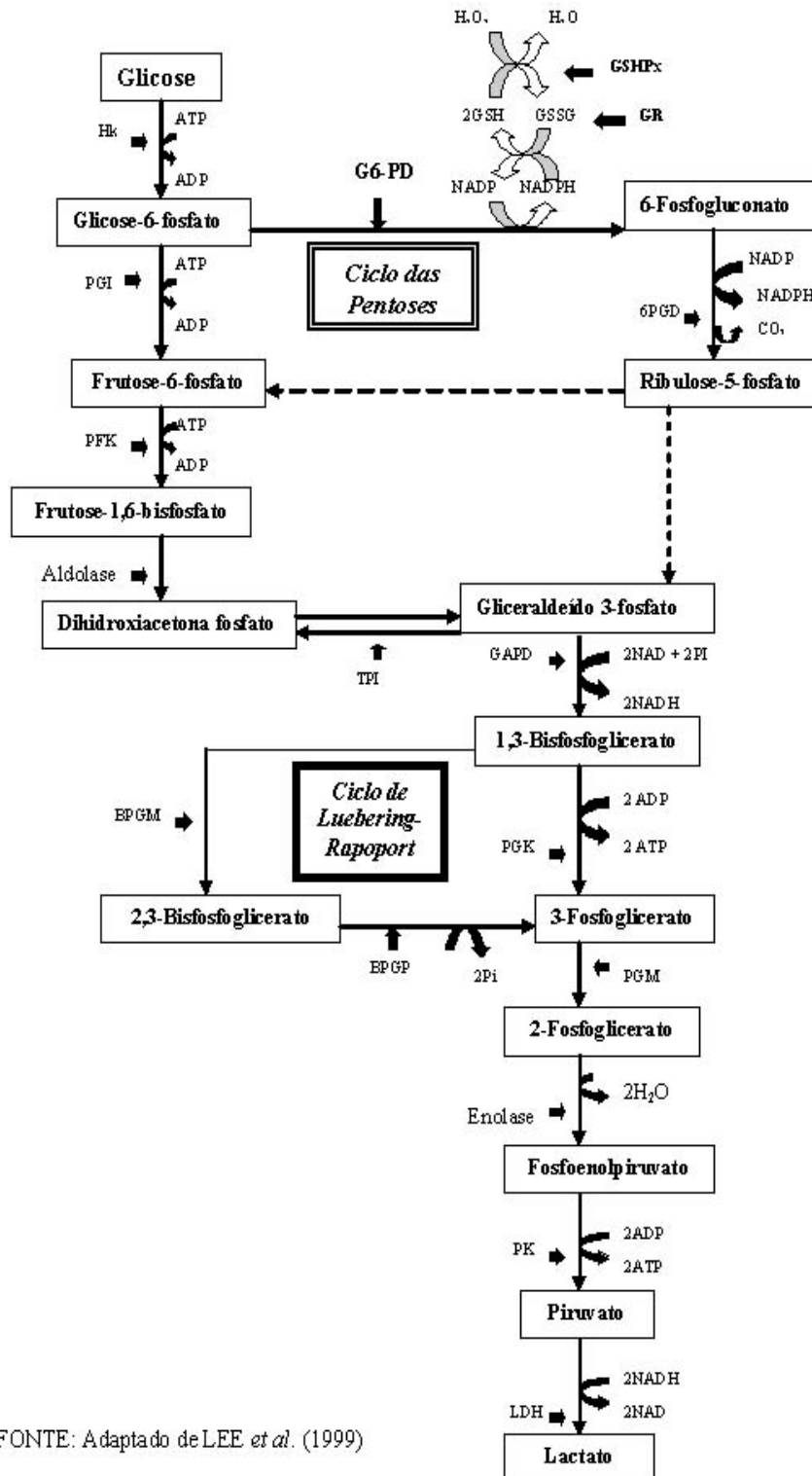
A ligação, o transporte e a liberação do oxigênio não requerem consumo de energia por parte do eritrócito. Entretanto, para que o eritrócito realize sua função eficientemente e sobreviva na circulação durante o seu tempo de vida de aproximadamente 120 dias, necessita de energia. A mesma é requerida para manter: (1) o ferro da hemoglobina na forma divalente (Fe²⁺); (2) alto nível de potássio e baixos níveis de cálcio e sódio dentro da célula contra um gradiente plasmático de níveis altos de sódio e cálcio e baixo de potássio; (3) grupos sulfidril de enzimas, hemoglobina e proteínas de membrana na forma ativa reduzida; e (4) forma bicôncava da célula (BEUTLER et al., 1995).

A glucose é a fonte de energia normal do eritrócito (BEUTLER et al., 1995). Por não possuir um composto de armazenagem, o eritrócito normal necessita ter um acesso constante à glicose. Esta entra na célula através de um mecanismo de transporte facilitado, que utiliza um transportador (LEE et al., 1999).

Como o eritrócito maduro não possui mitocôndrias, sua energia é obtida por duas vias principais: a via glicolítica anaeróbia (Embden-Meyerhof) e a via das pentoses fosfato ou derivação da hexose monofosfato, ou ainda via do fosfogliconato, cujas vias estão ilustradas na Figura 1. Sob circunstâncias normais, cerca de 90% da glicose da hemácea é metabolizada pela via anaeróbia e 10% pela via não produtora de ATP. O contrário ocorre em condições de estresse oxidativo,

nas quais a via de oxidação das pentoses pode ser responsável por até 90% do consumo de glicose (LEE et al., 1999)

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSSES E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS



FONTE: Adaptado de LEE et al. (1999)

A via glicolítica de Embden-Meyerhof forma três importantes produtos: NADH, um co-fator na reação da metahemoglobina redutase; ATP, o principal nucleotídeo fosfato de alta energia; e 2,3-BPG, um regulador da função da hemoglobina. Para cada molécula de glicose metabolizada, duas moléculas de NADH são geradas (LEE et al., 1999). O NADH é essencial para manter o ferro do heme no estado reduzido, um processo enzimático que é mediado pela NADH-metahemoglobina-redutase. A oxidação do ferro do heme a Fe^{3+} produz metahemoglobina, que não transporta oxigênio (PERCY et al., 2005).

Os rendimentos de ATP e 2,3-BPG variam, dependendo da atividade do desvio de Luebering-Rapoport, uma via colateral que só ocorre no eritrócito. Esse rendimento pode, entretanto, estar diminuído pelo grau de formação de 2,3-BPG. Por essa razão, a etapa de formação do 2,3-BPG é chamada de embreagem energética (BEUTLER et al., 1995; LEE et al., 1999).

Os eritrócitos apresentam concentrações singularmente elevadas de 2,3-BPG. Esse intermediário, formado pela derivação de Luebering-Rapoport, diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e aumenta seu aporte para os tecidos periféricos (BENNETT; PLUM, 1997).

Das onze enzimas da via glicolítica, três parecem ser particularmente importantes na regulação da velocidade glicolítica: hexoquinase (Hx), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK). Para a catalização das reações, essas enzimas têm um pH ótimo relativamente alto, com uma atividade reduzida em níveis de pH menor que 7,0. Por essa razão, a glicólise no eritrócito é sensível ao pH, sendo estimulada pelo seu aumento (BEUTLER et al., 1995; LEE et al., 1999).

A glicólise é importante para a hemácea ao ponto que, quando há um comprometimento da atividade de uma das enzimas glicolíticas, a sua viabilidade é reduzida, podendo resultar em anemia hemolítica (LEE et al., 1999).

Na via das pentoses fosfato ou derivação da hexose monofosfato, a glicose-6-fosfato é oxidada, gerando dióxido de carbono. Nesse processo de oxidação, o nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NADP^+$) é reduzido a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). O NADPH gerado não fornece energia para a célula, pelo contrário, por servir como co-fator na redução da glutatona oxidada (GSSG), é um importante agente redutor na célula e a fonte final

de proteção contra o ataque oxidativo. A sua utilização é o principal estímulo dessa via. Agentes redox, como azul de metileno, cisteína, ascorbato e outros, induzem um aumento de até vinte vezes no metabolismo das pentoses, provavelmente por promover a oxidação da glutatona (BEUTLER et al., 1995; LEE et al., 1999).

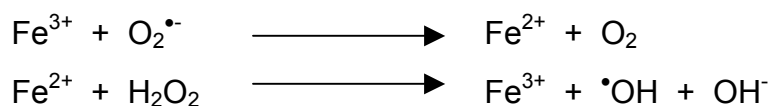
2.1.4 Metabolismo Oxidativo dos Eritrócitos e Hemólise

O dano oxidativo na maioria das células e tecidos usualmente resulta do aumento da geração de radicais livres de oxigênio. Denomina-se radical livre qualquer espécie química capaz de existência independente, que contenha um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital externo. Quando dois radicais livres se encontram, seus elétrons desemparelhados formam par e ambos se consomem. Entretanto, alguns radicais livres buscam o seu equilíbrio, tomando elétrons de agentes químicos estabilizados e, ao estabilizarem eletricamente, formam outros radicais livres, dando início a reações em cadeias (JANDL, 1996).

As espécies reativas de O_2 formadas em maiores quantidades no organismo são $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 , peróxidos lipídicos e espécies relacionadas. Estes compostos têm uma meia vida muito mais curta, mas, mesmo assim, podem causar graus variados de toxicidade nas células, reagindo com grande número de moléculas, tais como lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, dentre outros (SALTMAN, 1989; CHEN et al., 2000).

Um conjunto crescente de evidências indica que metais de transição agem como catalisadores da oxidação de macromoléculas biológicas e, portanto, a toxicidade associada a esses metais pode ser devida, em parte, ao dano oxidativo do tecido (CHEESEMAN; SLATER, 1996).

Evidências indicam que o íon férrico (Fe^{3+}) atua como catalisador para a reação de Fenton, facilitando a conversão do ânion $O_2^{\cdot-}$ e de H_2O_2 a espécies freqüentemente envolvidas nas reações que iniciam a peroxidação lipídica (CHEESEMAN; SLATER, 1996). A reação de Fenton está ilustrada a seguir:



Dentre as classes de moléculas que podem ser lesadas pelas espécies reativas de O_2 , os lipídeos são dos mais susceptíveis à oxidação. A destruição dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como malonildialdeído (MDA) e outros aldeídos são especialmente danosos, reduzindo a viabilidade das células. A peroxidação lipídica caracteriza-se por uma reação em cadeia. A oxidação inicial de poucas moléculas de lipídeos pode resultar em um significativo dano tissular (MYLONAS; KOURETAS, 1999).

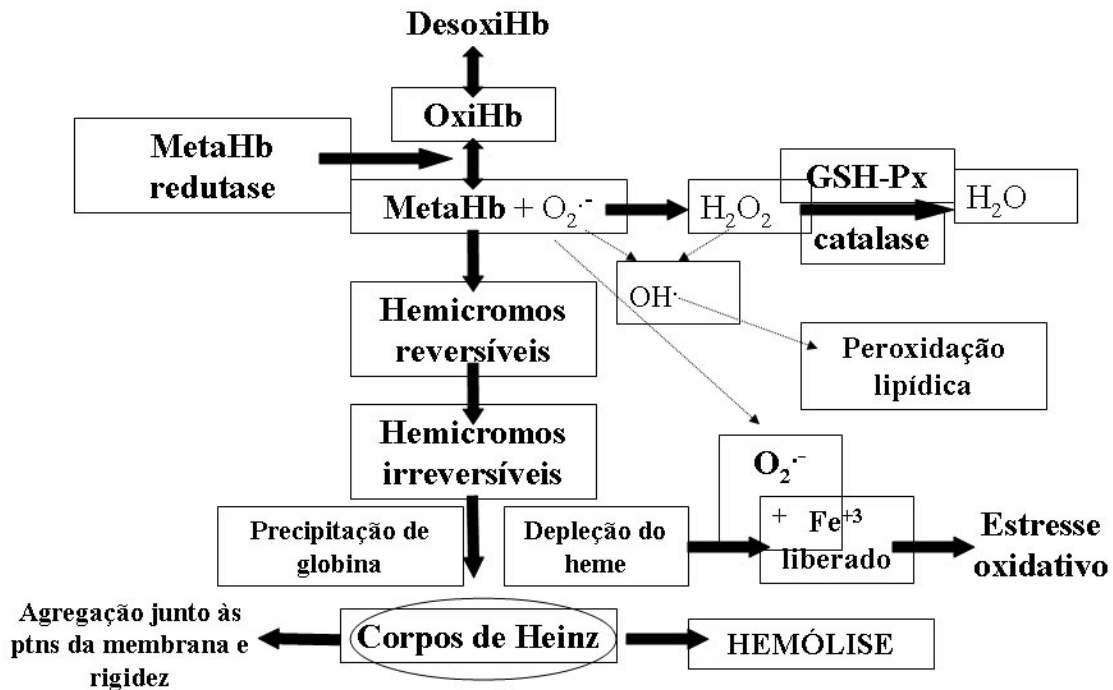
A molécula de hemoglobina, em especial a região não polar, que contém o grupo heme, necessita manter sempre o ferro no estado ferroso. Qualquer modificação neste pacote químico pode permitir o acesso de pequenos ânions ou moléculas de água e, conseqüentemente, dar origem à formação de radicais livres, desencadeando o processo de oxidação da hemoglobina (NAOUM, 1996). Os eritrócitos humanos normais apresentam cerca de 1% de metahemoglobina, ou seja, hemoglobina em sua forma oxidada, na qual o Fe^{2+} passou para o Fe^{3+} (COLEMAN, 2000).

Quando o eritrócito está sob estresse oxidativo, seja de origem induzida, por deficiência de enzimas e de compostos antioxidantes, ou por anormalidades químicas da hemoglobina, a hemólise se apresenta em diferentes intensidades. Assim, as lesões eritrocitárias podem ser devidas a fatores como: a) oxidação da hemoglobina a metahemoglobina, desencadeando a formação de hemicromos, produtos de desnaturação progressiva da hemoglobina; b) ataque de radicais livres aos ácidos graxos poliinsaturados da membrana, c) ataque de radicais livres sobre aminoácidos específicos, com oxidação das proteínas da membrana (WINTERBOURN, 1990; BRACCI et al., 2002).

Quando a oxidação a metahemoglobina é acentuada, há rápida conversão da metahemoglobina a hemicromos e, algumas vezes, perda do heme, resultando na desnaturação e precipitação na forma de corpos de Heinz. Os hemicromos se ligam ao domínio citoplasmático da banda 3, levando ao agrupamento da banda 3 na membrana e à agregação dos hemicromos para formar os corpos de Heinz. Isso resulta em um reconhecimento imunológico da redistribuição da banda 3, pela

formação de antígenos senescentes autólogos, levando à remoção dessas células da circulação, como pode ser exemplificado na Figura 2 (WINTERBOURN, 1990).

Figura 2 - OXIDAÇÃO NO ERITRÓCITO



2.1.5 Sistema Antioxidante do Eritrócito

O eritrócito, assim como outras células do organismo, apresenta várias formas de defesa antioxidante como, por exemplo, coletores de radicais livres e sistemas enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos incluem GSH, NADPH, NADH e algumas vitaminas derivadas exclusivamente de dietas, como as vitaminas C e E, entre outros. O sistema antioxidante tem a função de manter o estado reduzido da célula, protegendo assim a integridade estrutural e funcional de macromoléculas biologicamente fundamentais como proteínas, fosfolípidos, entre outras (FREI, 1999; TAVAZZI et al., 2000).

A maioria das enzimas antioxidantes são dependentes de co-fatores externos para que possam desempenhar suas atividades. A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima dependente de cobre e zinco, que catalisa a dismutação de superóxido gerado na auto-oxidação da hemoglobina, para formar O_2 e H_2O_2 . Este último é removido por ação da catalase ou da glutathiona peroxidase (GSH-Px) (HALLIWELL, 1999).

A catalase é um tetrâmero e possui quatro grupamentos heme. Está presente em grande quantidade, ligada à proteína 4.5 da membrana e cada molécula pode se ligar a até quatro moléculas de NADPH, constituindo-se na principal reserva deste composto dentro do eritrócito. Esta enzima pode decompor o H_2O_2 , formando água e O_2 molecular (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999; LEE et al., 1999).

A GSH-Px é uma enzima dependente de selênio, micronutriente com propriedades antioxidantes. Além de H_2O_2 , esta enzima também remove hidroperóxidos lipídicos oriundos da membrana (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

A metahemoglobina redutase, NADH dependente, é também chamada de citocromo b_5 metahemoglobina redutase. Esta enzima é uma flavoproteína constituída de uma cadeia peptídica e um grupo prostético, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). A enzima converte aproximadamente 67% da metahemoglobina a deoxihemoglobina, através do uso de dois carreadores de elétrons, o citocromo b_5 e o NADH. A deficiência genética dessa enzima ou de citocromo b_5 pode causar metahemoglobinemia congênita em humanos (PERCY et al., 2005).

A metahemoglobina redutase, NADPH dependente, reduz o FAD em presença de NADPH. O FAD reduzido (FADH) converte, então, a metahemoglobina em desoxihemoglobina. A deficiência dessa enzima não está associada a casos de metahemoglobinemia porque a mesma reduz apenas 5% da metahemoglobina formada (PERCY et al., 2005).

A GSH é o mais abundante tiol celular, formada a partir do ácido glutâmico e da cisteína em presença de ATP e de duas enzimas, a glutamil-cisteína sintetase e a glutathiona sintetase (STRYER, 1995). A manutenção dos níveis de GSH é essencial para sustentar o estado reduzido dos tióis de enzimas celulares e de proteínas do citoesqueleto. Esse tripeptídeo é importante na proteção da célula contra o estresse

oxidativo; na destoxificação de uma variedade de xenobióticos eletrofílicos; na remoção de espécies reativas do O₂, peróxidos e hidroperóxidos orgânicos; e na regeneração de vitaminas antioxidantes (CHEN et al., 2000).

Na redução de hidroperóxidos e nas reações em que protege a hemoglobina da oxidação, a GSH serve como substrato da GSH-Px, doando elétrons e formando a glutathiona oxidada (GSSG). A maioria da GSSG formada é então reduzida a GSH pela glutathiona redutase (GR), com consumo de NADPH (NIKI et al., 1995).

O NADPH e o NADH são os principais carreadores de elétrons dentro da célula. As suas concentrações são mantidas pela ingestão adequada de niacina ou, em condições extremas, pelo triptofano como substituto da niacina na formação de nicotinamida. As formas reduzidas desses compostos são mantidas por elétrons provenientes da oxidação de alimentos. Entretanto, o estado redutor da célula está intimamente ligado à condição energética de um organismo. Se houver insuficiência prolongada de energia ou de niacina e riboflavina, é de se esperar que a eficiência do sistema redutor fique comprometida (CHAN et al., 1999).

2.2 DOENÇAS HEMOLÍTICAS

O termo hemólise abrange todos os mecanismos diretos e indiretos que causam a morte prematura do eritrócito (JANDL, 1991).

As doenças hemolíticas caracterizam-se pela destruição ou remoção dos eritrócitos da circulação antes do seu tempo normal de sobrevivência de 120 dias. Em algumas doenças hemolíticas, a lesão e a destruição dos eritrócitos têm sido atribuídas ao aumento do estresse oxidativo (DHALIWAL et al., 2004). A anemia falciforme, as talassemias e a deficiência de G6-PD estão entre as anomalias genéticas mais frequentes, e são exemplos importantes de doenças genéticas que apresentam estresse oxidativo aumentado (CHAN et al., 1999).

As talassemias, também chamadas hemoglobinopatias quantitativas, se constituem em um grupo de doenças genéticas que apresentam um desequilíbrio na produção das cadeias de globina da hemoglobina. Na β -talassemia, o defeito genético é comumente associado à deleção ou ruptura do braço curto do cromossomo 11, resultando em uma supressão parcial ou total da produção das

cadeias β (beta) (KASSAB-CHEKIR et al., 2003). Na α -talassemia, a deleção acontece no braço curto do cromossomo 16 e há também um prejuízo total ou parcial na produção das cadeias α (alfa). A ocorrência de anemia pode variar de leve a severa e depende do tipo de talassemia e do nível de produção das cadeias envolvidas (CHENG et al., 2004).

Várias evidências sugerem que espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na evolução do quadro clínico das talassemias, pois as mesmas são geradas em grandes quantidades em eritrócitos talassêmicos, devido à presença do excesso de cadeias globínicas (ANASTASSOPOULOU, 2000). Foi demonstrado que eritrócitos de indivíduos talassêmicos são mais susceptíveis à auto-oxidação, uma vez que apresentam aumento da formação de malonil dialdeído (MDA), após uma sobrecarga oxidativa.

Os mecanismos que contribuem para o estresse oxidativo são numerosos e incluem excesso de Fe^{+3} intracelular e plasmático e auto-oxidação de globinas instáveis com geração de radicais livres, os quais promovem a peroxidação lipídica (SHINAR; RACHMILEWITZ, 1990). O excesso do Fe^{+3} plasmático deve-se às repetidas transfusões que muitos dos indivíduos talassêmicos sofrem (SHRIER, 2002). As globinas, ao se auto-oxidarem, promovem a geração de radicais livres e, com o não aproveitamento do grupo heme, se decompõem em hemicromos, que precipitam no interior dos eritrócitos, causando alterações morfológicas e funcionais. Os hemicromos são identificados morfológicamente como corpos de precipitados de hemoglobina H nos eritrócitos de talassemia α , e como corpos de Heinz nos eritrócitos de talassemia β .

O estresse oxidativo crônico dos eritrócitos, neutrófilos polimorfonucleares e plaquetas nos talassêmicos se deve à maior susceptibilidade ao dano mediado pelas espécies reativas de oxigênio (AMER; FILBACH, 2005). Alguns estudos mostram que pode ocorrer diminuição da concentração de vitamina E no plasma e eritrócitos de indivíduos talassêmicos, sugerindo que, problemas com os mecanismos antioxidantes podem ser responsáveis, em parte, pela susceptibilidade ao estresse oxidativo (RICE-EVANS; BAYSAL, 1987; CHAN et al., 1999).

A deficiência da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD) aumenta a vulnerabilidade dos eritrócitos ao estresse oxidativo. Esta eritroenzimopatia ocorre

devido a uma mutação genética localizada no braço longo do cromossomo X, levando à diminuição ou ausência da atividade desta enzima, e se manifesta clinicamente através de graus variados de hemólise (FRANK, 2005). A G6-PD é uma enzima chave do ciclo das pentoses, pois catalisa a formação de NADPH a partir de sua forma oxidada (NADP). O NADPH protege as células do estresse oxidativo, pois é requerido como co-fator na redução da glutatona oxidada (GSSG) para sua forma reduzida (GSH) e esta é a principal fonte de proteção contra o ataque oxidativo (ALICIGÜZEL, 2004). Os eritrócitos não são capazes de gerar NADPH por outro caminho, pois possuem limitado poder redutor devido à ausência de organelas. Quando há ausência ou diminuição de G6-PD, ocorre produção insuficiente de NADPH e conseqüente diminuição da concentração de GSH, levando ao aumento do estresse oxidativo dentro do eritrócito, que ocorre especialmente quando $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 são formados por fatores exógenos, como drogas, infecções e em conseqüência das reações de oxidação entre a hemoglobina e as espécies reativas de oxigênio. Quando estes oxidantes se acumulam dentro do eritrócito, pode ocorrer oxidação de proteínas de membrana e da hemoglobina com formação de metahemoglobina e de corpos de Heinz e, conseqüentemente, hemólise (CHAN et al., 1999).

Os indivíduos portadores desta eritroenzimopatia podem sofrer graus variados de hemólise, dependendo da ausência ou grau de atividade da G6-PD. Pode ocorrer hemólise crônica durante a vida do paciente, ou mesmo hemólise aguda em situações clínicas de infecção, ou após exposição ao feijão fava ou a drogas oxidativas. Os mecanismos exatos pelos quais ocorre a hemólise ainda são desconhecidos (FRANK, 2005). Além disso, tem-se evidenciado que os portadores desta eritroenzimopatia também possuem níveis reduzidos de antioxidantes, como por exemplo, vitamina E, vitamina C e glutatona (FRANK, 2005).

2.2.1 Doença Falciforme

A síntese das cadeias de globina é um processo complexo e, embora muito seguro, podem ocorrer erros, o que leva ao aparecimento de variações na estrutura da hemoglobina. Os efeitos fisiopatológicos são variáveis na dependência do defeito e do local. A doença falciforme é um termo genérico usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pela presença de um gene mutante, que determina a formação da hemoglobina S. (BEUTLER, 1995).

A anemia falciforme é uma doença hemolítica crônica, causada por uma mutação pontual (GAG⇒GTG) no gene da globina β (beta), originando uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (Hb S), ao invés da hemoglobina normal denominada hemoglobina A (Hb A). Essa mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina no 6º aminoácido da cadeia β , com conseqüente modificação físico-química da molécula de hemoglobina. Quando os pais são portadores de um único gene afetado (heterozigotos), produzindo Hb A e Hb S (AS), em geral assintomáticos, transmitem cada um deles um gene alterado para o filho, que assim recebe o gene anormal em dose dupla e é homozigoto para a formação de hemoglobina S (SS) (LEE et al., 1999).

Em condições de baixa concentração de oxigênio, as moléculas de Hb S desoxigenadas, têm a capacidade de agregarem, formando longos polímeros, que deformam a membrana da hemácea, conferindo-lhe uma forma de foice. A doença causada pelas células falciformes se caracteriza por um conjunto de sinais e sintomas provocados pela deformação de expressiva quantidade de eritrócitos com desoxihemoglobina S (BUNN, 1997). Esta modificação favorece a obstrução de vasos sanguíneos, podendo causar necrose de tecidos e órgãos, susceptibilidade aumentada a infecções, anemia e hemólise crônica (SOMJEE et al., 2004). A condição mais grave da doença ocorre nos indivíduos homozigotos (Hb SS), os quais somente possuem a hemoglobina variante. Em contraste, indivíduos heterozigotos (Hb AS) apresentam aproximadamente 25 a 60% de Hb S nos eritrócitos, são portadores assintomáticos ou apresentam poucas manifestações clínicas (STRONCEK et al., 2002).

2.2.2 Doença Falciforme e Estresse Oxidativo

Um dos fatores que predispõe ao processo hemolítico das células falciformes, induzindo-as a provocarem as múltiplas conseqüências patológicas da doença falciforme, deve-se à degradação oxidativa da hemoglobina S (DAS; ERSMAN, 1990). A desoxigenação da Hb S favorece a sua metahemoglobinização, ou seja, a formação de metahemoglobina S (meta-Hb S), com a conseqüente elevação desse pigmento dentro do eritrócito. Quando a concentração de meta-Hb S supera a ação da enzima meta-Hb redutase, é desencadeada a degradação da meta-Hb S, com formação de hemicromos e subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina S oxidada sob a forma de corpos de Heinz (WINTERBOURN, 1990, STEINBERG, 1998). Durante a transformação do eritrócito discóide com Hb S em eritrócito afoiçado, entre os eventos bioquímicos e polimerizantes da célula, ocorre a degradação oxidativa da Hb S, com liberação de espécies reativas de oxigênio ($O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} , H_2O_2) (STEINBERG, 1998).

O estresse oxidativo aumentado destes eritrócitos falcêmicos pode ser atribuído a um aumento da instabilidade da hemoglobina S e ocorre por desequilíbrio entre a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio e o baixo conteúdo de antioxidantes, como a glutatona reduzida, principal protetora contra os danos intracelulares de radicais livres (KLINGS; FARBER, 2001; AMER et al., 2005). Os eritrócitos falcêmicos podem gerar espontaneamente duas vezes mais $O_2^{\bullet-}$, peróxidos e radicais OH^{\bullet} que eritrócitos normais, promovendo assim, uma auto-oxidação aumentada do ferro (Fe^{+2}) da hemoglobina. A excessiva geração de radicais livres pode ser explicada, em parte, pelo Fe^{+3} descompartimentalizado e pela hemina liberada da Hb S desnaturada (HEBBEL et al., 1982; BROWNE et al., 1998). O estresse oxidativo pode contribuir no processo de falcização, formação de “células densas” e o próprio encurtamento da sobrevida do eritrócito através da hemólise (HEBBEL et al., 1982). Os radicais livres formados induzem à peroxidação lipídica e à subseqüente produção de quantidades anormais de MDA, ocorrendo aumento da rigidez, diminuição da deformabilidade e alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária (CHAN et al., 1999). O sistema de co-transportadores é estimulado pela oxidação dos tióis da membrana, e em células falcêmicas, contribui para o seu estado de desidratação. A presença de lipídeos hidroperóxidos também

causa uma sensibilidade mecânica anormal, conduzindo a um aumento da abertura dos canais de cálcio durante a deformação da célula (BROWNE et al., 1998). Além disso, a desnaturação oxidativa da hemoglobina leva à deposição de hemicromos na membrana, que se agrupam à proteína banda 3, gerando assim complexos imunorreativos, favorecendo a ligação de imunoglobulinas e a opsonização, o que culmina com a remoção acelerada dos eritrócitos pelo sistema fagocítico mononuclear (BROWNE et al., 1998).

A geração de estresse oxidativo aumentado característico da anemia falciforme pode também influenciar na gravidade das manifestações clínicas. Os polimorfonucleares neutrófilos, expostos a tais condições, tornam-se ativados e apresentam uma explosão do conteúdo de seus grânulos, liberando mais peróxido de hidrogênio, aumentando ainda mais a produção de espécies reativas de oxigênio e comprometendo, assim, sua função antibacteriana, fato que explica a susceptibilidade a infecções recorrentes (AMER et al., 2005). As plaquetas também são influenciadas, pois o estresse oxidativo as ativa, propiciando um estado de hipercoagulabilidade. Finalmente, os processos vaso-oclusivos podem também ser influenciados, pois eles resultam da aderência anormal das células falcizadas, neutrófilos e plaquetas ao endotélio vascular. AMER (2005) e seus colaboradores demonstraram que quantidades aumentadas de moléculas oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio, são produzidas durante tais crises.

As concentrações e as atividades de enzimas e de coletores de radicais livres envolvidos com a defesa antioxidante do eritrócito, como o GSH, parecem estar diminuídos nos eritrócitos falcêmicos, o que aumenta a propensão a formar corpos de Heinz. A vitamina E também pode estar diminuída no plasma e em eritrócitos de indivíduos com anemia falciforme. Este processo oxidativo contribui para a diminuição do tempo de meia-vida do eritrócito falciforme (LACHANT; TANAKA, 1986; RICE-EVANS et al., 1986; CHAN et al., 1999).

2.3 PRESERVAÇÃO DE ERITRÓCITOS PARA EMPREGO EM HEMOTERAPIA

2.3.1 Sangue Total e Hemocomponentes

A preservação de eritrócitos para uso em hemoterapia visa manter a sua viabilidade, isto é, sua integridade física e funcional no sangue circulante do receptor.

Com a evolução no campo da hemoterapia, utiliza-se sistemas de bolsas plásticas estéreis, fechadas, que garantem tanto a preservação do sangue e de seus componentes para uma transfusão mais eficiente, como a diminuição de riscos de contaminação por microorganismos. De um modo geral, colhe-se o sangue total em bolsa-mãe, a qual contém um anticoagulante adequado à sua preservação durante algum tempo. A partir do emprego de glicose como nutriente e de citrato como anticoagulante, os eritrócitos se mantinham viáveis por até 21 dias (MOORE, 1987). Com o uso dos anticoagulantes ácido cítrico-citato-dextrose (ACD) ou citrato-fosfato-dextrose (CPD), o tempo de preservação não melhorou, ou seja, só se assegurava uma sobrevida pós-transfusional (SPT) aceitável para os eritrócitos até os 21 dias (MOORE et al., 1987). Com adição de adenina ao CPD (CPDA-1 e CPDA-2), os eritrócitos puderam ser preservados para transfusão em sangue total ou na forma de concentrado de hemácias por até 35 dias (KENNEDY; JULIUS, 1994). Eritrócitos mantidos em ACD podem ser protegidos pela adição de vitaminas C e E, com diminuição da fragilidade osmótica e melhor manutenção dos níveis de 2,3 BPG (KOPEC-SZLEZAK et al, 1988).

A temperatura de preservação das bolsas, universalmente aceita e utilizada é de 1 a 6°C, por manter o metabolismo em condições basais, aumentando assim o tempo de preservação. Em experimentos recentes, observou-se que um dia de estoque de concentrado de eritrócitos isolados de sangue colhido em CPDA-1 a 25°C, equivalem a 10 dias de estoque entre 1 a 6°C (RUDELL et al., 1998).

Existem bolsas de materiais diversos para a preservação dos diferentes componentes do sangue. A variação da natureza química e da porosidade das paredes das bolsas varia de acordo com as necessidades de trocas gasosas de cada tipo de célula. Foi demonstrado que eritrócitos são melhor preservados em

bolsas se submetidos a freqüentes homogeneizações (HÖGMAN et al., 1991). O material mais empregado para as bolsas é o cloreto de polivinil (PVC), plasticizado com 2-etil-exil-ftalato (DEHP), o qual migra das paredes da bolsa para o meio, penetra na bicamada lipídica e reduz hemólise espontânea, aumentando a viabilidade dos eritrócitos (AUBUCHON et al., 1988). Novos componentes têm sido utilizados para a composição das bolsas de coleta, como o butiril-n-triexil citrato (BTHC), com melhor manutenção dos níveis de ATP e 2,3BPG nos eritrócitos (HÖGMAN et al., 1991).

O desenvolvimento de hemocomponentes tem limitado o uso de sangue total a poucas condições clínicas. O uso de sangue total fresco não é mais aceito na hemoterapia atual e traduz apenas a falta de disponibilidade de produtos mais adequados. O sangue total estocado deverá ser usado nos casos em que tenha ocorrido uma perda superior a 30% da volemia. Todavia, essas hemorragias também poderão ser manuseadas com concentrado de glóbulos vermelhos e soluções eletrolíticas e/ou coloidais (MURPHY et al., 2001; RAZOUK; REICHE 2004).

2.3.2 Soluções Aditivas

Investigações realizadas ao longo do tempo têm demonstrado que a suplementação do anticoagulante não é a melhor forma de se preservar eritrócitos. Soluções aditivas são baseadas, de um modo geral, na presença de substratos importantes para o metabolismo dos eritrócitos, na manutenção do pH, dos níveis de ATP e de 2,3 BPG, da morfologia e da viabilidade e no retardamento da hemólise. As soluções aditivas mais empregadas são: SAG, que contém cloreto de sódio, adenina e glicose (HÖGMAN et al., 1978), SAGM, que além desses compostos contém manitol como inibidor de hemólise (HÖGMAN et al, 1983a); e ADSOL, desenvolvida por FENWAL em 1978, também com adenina, glicose, manitol e cloreto de sódio (HEATON et al, 1981; MIRIPOL et al, 1983). Essas soluções preservam os eritrócitos viáveis durante 35 a 42 dias a 4°C, porém só mantêm níveis aceitáveis de 2,3 BPG nas primeiras 2 ou 3 semanas (HÖGMAN et al., 1983b, HEATON et al., 1984).

Com base na afirmação de que há correlação entre os níveis de ATP, a morfologia eritrocitária e a viabilidade dos eritrócitos (LACHANT et al., 1984), têm-se procurado melhorar as soluções aditivas em uso e criar outras, capazes de prolongar o tempo de preservação de eritrócitos *in vitro*.

2.3.3 Unidades de Eritrócitos Pobre em Leucócitos

As unidades eritrocitárias para transfusão não devem conter plaquetas ou granulócitos funcionais, uma vez que a maioria das reações transfusionais febris ocorre devido à presença de leucócitos na bolsa de sangue a ser transfundida, porém, as unidades de 450 ml de sangue total contêm cerca de $3,0 \times 10^9$ leucócitos (AABB, 1986). Unidades de eritrócitos pobres em leucócitos são preparados por métodos que assegurem a remoção de, pelo menos, 85% dos leucócitos originalmente presentes na bolsa de sangue coletado. Os métodos de remoção podem ser por: lavagem das hemácias; centrifugação invertida com retirada da camada leucoplaquetária ou *buffy-coat*; extração automática do *buffy-coat* durante a preparação; e uso de filtros leucodepletors. O número de leucócitos no componente final deverá ser menor que 5×10^6 células (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Atualmente, o método considerado mais eficiente para remover leucócitos é o uso de filtros leucodepletors (KENNEDY; JULIUS, 1994). Vários filtros têm sido propostos, compostos de algodão, acetato de celulose, fibras de poliéster ou outros materiais de eficiência variável. Com alguns deles, pode-se reter até 99,8% dos leucócitos e recuperar 95 – 100% dos eritrócitos, viáveis por até 42 dias em solução aditiva (BODENSTEINER, 1990).

O uso dos filtros de leucodepleção está indicado para os pacientes cronicamente dependentes de transfusões, particularmente os talassêmicos. Tem sido demonstrada uma diminuição significativa das reações adversas e da formação de anticorpos antileucocitários em pacientes talassêmicos que receberam repetidas transfusões de unidades de eritrócitos filtradas (RAZOUK; REICHE, 2004). Embora questionável, estes produtos têm sido utilizados como sendo eficientes para a prevenção da transmissão de infecção pelo Citomegalovírus (CMV) e infecção pelo

Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo I (HTLV-I) em pacientes receptores de sangue. Muitos filtros sangüíneos garantem níveis menores que 1×10^6 células ou até 1×10^4 células. (KENNEDY; JULIUS, 1994).

2.3.4 Emprego de Eritrócitos

Unidades de eritrócitos são constituídas por hemácias que permanecem na bolsa mãe depois que esta é centrifugada, enquanto o plasma é extraído para uma bolsa-satélite. Este procedimento pode ser realizado em qualquer momento antes da data de expiração do sangue coletado. O hematócrito do concentrado de hemáceas deve estar entre 65% a 75%, nas bolsas cuja solução anticoagulante preservadora seja CPDA-1, que podem permanecer armazenadas à temperatura de 2° a 4°C, por até 35 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). O concentrado de eritrócitos é indicado para aumentar a massa eritrocitária em pacientes que necessitem aumentar sua capacidade de transporte de oxigênio (AABB, 1986).

As principais situações descritas na literatura em que a transfusão de concentrado de eritrócitos não é justificada são: hematócrito superior a 30%, exceto nos casos com queda superior a 6% em 24 horas ou superior a 12% em 48 horas; hematócrito entre 24% a 30%, desde que não ocorram as seguintes alterações: queda do hematócrito superior a 6% nas últimas 24 horas; angina e dor torácica nas 24 horas que antecedem o ato transfusional; infarto agudo do miocárdio (IAM) até seis semanas antes da transfusão; perda de sangue superior a 1.000 ml antes da transfusão; eletrocardiograma indicando isquemia coronariana ou infarto agudo do miocárdio (MURPHY et al., 2001).

2.3.5 Eritrócitos de Indivíduos Portadores Heterozigóticos de Hemoglobina S

Eritrócitos de pacientes portadores de hemoglobina S exibem alterações no metabolismo celular, na estrutura e função da membrana celular resultantes da instabilidade desta hemoglobina anormal. Na anemia falciforme, indivíduos

homozigotos, os eritrócitos SS apresentam-se com baixa deformabilidade e anormalidades na sua reologia. A deformabilidade diminuída é um fator determinante crítico na microcirculação, pois pode gerar oclusão dos microvasos. Em indivíduos heterozigotos, a hemoglobina S representa aproximadamente 35% do total de hemoglobina, nos eritrócitos AS. Os portadores AS são normalmente assintomáticos, são considerados como potenciais doadores de sangue. Eritrócitos AS são considerados seguros para transfusão, com algumas ressalvas, em receptores que não tenham anóxia (STRONCEK et al., 2002).

SHENG et al. (1998), através de um estudo com Hb A e Hb S purificadas, obtidas de doadores de sangue AS, demonstraram que a Hb S tem uma tendência exagerada em se auto-oxidar em comparação com a Hb A.

Vários pesquisadores já comprovaram que eritrócitos AS, frequentemente ocluem os filtros na leucorredução. Assim, o sangue de doadores AS não pode ser filtrado adequadamente, com prolongamento no tempo, e filtragem incompleta, apresentando grande número residual de leucócitos (HIPPI; SCOTT, 1974; OULD AMAR et al., 1997; BEARD et al., 2000; SCHUETZ et al., 2004; OULD AMAR, 2006). De fato, os parâmetros que influenciam a filtração do sangue não estão claramente determinados. Os prováveis fatores envolvidos podem incluir temperatura, pH, osmolaridade, tipo de anticoagulante, tipo de armazenamento e saturação de oxigênio na unidade de sangue (BEARD et al., 2004). A maior causa de falha na filtração de eritrócitos de doadores com traço falciforme parece ser a polimerização da Hb S (SCHUETZ et al., 2004). STRONCEK et al. (2002) mostraram que a presença de CPD somada à baixa saturação de oxigênio parece ser responsável por grande parte da polimerização da Hb S.

BRANDÃO et al. (2003), observaram que os eritrócitos de doadores com traço falciforme tornam-se rígidos durante a estocagem, sugerindo que a Hb S poderia comprometer a elasticidade das células.

2.3.6 Emprego de Eritrócitos AS em Hemoterapia

Na maioria dos países, indivíduos com traço falciforme são aceitos como doadores de sangue, embora 35 a 45% do total de sua hemoglobina total seja anômala (Hb S).

Não há uma norma padrão internacional para esta questão, que defina se as unidades de sangue destes indivíduos devem ser descartadas ou se são aptas a serem transfundidas. Muitos centros de hemoterapia têm seu próprio regulamento a respeito (OULD AMAR, 2006). Na Arábia Saudita, Martinica, Reino Unido e França, as unidades de sangue positivas para Hb S são desprezadas e não são usadas para transfusão (OULD AMAR, 2006).

O problema da doação de sangue por portadores do traço falciforme começou a ser discutido no Brasil na década de 70. Nessa época, RAMALHO (1976), baseado na contra-indicação formal da transfusão de hemáceas AS feita por importantes autores norte-americanos (MOLLISON et al., 1972; OLSKI; NAIMAN et al., 1972), sugeriu que a investigação dessa hemoglobina anômala começasse a ser realizada nos serviços brasileiros de hemoterapia. Este procedimento seria duplamente útil, beneficiando simultaneamente o doador e o receptor de sangue. Enquanto o receptor estaria sendo protegido do recebimento de hemáceas anômalas, o doador, se identificado como siclêmico, poderia ser devidamente orientado e prevenido contra problemas de ordem individual e familiar.

Atualmente, sabe-se que a transfusão de hemáceas AS é realizada no Brasil, com apenas algumas contra-indicações bem específicas. A Resolução da Diretoria Colegiada do Ministério da Saúde nº 153 de 14 de junho de 2004 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) tornou obrigatória a investigação de hemoglobina S e de outras hemoglobinas anormais nos doadores de sangue e, ainda de acordo com esta resolução, os componentes eritrocitários de doadores com pesquisa de hemoglobina S positiva devem conter esta informação no rótulo. Esses componentes não devem ser utilizados em recém-nascidos, sobretudo em prematuros, em pacientes com hemoglobinopatias, acidose grave, pacientes que serão submetidos a cirurgias longas ou para transfusão intra-uterina.

A prevalência do traço falciforme na população brasileira varia de região para região, conforme os grupos raciais formadores e o processo de miscigenação.

Atualmente a Hemoglobina S deixou de ser caracterizada restrita à população negra, sendo encontrada também na população caucasóide.

Em estudos realizados no Brasil por NAUOM (1997), verificou-se que as regiões Norte e Nordeste do Brasil são as que apresentam maior prevalência para a Hb AS, sendo que no Estado da Bahia observou-se a maior prevalência, com índice de 5,55%, enquanto no Estado do Paraná, por exemplo, a prevalência foi de 1,87%. Entretanto, em recente pesquisa realizada por OLIVEIRA, et al. (2005), em doadores de sangue da Hemorede do Estado do Paraná, verificou-se uma prevalência de 2,38%, sendo a região de Paranaíba apresentou maior prevalência, seguida das regiões de Campo Mourão (1,86%), Cascavel (1,26%) e Curitiba (1,07%).

Esta triagem permite esclarecimentos e “aconselhamento” para portadores assintomáticos, não só para orientação de reprodução, mas também em relação às suas atividades físicas, uma vez que várias profissões ou esportes têm fatores de risco aumentados para os portadores de Hb S, como vôo em avião pressurizado, paraquedismo, esforço físico em grandes altitudes, ou situações de excesso de esforço físico. (FRANCIS et al., 1980; EMBURY et al., 1994)

Outros autores também levantaram o problema, após uma massiva ciclização intravascular ocorreu por uma transfusão de sangue de doador portador de traço falciforme (VEIGA; VAITHIANATHAN, 1963). Há relato de morte súbita, após anestesia, de paciente transfundido com sangue AS (BEARD et al., 2000). Além disso, infarto renal múltiplo e esplênico tem sido descrito e muitos outros eventos adversos após transfusões com unidades de sangue AS (SCHUETZ, et al., 2004). Entretanto, outros autores defendem que unidades de sangue contendo Hb AS estocadas sob condições adequadas não oferecem risco ao receptor, uma vez que este não esteja exposto a anóxia (STRONCEK et al., 2002).

2.4 AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS OXIDATIVAS

2.4.1 Substâncias oxidantes usadas como modelo experimental

Diversas substâncias têm sido usadas como modelos para causar injúria oxidativa aos mais diferentes sistemas biológicos. Primaquinas, compostos

nitroaromáticos, paracetamol e seus derivados oxidados, cromato entre outras (LEE et al., 1999; FERNANDES et al., 2000; CLARO et al., 2006).

O TBHP vem sendo utilizado como um modelo de agente oxidante sobre os eritrócitos, especialmente para se avaliar a sobrecarga oxidativa em proteínas eritrocitárias (CHEN et al., 2000; ZOU et al., 2001). De uma forma geral, o efeito oxidante do TBHP foi descrito como similar à ação de aminoácidos que sofreram peroxidação (KUO; TANG, 1998). A ação do TBHP em concentração de 0,5 mmoles/l por 60 min sobre eritrócitos humanos resultou em formação de metahemoglobina, além de induzir ao aparecimento de agregados de proteínas de membrana de alto peso molecular (MOORE et al., 1989). Concentrações menores do mesmo, da ordem de 0,2 mmol/l, levaram a modificações nas proteínas citosólicas, contudo, sem formação de oligômeros de alto peso molecular (RICE-EVANS et al., 1985). Na concentração de 0,5 mmol/l, no entanto, a atividade enzimática foi comprometida, especialmente de algumas bombas de íons, entre elas, a Ca/Mg ATPase. Essa inibição parece ser seletiva, pois outras enzimas presentes na membrana do eritrócito não apresentaram o mesmo padrão de inibição, entre elas, a acetilcolinesterase (MOORE et al., 1989). Em eritrócitos de rato, o TBHP revelou-se capaz de exercer ação oxidante seletiva sobre proteínas do citoesqueleto, banda 2.1 e anquirinas. Em ratos com dieta deficiente em selênio, a ação oxidante foi mais acentuada, revelando a importância do metabolismo de GSH para o sistema antioxidante eritrocitário, visto que o selênio é um co-fator necessário para a atividade de GSH-Px (SUZUKI et al., 1987).

Vários pesquisadores já demonstraram que o dano oxidativo provocado pelo TBHP está associado com a peroxidação lipídica da membrana e degradação das proteínas do citoesqueleto, especialmente nas junções horizontais do citoesqueleto, que são o seu alvo principal. O TBHP também causa inibição da Ca-ATPase da membrana celular e aumento na permeabilidade da passagem deste cátion pela membrana, além da exaustão da glutatona reduzida (CAPRARI et al., 1995; ROHN, 1993; VAN DER ZEE, 1996).

Em estudos recentes realizados por DOMANSKI et al. (2005), demonstrou-se que a exposição de eritrócitos humanos ao TBHP resulta em uma seqüência de processos oxidativos, tais como, a rápida oxidação da GSH, em aproximadamente de 30 a 60 segundos, através da glutatona peroxidase; oxidação da hemoglobina,

através da formação de radicais na reação entre o TBHP e a hemoglobina; os quais são consumidos imediatamente nas reações de peroxidação lipídica na membrana eritrocitária. Estes eventos foram acompanhados por transformações morfológicas na célula tais como, vesiculação, agregação, formação de equinócito e estomatócito, mudança na estrutura e complexo da membrana plasmática e sua hiperpolarização (BRYSZWSKA, et al., 1995; DOMANSKI, et al., 2005).

2.5 AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

A remoção preventiva de radicais livres também pode ser feita por compostos de baixo peso molecular como o acetato de α -tocoferol (vitamina E), efetivo na proteção da membrana, e do L-ascorbato (vitamina C), que é mais atuante na porção citoplasmática (CLARO et al., 2006). Em eritrócitos submetidos à ação oxidante, o uso da vitamina E reduziu a peroxidação lipídica sem, contudo, impedir a hemólise decorrente da sobrecarga oxidativa sobre proteínas da membrana (NIKI et al., 1997). A ação *in vitro* de vitamina C e vitamina E acarretou diminuição significativa da formação de corpos de Heinz e de metahemoglobina em eritrócitos humanos expostos à sobrecarga oxidativa com cloridrato de fenilhidrazina (CLARO et al., 2006). Demonstrou-se também que, flavonóides podem prevenir o estresse oxidativo, tanto por remoção direta de radicais peroxil e hidroxil como por quelação de íons ferrosos (FERRALI et al., 2000). Flavonóides isolados, como a quercetina e a rutina, ou mesmo extrato de uvas (*Vitis vinifera*) rico em polifenóis, especialmente antocianidinas, foram capazes de prevenir o dano oxidativo em eritrócitos tratados com oxidantes como TBHP e cloridrato de finilhidrazina, fato revelado pelo decréscimo na formação de metahemoglobina e de corpos de Heinz (COMAR, 2003).

2.5.1 Vitamina C

O ácido L-ascórbico ou vitamina C (Figura 3) é uma cetolactona hidrossolúvel não sintetizada pelo organismo humano, portanto é necessário um aporte diário na

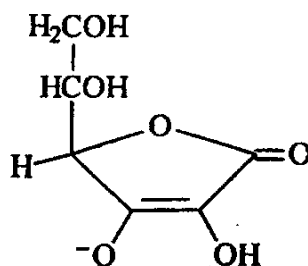
dieta. Quando absorvida, a vitamina C é distribuída aos tecidos pelo plasma, para exercer suas funções biológicas, sendo que uma das principais é a ação antioxidante, protegendo as lipoproteínas da oxidação (MAY, 1998). O transporte do ascorbato no plasma se dá na sua forma oxidada, de desidroascorbato. Uma vez dentro da célula, o desidroascorbato é reduzido por um mecanismo enzimático GSH-dependente (SULIVAN; STERN, 1982).

No eritrócito, a vitamina C tem o potencial de proteger o citoplasma e os componentes da membrana contra o estresse oxidativo. No citoplasma, a vitamina C reduz a metahemoglobina para a forma de hemoglobina através de mecanismos dependentes ou não de enzimas (MANSOURI; LURIE, 1993). Na membrana, pode afetar indiretamente a peroxidação lipídica através da reciclagem da vitamina E. Outra evidência da proteção da vitamina C é que, face a um estresse oxidativo, a vitamina C é depletada antes da vitamina E e da GSH (MAY et al., 1996).

JAJA et al. (2002) comprovaram que a suplementação com ácido ascórbico em crianças com anemia falciforme aumenta a concentração de hemoglobina, o volume corpuscular médio (VCM) e a porcentagem de hemoglobina fetal (HbF) enquanto diminui a porcentagem de drepanócitos irreversíveis. Os eritrócitos falciformes geram espontaneamente duas vezes mais espécies reativas de oxigênio, especialmente ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, antioxidantes como vitamina C, vitamina E e riboflavina estão diminuídos em indivíduos com anemia falciforme (CHAN et al., 1999; SOMJEE, et al., 2004).

A capacidade antioxidante da vitamina C é resultado do seu alto poder redutor, capaz de fornecer íons hidrogênio e elétrons, seja atuando diretamente sobre as espécies reativas de oxigênio, seja regenerando outros compostos de caráter antioxidante presentes na célula, como vitamina E e GSH (FERNANDES et al., 2000). Existem evidências de que a vitamina C intracelular pode doar elétrons a uma oxirredutase de membrana, revelando que seu potencial antioxidante pode proteger também a membrana plasmática (MAY et al., 2000).

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA C.



Fonte: MAY (1999)

2.5.2 Vitamina E

O termo vitamina E abrange um grupo de antioxidantes lipossolúveis. A análise estrutural dessas moléculas demonstrou que existem dois grupos: os tocoferóis (α , β , γ , δ) e tocotrióis (α , β , γ , δ). O α -tocoferol (Figura 4) é a forma mais abundante na natureza e a que tem maior atividade biológica (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999).

As principais fontes de vitamina E são sementes e óleos vegetais e o seu transporte no plasma ocorre através das lipoproteínas, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (KOGA et al., 1998). Sua estrutura é responsável pela habilidade de recolher radicais livres e de se incorporar em local adequado na bicamada lipídica da membrana celular, para recolher os radicais peroxil (KOGA et al., 1998).

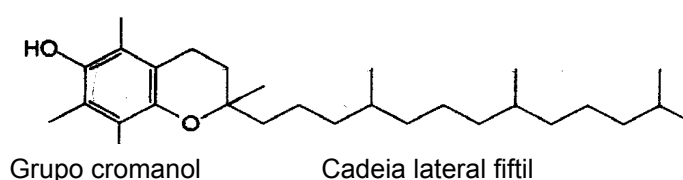
DUTTA-ROY (1999) caracterizou uma proteína na membrana plasmática, que se liga ao α -tocoferol para incorporá-lo na bicamada lipídica da membrana eritrocitária. Até então não se sabia ao certo porque o eritrócito mantinha baixas concentrações de α -tocoferol dentro da célula, mesmo com concentrações altas no plasma.

A vitamina E é o mais importante antioxidante da membrana celular. Em experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstrou-se que a vitamina E coleta radicais livres e H_2O_2 , protegendo a membrana eritrocitária da peroxidação lipídica e da hemólise. A vitamina E age como um “antioxidante quebrador de cadeia” através da doação de um átomo de hidrogênio, principalmente ao radical peroxil, prevenindo assim a propagação de radicais livres. A concentração de vitamina E presente na membrana

é inversamente proporcional à extensão da hemólise oxidativa (MAY, 1998; LII et al., 1998; AZZI; STOCKER, 2000).

Estudos realizados por JAJA et al. (2005a), demonstraram que a suplementação em curto prazo com α -tocoferol pode ser benéfica em crianças que sofrem de anemia falciforme.

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA E, NA FORMA DE α -TOCOFEROL



Fonte: BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER (1999)

2.5.3 Interações entre vitaminas C e E

Para a combinação entre dois antioxidantes ser sinérgica, a taxa de inibição da oxidação pelos dois antioxidantes precisa ser a mesma ou menor que a taxa de inibição de cada antioxidante sozinho. A combinação entre vitamina C e vitamina E pode ser efetiva na inibição da oxidação. Estes dois antioxidantes estão localizados em diferentes domínios mas, mesmo assim, interagem no domínio entre a membrana e a fase aquosa (NIKI et al., 1995).

A proximidade do grupo cromanol na superfície da membrana é consistente com o comportamento sinérgico das duas vitaminas, observado em peroxidação de fosfolípídeos de membranas artificiais. A vitamina C é um bom antioxidante quando radicais peroxil são gerados na fase aquosa, mas é muito menos efetiva quando esses radicais são inicialmente gerados dentro da membrana. A vitamina C não penetra na membrana suficientemente para interagir com o radical peroxil, mas doa

prontamente um elétron para a redução do radical α -tocoferoxil, formado na reação entre vitamina E e os radicais livres. Sugere-se que estes eventos ocorram na interface água/lipídeos da bicamada lipídica da membrana eritrocitária (STOCKER, 2000). Estudos *in vitro* mostraram que a vitamina C pode reciclar a vitamina E em membranas eritrocitárias e em eritrócitos intactos, assim como em outros sistemas biológicos (MAY et al., 1996; MAY, 1998).

A cooperação entre as vitaminas C e E tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, sugerindo um possível uso das duas vitaminas para fins terapêuticos (CHAN et al., 1999).

2.5.4 Uso das Vitaminas C e E para a Prevenção e Tratamento de Doenças Humanas

O uso de antioxidantes para a prevenção e tratamento de doenças humanas tem sido objeto de estudo há mais de duas décadas (HALLIWELL, 2000).

Dietas ricas em vegetais, frutas e grãos têm sido indicadas na proteção contra diversas doenças (NOGUCHI, et al., 2000). Dietas e suplementos vitamínicos ricos em vitamina E têm importante papel em doenças relacionadas com estresse oxidativo, como: câncer, doenças cardiovasculares, algumas doenças hemolíticas, entre outras (LII, et al. 1998).

Em muitos casos, como nas anemias por aumento do estresse oxidativo, os problemas nutricionais são devidos à contínua depleção dos antioxidantes decorrente do estresse oxidativo. A deficiência de vitamina E é comum em indivíduos falcêmicos, talassêmicos e em portadores de deficiência de G6-PD. Observou-se que a suplementação com vitamina E foi benéfica para restabelecer os níveis desta vitamina no plasma, melhorou os sintomas clínicos e diminuiu o número de eritrócitos falciformes irreversíveis (CHAN et al., 1999).

A vitamina C está presente no suco gástrico e pode ajudar na eliminação de nitrosaminas carcinógenas oriundas da dieta ou formadas no estômago, eliminando assim, uma possível causa de câncer (HALLIWELL, 1996).

A ação contra radicais livres e a proteção da lipoperoxidação na membrana eritrocitária, através da reciclagem da vitamina E, faz da vitamina C uma possibilidade para o tratamento de doenças hemolíticas com estresse oxidativo aumentado. Estudos *in vitro* demonstraram que a vitamina C pode diminuir a formação de corpos de Heinz e proteger eritrócitos falciformes contra o estresse oxidativo (LACHANT; TANAKA, 1986; WESTERMAN et al., 2000).

Baseando-se nos estudos sobre estresse oxidativo em algumas doenças hematológicas e a possibilidade do uso de vitamina C e de vitamina E no tratamento de doenças, considerou-se relevante o estudo de antioxidantes na preservação de estresse oxidativo provocado por agentes oxidantes.

3 OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Avaliar o processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de Hemoglobina S

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o metabolismo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de hemoglobina S homocigotos e heterocigotos.
- Investigar a ação de *tert*-butil hidropéroxido e de vitaminas C e E sobre o metabolismo oxidativo em eritrócitos de pacientes portadores de hemoglobina S, através da determinação de
 - concentração de metahemoglobina
 - formação de corpos de Heinz
 - índice de hemólise
 - concentração de glutariona reduzida e
 - atividade enzimática eritrocitária de G6-PD e GR

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Seleção de Doadores

Selecionou-se doze unidades de sangue de doadores do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), com idade entre dezoito e sessenta e cinco anos, sendo sete do sexo masculino e cinco do sexo feminino, coletadas e processadas de acordo com as normas técnicas estabelecidas pela Resolução da Diretoria Colegiada do Ministério da Saúde nº153, de 14 de junho de 2004, e adotadas no HEMEPAR. Os doadores foram classificados em dois grupos: indivíduos normais portadores de hemoglobina A (AA) (n=6) e indivíduos heterozigotos para hemoglobinas A e S (AS) (n=6). Os doadores assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido sobre o uso do seu sangue para a pesquisa, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Paraná, sob protocolo CEP/SD: 02-296 SI (075) 089-06 (08)09 FR: 107386 e CAAE 0045.0.091.000.0.

As unidades de sangue foram armazenadas em geladeira (Brastemp 420L) a 4°C durante os 42 dias de estocagem, controlando-se diariamente as temperaturas.

4.1.2 Seleção de Pacientes

Coletou-se sangue venoso de pacientes com anemia falciforme, portadores homozigotos de hemoglobina S (SS) (n=3), com idade entre dezoito e sessenta e cinco anos, sendo um do sexo masculino e dois do sexo feminino, que são atendidos regularmente no Ambulatório do HEMEPAR, em condição pré-transfusional. Os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido sobre o uso do seu sangue para a pesquisa, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta de Material

Para os grupos AA e AS coletou-se unidades de sangue venoso com volume aproximado de 400 ml em sistemas triplos de bolsas plásticas de PVC (Fenwal cód 4R1412, TRAVENOL LABORATORIES, Inc.), que contêm uma bolsa primária PL146[®] com 63 ml de CPDA-1 e duas bolsas de transferência; destas uma PL146[®] com 100 ml de ADSOL[®] e outra PL732[®] vazia. Para a seleção dos grupos AA e AS, realizou-se teste de solubilidade para pesquisa e investigação da presença de hemoglobina S. Para as unidades positivas no teste de solubilidade, confirmou-se a presença de hemoglobina S através de teste de falcização, pelo método de redução do metabissulfito de sódio a 2%, e de eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino e em pH ácido de acordo com protocolo estabelecido no HEMEPAR. Para as eletroforeses foram usados os géis de agarose da Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos (CELM).

Para o grupo SS, coletou-se 20 ml de sangue venoso, utilizando-se 2,8 ml de solução de citrato-fosfato-dextrose (CPD) pH 5,6 - 5,8 como anticoagulante.

4.2.2 Isolamento de Eritrócitos

4.2.2.1 Lavagem de eritrócitos

Em centrífuga refrigerada (HERMLE modelo Z323K) a 4°C, centrifugou-se o sangue coletado a 1200 x g por 10 min, retirando-se o plasma e a camada de leucócitos (*buffy-coat*) através da técnica de aspiração. Em seguida, lavou-se a suspensão de eritrócitos obtida com solução gelada de NaCl 154 mmoles/l por três vezes.

Ressuspendeu-se os eritrócitos em tampão fosfato salino, acertando-se o volume globular acerca de 40%, através do método de microhematócrito (DACIE; LEWIS, 1995). Colocou-se alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos em tubos de hemólise e centrifugou-se por 5 min a 1200 x g, retirando-se um volume de

sobrenadante correspondente ao volume de solução reagente a ser adicionado, não se alterando assim, o volume globular final da suspensão de eritrócitos, como será descrito nos itens 4.2.3 e 4.2.4.

4.2.3 Tratamento das Amostras com Substâncias Antioxidantes

4.2.3.1 Incubação de eritrócitos com vitamina C (ácido L-ascórbico):

As alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos, adicionou-se vitamina C (Sigma Chemical Co. A-0278), 500 mmoles/l solubilizada em solução tampão fosfato 67 mmoles/l, pH 7,6, com glicose 200 mg/dl, para concentrações finais de 0,5 a 20 mmoles/l, de acordo com o item 4.2.2.1. Os controles foram incubados apenas com solução tampão. A homogeneização foi realizada por inversão em homogeneizador PHOENIX HS 22 por 60 min em temperatura ambiente.

4.2.3.2 Incubação de eritrócitos com vitamina E (acetato de α -tocoferol):

Solubilizou-se a vitamina E (Sigma Chemical Co. T-3001) em tensoativo Tween 80 (Synf reagentes), na proporção 1:2, em banho-maria a 37°C (EVLAB EV015). Após a incorporação da vitamina E no tensoativo, adicionou-se uma solução de etanol 1% (v/v) levando-se novamente a mistura a 37°C até a completa solubilização. Dessa forma, preparou-se soluções estoque de vitamina E nas concentrações de 26,4 e 211,5 mmoles/l. As soluções foram acondicionadas em frasco âmbar e ao abrigo da luz, sendo conservadas por até 3 dias à temperatura ambiente. As alíquotas de 1 ml da suspensão de eritrócitos, adicionou-se solução de vitamina E, para concentrações finais de 0,5 a 20 mmoles/l, de acordo com o item 4.2.2.1. Homogeneizou-se as amostras por inversão em aparelho PHOENIX HS22 durante 60 min.

Em alíquotas de suspensão de eritrócitos, adicionou-se uma solução de Tween 80 e etanol 1% em volumes iguais aos usados para obtenção das concentrações finais de vitamina E. Após 60 min de homogeneização, adicionou-se o *terc*-butil hidroperóxido 1 mmol/l e novamente homogeneizado, através de aeração

com pipeta micrométrica. Realizou-se este procedimento a fim de se verificar possíveis interações entre o meio solubilizante da vitamina E e os eritrócitos.

4.2.3.3 Incubação de eritrócitos com vitamina C e vitamina E:

Adicionou-se vitamina C e vitamina E à suspensão de eritrócitos obtida no item 4.2.3.1 e 4.2.3.2, para concentrações finais de 2, 10 e 20 mmoles/l. As amostras foram homogeneizadas em aparelho de rotação PHOENIX HS22 durante 60 min.

4.2.4 Tratamento das Amostras com Substância Oxidante *terc*-Butilhidroperóxido (TBHP)

O *terc*-butilhidroperóxido (Sigma Chemical Co. B-2633) foi dissolvido em tampão fosfato 67 mmoles/l, pH 7,6, com glicose 200 mg/dl, a alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos para concentrações finais de 1 a 5 mmoles/l. A incubação foi realizada sob constante homogeneização por inversão em homogeneizador PHOENIX HS22, por 30 min.

4.2.4.1 Amostras tratadas com vitamina C ou vitamina E

Adicionou-se as alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos tratados com antioxidante vitamina C ou vitamina E, conforme os itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2, solução de *terc*-butilhidroperóxido para concentração final de 2 mmoles/l. Homogeneizou-se as amostras através de aeração, com auxílio de pipeta micrométrica. Incubou-se as amostras por 30 min à temperatura ambiente.

4.2.4.2 Amostras tratadas com vitamina C e vitamina E

Adicionou-se a alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos tratados com antioxidante vitamina C e vitamina E, conforme item 4.2.3.3, solução de *terc*-butilhidroperóxido para concentração final de 2 mmoles/l. Homogeneizou-se as amostras através de aeração, com auxílio de pipeta micrométrica. Incubou-se as amostras por 30 min à temperatura ambiente.

4.2.4.3 Amostras Controle Tratadas com *terc*-Butilhidroperóxido (TBHP)

Adicionou-se a alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos, *terc*-butilhidroperóxido para a concentração final de 2 mmoles/l. Homogeneizou-se as amostras através de aeração, com auxílio de pipeta micrométrica. Incubou-se as amostras por 30 min à temperatura ambiente.

4.2.5 Contagem de Corpos de Heinz

A contagem de corpos de Heinz foi realizada segundo a técnica de BEUTLER et al. (1955), modificado por CLARO et al (1998).

Das soluções obtidas no item 4.2.4, utilizou-se 25 μ l e adicionou-se a estas 0,5 ml de tampão fosfato 67 mmoles/l, pH 7,4, com glicose 200 mg/dl, composto por 1,3 partes de KH_2PO_4 67 mmoles/l e 8,7 partes de Na_2HPO_4 67 mmoles/l. Homogeneizou-se por aeração, com auxílio de uma micropipeta. Sobre uma lâmina de microscopia, adicionou-se 20 μ l da mistura a 50 μ l de corante metil violeta (2 g de cristal violeta Carlo Erba em 100 ml de solução de NaCl 0,73g/dl). Após 5 min, observou-se a formação de corpos de Heinz ao microscópio de luz, considerando-se como positivos eritrócitos que apresentem mais de uma inclusão próxima à membrana ou livres no citoplasma. Segundo DACIE & LEWIS (1995), os corpos de Heinz são arredondados e, se corados por cristal violeta apresentam coloração azul violeta, medindo cerca de 1 a 3 μ m. Após a contagem de 1000 células, estabeleceu-se a porcentagem de eritrócitos contendo corpos de Heinz.

4.2.6 Determinação da Concentração da Metahemoglobina

A medida da concentração da metahemoglobina é realizada segundo o método de EVELYN & MALLOY (1938), modificado por BEUTLER et al (1995).

Em um tubo de ensaio adicionou-se 10 ml de tampão fosfato 16 mmoles/l e 100 µl de suspensão de eritrócitos, tratados com ou antioxidante(s) e/ou oxidantes. Realizou-se a homogeneização por inversão e, após 5 min, procedeu-se a leitura espectrofotométrica (A) em comprimento de onda de 630 nm (espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601), utilizando-se como branco, água destilada. Nessa primeira leitura, a absorvância corresponde à metahemoglobina e outras substâncias cromógenas para 630 nm.

Em seguida, adiciona-se 50 µl de uma solução de cianeto neutralizado (NaCN 10 g/dl e ácido acético 12 g/dl na proporção de 1:1). Após 5 min, homogeneizou-se, realizou-se nova leitura (B) a 630 nm, com água destilada como branco. Nessa etapa, a metahemoglobina desaparece.

Do tubo da leitura B retirou-se uma alíquota de 2 ml, que foi misturada a 8 ml de tampão fosfato 66 mmoles/l, pH 6,6. Após a homogeneização, a leitura (D) é realizada em 540 nm, usando-se como branco 10 ml de tampão fosfato 66 mmoles/l, pH 6,6 e adicionou-se 50 µl de solução NaCN 10 g/dl e 50 µl de solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 20 g/dl. Nessa etapa, estimou-se a concentração de hemoglobina total.

A concentração de metahemoglobina é expressa como uma porcentagem em relação à concentração total de hemoglobina, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{MetaHb} = \frac{(A-B) \times F}{D}$$

Onde:

MetaHb = metahemoglobina em %

F = Fator de correção determinado para cada espectrofotômetro

O valor de referência para indivíduos normais é de até 1%.

O F foi calculado utilizando-se sangue de 5 indivíduos considerados saudáveis. Adicionou-se 100 µl de sangue total a um tubo de ensaio contendo 10 ml de tampão fosfato 16 mmoles/l, juntou-se 50 µl de K₃[Fe(CN)₆] 20 g/dl. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 min, fez-se a leitura (A) em 630 nm (SHIMADZU UV 1601), utilizando-se água destilada como branco.

Em seguida, adicionou-se 50 µl de cianeto neutralizado. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 min, fez-se a leitura (B) em 630 nm, usando-se água destilada como branco.

Em outro tubo, contendo 8 ml de tampão fosfato 66 mmoles/l, adicionou-se 2 ml da mistura reativa anterior, 50 µl de K₃[Fe(CN)₆] 20 g/dl e 50 µl de solução de NaCN 10 g/dl. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 min, fez-se a leitura (D) em 540 nm, usando como branco uma mistura de tampão fosfato 66 mmoles/l, e 50 µl de K₃[Fe(CN)₆] 20 g/dl e 50 µl de solução de NaCN 10 g/dl.

Fez-se então, o cálculo do fator para cada amostra usando-se a fórmula abaixo:

$$F = 100 \times \frac{D}{A-B}$$

O F, que varia para cada espectrofotômetro utilizado, é a média dos fatores obtidos para as 5 amostras de sangue utilizada.

4.2.7 Determinação Espectrofotométrica da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH):

A determinação da concentração de GSH foi realizada pelo método preconizado por BEUTLER et al. (1963).

4.2.7.1 Preparo do hemolisado

Em um tubo de ensaio hemolisou-se 200 μ l de suspensão de eritrócitos em 2 ml de água destilada.

4.2.7.2 Dosagem da concentração de hemoglobina

Adicionou-se uma alíquota de 200 μ l de hemolisado a 10 ml de reativo de Drabkin (DACIE; LEWIS 1995) para se estimar a concentração de hemoglobina da amostra, utilizando-se como padrão um sangue com concentração de hemoglobina conhecida, na diluição usual de 1:251. Procedeu-se a leitura a 540 nm, em espectrofotômetro (SHIMADZU UV 1601).

4.2.7.3 Dosagem da concentração de GSH:

Em seguida, adicionou-se 2 ml do hemolisado a 3 ml de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de EDTA dissódico e 30 g de NaCl em 100 ml de água destilada). Após 5 min, realizou-se a filtração em papel filtro qualitativo.

Adicionou-se uma alíquota de 1 ml do filtrado obtido a uma solução de Na_2HPO_4 300 mmoles/l. Após a homogeneização, procedeu-se a leitura espectrofotométrica (SHIMADZU UV 1601) a 412 nm (A1). Logo depois, adicionou-se 1 ml de solução de 5,5 ditiobis - DTNB (ácido 2-dinitrobenzóico) (Sigma Chemical Co. D-8130) em 100 ml de ácido cítrico 1g/dl ao tubo com a amostra e ao branco. Após nova homogeneização, realizou-se nova leitura em 412 nm (A2).

4.2.7.4 Cálculos e valores de referência

A concentração (C) de GSH é expressa em μ moles (micromoles) de GSH por grama de hemoglobina, de acordo com a fórmula:

$$\frac{C}{1000} = \frac{(A_2 - A_1) \times E_1}{13,6} \times \frac{11}{2} \times \frac{5}{2} \times \frac{100}{Hb}$$

Para simplificar a fórmula acima, obteve-se o valor numérico 101 através de cálculos entre os valores de diluições da amostra e o coeficiente de extinção molar (13,6 moles / l / cm):

$$C = \frac{(A_2 - A_1) \times E_1 \times 101}{Hb}$$

Onde:

Hb = concentração de hemoglobina da amostra

E₁ = fator de correção para o coeficiente de extinção de extinção molar

(13,6 l/(moles x cm) do ânion amarelo produzido quando a GSH interage com DTNB.

O fator de correção é usado quando o espectrofotômetro possui amplitude de onda maior que 6 nm, o que acarreta uma diminuição no coeficiente de extinção molar. O espectrofotômetro pode ser calibrado por comparação do valor de extinção no sistema teste (D₂) com aquele obtido no espectrofotômetro com amplitude de onda menor que 6 nm a 412 (D₁). O fator de correção derivado, E₁, é dado por D₁ / D₂ e é constante para o espectrofotômetro utilizado.

No caso do espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601 não houve a necessidade de calcular o fator de correção, pois o aparelho não possui amplitude de onda maior que 6 nm. O valor usado para E₁, então, foi igual a 1.

Os valores de referência em adultos normais são de 6,57 ± 1,04 μmoles/g de Hb (BEUTLER, 1984).

4.2.8 Determinação das Porcentagens de Hemólise

Determinou-se a concentração de hemoglobina extracelular no sobrenadante das suspensões de eritrócitos tratados com vitamina C, com vitamina C e vitamina E + *terc*-butilhidroperóxido e somente com *terc*-butilhidroperóxido de acordo com os itens 4.2.3.1, 4.2.4 e 4.2.4.1. respectivamente, pelo método do cianometahemoglobina adaptado para pequenas concentrações (PELLISSARI et al., 1993). As diluições do sobrenadante em reagentes de Drabkin variaram de acordo com o grau de hemólise observado visualmente em relação à faixa de sensibilidade do método. Assim, na ausência de coloração rósea visível, a diluição foi de 1:3; para coloração de rósea tênue, foi de 1:15; para coloração levemente avermelhada, de 1:50; para coloração avermelhada, de 1:95; e vermelho intenso, de 1:110. Utilizou-se a fórmula abaixo para o cálculo da hemoglobina extracelular:

$$Hb e = \frac{A \times \text{Diluição}}{5,68}$$

Onde:

Hb e = Concentração de hemoglobina extracelular em g/dl;

A = Absorbância em 540 nm;

5,68 = Constante de proporcionalidade

Calcularam-se as porcentagens de hemólise segundo HÖGMAN et al. (1981), pela fórmula:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{100 - Ht \times Hb e}{Hb}$$

Onde:

Ht = hematócrito em %

Hb e = Concentração de hemoglobina extracelular em g/dl

Hb = Concentração de hemoglobina na suspensão de eritrócitos

4.2.9 Determinação da Atividade de Enzimas do Sistema Antioxidante Eritrocitário

4.2.9.1 Preparo de hemolisados

Adicionou-se 0,1 ml da suspensão de eritrócitos a 1,9 ml de solução hemolisante EDTA- β -mercaptoetanol (BEUTLER, 1984), homogeneizando-se por agitação. Em seguida, procedeu-se o ciclo congelamento-degelo à temperatura de -20 °C durante 5 min, seguido de fusão a temperatura ambiente por mais 5 min, repetindo-se o processo duas vezes consecutivas. O hemolisado obtido foi conservado à temperatura de 4 °C para posterior utilização.

4.2.9.2 Dosagem da hemoglobina do hemolisado

Adicionou-se 200 μ l do hemolisado a 10 ml de reativo de Drabkin (VAN KAMPEN; ZIJLSTRA, 1961) para a estimacão da hemoglobina da amostra, utilizando-se como padrão um sangue com a concentraçã de hemoglobina conhecida (padrã de hemoglobina), na diluiçã usual de 1:251. Procedeu-se a leitura a 540 nm, em espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601.

Determinou-se a concentraçã de hemoglobina de alíquotas dos hemolisados através de dosagem espectrofotométrica pelo método da cianometahemoglobina (PELISSARI et al, 1993)

4.2.9.3 Determinação da Atividade Enzimática de Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6-PD).

A determinação da atividade desta enzima seguirá o seguinte protocolo:

REAGENTE	QUANTIDADE (μL)
Tris -HCl-EDTA 0,5 mol/l pH 8,0	100
MgCl ₂ 0,1mol/l	100
NADP 2 mmoles/l	100
Hemolisado 1:20	20
H ₂ O	680

Incubou-se por 10 min a 37⁰C.

G6-P 6 mmoles/l	100
-----------------	-----

FONTE: BEUTLER, 1984

Tipo: Cinética com Fator

Unidade: UI / g de hemoglobina.

Comprimento de onda: 340 nm

Tempo de intervalo: 60 s

Número de intervalos: 3 intervalos

Tipo de reação: Crescente

Temperatura: 37 °C

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta A \times 10^5}{6,22 \times 20 \times \text{Hb}}$$

Onde:

ΔA = variação de absorbância média por minuto

10^5 = diluição

6,22 = coeficiente de absorvidade molar do NADPH

20 = volume de reação

Hb = concentração de hemoglobina do hemolisado em gramas por decilitro.

Valor de Referência: 12,1 ± 2,09 UI / g de Hemoglobina

4.2.9.4 Determinação de Atividade Enzimática de Glutathiona Redutase (GR)

A determinação da atividade desta enzima será segundo o protocolo abaixo:

REAGENTE	QUANTIDADE(μl)
Tris-HCl-EDTA 1 mol/l pH 8,0	50
Hemolisado 1:20	10
H ₂ O	790

Incubou-se a 37°C por 10 min

GSSG 33 mmoles/l	100
------------------	-----

Incubou-se a 37°C por 10 min

NADPH 2 mmoles/l	50
------------------	----

FONTE: BEUTLER, 1984

Tipo: Cinética com Fator

Unidade: UI.g⁻¹ de hemoglobina.

Comprimento de onda: 340 nm

Tempo de intervalo: 60 seg

Número de intervalos: 3 intervalos

Tipo de reação: Decrescente

Temperatura: 37 °C

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta A \times 10^5}{6,22 \times 10 \times \text{Hb}}$$

Onde:

Δ D.O = variação de absorbância média por minuto

10⁵ = diluição

6,22 = coeficiente de absorvidade molar do NADPH

10 = volume de reação

Hb = concentração de hemoglobina do hemolisado em gramas por decilitro.

Valor de Referência: 7,18 ± 1,09 UI / g de Hemoglobina

4.2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA, dois critérios) seguida do teste de Tukey para a comparação de pares de médias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

A Figura 5 mostra a formação de corpos de Heinz (%) em suspensões de eritrócitos humanos AA, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias.

A Figura 5A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. Fica evidenciada a ação oxidante do TBHP em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando-se valores de até 30% de formação de corpos de Heinz.

Para se analisar o efeito protetor das vitaminas C e E sobre a formação de corpos de Heinz foi selecionada a concentração de 2 mmoles/l de TBHP, na qual foi observada a formação de cerca de 4 - 7% desses corpúsculos.

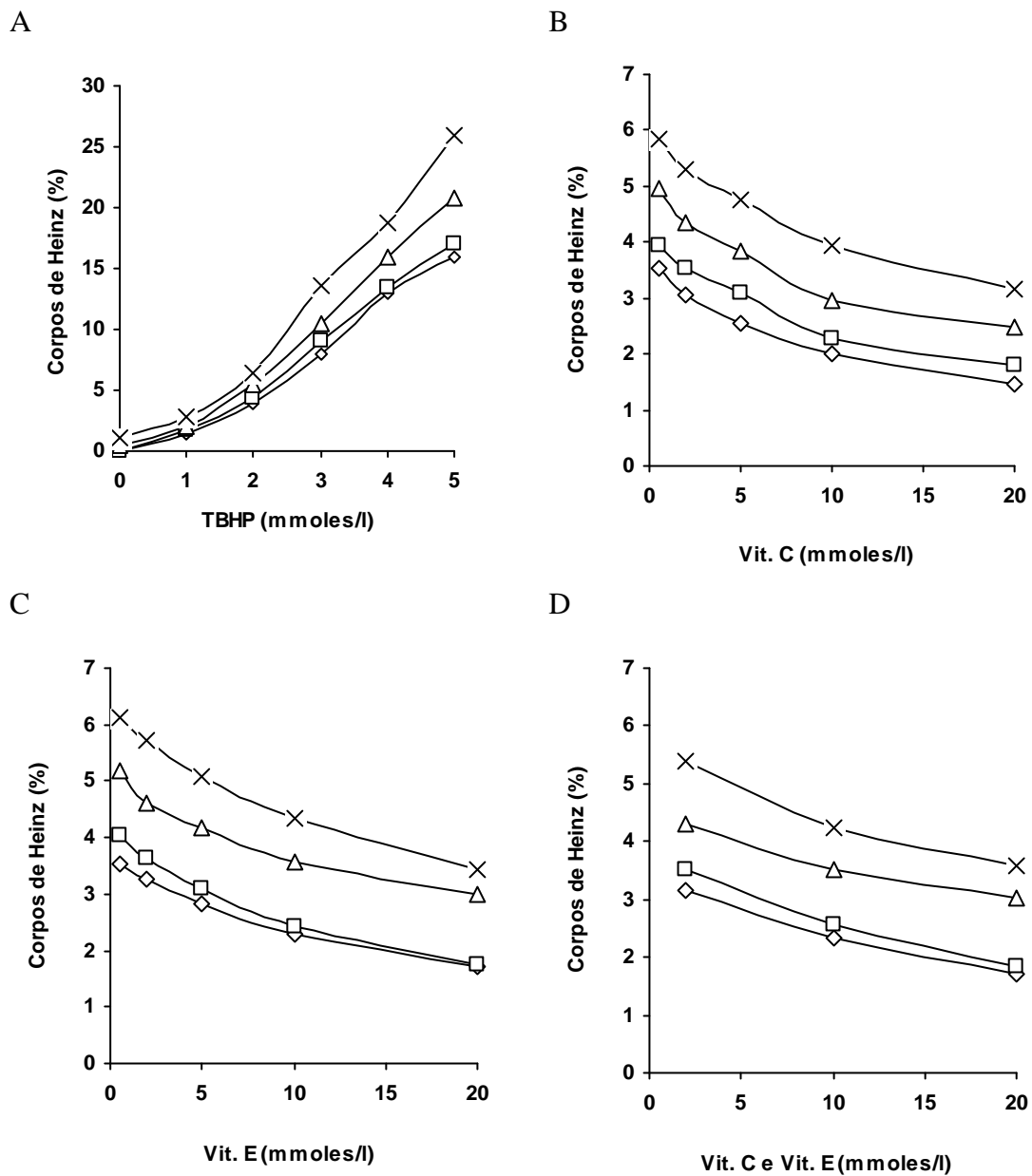
A Figura 5B representa a formação de corpos de Heinz na presença de vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se uma diminuição de corpos de Heinz em função da concentração da vitamina C e do tempo de armazenamento após o 14° dia.

A Figura 5C apresenta a formação de corpos de Heinz após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se uma diminuição de corpos de Heinz em função da concentração da vitamina E e do tempo de armazenamento após o 14° dia.

A Figura 5D apresenta formação de corpos de Heinz após incubação com as vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina. Observou-se uma diminuição de corpos de Heinz em função da concentração das vitaminas e do tempo de armazenamento após o 14° dia.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo de corpos de Heinz apresentados na Figura 5 estão listados na Tabela 1.

FIGURA 5. FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AA – Eritrócitos humanos normais contendo hemoglobina A.

TABELA 1 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	CH (%)	dp
0	0	0,00	0,00
	14	0,04	0,14
	28	0,42	0,25
	42	1,02	0,22
1	0	1,48	0,54
	14	1,67	0,51
	28	2,11	0,77
	42	2,84	0,96
2	0	3,85	1,16
	14	4,33	1,09
	28	5,54	1,29
	42	6,48	1,50
3	0	8,01	1,20
	14	9,04	1,01
	28	10,54	1,63
	42	13,58	2,15
4	0	12,92	1,82
	14	13,43	1,31
	28	15,91	1,93
	42	18,71	1,95
5	0	15,98	1,34
	14	17,06	1,34
	28	20,75	2,11
	42	25,93	2,20

Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	CH (%)	dp
1	0	3,53	0,99
	14	3,92	0,95
	28	4,96	1,15
	42	5,85	1,42
2	0	3,06	1,03
	14	3,53	0,81
	28	4,33	1,13
	42	5,31	1,36
5	0	2,54	0,85
	14	3,09	0,79
	28	3,84	1,02
	42	4,77	1,44
10	0	1,99	0,76
	14	2,28	0,65
	28	2,95	0,91
	42	3,95	1,16
20	0	1,48	0,70
	14	1,82	0,49
	28	2,49	0,94
	42	3,17	1,03

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	CH (%)	dp
1	0	3,53	0,89
	14	4,03	1,22
	28	5,17	1,20
	42	6,14	1,41
2	0	3,25	0,95
	14	3,63	1,02
	28	4,62	1,21
	42	5,72	1,34
5	0	2,84	0,86
	14	3,10	0,84
	28	4,18	1,13
	42	5,07	1,21
10	0	2,28	0,82
	14	2,43	0,73
	28	3,58	1,12
	42	4,32	1,17
20	0	1,72	0,93
	14	1,77	0,60
	28	3,00	0,99
	42	3,44	1,07

Vit.C e E (mmoles/l)	Tempo (dias)	CH (%)	dp
2	0	3,15	0,88
	14	3,52	0,82
	28	4,30	1,01
	42	5,38	1,27
10	0	2,33	0,74
	14	2,56	0,59
	28	3,51	0,88
	42	4,25	1,14
20	0	1,71	0,81
	14	1,84	0,51
	28	3,02	0,89
	42	3,58	1,15

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; CH – corpos de Heinz. dp – desvio padrão. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A

A Figura 6 mostra a formação de metahemoglobina (%) em suspensões de eritrócitos humanos AA, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, e armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias.

A Figura 6A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. Fica evidenciada a ação oxidante do TBHP em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando-se valores próximos de 30% de formação de metahemoglobina.

Para os estudos de formação de metahemoglobina foi selecionada a concentração de 2 mmoles/l de TBHP, na qual foi observada a formação de cerca de 3 - 6% de hemoglobina oxidada, a fim de se analisar o efeito protetor das vitaminas C e E.

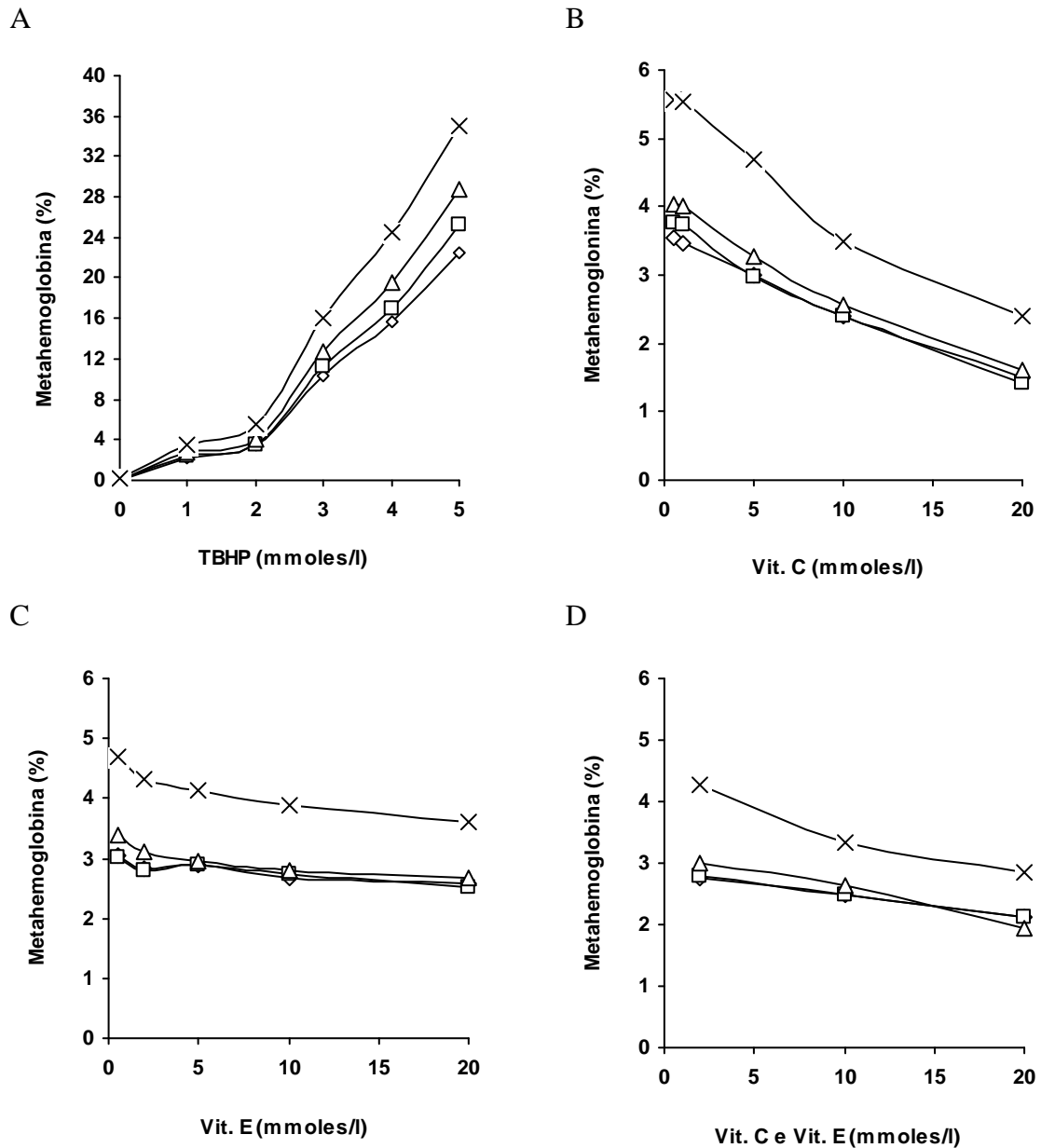
A Figura 6B representa a formação de metahemoglobina na presença de vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se uma diminuição de metahemoglobina em função da concentração da vitamina C. Com relação ao tempo de armazenamento, foi observada diferença apenas após o 28º dia.

A Figura 6C apresenta a formação de metahemoglobina após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se uma diminuição de metahemoglobina em função da concentração da vitamina E. Com relação ao tempo de armazenamento, foi observada diferença apenas após o 28º dia.

A Figura 6D apresenta formação de metahemoglobina após incubação com as vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina. Observou-se uma diminuição de metahemoglobina em função da concentração das vitaminas. Com relação ao tempo de armazenamento, foi observado diferença apenas após o 28º dia.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo de metahemoglobina apresentados na Figura 6 estão listados na Tabela 2.

FIGURA 6. CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A

TABELA 2 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 IAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	Metahemoglobina (%)	dp	Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	Metahemoglobina (%)	dp
0	0	0,00	0,00	1	0	3,55	0,18
	14	0,00	0,00		14	3,77	0,37
	28	0,03	0,08		28	4,04	0,30
	42	0,10	0,23		42	5,57	0,77
1	0	2,15	0,58	2	0	3,46	0,15
	14	2,41	0,72		14	3,73	0,34
	28	2,70	0,68		28	4,01	0,18
	42	3,57	0,64		42	5,53	0,79
2	0	3,41	0,21	5	0	2,99	0,16
	14	3,55	0,25		14	2,97	0,25
	28	4,12	0,26		28	3,27	0,31
	42	5,51	0,62		42	4,68	0,61
3	0	10,25	0,83	10	0	2,41	0,16
	14	11,17	0,89		14	2,40	0,23
	28	12,78	1,87		28	2,55	0,30
	42	15,95	2,16		42	3,49	0,59
4	0	15,58	1,65	20	0	1,49	0,24
	14	17,04	2,43		14	1,43	0,31
	28	19,51	3,16		28	1,61	0,32
	42	24,53	3,40		42	2,41	0,39
5	0	22,57	1,90				
	14	25,33	2,71				
	28	28,76	3,61				
	42	35,00	2,88				

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	Metahemoglobina (%)	dp	Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	Metahemoglobina (%)	dp
1	0	3,05	0,26	2	0	2,75	0,45
	14	3,02	0,35		14	2,77	0,53
	28	3,38	0,30		28	3,01	0,48
	42	4,68	0,68		42	4,27	0,73
2	0	2,82	0,34	10	0	2,50	0,36
	14	2,79	0,44		14	2,49	0,45
	28	3,12	0,30		28	2,63	0,52
	42	4,33	0,72		42	3,34	0,45
5	0	2,88	0,30	20	0	2,11	0,41
	14	2,89	0,37		14	2,11	0,33
	28	2,95	0,43		28	1,95	0,59
	42	4,14	0,50		42	2,85	0,42
10	0	2,68	0,28				
	14	2,75	0,32				
	28	2,81	0,40				
	42	3,88	0,44				
20	0	2,59	0,25				
	14	2,51	0,30				
	28	2,67	0,49				
	42	3,62	0,36				

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; dp – desvio padrão. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A

A Figura 7 mostra as concentrações de glutathiona reduzida (GSH, $\mu\text{moles/g}$ de Hb) em suspensões de eritrócitos humanos AA tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias.

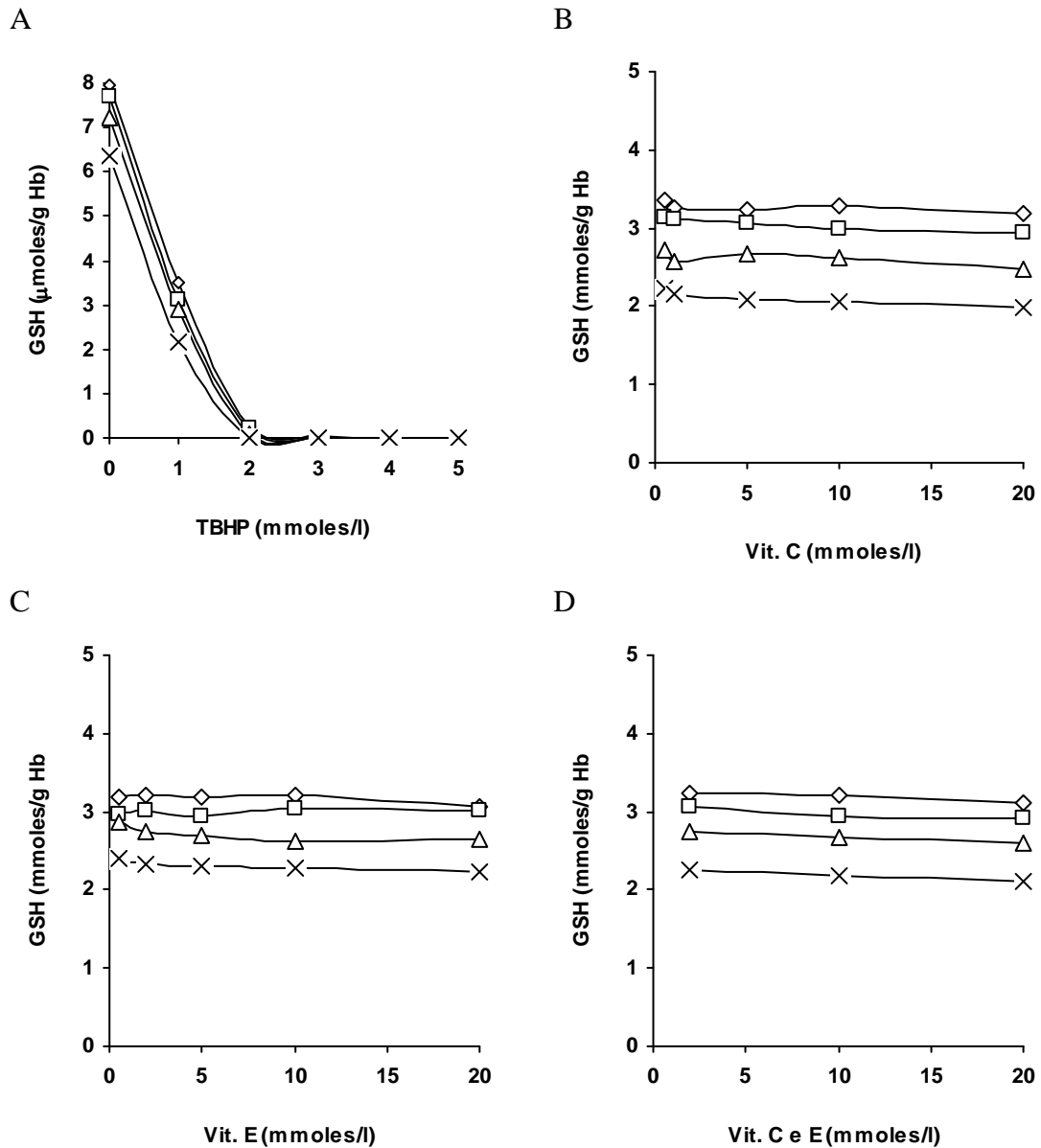
A Figura 7A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l . A ação oxidante do TBHP fica evidenciada em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando-se valores desde 8 até 0 $\mu\text{moles/g}$ de Hb de GSH.

Para a análise do efeito protetor das vitaminas C e E sobre a concentração de GSH, foi selecionada a concentração de 1 mmol/l de TBHP, na qual foram observados valores de GSH com cerca de 2 – 4 $\mu\text{moles/g}$ de Hb.

A Figura 7B, 7C e 7D apresentam a concentração de GSH após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l , e vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l e vitamina C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina, respectivamente. Não se observou nenhuma ação protetora das vitamina C ou E em função da concentração ou do tempo de armazenamento.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo de GSH apresentados na Figura 7 estão listados na Tabela 3.

FIGURA 7. CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 1 mmol/l. Tempos: \diamond - zero; \square - 14 dias; \triangle - 28 dias; \times - 42 dias; GSH – glutationa reduzida. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A.

TABELA 3 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	GSH (μmoles/g Hb)	dp	Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	GSH (μmoles/g Hb)	dp
0	0	7,95	0,27	1	0	3,36	0,21
	14	7,72	0,27		14	3,14	0,14
	28	7,24	0,38		28	2,71	0,17
	42	6,36	0,91		42	2,22	0,41
1	0	3,48	0,38	2	0	3,26	0,18
	14	3,12	0,23		14	3,11	0,13
	28	2,88	0,22		28	2,58	0,19
	42	2,17	0,29		42	2,16	0,44
2	0	0,25	0,24	5	0	3,24	0,22
	14	0,21	0,21		14	3,08	0,11
	28	0,08	0,09		28	2,68	0,23
	42	0,00	0,00		42	2,08	0,41
3	0	0,04	0,07	10	0	3,28	0,19
	14	0,00	0,00		14	2,99	0,08
	28	0,00	0,00		28	2,61	0,29
	42	0,00	0,00		42	2,07	0,33
4	0	0,00	0,00	20	0	3,18	0,28
	14	0,00	0,00		14	2,93	0,12
	28	0,00	0,00		28	2,47	0,31
	42	0,00	0,00		42	1,98	0,31
5	0	0,00	0,00				
	14	0,00	0,00				
	28	0,00	0,00				
	42	0,00	0,00				
Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	GSH (μmoles/g Hb)	dp	Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	GSH (μmoles/g Hb)	dp
1	0	3,19	0,22	2	0	3,23	0,30
	14	2,97	0,12		14	3,06	0,17
	28	2,86	0,20		28	2,75	0,24
	42	2,39	0,34		42	2,26	0,17
2	0	3,21	0,23	10	0	3,21	0,22
	14	3,02	0,16		14	2,94	0,20
	28	2,74	0,19		28	2,68	0,31
	42	2,33	0,36		42	2,17	0,14
5	0	3,18	0,27	20	0	3,11	0,29
	14	2,93	0,16		14	2,92	0,23
	28	2,69	0,24		28	2,59	0,28
	42	2,30	0,37		42	2,11	0,11
10	0	3,21	0,19				
	14	3,03	0,14				
	28	2,62	0,33				
	42	2,28	0,37				
20	0	3,06	0,17				
	14	3,02	0,23				
	28	2,64	0,23				
	42	2,23	0,37				

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; GSH – glutatona reduzida; dp – desvio padrão. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A

As atividades enzimáticas da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD), (UI/g de Hb) em eritrócitos humanos AA, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias, estão apresentadas na Figura 8.

A Figura 8A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A ação oxidante do TBHP fica evidenciada em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando-se valores desde 13 até 4 UI/g de Hb de G6-PD.

Para os estudos da atividade da G6-PD e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 5 mmoles/l de TBHP, na qual foi observada atividade desta enzima de 4 – 6 UI/g de Hb.

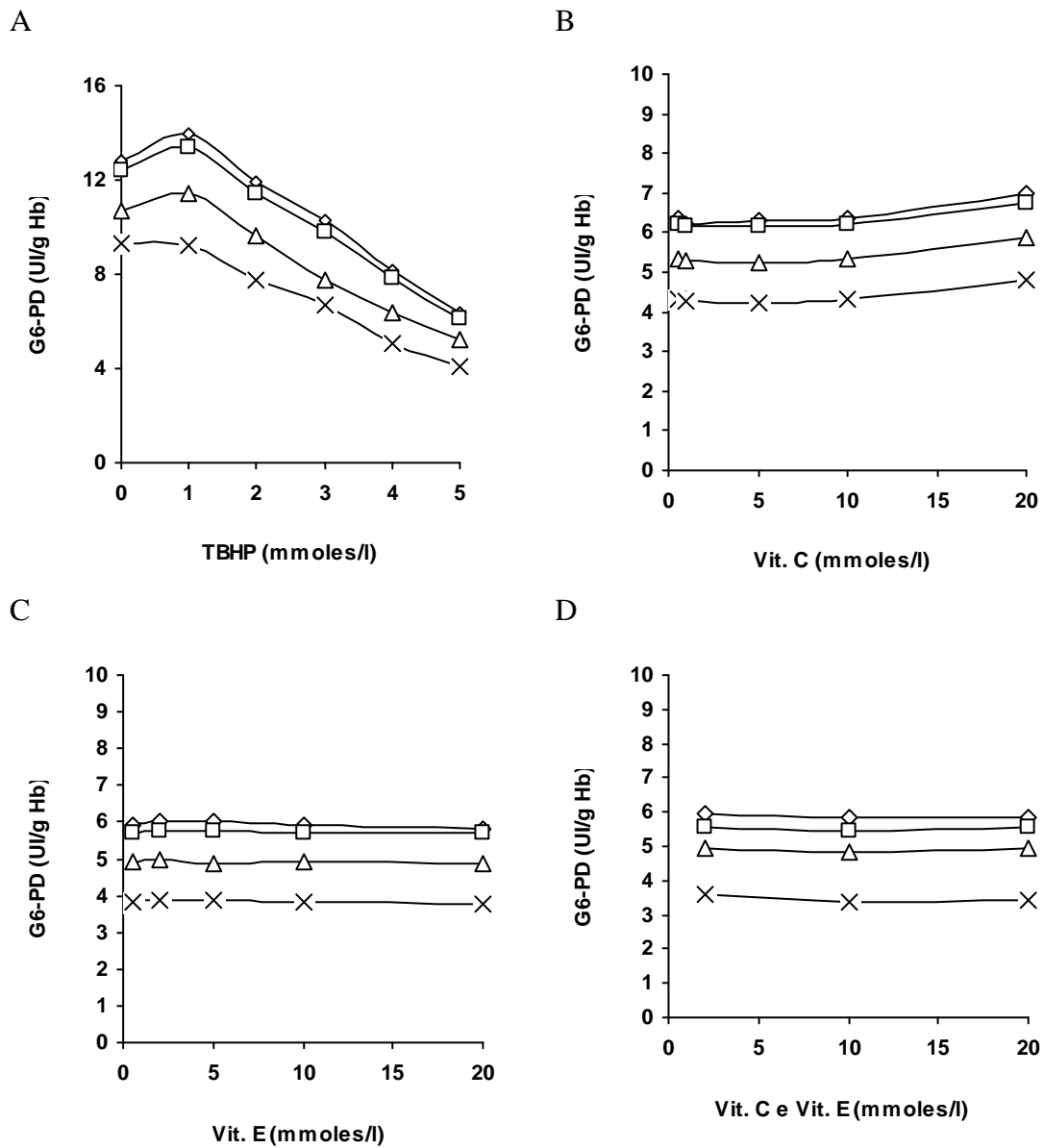
A Figura 8B apresenta a atividade da G6-PD após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Não se observou nenhuma ação protetora da vitamina C em função da concentração ou do tempo de armazenamento.

A Figura 8C apresenta a atividade da G6-PD após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Não se observou nenhuma ação protetora da vitamina E em função da concentração ou do tempo de armazenamento.

A Figura 8D apresenta a atividade da G6-PD, após incubação com vitamina C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina. Não se observou nenhuma ação protetora das vitaminas C e E em função da concentração ou do tempo de armazenamento.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo da atividade de G6-PD apresentados na Figura 8 estão listados na Tabela 4.

FIGURA 8. ATIVIDADE DA ENZIMA GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6-PD) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 5 mmoles/l. Tempos: \diamond - zero; \square - 14 dias; \triangle - 28 dias; \times - 42 dias; G6-PD – glicose 6-fostato desidrogenase. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A.

TABELA 4 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA ATIVIDADE DA ENZIMA G6-PD EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	G6-PD (UI/g Hb)	dp	Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	G6-PD (UI/g Hb)	dp
0	0	12,78	0,42	1	0	6,36	0,19
	14	12,41	0,46		14	6,22	0,23
	28	10,70	0,44		28	5,35	0,58
	42	9,29	0,22		42	4,30	0,68
1	0	13,99	0,51	2	0	6,23	0,19
	14	13,37	0,53		14	6,19	0,24
	28	11,44	0,43		28	5,27	0,50
	42	9,22	0,86		42	4,29	0,53
2	0	11,88	0,44	5	0	6,29	0,21
	14	11,46	0,51		14	6,18	0,28
	28	9,67	0,69		28	5,22	0,55
	42	7,75	0,68		42	4,22	0,52
3	0	10,25	0,29	10	0	6,37	0,21
	14	9,82	0,46		14	6,22	0,22
	28	7,79	0,69		28	5,32	0,72
	42	6,69	0,49		42	4,31	0,49
4	0	8,14	0,81	20	0	6,97	0,48
	14	7,82	0,61		14	6,74	0,45
	28	6,34	0,77		28	5,87	0,97
	42	5,04	0,30		42	4,80	0,74
5	0	6,39	0,20				
	14	6,12	0,24				
	28	5,19	0,44				
	42	4,08	0,42				

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	G6-PD (UI/g Hb)	dp	Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	G6-PD (UI/g Hb)	dp
1	0	5,91	0,32	2	0	5,94	0,40
	14	5,69	0,41		14	5,58	0,41
	28	4,92	0,30		28	4,95	0,67
	42	3,82	0,39		42	3,60	0,75
2	0	6,04	0,37	10	0	5,82	0,41
	14	5,74	0,40		14	5,46	0,40
	28	4,96	0,65		28	4,83	0,43
	42	3,86	0,40		42	3,39	0,74
5	0	6,00	0,42	20	0	5,84	0,42
	14	5,77	0,39		14	5,54	0,60
	28	4,84	0,41		28	4,97	0,68
	42	3,87	0,41		42	3,44	0,77
10	0	5,91	0,32				
	14	5,69	0,41				
	28	4,92	0,30				
	42	3,82	0,39				
20	0	5,82	0,40				
	14	5,68	0,46				
	28	4,89	0,49				
	42	3,76	0,40				

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; G6-PD – glicose 6-fostato desidrogenase; dp – desvio padrão. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A.

A Figura 9 exhibe a atividade enzimática da glutathiona redutase (GR, UI/g de Hb) em suspensões de eritrócitos humanos AA, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias.

A Figura 9A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A ação oxidante do TBHP fica evidenciada em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando-se valores desde 8 até 4 UI/g de Hb de GR.

Para os estudos da atividade da GR e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 5 mmoles/l de TBHP, na qual foi observada atividade desta enzima de 5 – 6 UI/g de Hb.

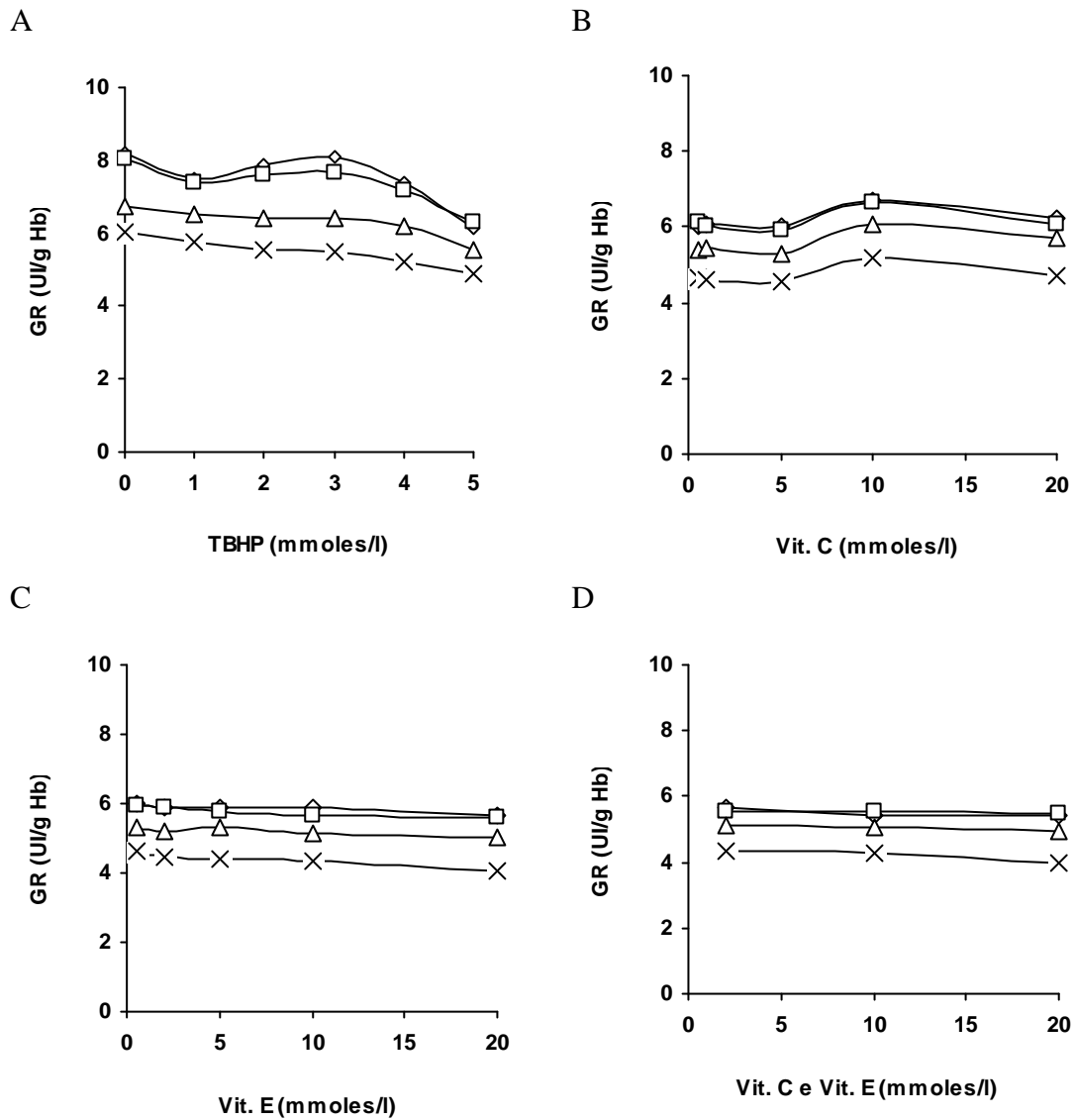
A Figura 9B apresenta a atividade da GR após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Não se observou nenhuma ação protetora da vitamina C em função da concentração ou do tempo de armazenamento.

A Figura 9C apresenta a atividade da GR após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Não se observou nenhuma ação protetora da vitamina E em função da concentração ou do tempo de armazenamento.

A Figura 9D apresenta a atividade da GR, após incubação com vitamina C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina. Não se observou nenhuma ação protetora das vitaminas C e E em função da concentração ou do tempo de armazenamento.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo da atividade de GR apresentados na Figura 9 estão listados na Tabela 5.

FIGURA 9. ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 5 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias; GR – glutathione redutase. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A.

TABELA 5 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA ATIVIDADE DA ENZIMA GR EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	GR (UI/g Hb)	dp	Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	GR (UI/g Hb)	dp
0	0	8,22	0,24	1	0	6,02	0,17
	5	5,94	0,15		14	6,11	0,37
	28	6,74	0,27		28	5,41	0,35
	42	6,01	0,17		42	4,68	0,75
1	0	7,48	0,55	2	0	6,07	0,18
	14	7,41	0,42		14	6,01	0,54
	28	6,51	0,42		28	5,43	0,43
	42	5,74	0,60		42	4,62	0,77
2	0	7,91	0,29	5	0	6,04	0,18
	14	7,58	0,27		14	5,91	0,48
	28	6,41	0,12		28	5,29	0,37
	42	5,53	0,70		42	4,55	0,81
3	0	8,09	0,12	10	0	6,69	0,17
	14	7,64	0,49		14	6,66	0,49
	28	6,40	0,33		28	6,08	0,44
	42	5,47	0,76		42	5,20	0,81
4	0	7,38	0,25	20	0	6,21	0,22
	14	7,16	0,41		14	6,06	0,52
	28	6,17	0,34		28	5,70	0,75
	42	5,24	0,65		42	4,73	0,93
5	0	6,13	0,16				
	14	6,30	0,44				
	28	5,57	0,40				
	42	4,89	0,67				

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	GR (UI/g Hb)	dp	Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	GR (UI/g Hb)	dp
1	0	6,01	0,20	2	0	5,69	0,41
	14	8,78	12,54		14	5,56	0,55
	28	5,34	0,57		28	5,12	0,38
	42	4,61	0,30		42	4,32	0,40
2	0	5,87	0,27	10	0	5,44	0,43
	14	5,87	0,27		14	5,56	0,50
	28	5,21	0,41		28	5,03	0,37
	42	4,44	0,41		42	4,25	0,49
5	0	5,91	0,33	20	0	5,43	0,40
	14	5,77	0,38		14	5,49	0,50
	28	5,29	0,37		28	4,97	0,38
	42	4,40	0,37		42	3,99	0,42
10	0	5,87	0,38				
	14	5,66	0,41				
	28	5,12	0,53				
	42	4,36	0,50				
20	0	5,63	0,35				
	14	5,61	0,50				
	28	5,04	0,41				
	42	4,06	0,32				

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; GR – glutatona redutase; dp – desvio padrão. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A.

Na Figura 10 estão apresentadas as porcentagens de hemólise (%) em suspensões de eritrócitos AA, tratados com vitamina C e vitamina E e submetidos à ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas em 0, 14, 28 e 42 dias de estocagem.

A Figura 10A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. Fica demonstrada a ação oxidante do TBHP em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando-se valores de até 3% de hemólise.

Para os estudos da hemólise e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 2 mmoles/l de TBHP, onde foi observada hemólise inferior a 1%.

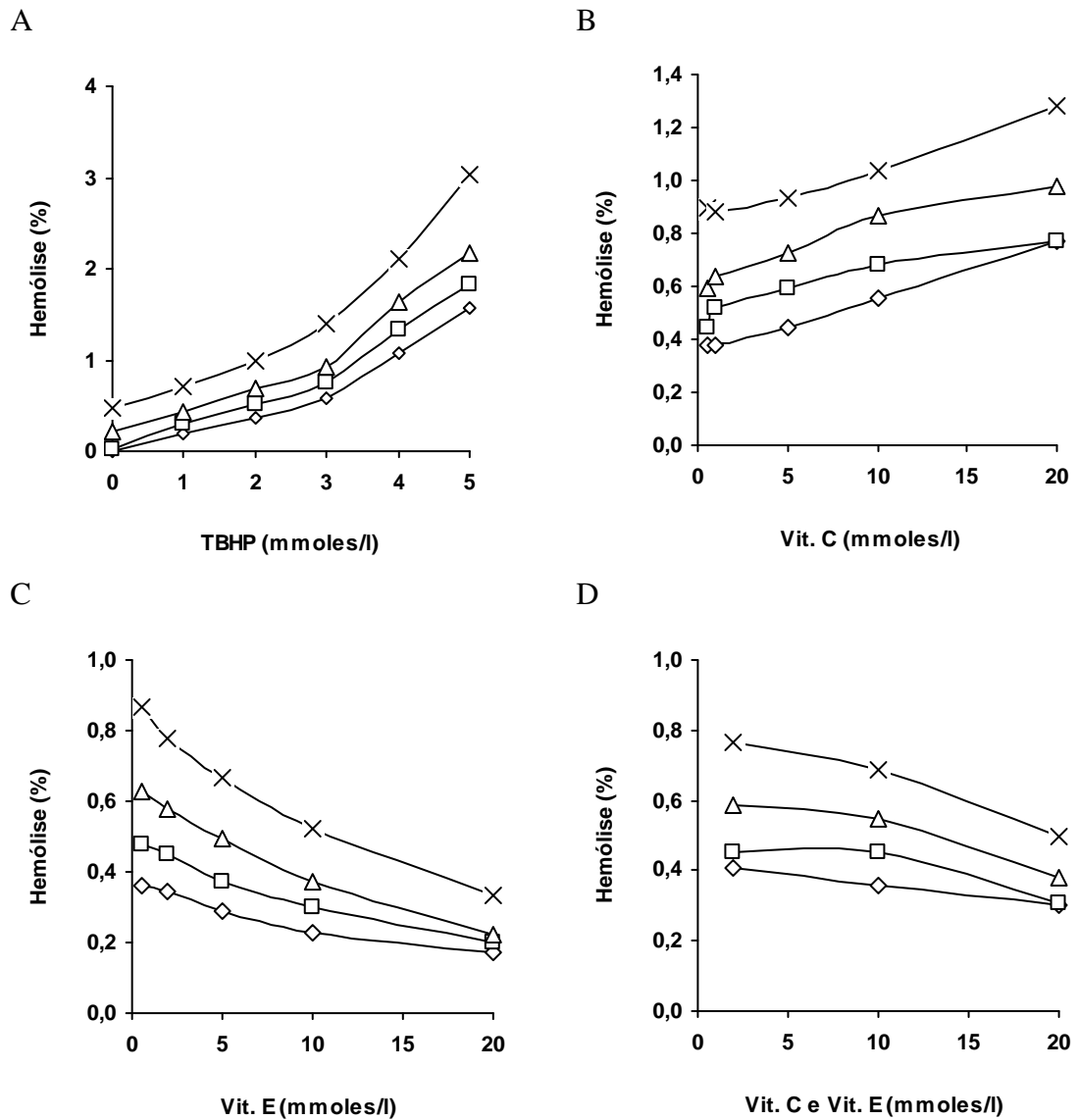
A Figura 10B apresenta as porcentagens de hemólise após a incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Não se observou nenhuma ação protetora da vitamina C e, ao contrário, sua ação foi pró-oxidante neste experimento.

A Figura 10C apresenta as porcentagens de hemólise após a incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se ação protetora da vitamina E em função da concentração desta vitamina e do tempo de armazenamento.

A Figura 10D mostra as porcentagens de hemólise após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se ação protetora da vitamina E em função da concentração desta vitamina e do tempo de armazenamento.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo da hemólise apresentados na Figura 10 estão listados na Tabela 6.

FIGURA 10. PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A.

TABELA 6 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS COM HEMOGLOBINA AA SUBMETIDOS À AÇÃO ANTIOXIDANTE DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE DE TBHP. AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	Hemólise (%)	dp	Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	Hemólise (%)	dp
0	0	0,00	0,00	1	0	0,38	0,06
	14	0,03	0,05		14	0,44	0,16
	28	0,22	0,09		28	0,59	0,13
	42	0,47	0,15		42	0,89	0,14
1	0	0,19	0,08	2	0	0,38	0,07
	14	0,31	0,12		14	0,52	0,15
	28	0,44	0,09		28	0,63	0,07
	42	0,70	0,13		42	0,88	0,12
2	0	0,36	0,11	5	0	0,44	0,09
	14	0,51	0,13		14	0,59	0,15
	28	0,69	0,14		28	0,73	0,09
	42	0,99	0,20		42	0,93	0,07
3	0	0,57	0,08	10	0	0,56	0,08
	14	0,75	0,11		14	0,67	0,12
	28	0,93	0,18		28	0,87	0,07
	42	1,40	0,29		42	1,04	0,11
4	0	1,07	0,15	20	0	0,77	0,10
	14	1,33	0,14		14	0,77	0,19
	28	1,63	0,21		28	0,98	0,11
	42	2,10	0,37		42	1,28	0,18
5	0	1,58	0,23				
	14	1,84	0,21				
	28	2,17	0,34				
	42	3,03	0,56				

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	Hemólise (%)	dp	Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	Hemólise (%)	dp
1	0	0,36	0,07	2	0	0,41	0,08
	14	0,48	0,14		14	0,46	0,13
	28	0,63	0,13		28	0,58	0,07
	42	0,87	0,11		42	0,76	0,13
2	0	0,34	0,08	10	0	0,36	0,07
	14	0,45	0,10		14	0,46	0,14
	28	0,58	0,08		28	0,55	0,05
	42	0,78	0,12		42	0,69	0,09
5	0	0,29	0,06	20	0	0,30	0,05
	14	0,37	0,08		14	0,31	0,09
	28	0,50	0,09		28	0,38	0,07
	42	0,67	0,12		42	0,50	0,08
10	0	0,23	0,05				
	14	0,30	0,08				
	28	0,37	0,06				
	42	0,52	0,10				
20	0	0,17	0,04				
	14	0,20	0,00				
	28	0,22	0,05				
	42	0,34	0,12				

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; dp – desvio padrão. AA – Eritrócitos humanos normais com hemoglobina A.

A Figura 11 mostra as porcentagens médias obtidas para a formação de corpos de Heinz (%) em suspensões de eritrócitos humanos AS, tratados com vitamina C e vitamina E e submetidos à ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas em 0, 14, 28 e 42 dias de estocagem.

A Figura 11A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. Fica evidenciada a ação oxidante do TBHP em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando valores de até 60% de formação de corpos de Heinz.

Para os estudos de formação de corpos de Heinz e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 2 mmoles/l de TBHP, na qual foi observada a formação de cerca de 5 - 17% desses corpúsculos.

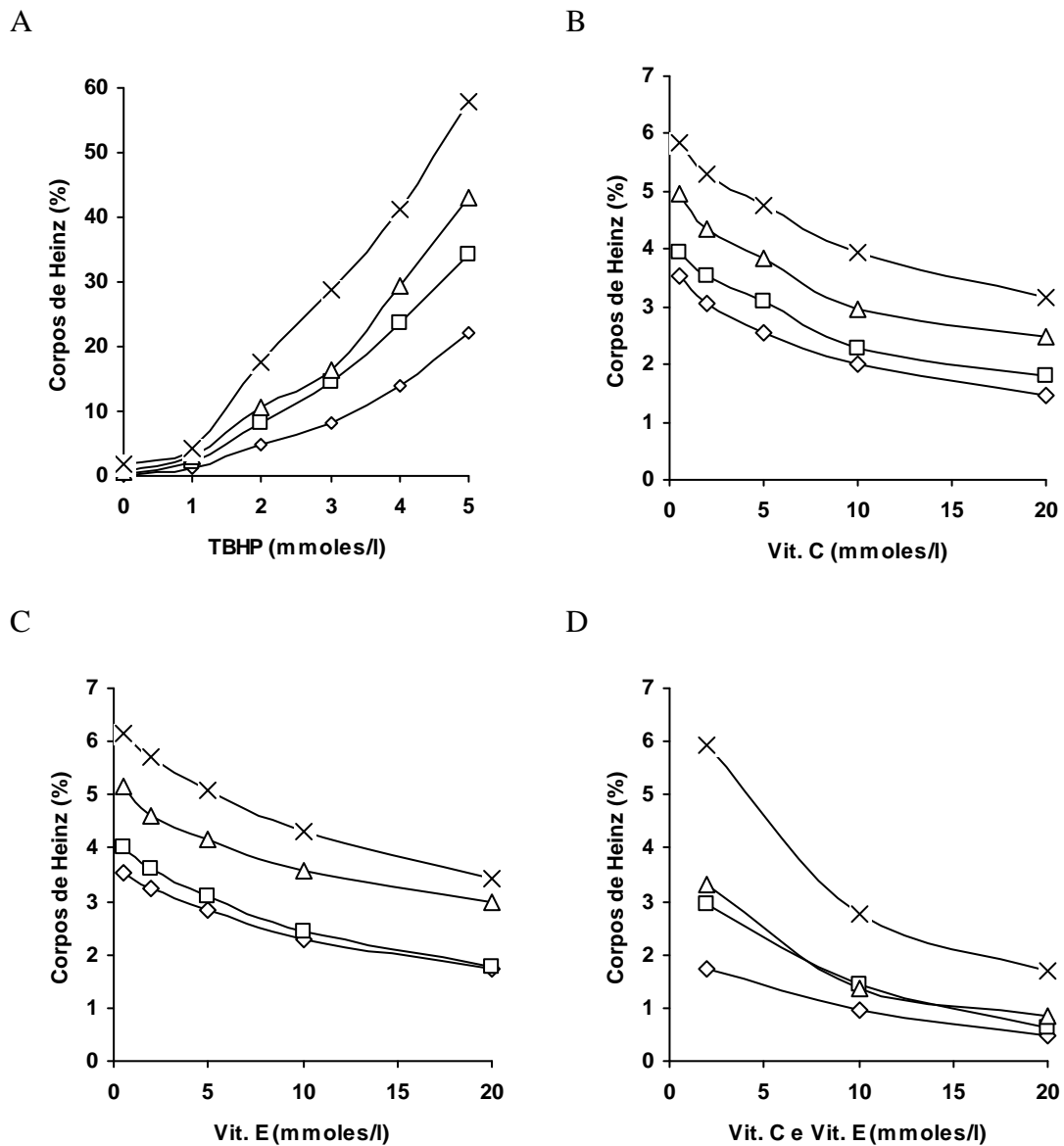
A Figura 11B representa a formação de corpos de Heinz após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se uma eficiente proteção da vitamina C, em todas as concentrações usadas, contra a indução da formação de corpos de Heinz pelo TBHP, diretamente proporcional à sua concentração. Foram observadas diferenças entre os dias de armazenamento após o 14° dia.

A Figura 11C apresenta a formação de corpos de Heinz após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se uma forte ação antioxidante da vitamina E, frente à indução da formação de corpos de Heinz pelo TBHP. Foi observado diferenças entre dias após o 14° dia.

A Figura 11D apresenta formação de corpos de Heinz após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina. Observa-se, pelos resultados obtidos, que a ação conjunta das vitaminas é levemente mais eficiente que suas ações isoladas, contra a formação de corpos de Heinz induzida pelo TBHP. Foi observado diferenças entre dias após o 28° dia de armazenamento.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo dos corpos de Heinz apresentados na Figura 11 estão listados na Tabela 7.

FIGURA 11. FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S

TABELA 7 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	CH (%)	dp
0	0	0,07	0,09
	14	0,25	0,23
	28	0,75	0,25
	42	1,74	0,51
1	0	1,30	0,38
	14	2,23	0,99
	28	2,99	0,95
	42	4,22	0,97
2	0	4,88	1,42
	14	8,15	4,57
	28	10,63	5,91
	42	17,47	9,15
3	0	8,21	2,16
	14	14,61	7,45
	28	16,44	6,88
	42	28,70	10,11
4	0	14,02	2,96
	14	23,69	7,64
	28	29,42	6,12
	42	41,10	8,59
5	0	22,17	4,29
	14	34,17	10,76
	28	42,93	8,65
	42	57,73	10,67

Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	CH (%)	dp
1	0	3,08	0,78
	14	5,23	2,27
	28	6,03	2,27
	42	10,49	4,96
2	0	2,06	0,79
	14	3,62	1,10
	28	4,28	1,21
	42	7,51	2,65
5	0	1,23	0,48
	14	2,38	0,98
	28	2,38	1,06
	42	4,18	1,11
10	0	0,90	0,29
	14	1,50	0,41
	28	1,55	0,76
	42	2,87	0,99
20	0	0,43	0,20
	14	0,82	0,28
	28	0,96	0,45
	42	1,88	0,82

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	CH (%)	dp
1	0	4,04	0,96
	14	6,15	3,16
	28	7,68	3,34
	42	13,59	6,16
2	0	2,56	0,70
	14	4,95	2,74
	28	5,80	2,78
	42	10,75	4,91
10	0	2,11	0,83
	14	4,10	2,52
	28	4,35	2,47
	42	8,34	4,91
20	0	1,39	0,44
	14	2,31	1,29
	28	2,52	1,45
	42	4,58	2,60

Vit.C e E (mmoles/l)	Tempo (dias)	CH (%)	dp
2	0	1,74	0,74
	14	2,95	1,00
	28	3,32	0,62
	42	5,93	1,75
10	0	0,95	0,40
	14	1,45	0,55
	28	1,35	0,37
	42	2,78	0,82
20	0	0,47	0,24
	14	0,63	0,21
	28	0,85	0,30
	42	1,68	0,57

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; CH – corpos de Heinz. dp – desvio padrão. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S

A Figura 12 exhibe as porcentagens médias de formação de metahemoglobina (%) em suspensões de eritrócitos humanos AS, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias.

A Figura 12A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. Fica evidenciada a ação oxidante do TBHP em função das concentrações e durante o tempo de armazenamento, observando-se valores de até 70% de formação de metahemoglobina.

Para os estudos de formação de metahemoglobina e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 2 mmoles/l de TBHP, na qual foi observada a formação de cerca de 20 - 40% de hemoglobina oxidada.

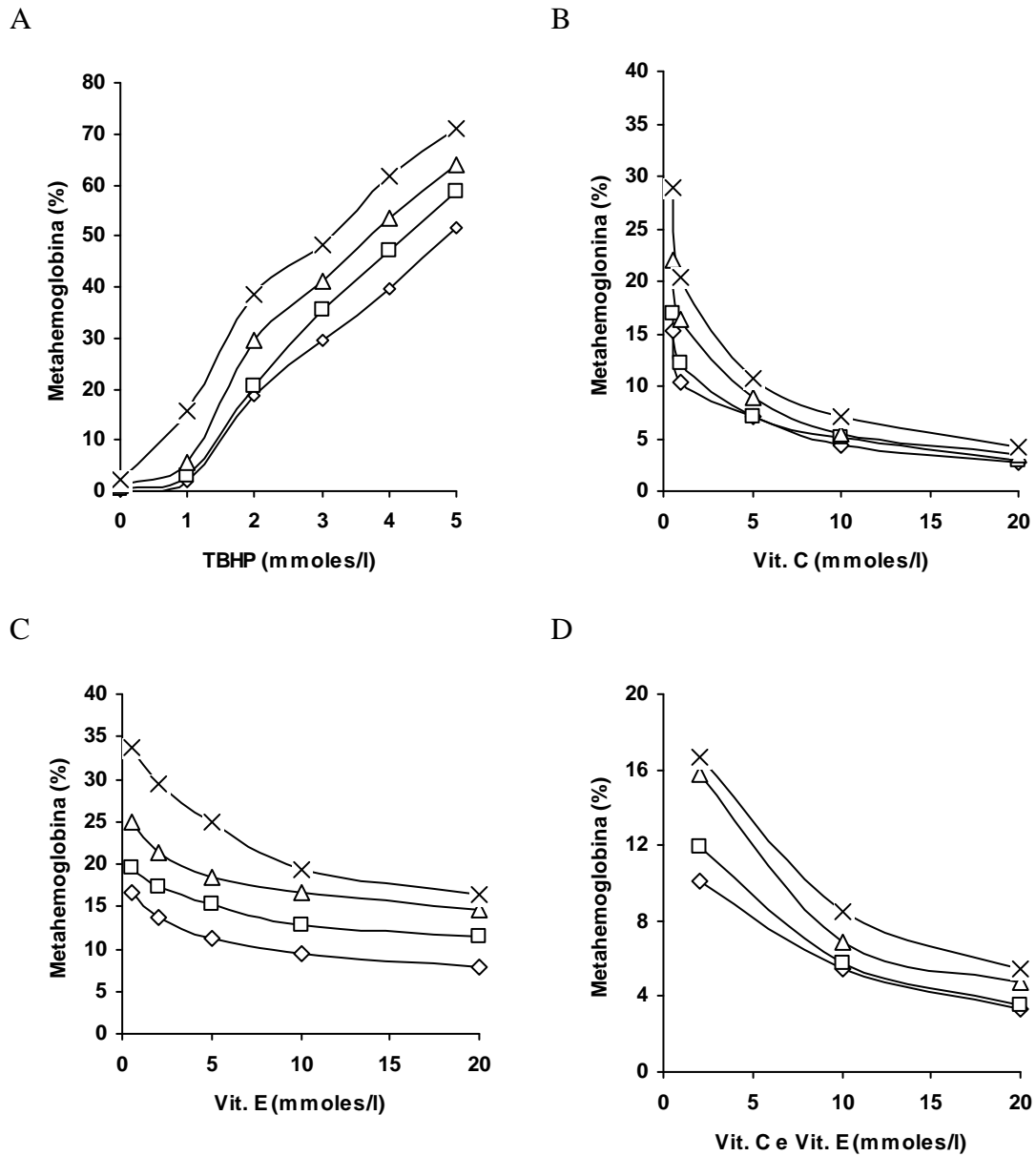
A Figura 12B representa a formação de metahemoglobina após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. A formação de metahemoglobina induzida pelo TBHP foi reduzida pela adição de vitamina C, em todas as concentrações.

A Figura 12C apresenta a formação de metahemoglobina após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se a ação protetora da vitamina E, pois também houve diminuição da formação de metahemoglobina induzida pelo oxidante TBHP.

A Figura 12D apresenta formação de metahemoglobina após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina. Os resultados mostram que a ação conjunta das vitaminas é levemente mais eficiente que suas ações isoladas, contra a formação de metahemoglobina induzida pelo TBHP.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo da formação de metahemoglobina apresentados na Figura 12 estão listados na Tabela 8.

FIGURA 12. CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; Δ - 28 dias; × - 42 dias. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

TABELA 8 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA A CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	Metahemoglobina (%)	dp
0	0	0,14	0,18
	14	0,35	0,27
	28	1,02	0,46
	42	2,29	0,71
1	0	1,83	0,43
	14	2,81	1,33
	28	5,66	1,90
	42	15,81	6,10
2	0	18,55	4,02
	14	20,43	5,63
	28	29,39	8,93
	42	38,62	9,29
3	0	29,39	5,00
	14	35,53	10,11
	28	40,94	9,03
	42	48,23	8,11
4	0	39,79	4,31
	14	46,96	10,88
	28	53,27	10,69
	42	61,86	10,63
5	0	51,62	6,87
	14	58,57	8,60
	28	63,95	7,73
	42	71,12	8,51

Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	Metahemoglobina (%)	dp
1	0	15,30	1,82
	14	16,96	3,34
	28	22,06	3,09
	42	28,86	3,70
2	0	10,33	1,36
	14	12,12	1,59
	28	16,40	3,40
	42	20,40	2,17
5	0	7,08	1,02
	14	7,09	0,84
	28	8,87	2,48
	42	10,66	3,28
10	0	4,31	0,53
	14	5,01	0,61
	28	5,39	1,06
	42	7,14	1,53
20	0	2,75	0,60
	14	2,89	0,41
	28	3,47	0,60
	42	4,27	0,74

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	Metahemoglobina (%)	dp
1	0	16,52	3,16
	14	19,58	5,65
	28	24,95	6,15
	42	33,61	6,59
2	0	13,64	3,46
	14	17,37	5,91
	28	21,45	6,53
	42	29,33	7,78
5	0	11,18	3,41
	14	15,34	6,44
	28	18,51	7,00
	42	25,01	8,12
10	0	9,46	3,65
	14	12,80	5,78
	28	16,62	7,57
	42	19,32	8,05
20	0	7,86	3,57
	14	11,48	7,03
	28	14,53	7,99
	42	16,51	8,34

Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	Metahemoglobina (%)	dp
2	0	10,08	3,05
	14	11,88	1,27
	28	15,78	4,66
	42	16,65	1,73
10	0	5,43	1,92
	14	5,79	1,71
	28	6,89	2,83
	42	8,53	1,97
20	0	3,33	1,16
	14	3,55	1,24
	28	4,72	2,14
	42	5,45	2,07

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; dp – desvio padrão. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

A Figura 13 apresenta as concentrações médias de glutathiona reduzida (GSH) em suspensões de eritrócitos humanos AS, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias.

A Figura 13A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. Fica notória a ação oxidante do TBHP em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando-se a extinção da detecção de GSH após 3 mmoles/l de TBHP.

Para os estudos de GSH e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 1 mmol/l de TBHP, na qual foi observada a concentração de cerca de 1 – 3 μ moles/g de Hb de GSH.

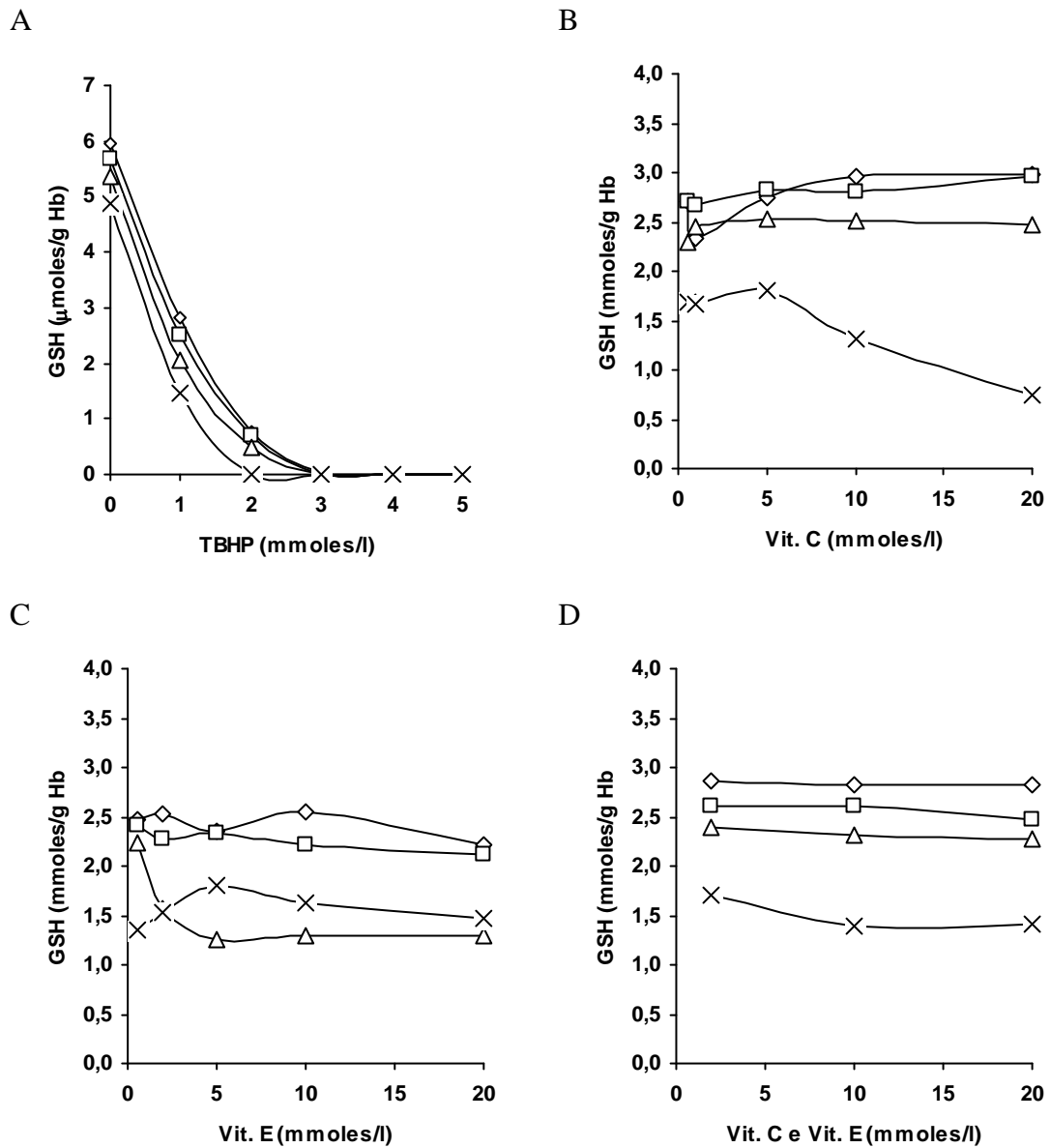
A Figura 13B representa a concentração de GSH após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Nas amostras tratadas com vitamina C, não se observou nenhuma ação antioxidante.

A Figura 13C apresenta a concentração de GSH após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Não se observou nenhuma ação antioxidante da vitamina E neste experimento.

A Figura 13D apresenta a concentração de GSH após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l. Não se observou nenhuma ação antioxidante das vitaminas C e E neste experimento.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo de GSH apresentados na Figura 13 estão listados na Tabela 9.

FIGURA 13. CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 moles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias; GSH – glutationa reduzida. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

TABELA 9 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	GSH (μmoles/g Hb)	dp	Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	GSH (μmoles/g Hb)	dp
0	0	5,96	0,51	1	0	2,71	3,42
	14	5,69	0,50		14	2,71	3,01
	28	5,35	0,37		28	2,30	1,65
	42	4,86	0,35		42	1,68	3,62
1	0	2,81	0,62	2	0	2,34	2,30
	14	2,50	0,71		14	2,67	2,87
	28	2,05	0,60		28	2,44	3,15
	42	1,48	0,41		42	1,67	2,92
2	0	0,77	0,62	5	0	2,74	3,51
	14	0,69	0,62		14	2,83	2,22
	28	0,50	0,44		28	2,54	2,38
	42	0,00	0,00		42	1,81	2,98
3	0	0,05	0,12	10	0	2,96	2,77
	14	0,00	0,00		14	2,81	1,18
	28	0,00	0,00		28	2,51	3,56
	42	0,00	0,00		42	1,32	3,44
4	0	0,00	0,00	20	0	2,99	2,55
	14	0,00	0,00		14	2,95	3,77
	28	0,00	0,00		28	2,48	2,97
	42	0,00	0,00		42	0,74	2,31
5	0	0,00	0,00				
	14	0,00	0,00				
	28	0,00	0,00				
	42	0,00	0,00				
Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	GSH (μmoles/g Hb)	dp	Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	GSH (μmoles/g Hb)	dp
1	0	2,46	0,27	2	0	2,85	0,24
	14	2,42	0,28		14	2,61	0,34
	28	2,23	0,18		28	2,39	0,32
	42	1,35	0,60		42	1,70	0,23
2	0	2,54	0,24	10	0	2,83	0,42
	14	2,28	0,16		14	2,62	0,37
	28	1,56	0,90		28	2,32	0,36
	42	1,53	0,38		42	1,40	0,30
5	0	2,35	0,21	20	0	2,82	0,59
	14	2,33	0,12		14	2,46	0,43
	28	1,25	0,95		28	2,27	0,33
	42	1,81	0,19		42	1,42	0,25
10	0	2,55	0,28				
	14	2,21	0,08				
	28	1,30	1,02				
	42	1,63	0,22				
20	0	2,22	0,19				
	14	2,12	0,11				
	28	1,30	0,99				
	42	1,48	0,24				

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; GSH – glutatona reduzida; dp – desvio padrão. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

Na Figura 14, verifica-se a atividade enzimática da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) (UI/g de Hb) em suspensões de eritrócitos humanos AS, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias.

A Figura 14A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A ação oxidante do TBHP pode ser observada em função do tempo e das concentrações de armazenamento, observando-se a diminuição da atividade enzimática de $17 - 1$ UI/g de Hb.

Para os estudos da atividade da G6-PD e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 5 mmoles/l de TBHP, onde foi observada queda na atividade desta enzima de $3 - 1$ UI/g de Hb.

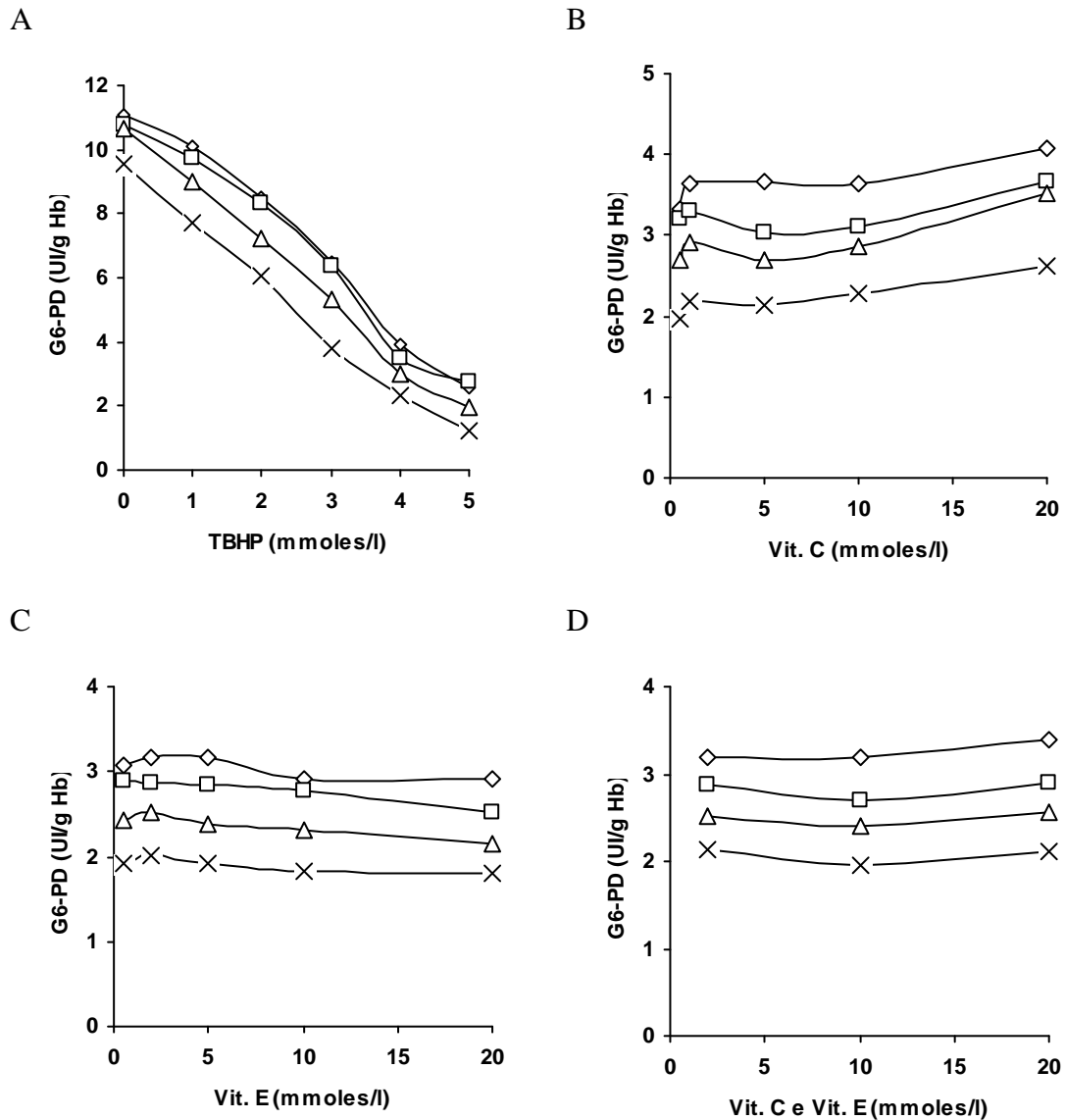
A Figura 14B apresenta a atividade enzimática da G6-PD após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se ação antioxidante da vitamina C neste experimento.

A Figura 14C apresenta a atividade enzimática G6-PD após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Não se observou nenhuma ação antioxidante da vitamina E neste experimento.

A Figura 14D apresenta a atividade enzimática G6-PD após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina. Não se observou nenhuma ação antioxidante das vitaminas C e E neste experimento.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo da G6-PD apresentados na Figura 14 estão listados na Tabela 10.

FIGURA 14. ATIVIDADE DA ENZIMA GLUCOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6-PD) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias; G6-PD – glicose 6-fostato desidrogenase. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

TABELA 10 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA ATIVIDADE DA G6-PD EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	G6-PD (UI/g Hb)	dp	Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	G6-PD (UI/g Hb)	dp
0	0	11,07	0,93	1	0	3,32	0,99
	14	10,78	0,82		14	3,21	0,84
	28	10,63	1,36		28	2,68	0,90
	42	9,53	1,15		42	1,98	0,87
1	0	10,13	0,68	2	0	3,64	0,85
	14	9,74	0,48		14	3,30	1,01
	28	9,02	0,49		28	2,92	0,95
	42	7,72	0,40		42	2,18	0,92
2	0	8,48	0,89	5	0	3,67	0,88
	14	8,31	0,95		14	3,03	0,86
	28	7,20	1,47		28	2,70	0,84
	42	6,06	0,87		42	2,14	0,95
3	0	6,51	1,21	10	0	3,64	0,91
	14	6,37	1,40		14	3,11	1,17
	28	5,34	1,37		28	2,86	0,96
	42	3,80	0,55		42	2,27	1,13
4	0	3,94	0,50	20	0	4,09	1,23
	14	3,48	0,43		14	3,66	1,29
	28	3,01	0,30		28	3,53	1,32
	42	2,31	0,39		42	2,63	1,72
5	0	2,58	0,39				
	14	2,77	0,70				
	28	1,94	0,27				
	42	1,23	0,40				

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	G6-PD (UI/g Hb)	dp	Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	G6-PD (UI/g Hb)	dp
1	0	3,08	0,93	2	0	3,18	0,56
	14	2,90	1,02		14	2,87	0,80
	28	2,44	0,79		28	2,51	0,69
	42	1,92	0,86		42	2,14	0,85
2	0	3,17	0,81	10	0	3,18	0,48
	14	2,86	0,99		14	2,70	0,72
	28	2,53	0,82		28	2,41	0,58
	42	2,01	0,89		42	1,97	0,92
5	0	3,17	0,73	20	0	3,38	0,58
	14	2,85	1,04		14	2,90	0,66
	28	2,38	0,79		28	2,57	0,81
	42	1,91	0,81		42	2,11	1,08
10	0	2,92	0,84				
	14	2,78	0,94				
	28	2,31	0,79				
	42	1,82	0,78				
20	0	2,91	1,00				
	14	2,52	0,95				
	28	2,14	0,71				
	42	1,81	0,88				

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; G6-PD – glicose 6-fostato desidrogenase; dp – desvio padrão. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

A Figura 15 exibe a atividade enzimática da glutathiona redutase (GR, UI/g de Hb) em suspensões de eritrócitos humanos AS, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias.

A Figura 15A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. Notou-se a ação oxidante do TBHP em função do tempo e das concentrações de armazenamento, observando-se a variação da atividade enzimática de até 7 até 3 UI/g de Hb.

Para os estudos da atividade da GR e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 5 mmoles/l de TBHP, na qual foi observada redução da atividade desta enzima para cerca de 4 – 3 UI/g de Hb.

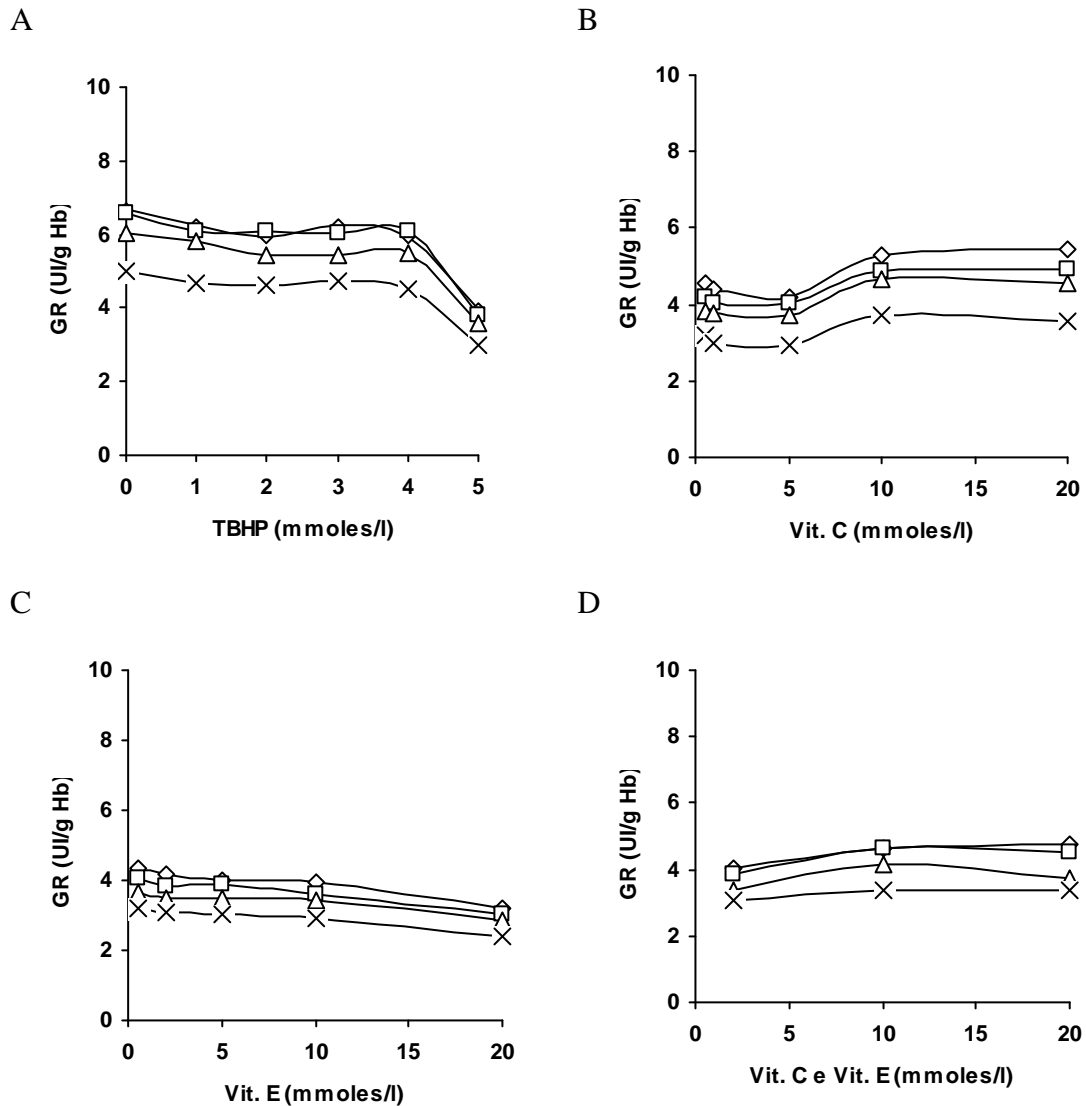
A Figura 15B mostra a atividade enzimática da GR após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se ação antioxidante da vitamina C neste experimento nas concentrações de 10 e 20 mmoles/l da vitamina.

A Figura 15C apresenta a atividade enzimática da GR após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se uma leve ação pró-oxidante na concentrações de 20 mmoles/l da vitamina.

A Figura 15D mostra a atividade enzimática da após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se apenas uma leve ação antioxidante destas vitaminas nas concentrações de 10 e 20 mmoles/l destas vitaminas.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo da GR apresentados na Figura 15 estão listados na Tabela 11.

FIGURA 15. ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias; GR – glutathione redutase. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

TABELA 11 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA ATIVIDADE DA ENZIMA GR EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	GR (UI/g Hb)	dp
0	0	6,67	1,00
	14	6,55	1,03
	28	6,01	1,32
	42	4,99	0,46
1	0	6,23	0,94
	14	6,07	0,90
	28	5,79	1,07
	42	4,69	0,52
2	0	5,90	0,82
	14	6,08	0,71
	28	5,42	0,97
	42	4,64	0,52
3	0	6,24	0,87
	14	6,05	0,84
	28	5,41	1,19
	42	4,72	0,40
4	0	5,93	0,77
	14	6,07	1,05
	28	5,51	1,36
	42	4,53	0,58
5	0	3,96	0,54
	14	3,82	0,79
	28	3,57	0,86
	42	2,97	0,42

Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	GR (UI/g Hb)	dp
1	0	4,55	1,65
	14	4,19	1,30
	28	3,81	1,49
	42	3,20	0,83
2	0	4,39	1,81
	14	4,05	1,20
	28	3,75	1,37
	42	2,99	0,80
5	0	4,18	1,54
	14	4,04	1,40
	28	3,72	1,48
	42	2,91	0,61
10	0	5,31	1,62
	14	4,85	1,38
	28	4,67	1,45
	42	3,70	1,00
20	0	5,47	2,06
	14	4,91	1,55
	28	4,54	1,58
	42	3,58	1,00

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	GR (UI/g Hb)	dp
1	0	4,36	1,71
	14	4,03	1,68
	28	3,69	1,38
	42	3,19	1,42
2	0	4,19	1,74
	14	3,83	1,61
	28	3,48	1,63
	42	3,11	1,42
5	0	4,00	1,70
	14	3,86	1,72
	28	3,48	1,31
	42	3,02	1,47
10	0	3,97	2,11
	14	3,58	1,61
	28	3,45	1,63
	42	2,94	1,32
20	0	3,18	0,68
	14	3,03	0,68
	28	2,88	0,53
	42	2,42	0,62

Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	GR (UI/g Hb)	dp
2	0	4,01	1,57
	14	3,87	1,50
	28	3,40	1,27
	42	3,04	1,54
10	0	4,65	1,41
	14	4,65	1,39
	28	4,18	1,26
	42	3,38	1,01
20	0	4,77	1,74
	14	4,54	1,60
	28	3,75	1,54
	42	3,38	1,47

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; GR – glutathiona redutase; dp – desvio padrão. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

Na Figura 16 estão apresentadas as porcentagens de hemólise (%) em suspensões de eritrócitos humanos AS, tratados com vitamina C e/ou vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP, armazenadas a 4 °C e testadas após 0, 14, 28 e 42 dias de armazenamento.

A Figura 16A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. Fica evidente a ação oxidante do TBHP em função das concentrações e do tempo de armazenamento, observando valores de até 10% de hemólise.

Para os estudos da hemólise e o efeito protetor das vitaminas C e E, foi selecionada a concentração de 2 mmoles/l de TBHP, onde foi observada hemólise de 1 - 3%.

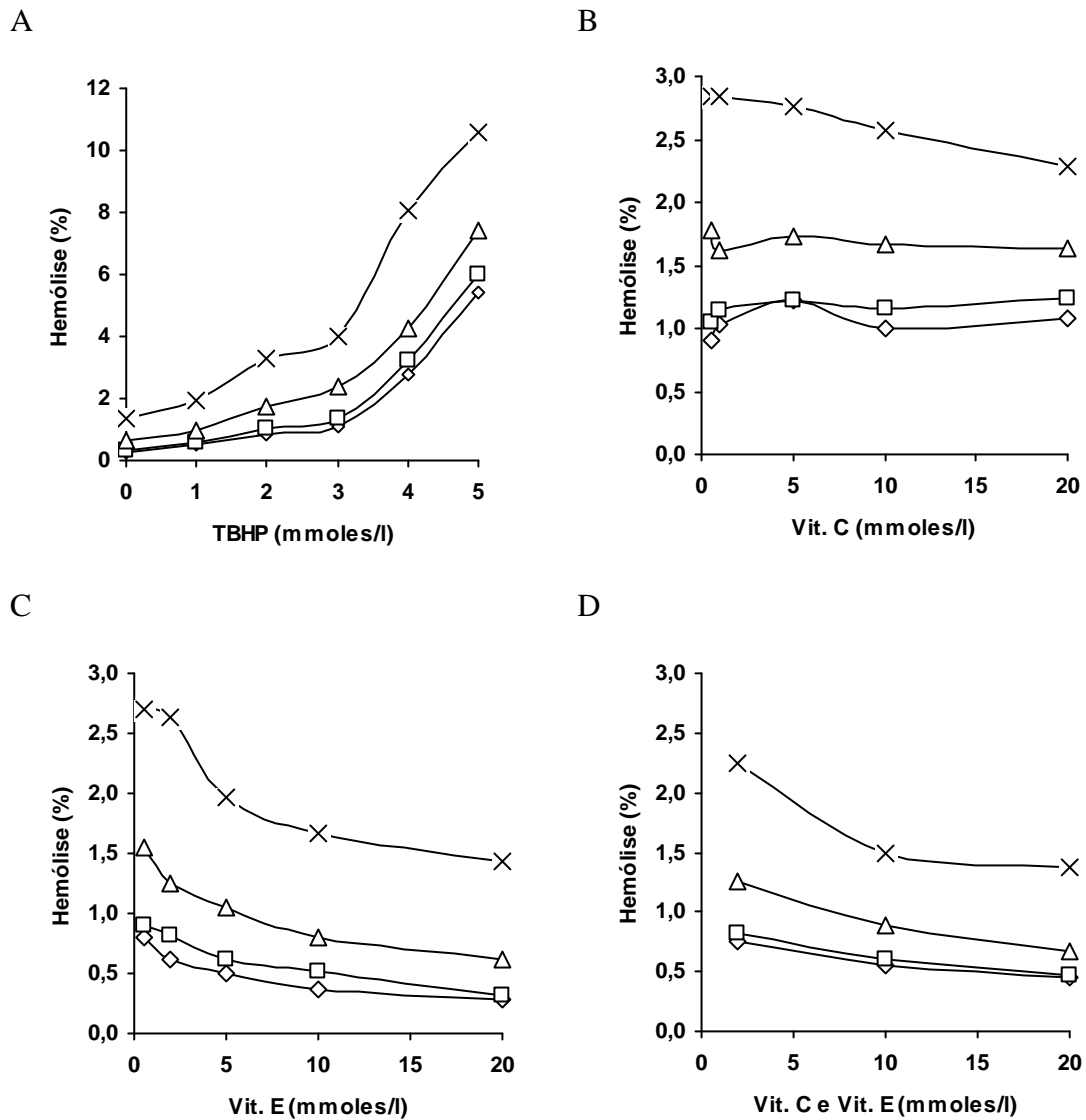
A Figura 16B apresenta as porcentagens de hemólise após incubação com vitamina C nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. Observou-se ação antioxidante da vitamina C apenas para o 42º dia.

A Figura 16C apresenta as porcentagens de hemólise após incubação com vitamina E nas concentrações de 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. Os resultados apontam uma ação protetora desta vitamina, uma vez que a porcentagem de hemólise diminuiu na sua presença.

A Figura 16D mostra as porcentagens de hemólise após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l de cada vitamina. Observou-se uma ação eficaz antioxidante com o uso simultâneo das vitaminas C e E neste experimento.

As médias aritméticas e os desvios padrão para o estudo da hemólise apresentados na Figura 16 estão listados na Tabela 12.

FIGURA 16. PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS, INCUBADOS COM VITAMINA C e VITAMINA E, SUBMETIDOS À AÇÃO DE PRÓ-OXIDANTE TBHP.



Os pontos experimentais são médias de 12 determinações. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l. Tempos: ◇ - zero; □ - 14 dias; △ - 28 dias; × - 42 dias. As médias e os desvios padrão estão apresentados na tabela abaixo. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S.

TABELA 12 MÉDIA E DESVIO PADRÃO PARA PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS AS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E DE PRÓ-OXIDANTE TBHP, EM AMOSTRAS ARMAZENADAS DURANTE 42 DIAS.

TBH (mmoles/l)	Tempo (dias)	Hemólise (%)	dp
0	0	0,26	0,09
	14	0,34	0,11
	28	0,64	0,18
	42	1,38	0,68
1	0	0,51	0,15
	14	0,61	0,16
	28	0,98	0,22
	42	1,92	0,84
2	0	0,83	0,15
	14	1,03	0,34
	28	1,77	0,94
	42	3,31	1,43
3	0	1,11	0,26
	14	1,34	0,33
	28	2,39	0,94
	42	4,03	1,55
4	0	2,78	0,63
	14	3,20	0,61
	28	4,28	2,20
	42	8,05	3,78
5	0	5,39	0,88
	14	5,99	0,59
	28	7,43	2,14
	42	10,56	3,94

Vit. C (mmoles/l)	Tempo (dias)	Hemólise (%)	dp
1	0	0,91	0,17
	14	1,05	0,29
	28	1,77	0,93
	42	2,84	1,15
2	0	1,04	0,17
	14	1,15	0,26
	28	1,63	0,69
	42	2,84	1,12
5	0	1,22	0,19
	14	1,22	0,39
	28	1,73	0,87
	42	2,76	0,96
10	0	1,01	0,17
	14	1,15	0,34
	28	1,66	0,42
	42	2,58	0,84
20	0	1,08	0,28
	14	1,23	0,38
	28	1,63	0,45
	42	2,28	0,67

Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	Hemólise (%)	dp
1	0	0,80	0,28
	14	0,91	0,30
	28	1,55	0,90
	42	2,70	1,37
2	0	0,62	0,21
	14	0,82	0,31
	28	1,25	0,75
	42	2,63	1,16
5	0	0,49	0,19
	14	0,63	0,28
	28	1,04	0,70
	42	1,97	1,19
10	0	0,38	0,10
	14	0,52	0,21
	28	0,79	0,46
	42	1,66	0,97
20	0	0,28	0,14
	14	0,32	0,13
	28	0,61	0,31
	42	1,43	0,77

Vit. C e Vit. E (mmoles/l)	Tempo (dias)	Hemólise (%)	dp
2	0	0,76	0,28
	14	0,82	0,29
	28	1,26	0,71
	42	2,24	1,31
10	0	0,56	0,13
	14	0,60	0,19
	28	0,89	0,42
	42	1,49	0,93
20	0	0,46	0,15
	14	0,47	0,18
	28	0,66	0,31
	42	1,37	0,69

Os pontos experimentais são médias de 12 determinações; dp – desvio padrão. AS – Eritrócitos humanos de indivíduos portadores heterozigotos de hemoglobina S

O efeito pró-oxidante de TBHP e a ação protetora antioxidante das vitaminas C e E, observados nas Figuras 5 - 16, estão resumidos nas Tabelas 13, onde N representa a ausência de ação pró- ou antioxidante; S, o efeito antioxidante; e S*, o efeito pró-oxidante.

TABELA 13 EFEITO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP E ANTIOXIDANTE DE VITAMINA C e E EM ERITRÓCITOS CONTENDO HEMOGLOBINA AA E AS, DURANTE 42 DIAS DE ARMAZENAMENTO.

Hb	Composto ⁴	C. Heinz ¹		mHb ¹		GSH ²		G6-PD ³		GR ³		Hemólise ¹	
		dias	conc	dias	conc	dias	conc	dias	conc	dias	conc	dias	conc
AA	TBH	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*
	Vit. C + TBH	S	S	S	S	S*	N	S*	N	S*	N	S*	S*
	Vit. E + TBH	S	S	S	S	S*	N	S*	N	S*	N	S	S
	Vit. C + E + TBH	S	S	S	S	S*	N	S*	N	S*	N	S	S
AS	TBH	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*
	Vit. C + TBH	S	S	S	S	S*	N	S*	S	S*	S	N	N
	Vit. E + TBH	S	S	S	S	S*	N	S*	N	S*	S*	S*	S
	Vit. C + E + TBH	S	S	S	S	S*	N	S*	N	S*	S	S*	S

N - Sem ação pró- ou antioxidante; S - efeito anti-oxidante; S* - efeito pró-oxidante . Concentração do TBHP utilizando antes do tratamento com Vit. C e E: 1- 2 mmoles/l; 2 - 1 mmol/l; 3 - 5 mmoles/l. 4 - Concentração dos compostos usados: TBH 1-5 mmoles/l ; Vit. C 0,5-20 mmoles/l; Vit. E 0,5-20 mmoles/l; Vit. C e E 2-20 mmoles/l.

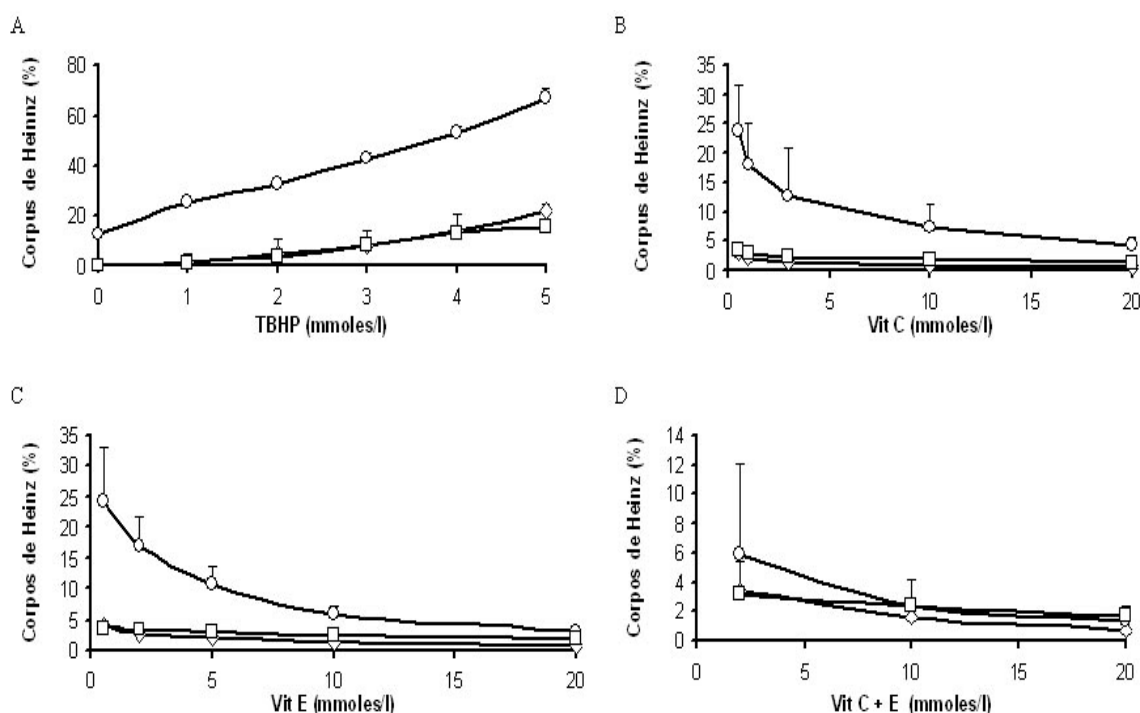
A Figura 17 ilustra a formação de corpos de Heinz em eritrócitos humanos AA, AS e SS tratados com vitamina C e vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP em amostras recém colhidas, ou seja, tempo zero de estocagem.

A Figura 17A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l.

A Figura 17B mostra a ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitamina C 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 17C apresenta a ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitamina E 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 17D apresenta formação de metahemoglobina por ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l .

Observa-se a ação pró-oxidante do TBHP em função da concentração para todos os eritrócitos AA, AS e SS. Entretanto, a ação é muito mais acentuada para os eritrócitos SS, onde a percentagem de corpos de Heinz é de cerca de 20% no controle e chega a atingir cerca de 70% sob a ação de TBHP 5 mmoles/l (Figura 17A). Observa-se claramente nas Figuras 17B-D a ação protetora das vitaminas C e E, nas concentrações utilizadas, através da diminuição da formação de corpos de Heinz, pela ação do TBHP 2 mmoles/l.

FIGURA 17. FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).



○ - Hemogloblina SS; ◇ - Hemogloblina AS; □ - Hemogloblina AA. As barras de erro representam o desvio padrão (dp). Os pontos experimentais ($\bar{X} \pm dp$) são médias de 18, 15 e 9 determinações, respectivamente para AS, AA e SS. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l

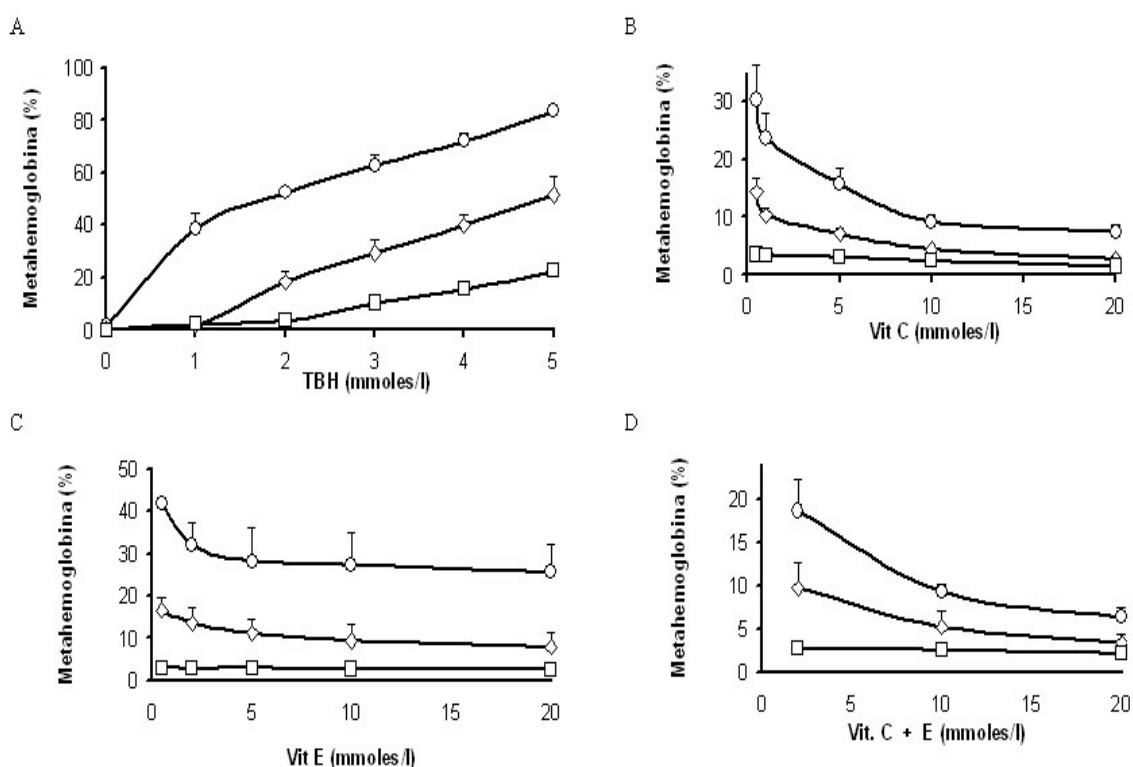
A Figura 18 ilustra as percentagens médias de formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos AA, AS e SS tratados com vitamina C e vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP em amostras recém colhidas, ou seja, tempo zero de estocagem.

A Figura 18A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A Figura 18B mostra a ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitamina C 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 18C apresenta a ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitamina E 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 18D apresenta a formação de metahemoglobina por

ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l.

Observa-se a ação pró-oxidante do TBHP em função da concentração para todos os eritrócitos AA, AS e SS. Entretanto, a ação é muito mais acentuada para os eritrócitos SS, onde a percentagem de metahemoglobina é de cerca de 20% no controle, e chega a atingir cerca de 85% em TBHP 5 mmoles/l (Figura 18A). Observa-se claramente nas Figuras 18B-D a ação protetora das vitaminas C e E, nas concentrações utilizadas, responsável pela diminuição da formação de metahemoglobina, pela ação do TBHP 2 mmoles/l.

FIGURA 18. FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÊM COLHIDAS (TEMPO ZERO).



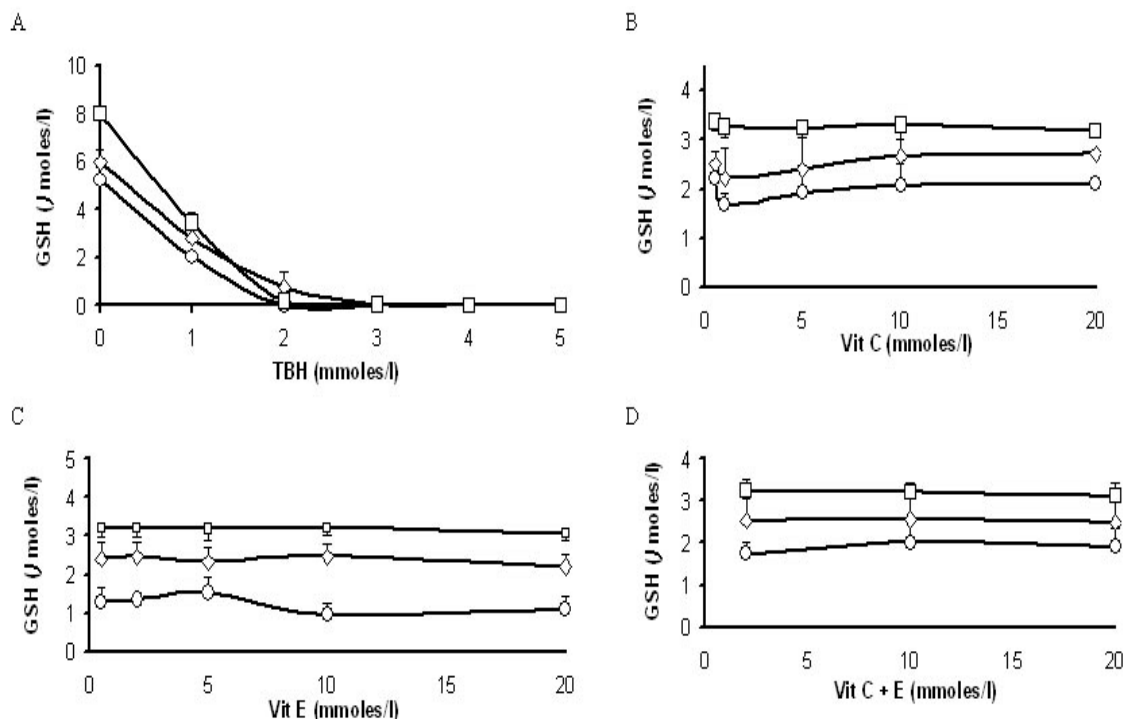
○ - Hemogloblina SS; ◇ - Hemogloblina AS; □ - Hemogloblina AA. As barras de erro representam o desvio padrão (dp). Os pontos experimentais ($\bar{X} \pm dp$) são médias de 18, 15 e 9 determinações, respectivamente para AS, AA e SS. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l.

A Figura 19 apresenta as concentrações médias de glutathiona reduzida em eritrócitos humanos AA, AS e SS submetidos à ação pró-oxidante de TBHP e antioxidante de vitaminas C e E em amostras recém colhidas (tempo zero).

A Figura 19A ilustra a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A Figura 19B mostra a ação de terc-butil hidroperóxido 1 mmol/l, após incubação com vitamina C 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 19C apresenta a ação de terc-butil hidroperóxido 1 mmol/l, após incubação com vitamina E 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 19D apresenta os valores obtidos para glutathiona reduzida por ação de terc-butil hidroperóxido 1 mmol/l, após incubação com vitaminas C e E, em concentrações de 2 a 20 mmoles/l.

A ação pró-oxidante do TBHP, em função da concentração, está evidenciada para todos os eritrócitos AA, AS e SS. A concentração de glutathiona reduzida é extinta na concentração de 2 mmoles/l de TBHP (Figura 19A). Entretanto, a ação é muito mais acentuada para os eritrócitos SS. Observa-se, nas Figuras 19B-D alguma ação protetora das vitaminas C e E, nas concentrações utilizadas, demonstrada por concentrações de GSH da ordem de 1 a 3 μ moles/g Hb.

FIGURA 19. CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).



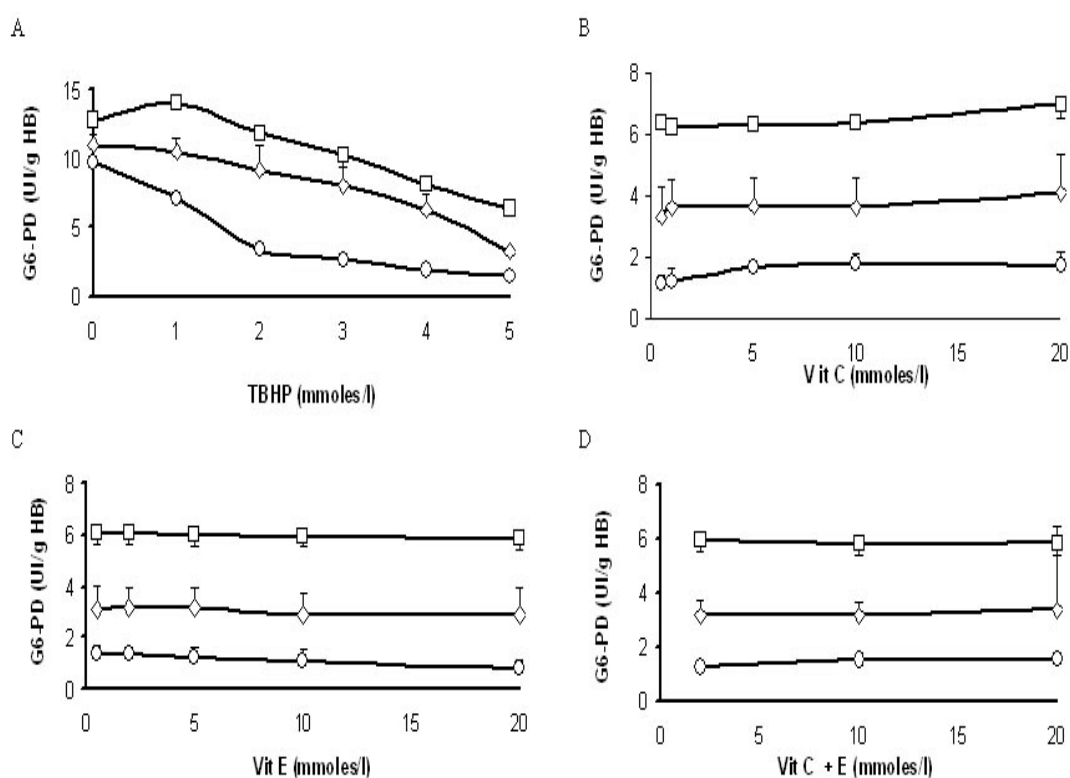
○ - Hemogloblina SS; ◇ - Hemogloblina AS; □ - Hemogloblina AA. As barras de erro representam o desvio padrão (dp). Os pontos experimentais ($\bar{X} \pm dp$) são médias de 18, 15 e 9 determinações, respectivamente para AS, AA e SS. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 1 mmoles/l.

A Figura 20 ilustra as atividades enzimáticas de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD) em eritrócitos humanos AA, AS e SS tratados com vitamina C e vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP em amostras recém colhidas, ou seja, tempo zero de estocagem.

A Figura 20A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A Figura 20B mostra a ação de terc-butil hidroperóxido 5 mmoles/l após incubação com vitamina C 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 20C apresenta a ação de terc-butil hidroperóxido 5 mmoles/l, após incubação com com vitamina E 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 20D apresenta as atividades de G6-PD sob a ação de terc-butil hidroperóxido 5 mmoles/l, após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l.

Observa-se a ação pró-oxidante do TBHP, em função da concentração, para todos os eritrócitos AA, AS e SS. Entretanto, esta ação é muito mais acentuada para os eritrócitos SS, onde a atividade enzimática de G6-PD inicialmente já está diminuída em cerca de 60% em relação ao controle e diminui ainda mais sob ação TBHP 5 mmoles/l (Figura 20A). Não se observa nenhuma ação protetora das vitaminas C e E, nas concentrações utilizadas (Figuras 20B-D).

FIGURA 20. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).



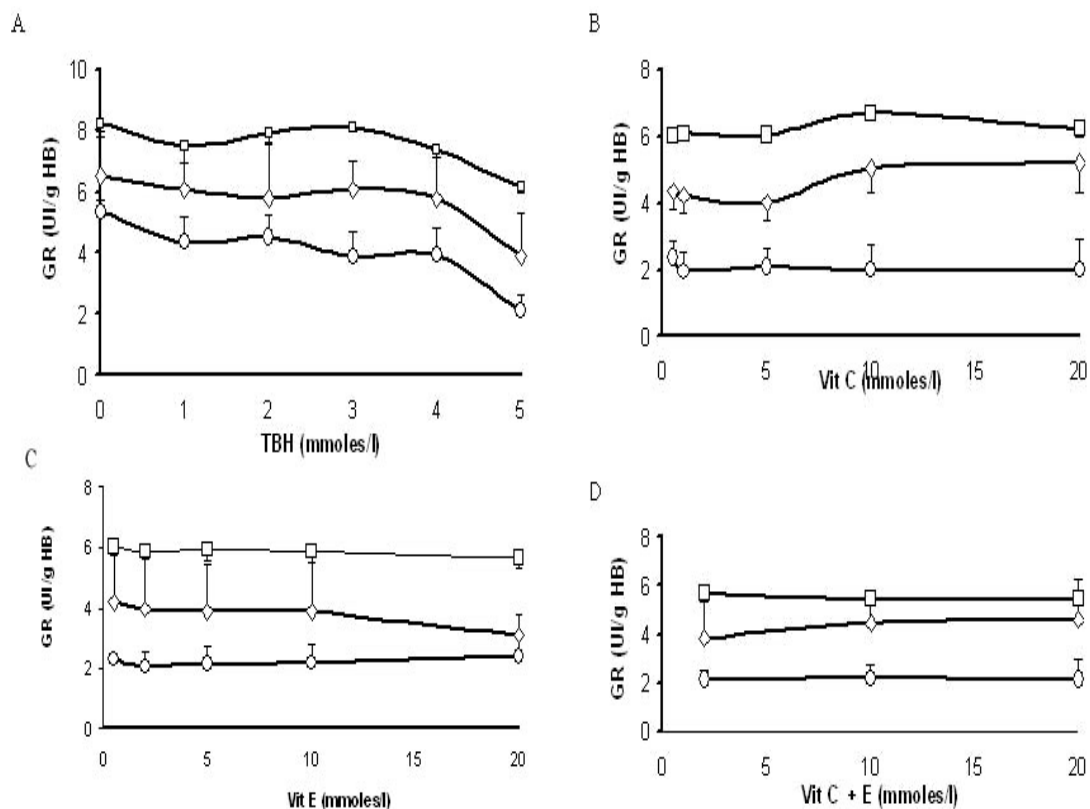
○ - Hemogloblina SS; ◇ - Hemogloblina AS; □ - Hemogloblina AA. As barras de erro representam o desvio padrão (dp). Os pontos experimentais ($\bar{X} \pm dp$) são médias de 18, 15 e 9 determinações, respectivamente para AS, AA e SS. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 5 mmoles/l.

A Figura 21 ilustra as atividades enzimáticas de glutathiona reduzida (GR) em eritrócitos humanos AA, AS e SS tratados com vitamina C e vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP em amostras recém colhidas, ou seja, tempo zero de estocagem.

A Figura 21A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A Figura 21B mostra a ação de terc-butil hidroperóxido 5 mmoles/l, após incubação com vitamina C 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 21C apresenta a ação de terc-butil hidroperóxido 5 mmoles/l, após incubação com vitamina E 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 21D apresenta as atividades de GR sob a ação de terc-butil hidroperóxido 5 mmoles/l, após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l.

Observa-se a ação pró-oxidante do TBHP em função da concentração para todos os eritrócitos AA, AS e SS. Novamente, a ação é muito mais acentuada para os eritrócitos SS, onde as atividades enzimáticas de GR inicialmente já se mostram diminuídas em cerca de 70% em relação ao controle e diminuem ainda mais sob a ação de TBHP 5 mmoles/l (Figura 21A). Nenhuma ação protetora das vitaminas C e E foi observada nas concentrações utilizadas (Figuras 21B-D).

FIGURA 21. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GR EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).



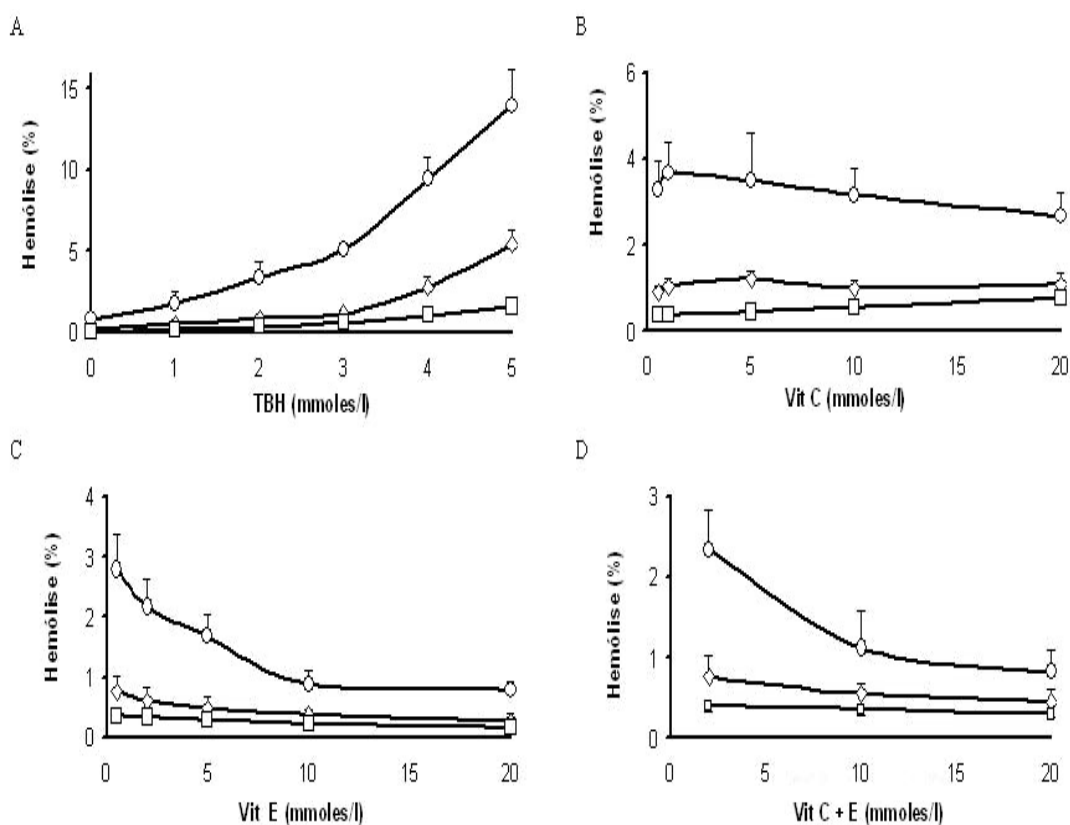
○ - Hemogloblina SS; ◇ - Hemogloblina AS; □ - Hemogloblina AA. As barras de erro representam o desvio padrão (dp). Os pontos experimentais ($\bar{X} \pm dp$) são médias de 18, 15 e 9 determinações, respectivamente para AS, AA e SS. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 5 mmoles/l.

A Figura 22 ilustra as percentagens médias de hemólise em eritrócitos humanos AA, AS e SS tratados com vitamina C e vitamina E e posterior ação pró-oxidante de TBHP em amostras recém colhidas, ou seja, tempo zero de estocagem.

A Figura 22A apresenta a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l. A Figura 22B mostra a ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitamina C 0,5, 1, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 22C apresenta a ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitamina E 0,5, 2, 5, 10 e 20 mmoles/l. A Figura 22D apresenta as porcentagens de hemólise sob a ação de terc-butil hidroperóxido 2 mmoles/l, após incubação com vitaminas C e E nas concentrações de 2, 10 e 20 mmoles/l.

Evidenciou-se a ação pró-oxidante do TBHP em função da concentração para todos os eritrócitos AA, AS e SS. Entretanto, a ação é muito mais acentuada para os eritrócitos SS, onde a percentagem de hemólise é de cerca de 5% no controle e chega a atingir cerca de 15% sob a ação de TBHP 5 mmoles/l (Figura 22A). A vitamina C mostrou alguma ação antioxidante por uma leve redução da hemólise (Figura 22B). Já nas Figuras 22C e D, observa-se claramente a ação protetora da vitamina E, bem como das vitaminas C e E em conjunto, nas concentrações utilizadas, na diminuição da percentagem de hemólise sob a ação do TBHP 2 mmoles/l.

FIGURA 22. PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS AA, AS E SS SUBMETIDOS À AÇÃO DAS VITAMINAS C e E, E POSTERIOR AÇÃO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP EM AMOSTRAS RECÉM COLHIDAS (TEMPO ZERO).



O - Hemogloblina SS; ◇ - Hemogloblina AS; □ - Hemogloblina AA. As barras de erro representam o desvio padrão (dp). Os pontos experimentais ($\bar{X} \pm dp$) são médias de 18, 15 e 9 determinações, respectivamente para AS, AA e SS. Fig. B-D – Eritrócitos tratados com TBHP 2 mmoles/l.

O efeito pró-oxidante de TBHP e a ação protetora antioxidante das vitaminas C e E, observados nas Figuras 18 - 22, estão resumidos nas Tabelas 14, onde N representa a ausência de ação pró - ou antioxidante; S, o efeito antioxidante; e S*, o efeito pró-oxidante.

TABELA 14 EFEITO PRÓ-OXIDANTE DE TBHP E ANTIOXIDANTE DE VITAMINA C e E EM ERITRÓCITOS CONTENDO HEMOGLOBINA AA, AS E SS. AMOSTRAS RECÉM-COLHIDAS (TEMPO ZERO).

Composto ⁴	C. Heinz ¹			mHb ¹			GSH ²			G6-PD ³			GR ³			Hemólise ¹		
	AA	AS	SS	AA	AS	SS	AA	AS	SS	AA	AS	SS	AA	AS	SS	AA	AS	SS
TBHP	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*
Vit. C + TBHP	N	N	S	N	S	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Vit. E + TBHP	N	N	S	N	S	S	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	S
Vit. C + E + TBHP	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S

N - Sem ação pró- ou anti-oxidante; S - efeito anti-oxidante; S* - efeito pró-oxidante. Concentração do TBHP utilizando antes do tratamento com Vit. C e E: 1- 2 mmoles/l; 2 - 1 mmol/l; 3 - 5 mmoles/l. 4 - Concentração dos compostos usados: TBH 1-5 mmoles/l ; Vit. C 0,5-20 mmoles/l; Vit. E 0,5-20 mmoles/l; Vit. C e E 2-20 mmoles/l.

Fica evidenciada, nas Tabelas 13 e 14, que a ação pró-oxidante do TBHP em função da concentração é muito mais intensa nos eritrócitos AS que nos AA. Igualmente, as ações protetoras das vitaminas C e E manifestam-se nos eritrócitos AS.

Observações realizadas com amostras recém-colhidas (tempo zero) permitem verificar (Tabela 14) que eritrócitos SS são mais susceptíveis às ações protetoras de vitaminas C e E, nas concentrações utilizadas.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A viabilidade e a conservação de eritrócitos normais armazenados vem sendo alvo de inúmeros estudos. Os eritrócitos isolados e preservados *in vitro* compõem um dos mais importantes componentes hemoterápicos. Vários pesquisadores têm estudado o comportamento *in vitro* de eritrócitos SS, mas poucas informações estão disponíveis sobre eritrócitos AS. Neste estudo, utilizamos amostras de eritrócitos obtidos de indivíduos normais AA e de portadores de dois diferentes genótipos para Hb S (AS e SS).

Para a realização dos experimentos com eritrócitos, optou-se por empregar suspensões de células em tampão fosfato 67 mmoles/l pH 7,4, com glucose 200 mg/dl. Tal meio apresenta condições satisfatórias para manutenção da atividade metabólica do eritrócito durante a realização dos experimentos. Definiu-se como 40% o volume globular a ser empregado nas preparações das amostras, com base no fato de que as técnicas utilizadas são, em geral, padronizadas para sangue total. Na literatura, relata-se experimentos de ação oxidativa com suspensões de eritrócitos com volume globular variando entre 1% e 45% (TROTТА, 1981 e DEUTICKE et al., 1987; FERRALI et al., 1992; FERNANDES et al., 2000; MAY et al., 2000; MAWATARI e MEURAKAMI, 2001; COMAR, 2003; CLARO et al., 2006).

Para testar a ação de substâncias antioxidantes sobre o metabolismo dos eritrócitos, optou-se pelo emprego das vitaminas C e E. Estas vitaminas são amplamente empregadas em medicamentos, nutracêuticos e alimentos funcionais, devido às suas elevadas capacidades antioxidantes. Além disso, são freqüentes modelos de estudo. Foi considerado relevante, também, o fato de que diversos autores propõem que essas vitaminas sejam empregadas no tratamento de pacientes portadores de doenças hemolíticas diversas (CHAN et al., 1999).

Para se estudar a ação protetora de substâncias com propriedades antioxidantes em eritrócitos humanos, foi relevante a escolha de um agente oxidante, considerando-se a sua natureza e as concentrações em que seria empregado. O TBHP, um hidroperóxido orgânico, é um modelo de agente oxidante largamente utilizado e considerado como adequado para estudos de oxidação, em eritrócitos humanos (DEUTICKE et al., 1987; BEPPU et al., 1990; DOMANSKI et al., 2005). Notáveis efeitos danosos do TBHP sobre várias células já foram bem

investigados (AHENE, et al., 2000). Mecanismos de geração de radicais livres por sua ação também já são conhecidos (VAN DER ZEE, et al 1996). A concentração escolhida para a solução estoque de TBHP foi de 50 mmoles/l em NaCl 154 mmoles/l, o que possibilitou a adição de pequenos volumes às suspensões de eritrócitos, evitando-se interferências no tamponamento do meio. Diversas concentrações de TBHP foram testadas nas suspensões de eritrócitos e os experimentos relacionados são discutidos a seguir, avaliando-se a ação protetora das vitaminas C e E.

No que diz respeito aos eritrócitos AA, a formação de corpos de Heinz induzidas por TBHP 2 mmoles/l é diminuída pela presença de vitaminas C ou E (Figura 5).

Em relação à formação de metahemoglobina, os eritrócitos AA mostraram ação pró-oxidante por TBHP 2 mmoles/l e antioxidante por vitaminas C ou E até 20 mmoles/l (Figura 6). CLARO et al. (2006) demonstraram a capacidade da vitamina C na proteção da molécula de hemoglobina ao dano oxidativo por fenilhidrazina, evidenciando inibição na formação de metahemoglobina em concentrações de vitamina C a partir de 0,5 mmol/l. KRUKOSKI (2006) demonstrou que a pré-incubação dos eritrócitos com vitamina C, em concentrações de 5 a 60 mmoles/l, inibiu parcialmente a formação de metahemoglobina por TBHP 2 mmoles/l. DUNNE et al. (2006) evidenciaram que o ascorbato é capaz de efetivamente reduzir a metahemoglobina plasmática, a ferril hemoglobina e, ainda, os radicais derivados das globinas.

Conforme exemplificado na Figura 7, as mesmas concentrações de TBHP foram utilizadas para se investigar o efeito deste oxidante sobre os níveis do principal antioxidante intracelular, a GSH. Observou-se o efeito pró-oxidante do TBHP 2 mmoles/l. Não foi observado nenhuma ação antioxidante das vitaminas C e E até 20 mmoles/l pela medida da concentração de GSH em eritrócitos AA. Os dados citados acima corroboram os de MAWATARI E MEURAKAMI (2001), que evidenciaram exaustão quase imediata de GSH em eritrócitos incubados com TBHP 1 mmol/l. COMAR (2003) e KRUKOSKI (2006) observaram que a exposição de eritrócitos humanos normais a TBHP resulta na depleção de GSH quase que completa nesta mesma concentração.

Estudos prévios realizados neste laboratório concordam com nossos dados, pois também comprovaram que as vitaminas antioxidantes testadas no presente estudo não exercem qualquer ação no sentido de proteger a depleção ou recuperar a concentração de GSH nas concentrações testadas (CLARO et al., 2006; KRUKOSKI, 2006).

A avaliação do potencial oxidante do TBHP sobre o eritrócito também foi investigada com a determinação da atividade enzimática de G6-PD e de GR eritrocitárias. A G6-PD de eritrócitos AA, sofreu ação pró-oxidante de TBHP, sendo que a atividade enzimática diminuiu cerca de 70% na concentração de 5 mmoles/l do agente. Esses valores permaneceram constantes na presença de até 20 mmoles/l das vitaminas C e E. Assim não se obteve êxito na manutenção da atividade desta enzima com uso de antioxidantes (Figura 8).

A via das pentoses fosfato é estimulada sob condições de estresse oxidativo causada por hidroperóxidos (TBHP) ou por algum agente depressor de GSH. Os resultados deste trabalho não são concordantes com os de KUO e TANG (1998), que demonstraram que a redução do NADP^+ para NADPH pela G6-PD protegeu os eritrócitos do dano oxidativo induzido pelo TBHP.

A enzima GR de eritrócitos AA sofreu leve ação pró-oxidante TBHP 5 mmoles/l (Figura 9), com manutenção de cerca de 75% da atividade enzimática. Não foi observada nenhuma ação das vitaminas C e E entre 0,5 e 20 mmoles/l. Tem-se demonstrado que a GR apresenta um papel crucial no sistema de reciclagem da GSSG (BUKOWSKA, 2004). YANG et al. (2004), questionaram se sob certas condições de estresse oxidativo em hepatócitos humanos, a GR seria um bom marcador da diminuição da relação GSH/GSSG. YANG et al. (2006) observaram que a GR deve ser a maior determinante na regulação da relação de GSH/GSSG em situações de estresse oxidativo em quaisquer células ou tecido, inclusive eritrócitos. WU et al. (2004) também demonstraram que a síntese ou reciclagem da glutatona envolve as enzimas GR e GSHPx.

Em estudos realizados por ANDERSEN et al. (1997), demonstrou-se um decréscimo na atividade da enzima glutatona redutase em relação à sua meia-vida. Estes autores observaram uma correlação negativa entre a atividade enzimática e a idade do indivíduo. Este fato também já havia sido evidenciado por CEBALLOS-PICOT et al. (1992), na França.

A hemólise induzida por TBHP 2 mmoles/l em eritrócitos AA é da ordem de 1%. Sob a mesma condição do agente oxidante e pela presença de vitaminas E e vitaminas C + E, a hemólise é diminuída, permanecendo na faixa inferior a 1% (Figura 10). É interessante notar o efeito pró-oxidante da vitamina C, que eleva o índice de hemólise para valores superiores a 1%, na presença de TBHP.

CLARO et al. (2006) encontraram resultados semelhantes, com aumento da hemólise até 1,5% em 20 mmoles/l de vitamina C. A vitamina C geralmente é conhecida como um agente redutor. Porém, dependendo da sua concentração e das condições, ela pode funcionar como um agente pró-oxidante. É relatado que, em altas concentrações, a mesma, pode levar à hemólise na ausência de agentes oxidantes (JAIN; SUBRAHMANYAM, 1978; WINTERBOURN, 1979; CLARO et al., 2006).

Na doença falciforme, há um alto potencial de dano oxidativo devido ao desequilíbrio crônico de potencial redox nos eritrócitos, que freqüentemente resulta na contínua geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estes eventos culminam em complicações clínicas, que vão desde alterações leves até severa hemólise (HEBBEL et al., 1982). A produção de ERO pode ser grosseiramente amplificada em resposta a uma variedade de condições patológicas como hipóxia, inflamação, infecção, desidratação e deficiência de vitaminas antioxidantes (HASANATO, 2006).

Eritrócitos AS apresentam maiores índices de formação de corpos de Heinz e de metahemoglobina induzidas por TBHP 2 mmoles/l em relação aos eritrócitos AA, na faixa de 5-20% e de 20-40%, respectivamente. Observou-se um efeito antioxidante estatisticamente significativo em presença de vitaminas C e E, diminuindo para aproximadamente 2% para a formação de corpos de Heinz e de 5% para a metahemoglobina na concentração de 20 mmoles/l das vitaminas, na presença de TBHP 2mmoles/l (Figuras 11-12).

Os produtos resultantes da degradação oxidativa da hemoglobina, caracterizados pelo aumento dos valores médios de metahemoglobina e da concentração de corpos de Heinz, estão diretamente relacionados com o aumento da instabilidade da Hb S (BROWNE et al., 1998). HEBBEL et al., (1982) observou que os eritrócitos que contenham Hb S geram espontaneamente quantidades excessivas de ERO durante a incubação *in vitro*, estes valores que podem ser

duplicados em relação aos de eritrócitos contendo apenas Hb normal. Em recente trabalho publicado por SOUZA (2004), evidenciou-se que a simples presença da Hb S, como ocorre nos eritrócitos AS, é capaz de causar elevação da concentração de metahemoglobina para 52,6% e induzir a precipitação de corpos de Heinz para 73,7% dos eritrócitos.

O uso da vitamina C como antioxidante baseia-se no importante papel desempenhado por este composto nos sistemas biológicos, especialmente como fornecedor de equivalentes redutores para os sistemas de detoxificação redox. Por esta razão, tal vitamina tem sido amplamente empregada em pacientes com anemia falciforme (LACHANT; TANAKA, 1986; CHAN et al, 1999; JAJA et al, 2002; OULD AMAR et al 2006). Dentro do eritrócito, o ascorbato pode doar elétrons à metahemoglobina redutase-NADH dependente que, por sua vez, reduz a metahemoglobina (SULLIVAN; STERN, 1982; MANSOURI; LURIE, 1993). Entretanto, o ascorbato pode reduzir a metahemoglobina independente desta enzima. Para isso, requer redutores equivalentes do ciclo das pentoses. O ascorbato presente no plasma é transportado para dentro da célula, principalmente na sua forma oxidada, desidroascorbato, o qual é reduzido, por um mecanismo dependente de glutathione (SULLIVAN; STERN, 1982).

A concentração de GSH de eritrócitos AS sofreu forte ação pró-oxidante de TBHP nas concentrações de 1-5 mmoles/l, desaparecendo após 2 mmoles/l de TBHP. Com base nestes dados, foi escolhida a concentração de 1 mmol/l de TBHP para a realização dos demais experimentos envolvendo dosagens de GSH em amostras com antioxidantes. Os níveis obtidos de GSH na presença de 1 mmol/l de TBHP foram de cerca de 2,5 μ moles/g Hb e não houve recuperação de GSH tanto na presença de vitamina C, quanto de vitamina E. Evidenciou-se ainda, em eritrócitos SS e AS, uma concentração basal de GSH diminuída em relação a eritrócitos AA (Figura 13).

A atividade de G6-PD em eritrócitos AS, foi fortemente inibida na presença de TBHP 1-5 mmoles/l, com níveis de apenas 25% na presença de 5 mmoles/l do oxidante. Houve uma leve proteção contra esta redução de atividade na presença de vitaminas C. Não houve proteção contra a redução de atividade na presença de vitamina E e vitamina C + E de 0,5 a 20 mmoles/l. E ainda houve manifestação pró-

oxidante com relação ao tempo de incubação de 0 a 42 dias, mesmo na presença destas vitaminas (Figura 14).

A atividade da enzima GR de eritrócitos AS sofreu inibição na presença de TBHP 5 mmoles/l, mantendo-se em 40%. Houve uma leve proteção da atividade enzimática pela presença das vitaminas C e vitaminas C + E de 0,5 a 20 mmoles/l. Além disso, observou-se o efeito pró-oxidante com relação ao tempo de incubação de 0 a 42 dias, mesmo nas presenças das vitaminas (Figura 15). Estes resultados contradizem os obtidos por LOPEZ et al. (1999), que avaliaram a atividade de GR em eritrócitos de gestantes AS e AA, não encontrando diferença significativa entre estes grupos. No entanto, tais autores correlacionaram a deficiência de GR nos dois grupos estudados com uma insuficiência no suprimento dietético de riboflavina, porém não com a presença de HbS.

Observou-se a indução de cerca de 3% de hemólise por TBHP 2 mmoles/l em eritrócitos AS, a qual foi diminuída pela presença de vitaminas E e vitaminas C + E, permanecendo em torno de 1%. Foi observado efeito protetor da vitamina C isolada somente após o 28º dia (Figura 16).

Estudos mostram que a vitamina E age como um antioxidante, protegendo o eritrócito da hemólise induzida por estresse oxidativo. A vitamina E, aparentemente, interage com diferentes espécies de oxidantes derivados do H_2O_2 , prevenindo a peroxidação lipídica e a oxidação de grupos sulfidril, as quais podem conduzir à hemólise (BROWNLEE et al., 1977; LEE et al., 1999).

Com relação à análise de eritrócitos no tempo zero, observa-se claramente nas Figuras 13-18, pela avaliação do estado redox dos eritrócitos através das percentagens de corpos de Heinz e de metahemoglobina, dos índices de hemólise, da concentração de GSH, e das atividades das enzimas G6-PD e GR, que os eritrócitos SS apresentam um estado oxidado mais intenso que os eritrócitos AA ou AS. Esses resultados são estatisticamente significativos (ANOVA $p < 0,05$). Os nossos dados foram concordantes com os estudos prévios de outros autores, que demonstraram que o aumento do estresse oxidativo nas células falciformes pode ser atribuído à inerente instabilidade da Hb S (CHAN et al, 1999; KLINGS; FARBER, 2001). Este fato foi demonstrado, uma vez que as células falciformes produzem quantidades duas vezes maiores de $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 e OH^{\cdot} do que os eritrócitos normais (HEBBEL et al., 1982; REPKA; HEBBEL, 1991).

Com relação à formação de corpos de Heinz e hemólise nos eritrócitos de indivíduos com hemoglobina AA e AS, foi verificada forte ação pró-oxidante de TBHP 1-5 mmoles/l e nenhuma ação protetora de vitaminas até a concentração de 20 mmoles/l. Entretanto, para eritrócitos SS, a ação pró-oxidante do TBHP 1-5 mmoles/l foi bastante intensa, sendo que a presença de vitaminas C e E no meio de incubação levou à diminuição da percentagem de corpos de Heinz. Diante dos valores obtidos, é possível admitir que a Hb S, independente do genótipo, ao se tornar desoxigenada (desoxiHb S), expõe o ferro à oxidação, sofrendo a metemoglobinização, com intensidade cinco vezes maior que a eritrócitos AA. Ao se considerar que a elevação do número de eritrócitos contendo corpos de Heinz representa o produto final da degradação oxidativa da hemoglobina, poderia-se sugerir que eritrócitos com Hb S são pelo menos 50 vezes mais susceptíveis à sua formação em relação aos normais, de acordo com as frequências médias obtidas para corpos de Heinz (Figura 17).

Nossos resultados são concordantes com os de vários autores. HASANATO (2006) demonstrou que as concentrações de antioxidantes, como vitaminas A, C, E e Zinco, estão severamente diminuídas em pacientes que sofrem de anemia falciforme, e que esta condição poderia ser responsável pelo aumento do desequilíbrio redox, aumentando assim a formação de metahemoglobina, corpos de Heinz e hemólise nestes pacientes. Desta forma, se poderia supor que a suplementação destes indivíduos com antioxidantes, como vitamina C e E poderia ser benéfica em relação ao seu estado clínico.

Observa-se a diminuição da percentagem de hemólise na presença de vitamina E e vitamina C + E, mas não na presença somente de vitamina C em eritrócitos AA, AS e SS (Figura 22). Em contraste com estes dados, LACHANT & TANAKA (1986) demonstraram um efeito protetor do ácido ascórbico em eritrócitos falciformes contra a hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio *in vitro*.

Quanto à avaliação da metahemoglobina de indivíduos com hemoglobina AS e SS, observou-se forte ação pró-oxidante de TBHP 1-5 mmoles/l e uma menor ação em eritrócitos de indivíduos normais (AA). Os níveis de metahemoglobina na presença de 5 mmoles/l de TBHP foram de 80, 60 e 20%, respectivamente, para indivíduos SS, AS e AA. A presença das vitaminas reduz os níveis de

metahemoglobina para os eritrócitos SS e AS. Comparativamente, nenhum efeito foi observado para os eritrócitos normais.

Os produtos resultantes da degradação oxidativa da hemoglobina, caracterizados pelo aumento dos valores médios de metahemoglobina e do número de corpos de Heinz, estão relacionados com a concentração de HbS. Assim, a degradação oxidativa da hemoglobina decresce entre os genótipos estudados da seguinte forma: SS > AS > AA.

Há muito tempo tem-se sugerido que a suplementação com vitamina C pode ser benéfica para indivíduos que sofrem de anemia falciforme. Estudos *in vitro* mostraram que o ácido ascórbico tem efeito estimulatório sobre a taxa de oxidação da glicose nas células falciformes (LACHANT; TANAKA, 1986). Vários pesquisadores demonstraram que suplementação de vitamina C reduziu o número de drepanócitos irreversíveis e aumentou a concentração de hemoglobina e o volume corpuscular médio (VCM) em indivíduos adultos portadores de anemia falciforme (JAJA et al., 2000) e em crianças (JAJA et al., 2002). Acredita-se que estas ações sejam devidas à redução da destruição destes eritrócitos.

AMER et al. (2003 e 2004) demonstraram que agentes oxidantes estão aumentados, enquanto agentes antioxidantes como vitamina C e vitamina E estão diminuídos nas células falciformes. A suplementação, com tais vitaminas, pode reduzir o estresse oxidativo, tanto na anemia falciforme quanto em pacientes com talassemia. Estudos realizados por HASANATO (2006), comprovaram que, além da deficiência de vitaminas antioxidantes, os pacientes com anemia falciforme, também possuem quantidades plasmáticas elevadas de cobre, que é um elemento bem conhecido por suas propriedade pró-oxidativas, fato agravante que contribui na severidade do desequilíbrio redox.

ANDERSEN et al., (1997) evidenciaram que as variações nas concentrações de sistemas antioxidantes de uma população em geral e a influência da idade, sexo, estilo de vida, dieta e fatores ambientais são parâmetros que devem ser considerados antes do papel dos antioxidantes na prevenção de doenças, como acontece em pacientes portadores de Hb S, que possuem níveis diminuídos de vitaminas antioxidantes e atividade exacerbada do sistema antioxidante.

Assim como ocorre em eritrócitos normais, a exposição de eritrócitos de pacientes de anemia falciforme (SS) ao TBHP leva, em poucos segundos, a reações

com a hemoglobina, oxidando-a e formando radicais altamente reativos, como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e OH^{\cdot} . Estes radicais conduzem à formação de metahemoglobina e hemicromos, causando peroxidação lipídica na membrana e aumentando a quantidade de corpos de Heinz (FERRALI et al., 1992; HASHMI & SALEEMUDDIN, 1996; CESQUINI et al., 2003).

Estes resultados são totalmente concordantes com os obtidos por LACHANT & TANAKA (1986), que observaram que a vitamina C, na concentração de 1 mmol/l, inibiu a formação de corpos de Heinz induzida por *cloridrato de fenil-hidrazina* em eritrócitos falcêmicos. Os mesmos autores ainda salientam que a vitamina C em baixas concentrações (0,1mmol/l) mostra-se eficaz na proteção destes eritrócitos contra a hemólise, embora em concentrações maiores possa ser fonte desencadeadora de hemólise. Entretanto, a vitamina E foi encontrada como maior responsável pela proteção efetiva de elevados índices de hemólise. Este antioxidante mostrou-se eficaz pela sua ação direta na membrana plasmática, prevenindo a formação de drepanócitos e diminuindo a quantidade circulante destas células (LACHANT & TANAKA, 1986; CHAN et al., 1999, JAJA et al., 2005).

Quanto à atividade de G6-PD, observou-se uma forte inibição na presença de TBHP 1-5 mmoles/l. As atividades enzimáticas observadas na presença de 5 mmoles/l de TBHP (1 a 6 UI/g Hb) não sofreram nenhuma alteração nas presenças de vitaminas C e E até 20 mmoles/l. O mesmo fenômeno ocorreu com a enzima GR, ou seja, nenhuma recuperação foi observada nas presenças destas vitaminas.

Para o monitoramento da concentração de GSH de indivíduos com hemoglobina AA, AS e SS, observou-se forte ação pró-oxidante de TBHP 1-5 mmoles/l, chegando a valores de GSH próximos de zero a partir de 2 mmoles/l de TBHP. Os níveis de GSH observados na presença de 1 mmol/l de TBHP foram de cerca de 2 a 4 μ moles/g Hb. Os níveis de vitamina C e E empregados (0,5 a 20 mmoles/l) mostraram uma leve recuperação dos níveis de GSH para a hemoglobina SS.

Os estudos realizados por REID et al. (2006) sugerem que baixos níveis de GSH em eritrócitos de pacientes com doença falciforme não são devidos à supressão na síntese ou prejuízo na regeneração, mas sim ao aumento do consumo

deste tripeptídeo, em virtude da condição do aumento constante de estresse oxidativo nestes eritrócitos.

O processo oxidativo induzido pelo TBHP nos eritrócitos humanos pode ser descrito a partir da seguinte seqüência de eventos: ⇒ rápida oxidação da GSH (30 a 60 segundos) ⇒ oxidação da oxihemoglobina ⇒ peroxidação lipídica da membrana. Estes eventos vêm acompanhados da transformação morfológica da célula, com vesiculação, agregação, formação de equinócito ou estomatócito, mudanças nos complexos e na estrutura da membrana plasmática e sua hiperpolarização (DOMANSKI et al., 2005). Uma vez que o hidroperóxido orgânico inicia a cascata de reações nos eritrócitos, a química e bioquímica deste já está bem conhecida. Contudo, nas células falciformes estes eventos tomam uma dimensão muito maior, tendo como principal estágio a interação da oxiHb S com TBHP, que culmina em efeitos deletérios tanto para o eritrócito SS quanto para o heterozigoto AS (CESQUINI et al., 2003).

Como exposto anteriormente, ao interagir com espécies reativas de O_2 geradas por oxidantes, a vitamina C se oxida a ácido desidroascórbico, voltando a ser reduzida pela GSH. Assim, a concentração de GSH diminui, com formação de GSSG. Uma possível explicação para os resultados obtidos é que a vitamina C, em baixas concentrações, não seria suficiente para interagir com grande quantidade de radicais livres e $O_2^{\cdot -}$ gerados pelo TBHP, não havendo excesso de ácido desidroascórbico para ser reduzido pela GSH. Este evento poderia ocorrer tanto em eritrócitos AA, quanto nos AS e SS.

A vitamina E, sabidamente, não tem atuação efetiva na face citosólica dos eritrócitos e, conseqüentemente, não exerceria ação sobre a GSH, que está inteiramente imersa no citoplasma do eritrócito. CHEN et al., (2000) demonstraram, em hepatócitos de ratos, que o pré-tratamento, *in vitro*, com 100 μ moles/l de succinato de tocoferol não impediu a diminuição da concentração de GSH provocada pela adição de TBHP 2 mmoles/l.

ADELEKAN et al. (1989) demonstraram que níveis dos metabólitos do sistema antioxidante de eritrócitos de pacientes com anemia falciforme e traço falciforme estão reduzidos comparativamente a eritrócitos normais. Os níveis mais baixos encontrados foram para a concentração de vitamina E, que se encontraram significativamente inferiores em tais pacientes. Ácido ascórbico pode ser importante

em indivíduos portadores de anemia falciforme devido ao significativo estresse oxidativo que ocorre nesta doença. O ascorbato pode contribuir para a redução da geração de espécies reativas de oxigênio geradas nestes eritrócitos e para reciclagem da vitamina E nas células. (WESTERMAN, et al. 2000). Estudos realizados por JAJA et al. (2005) demonstraram que a suplementação em curto prazo com α -tocoferol pode ser benéfica em crianças que sofrem de anemia falciforme.

WESTERMAN et al. (2000) concluíram que o (1) ascorbato está presente nas células falciformes, mais comumente devido à reciclagem do ascorbato pela vitamina E, apesar do aumento da geração de radicais livres. (2) o aumento da excreção renal pode contribuir para os baixos níveis plasmáticos de ascorbato. (3) A presença ampla de ascorbato nas células falciformes e a diminuição de ascorbato no plasma, sugerem que o ascorbato se movimenta pela membrana do drepanócito de forma diferente daquela dos eritrócitos normais.

AMER et al. (2005) evidenciaram que o tratamento *in vitro* de eritrócitos falcêmicos com antioxidante N-acetilcisteína (NAC) inibiu a formação de drepanócitos irreversíveis e restabeleceu os níveis normais de GSH.

Glutathiona reduzida, vitamina E, vitamina C e as enzimas antioxidantes são as principais defesas antioxidantes contra a injúria oxidativa nas células falciformes e a primeira consequência da deficiência de um ou mais destes antioxidantes é dano ao drepanócito (CESQUINI et al., 2003). Interações entre flavonóides e ácido ascórbico têm sido amplamente descritas, CESQUINI et al. (2003) comprovaram que a adição de ascorbato para reagir na proteção do eritrócito falciforme da oxidação pelo TBHP, aumentou o potencial antioxidante dos flavonóides quercetina e rutina. Entretanto nossos resultados não demonstraram ação eficaz da vitamina C ou da vitamina E e tão pouco do uso simultâneo das duas vitaminas na recuperação de GSH.

Quando os eritrócitos contendo hemoglobinas AA e AS são armazenados durante 42 dias, ocorre uma alteração significativa em seu estado redox provocado pelo estresse oxidativo. Esses resultados foram observados na avaliação de formação de corpos de Heinz, metahemoglobina, índices de hemólise, níveis de GSH e atividade das enzimas G6-PD e GR, ilustrados nas figuras 5-16 e tabela 13.

Para corpos de Heinz e metahemoglobina, as vitaminas C e E empregadas nas concentrações até 20 mmoles/l foram capazes de proteger o eritrócito contra o

dano oxidativo provocado pelo estresse do armazenamento. Para a hemólise houve uma leve proteção para eritrócitos com a hemoglobina AA (anova $p < 0,05$). Para ambos os eritrócitos os níveis de concentração de GSH e níveis de atividade das enzimas G6-PD e GR diminuíram durante o armazenamento, mesmo com o tratamento com as vitaminas C e E antes da estocagem. Houve um aumento no índice de hemólise para eritrócitos com a hemoglobina AS (anova $p < 0,05$).

Para eritrócitos contendo a hemoglobina AS, as vitaminas C e E mostraram certa capacidade para proteger as enzimas G6-PD e GR contra os danos causados pela incubação dos eritrócitos com 5 mmoles/l de TBHP, mas não contra os danos causados pelo estresse durante o armazenamento em 42 dias

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que os eritrócitos contendo hemoglobina AS e SS são muito mais suscetíveis à ação pro-oxidante do TBHP até 5 mmoles/l e às perdas de proteção contra o estresse oxidativo durante o armazenamento. Entretanto, as vitaminas C e E, nas concentrações de até 20 mmoles/l, mostraram-se eficazes na proteção do estado redox da hemoglobina e contra os mecanismos oxidativos de hemólise.

Esses efeitos protetores das vitaminas C e E sobre o estresse oxidativo observado principalmente em eritrócitos AS e SS abrem perspectivas para o emprego dessas vitaminas no tratamento de pacientes com anemia falciforme, bem como na preservação de unidades transfusionais de eritrócitos AS.

7 CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo da ação protetora das vitaminas C e E em estresse oxidativo por armazenamento e ação do pró-oxidante *tert*-butilhidroperóxido (TBHP) em eritrócitos normais (AA) e de heterozigotos para hemoglobina S (AS), armazenados a 4°C em durante 42 dias; e, em estresse oxidativo somente pela ação de TBHP, em eritrócitos AA, AS e de pacientes portadores de anemia falciforme (SS), após 30 min de incubação, permitem concluir que:

1. O TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles/l, causou ação oxidante em eritrócitos AA, AS e SS, proporcional à sua concentração, demonstrada pela avaliação de formação de corpos de Heinz, metahemoglobina, hemólise, níveis de GSH e atividades das enzimas G6-PD e GR;
2. A pré-incubação dos eritrócitos AA e AS com vitamina C, vitamina E e vitamina C+E, 0,5 a 20 mmoles/l, protegeu contra o estresse oxidativo devido ao armazenamento e à ação do TBHP, de acordo com os valores de formação de corpos de Heinz, metahemoglobina e hemólise. Não foi observada proteção contra a redução nos níveis de GSH;
3. Em eritrócitos AS, as vitaminas C e E mostraram certa capacidade para proteger as enzimas G6-PD e GR contra os danos causados pela incubação dos eritrócitos com 5 mmoles/l de TBHP, mas não pelo estresse durante o armazenamento de 42 dias;
4. Foram observadas as ações protetoras das vitaminas C e E para a formação de corpos de Heinz, metahemoglobina, GSH e hemólise, em eritrócitos SS.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que os eritrócitos AS e SS são muito mais suscetíveis à ação pró-oxidante do TBHP até 5 mmoles/l e às perdas de proteção contra o estresse oxidativo durante o armazenamento.

Entretanto, as vitaminas C e E, em concentrações de até 20 mmoles/l, mostraram-se eficazes na proteção do estado redox da hemoglobina e contra os mecanismos oxidativos de hemólise. Esses efeitos protetores das vitaminas C e E

sobre o estresse oxidativo, observados principalmente em eritrócitos AS e SS, abrem perspectivas para o emprego dessas vitaminas no tratamento de pacientes com anemia falciforme, bem como na preservação de unidades transfusionais de eritrócitos AS.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELEKAN, D.A.; THUMHAN, D.I.; ADEKILE, A.D. Reduced antioxidant capacity in pediatric patients with homozygous sickle cell disease. **European Journal of Clinical nutrition**. v.43, n.9. p. 609-614. 1989.
- AHENE, S.A.; O'BRIEN, N.M. **Free Rad. Biol. Med.** v.29. p.507-514. 2000.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos de Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, 1999. p. 80.
- ALICIGÜZEL, Y.; ASLAN, M. N-Acetyl cysteine, L-cysteine and β -mercaptoethanol augment selenium-glutathione peroxidase activity in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient human erythrocytes. **Clinical Experimental Medicine**. V. 3. p. 50-55. 2004.
- AMER, J.; FILBACH, E. Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta-thalassaemia patients. **British Journal of Haematology**. V. 129. p.435-441. 2005.
- AMER, J.; HUSSAN, G.; RACHMILEWITZ, E.; KOREM, A.; LEVIN, C.; FIBACH, EITAN. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **British Journal of Haematology**. V. 132. p.108-113. 2005.
- ANDERSEN, H.R.; NIELSEN, J.B.; NIELSEN, F.; GRANDEJAN, P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. **Clinical Chemistry**. v.43. n. 4, p.562-568. 1997.
- ANASTASSOPOULOU, J.; ANIFANTAKIS, B.; ANIFANTAKIS, Z.-A.; DOVAS, A.; THEOPHANIDES, T. The role of free radical reactions with haemoglobin and thalassaemia. **Journal of Inorganic Biochemistry**. V. 79. p. 327-329. 2000.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE BANCOS DE SANGUE (AABB). Terapêutica Transfusional: Manual para Médicos. 3 ed. Bethesda, 1986, 104p.
- AUBUCHON, J.P.; ESTEP, T.N.; DAVEY, R.J. The effect on the plasticized di-2-ethylhexyl phthalate on the survival of stored RBCs. **Blood**. New York, v.71. p.448-452. 1988
- AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 39, p. 231-255, 2000.
- BEARD, M.J.; CARDIGAN, R.; SEGATCHIAN, J.; BENNETT, J.; SMITH, K.M.; WILLIAMSON, L.M. Leucofiltration of sickle cell trait blood "the blocker": NBS London & S.E. experience. **Transfusion Science**. v.22, n.1-2. p.71-73. 2000.

BEARD, M.J.; CARDIGAN, R.; SEGATCHIAN, J.; KRAILADSIRI, P.; WILLIAMSON, L.M. Variables determining blockage of WBC-depleting filters by Hb sickle cell trait donations. **Transfusion**. v.44, n.3. p.422-430. 2004.

BENNETT, J.C.; PLUM, F. **Cecil - Tratado de Medicina Interna**. 20 ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1997, 2647 p.

BEPU, M.; TAKANASHI, M.; MURAKAMI, M.; KATO, T.; KIKUGAWA, K. Modification of glycoporphin A during oxidation of erythrocyte membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 1023, p. 413-420. 1990.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods**. 3. ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984.

BEUTLER, E.; DERN, R.; ALVING, A.S. The hemolytic effect of primaquine. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 45. p. 40-45. 1955.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of good glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. Saint Louis, v. 61. p. 882-890, 1963.

BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLIER, B. S.; KIPPS, T. J. K. **Hematology**. 5. ed., New York: Mc Graw-Hill, 1995, p.L51.

BODENSTEINER, D.C. Leukocyte depletion filters: a comparison of efficiency. **Am. J. Hematol.** New York, v.35. p.184-186. 1990.

BRACCI, R.; PERRONE, S.; BUONOCORE, G. Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period. **Acta Paediatrica. Supplementum**, Uppsala, v.91(438), p. 130-134, 2002.

BRANDÃO, M.M.; FONTES, A.; CESAR, C.L.; SAAD, S.T.O.; BARJAS-CASTRO, M.L. Elastic properties of stored red blood cells from sickle trait donors units. **Vox Sanguinis**. v.85. p. 213-215. 2003.

BRIGELIUS-FLOHÈ, R.; TRABER, M. Vitamin E: function and metabolism. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 13, p. 1145-1153, 1999.

BRISZEWSKA, M.; ZAVODNIK, I.B.; NIEKURZAK, A.; SZOSLAND, K. **Biochem. Mol. Biol. Int.** v. 37. p. 345-354. 1995.

BROWNLEE, N.R.; HUTTNER, J.J.; PANGANAMALA, R.V.; CORNWELL, D.G. Role of vitamin E in glutathione-induced oxidant stress: methemoglobinemia, lipid peroxidation and hemolysis. **Journal of Lipid Research**, New York. v. 18, p. 635-642. 1977.

BROWNE, P.; SHALEV, O.; HEBBEL, R.P. The Molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 24 (n. 6) p. 1040-1048. 1998.

BUKOWSKA, B. 2,4,5-T and 2,4,5-TCP induce oxidative damage in human erythrocytes: the role of glutathione. **Cell Biology International**. v. 28, p. 557-568. 2004.

BUNN, H.F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v.337, p.762-769, 1997.

CAPRARI, P.; BOZZI, A.; MALORNI, W.; BOTTINI, A.; EOSI, F.; SANTINI, M.T.; SLAVATI, A.M. **Chem. Biol. Interact**. v.94. p. 243-258. 1995.

CATANIA, A.; CAIMI, G. Membrane eritrocitária interrelazioni fra lipidi, protodi, e proprietà dinamiche. **Minerva Medica**, Turin, v. 83, p. 187-192, 1992.

CESQUINI, M.; TORSONI, M.A.; STOPPA, G.R.; OGO, S.H. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. n.57. p. 124-129. 2003.

CHAN, A.; CHOW, C.; CHIU, D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 222, p. 274-282, 1999.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. **Food and Chemical Toxicology**. Elmsford, v. 37, p. 949-962, 1999.

CHAILLEY, B.; WEED, R.I.; LEBLOND, P.F.; MAIGNÉ, L. Formes échinocytaires et stomatocytaires du globule rouge. **Nou. Rev. Fr. Hématol**. v.13, p.71-88, 1973.

CHEESMAN, K. H.; SLATER, T.F. **Radicais Livres em Medicina**. Interlivros, 1. Ed. Rio de Janeiro, 1996.

CHEN, H. W.; CHIANG, M. T.; WANG, C. Y.; LII, C. K. Inhibition of terc-butyl hydroperoxide-induced by α -tocopherol and glutathione. **Food and Chemical toxicology**. Elmsford, v.38, p.1089-1096, 2000.

CHENG, M.; HO, H.; TSENG, H.; LEE, C.; SHIH, L.; CHIU, D.T. Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of α - thalassaemia. **British Journal of Haematology**. V. 128. p. 119-127. 2004.

CICCOLI, L.; SIGNORINI, C.; SCARANO, C.; ROSSI, V.; BAMBAGIONI, S.; FERRALI, M.; COMPORTI, M.; Iron release in erythrocytes from patients with beta-thalassemia. **Free radical Research**. London, v. 30(5), p. 407-413, 1999.

CLARCK, M.R. Senescence of red blood cells: Progress and Problems. **Physiol. Rev.**, Bethesda: v. 68, p 503-553,1988.

CLARO, L.M.; ALBERTON, K.; LEONART, M.S.S. Formação de corpos de Heinz em eritrócitos de pacientes portadores de anemias hemolíticas. **Revista do XXV Congresso brasileiro de Análises Clínicas**. Porto Alegre, v.30. n.2. p. 93.1998.

CLARO, L. M.; LEONART, M.S.; NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamins C and E on oxidative process in human erythrocyte. **Cell Biochemistry and Function**. v.230, p. 1-5. 2006.

COLEMAN, M.D. Use of *in vitro* methaemoglobin generation to study antioxidant status in the diabetic erythrocytes. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 60, p.1409-1416, 2000.

COMAR, S. R. **Ação de quercetina, rutina e extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera* em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa**. Curitiba. 2003. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

COMPORTI, M.; SIGNORI, C.; BUONOCORE, G.; CICCOLI, L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. **Free Radical Biology & Medicine**. New York, v. 32(7), p. 568-576, 2002.

DACIE, J.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 8 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.

DAS, D.K.; ERSMAN, W.B. Oxigen radicals. Sitemic events and disease process. Basel: Karger, 1990. 196p.

DHALIWAL, G.; CORNETT, P.A.; TIERNEY, JR, L.M. Hemolytic Anemia. **American Family Physician**, V. 69 (11). p. 2599-2606. 2004.

DEUTICKE, B.; HELLER, K.B.; HAEST, C.W.M. Progressive oxidative membrane damage in erythrocyte after pulse treatment with t-butylhydroxide. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 899, p. 113-124. 1987.

DODGE, J.; MITCHELL, C.; HANAHAN, D.J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. New York. V. 100. p. 119-130, 1963.

DOMANSKI, A.V.; LAPSHINA, E.A.; ZAVODNIK, I.B. Oxidative processes induced by tert-Butyl Hydroperoxide in Human Red Blood Cells: Chemiluminescence Studies. **Biochemistry (Moscow)**. v.7, n.7, p.761-769. 2005.

DUNNE, J. CARON, A. MENU, P. et al. Ascorbate removes key precursors to oxidative damage by cell free hemoglobin in vitro and in vivo. **Biochemical Journal**. v.399, n.3, p.513-524. 2006.

EMBURY, S.H.; HEBBEL, R.P.; MOHANDAS, N.; STEINBERG, M.H. Sickle cell disease basic principles and clinical practice. New York. **Raven Press**. 1994.

EVELYN, K.A.; MALLOY, H.A.T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 126. p. 655-664, 1938.

DUCROCQ, R. Good practices for the study of hemoglobin. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, 2003.

DUTTA-ROY, A. K. Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of α -tocopherol: role of tocopherol-binding proteins. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 37, p. 967-971, 1999.

FERNANDES, M. A. S.; GERALDES, C. F. G. C.; OLIVEIRA, C. R.; ALPOIM, M. C. Chromate-induced human erythrocytes haemoglobin oxidation and peroxidation: influence on vitamin E, vitamin C, salicylate, desferoxamine and N-ethylmaleimide. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 114, p. 237-243, 2000.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CICCOLI, L.; COMPORTI, M. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. **Biochemical Journal**. London. v. 285, p. 295-301. 1992.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; CACCIOTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M.; Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**. Amsterdam, v. 416, p.123-129, 1999.

FERRALI, M.; SIGNORINI, C.; BAMBAGIONI, S.; ROSSI, V.; POMPELLA, A.; COMPORTI, M.; Protection of erythrocyte against oxidative damage and autologous immunoglobulin G (IgG) binding by iron chelator flúor-benzoil-pyridoxal hidrazone. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 59, p. 1365-1373, 2000.

FRANCIS, C.K.; BLEAKLEY, D.W. The risk of sudden death in sickle cell trait: noninvasive assessment of cardiac response to exercise. **Catheterization and Cardiovascular Diagnosis**. v.6. p.73-80.1980.

FRANK, J. E. Diagnosis and management of G6PD deficiency. **American Family Physician**.V. 72. p. 1277-1282. 2005.

FREI, B. Molecular and biological mechanism of antioxidant action. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 13, p. 963-964, 1999.

GRIMES, A. T.; **Human red cell metabolism**. Oxford: Blackwell, 1980, 384p.

HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo. **Free Radical Research**, London, v. 25, n. 5, p. 439-454, 1996.

HALLIWELL, B. The antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Radical Research**, London, v. 31, p. 261-272, 1999.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**. v.355, p.1179-1180. 2000.

HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. **Blood: Principles and Practice of Hematology**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, p. 76-174, 1995.

HARRIS, J. R. **Blood cell biochemistry**. London: Plenum Press, 1991. v. 3: Erythroid Cells. Cap. 7.

HASANATO, R.M.W. Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia. **Ann. Saudi Méd.** v.26, n.1: p.17-21. 2006.

HASHMI, A.; SALEEMUDDIN, M. Phenylhydrazine causes sulfhydryl oxidation and protein aggregation in hemoglobin-free human erythrocyte membranes. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 40, n. 3, p. 543-550. 1996.

HEATON, A.; MIRIPOL, J.; GRAPKA, B.; et al. Improved storage of high hematocrit cell concentrates using a manitol, adenine, saline, glucose solution. **Transfusion**. Philadelphia : v.21. p.600-601. 1981.

HEATON, A.; MIRIPOL, J.; ASTER, R.; et al. Use of ADSOL preservation solution for prolonged storage of low viscosity AS-1 red blood cells. **Br. J. Haematol.** Oxford : v.57. p.467-478. 1984.

HEBBEL, R.; EATON, J.; BALASINGAM, M.; STEINBERG, M. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 70, p. 1253-1259, 1982.

HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab. Clin. Méd.** v. 107, p. 401-404. 1986.

HEBBEL, R.P. The sickle erythrocyte in double jeopardy: Autoxidation and iron descompartmentalization. **Semin. Hematol.** v.1, p.51-69. 1990.

HIPP, M.J.; SCOTT, R.B. Altered filterability of CPD-stored sickle trait donor blood. **Transfusion**. v.14, n.5. p. 447-452. 1974.

HÖGMAN, C.F.; HEDLUND, K.; ZETTERSTROM, H. Clinical usefulness of red cells preserved in protein-poor mediums. **N. England J. Méd.** Boston : v. 299. p.1377-1382. 1978.

HÖGMAN, C.F.; HEDLUND, K.; SAHLESTROM, Y. Red cell preservation in protein-poor media. Protection against *in vitro* hemolysis. **Vox Sanguinis**. Basel. V. 41. p. 274-281. 1981

HÖGMAN, C.F.; AKERBLUM, O.; HEDLUND, K.; et al. Red cell suspensions in SAGM medium. **Vox Sang.** Basel : v. 45. p.217-223. 1983a.

HÖGMAN, C.F.; ROSÉN, I.; ANDREEN, M. et al. Haemotherapy with red cell concentrates and new red cell storage medium. **Lancet**. London : v.1. p.269-272. 1983b.

HÖGMAN, C.F.; ERIKSSON, L.; ERICSON, A.; et al. Storage of saline-adenine-glucose-mannitol-suspended red cells in a new plastic container: polyvinylchloride plasticized with butyryl-n-trihexyl-citrate. **Transfusion**. Philadelphia : v.31. p.26-29. 1991.

JAJA, S.I.; OPESANWO, O.; MOJIMINIYI, F.B.; KEHINDE, M.O. Lung function, hemoglobin and irreversibly sickled cell patients. **West African Journal of Medicine**. v.19, n.3. p.225-229. 2000.

JAJA, S.I.; IKOTUN, A.R.; GBENEBITSE, S.; TEMIYE, E.O. Blood pressure, hematologic and erythrocyte fragility changes in children suffering from sickle cell anemia following ascorbic acid supplementation. **Journal of Tropical Pediatrics**. v.48, n.6. p. 366-370. 2002.

JAJA, S.I.; GBADAMOSI, T.A.; GBENEBITSE, S.; KEHINDE, M.O. The effect of warmth or/and vitamin E supplementation on forearm vascular resistance in sickle cell anaemia subjects. **Nigerian Postgraduate Medical Journal**. v.10, n.1. p. 6-12. 2003.

JAJA, S.I.; GBENEBITSE, S.; KEHINDE, M.O. Effect of changes in plasma vitamin E level of vascular responses and lipid peroxidation in sickle cell anaemia subjects. **Nigerian Postgraduate Medical Journal**. v.12, n.2. p. 81-84. 2004

JAJA, S.I.; AIGBE, P.E.; GBENEBITSE, S.; TEMIYE, E.O. Changes in erythrocyte following supplementation with alpha-tocopherol in children suffering from sickle cell anaemia. **Nigerian Postgraduate Medical Journal**. v. 12, n.2. p.110-114. 2005.

JAIN, S.K.; SUBRAHMANYAM, D. On the mechanism of phenylhydrazine-induced hemolytic anemia. **Biochemical Biophysical Research Communication**. Orlando, v. 82. p. 1320-1324. 1978.

JAIN, S. K.; MOHANDAS, N.; CLARCK, M. R.; SHOHET, S. B. The effect of malonyldialdehyde, a product of lipid peroxidation on the deformability, dehydration and ⁵¹Cr-survival of erythrocytes. **British Journal of Haematology**, London, v. 53, p.247-255, 1983.

JANDL, J.H. **Blood: Pathophysiology**. Blackwell Scientific Publications, Inc., Boston: 1991.

JANDL, J. H. **Blood: textbook of Hematology**. 2.ed., Boston: Brown and Company, 1996, 1510p.

KASSAB-CHEKIR, A.; LARADI, S.; FERCHICHI, S.; KHELIL, A.H.; FEKI, M.; AMRI, F.; SELMI, H.; BEJAOU, M.; MILED, A. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. **Clinica Chimica**. V.338. p. 79-86. 2003.

KENNEDY, MS.; JULIUS, C. Transfusion therapy. In: Harmening, D. **Modern Blood Banking and Transfusion Practices**. 3th. ed. Philadelphia: FA Davis Company, p. 316-333, 1994.

KLINGS, E.S.; FARBER, H.W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Respiratory Research**. V. 2. p. 280-285. 2001.

KOGA, T.; MORO, K.; TERAU, J. Protective effect of vitamin E analog, phosphatidylchromanol, against oxidative hemolysis of human erythrocytes. **Lipids**, Champaing, v. 33, n. 6, p. 589-595, 1998.

KOPEC-SZLEZAK, J.; GRABARCZYK, M.; SZCZEPANKA, D.W.; et al. Protective effects of vitamins E and C in erythrocyte in blood preserved in ACD solution and stored at 4 degree C. **Haematology**. Budapest: v.21. p.219-226, 1988.

KRUKOSKI, D.W. Ação antioxidante de ácido L-ascórbico e desferroxamina em eritrócitos humanos isolados submetidos a sobrecarga oxidativa por *tert*-butil hidroperóxido. Curitiba. 2006. 75p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.

KUO, W.Y.; TANG, T.K. Effects of G6PD overexpression in NIH3T3 cells treated with *tert*-butyl hidroperoxide ou paraquat. **Free Radical & Medicine**. v.24, n. 7/8. p. 1130-1138. 1998.

LACHANT, N.A.; NOBLE, N.A.; MYHRE, B.A.; et al. Antioxidant metabolism during blood storage and its relationship to posttransfusion cell survival. **Am. J. Hematol**. New York : v.17. p.237-349. 1984.

LACHANT, N.; TANAKA, K.; Antioxidants in sickle cell disease: the in vitro effects of acid acorbic. **The American Journal of the Medical Sciences**, New York, v. 292, n.1, p. 3-10, 1986.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London. V. 227. p. 783-789, 1970.

LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 196-217.

LII, C.K.; KO, Y.; CHIANG, M.; SUNG, W.; CHEN, H. Effects of dietary vitamin E on antioxidant status and antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats. **Nutrition and Cancer**, New Jersey, v. 32, n. 2, p. 95-100, 1998.

LIU, G. T.; ZHANG, T. M.; WANG, B.E.; WANG, Y. W. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. **Biochemical Pharmacology**. New York, v. 43(2), p. 147-152, 1992.

LOPEZ, N.; GONZALEZ, O.L.; HIDALGO, P.C. Erythrocyte glutathione reductase in pregnant women with hemoglobin AA and AS. **Sangre (Barcelona)**. v. 44. n. 3, p.195-198. 1999.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biologic Chemistry**. Baltimore. V.193. p.265-275, 1951.

MANSOURI, A.; LURIE, A. Concise review: methaemoglobinemia. **American Journal of Hematology**, New York, v. 42, p. 7-12, 1993.

MAWATARI, S.; MEURAKAMI, K. Effects of ascorbate on membrane phospholipids and tocoferols in intact erythrocytes during peroxidation by t-butylhydroperoxide: comparison with effects of dithiothreitol. **Lipids**. v. 36, n. 1. p. 57-65. 2001.

MAY, J. M.; QU, Z.; WHITESELL, R.; COBB, C. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. **Free Radical Biology & Medicine**, London, v. 20, n. 4, p. 543-551, 1996.

MAY, J. M.; Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. **Frontiers in Bioscience**. Philadelphia, v. 2, p. 1-10, 1998.

MAY, J. M.; QU, Z.; MORROW, J.; COBB, C. Ascorbate-dependent protection of human erythrocytes against oxidant stress generated by extracellular diazobenzene sulfonate. **Biochemical Pharmacology**. Oxford, v. 60, p. 47-53, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Resolução da Diretoria Colegiada -RDC no. 153, de 14 de junho de 2004. Anexo 1 - **Regulamento Técnico dos Serviços de Hemoterapia**,. Brasília, Distrito Federal: Ministério da Saúde, 2004.

MIRIPOL, J.; STEWART, M.; GANS, M.; et al. Preparation of platelets and plasma with CPD-ADSOL triple blood-pack units. **Transfusion**. Philadelphia : v.23. p.415. 1983.

MOHANDAS, N.; CHASSIS, J. A. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. **Seminars in Hematology**. Orlando, v. 30, p. 171-192, 1993.

MOLLISON, P.L.; ENGELFRIET, C.P.; CONTRERAS, M. Blood transfusion in clinical medicine. **Blackwell Science**. 10 ed. London. 1972.

MOORE, G.L. Additive solution for better blood preservation. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci**. Cleveland: v.25, p.211-229, 1987.

MOORE, G.L.; LEDFORD, M.E.; MATHEWSON, P.J.; et al. Post-thaw storage at 4°C of previously frozen red cells with retention of 2,3 DPG. **Vox Sang.** Basel: v.53, p. 15-18, 1989.

MURPHY, M.F.; WALLIGTON, T.B.; KELSEY, P. et al. Guidelines for the clinical use of red cell transfusions. **British Journal of Haematology.** v.113: p. 24-31. 2001.

MYLONAS, C.; KOURETAS, D. Lipid peroxidation and tissue damage. **In Vivo,** Athens, v.13(3), p. 295-309, 1999.

NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** Santos, v. 18(173), p. 75-81, 1996.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias.** São Paulo: Sarvier, 1997, 171p.

NAOUM, P.C. **Eletroforese, Técnicas e Diagnósticos.** São Paulo: Santos, 1999.

NIKI, E.; NOGUCHI, N.; TSUCHIHASHI, H.; GOTOH, N.; Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. **American of Clinical Nutrition,** New York, v. 62, supl. p. 1322-1326S, 1995.

NIKI, E. Free radicals in the 1900's: from *in vitro* to *in vivo*. **Free Radical Research,** London, v. 33, p. 693-704, 2000.

NOGUCHI, N.; WATANABE, A.; SHI, H. Diverse functions of antioxidants. **Free Radical Reseach.** v.33, p.809-819. 2000.

OLIVEIRA, M.A.; BÖGGER, J.T.; CAZ ROSA, K.; COLOMBARI, R. Prevalência da hemoglobina S em doadores de sangue na hemorede do estado do Paraná. Umuarama, 2005. Artigo (Especialização – Área de Análises Clínicas) Universidade Paranaense.

OLIVIERI, N. F.; KOREN, G.; HERMANN, C.; BENTUR, Y.; CHUNG, D.; KLEIN, J.; FREEDMAN, M. H.; McCLELLAND, R. A.; TEMPLETON, D. M. Comparison of oral chelator L1 and desferrioxamine in iron loaded patients. **The Lancet.** London, v. 336, p. 1275-1279, 1990.

OLSKI, F.A.; NAIMAN, J.L. Hematologic problems in the newborn. Philadelphia: Saunders. 1972.

OULD AMAR, A.K.; CESAIRE, R.; ROBERT, P.; MAIER, H.; BUCHER, B. Altered filterability of fresh sickle cell trait donor blood. **Vox Sanguinis.** v.73, n.1. p.55-56. 1997.

OULD AMAR, A.K. Red blood cells from donors sickle cell trait: a safety issue for transfusion. **Transfusion Medicine.** v.16. p. 248-253. 2006.

PELISSARI, C.B.; STIGHEN, S.T.; NASCIMENTO, A.J.; LEONART, M.S.S. Padronização para a dosagem de hemoglobina extracelular pelo método da cianometahemoglobina. **Rev. Bras. de Análises Clínicas**. Vol 25, p. 14-16, 1993.

PERCY, M.J.; McFERRAN, N.V.; LAPPIN, T.R.J. Disorders of oxidised haemoglobin. **Blood Reviews**. Vol. 19. p. 61-68. 2005.

RAMALHO, A.S. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. **Revista Associação Médica Brasileira**. v.22. p. 467-468. 1976.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico – Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais**. 6ª ed., Guanabara-Koogan, p.44. Rio de Janeiro. 1997.

RAZOUK, F.H.; REICHE, E.M.V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. **Ver. Bras. Hematol. Hemot.** v.26, n. 2: p. 126-134. 2004.

REID, M.; BADALOO, A.; FORRESTER, T.; JAHOOOR, F. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. **American Journal of Physiology. Endocrinol. Metab.** v. 291. n.1. E.73-79. 2006.

REPKA, T.; SHALEV, O.; REDDY, R.; YUAN, J.; ABRAHAMOV, A.; RACHMILEWITZ, E.; LOW, P.S.; HEBBEL, R.P. Nonrandom association of free iron with membranes of sickle and beta-thalassemic erythrocytes. **Blood**. v.82. p.3204-3210. 1993.

REVUELTA, L.A.; GALEGO, S.J.I.; HERNÁNDEZ, H.A.; YAGUE, S.J.; LLANILLO, M. Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterol-modified erythrocytes exposed to *t*-BuOOH. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1734, p. 74-85, 2005.

RICE-EVANS, C.; OMORPHOS, S.C.; BAYSAL, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. **Biochemical Journal**, London, v. 327, p. 265-269, 1986.

RICE-EVANS, C. BAYSAL, E. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes, **Biochemical Journal**, London, v. 244, p. 191-196, 1987.

RICE-EVANS, C. In: J.R. Harris. **Blood Cell Biochemistry**. New York, Plenum Press, 1991.

ROHN, T.T.; HINDS, T.R.; VINCENZI, F.F. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1153, p. 67-76. 1993.

RUDELL, J.P.; LIPPERT, L.E.; BABCOCK, J.G.; et al. Effect of 24 hour storage at 25 degree C on the *in vitro* storage characteristics of CPDA-1 packed red cells. **Transfusion**. Philadelphia : v.38. p.424-428. 1998.

SALTMAN, P. Oxidative stress: a radical view. **Seminars in Hematology**, New York, v. 26(4), p. 249-256, 1989.

SEAMAN, C., WYSS, S., PIOMELLIS, S. The decline in energetic metabolism with aging in the erythrocyte and its relationship to cell death. **Am. J. Hematol.**, New York, v. 8, p. 31-42, 1980.

SCHUETZ, A.N.; HILIER, K.L.; ROBACK, J.D.; HILLYER, C.D. Leukoreduction filtration of blood with sickle cell trait. **Transfusion Medicine Reviews**. v.18, n.3. p. 168-176. 2004.

SHENG, K.; SHARIFF, M.; HEBBEL, R.P. Comparative oxidation of hemoglobins A and S. **Blood**. New York. v. 91, n.9. p.3467-3470. 1998.

SHINAR, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Oxidation desnaturation of red blood cells in thalassemia. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 27, p. 70-75, 1990.

SHRIER, S.L. Pathophysiology of thalassemia. **Current opinion in Hematology**. V. 9. p. 123-126. 2002.

SIGNORINI, C.; FERRALI, M.; CICCOLI, L.; SUGHERINI, L.; MAGNANI, A.; COMPORTI, M. Iron release, membrane protein oxidation and erythrocyte ageing. **FEBS Letters**. Amsterdam, v. 362, p. 165-170, 1995.

SILVA, P.H.; ZARONI, M.; COMAR, S. R.; ALVES, H. B. Estabelecimento dos valores normais do RDW para a população de Curitiba. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Rio de Janeiro, v.32(3), p. 233-235, 2000.

SIMMONS, A. **Hematology**. Butterworth-Heinemann. 2.ed., Oxford, 1997.

SOMJEE, S.S.; WARRIER, R. P.; THOMSON, J.L.; ORY-ASCANI, J.; HEMPE, J. M. Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, 128. p. 112-118. 2004.

SOUZA, P.C.; NAOUM, P.C. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da Hb S nos genótipos SS, SF (S/ β^0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. **J. Brás. Patol. Med. Lab**. v. 40, n. 4. p. 249-259. 2004.

SUZUKI, T.; DALE, G.L.; BEUTLER, E. The absence of gamma-glutamyltransferase in erythrocyte membranes. **Clinica Chimica Acta**. v.168, p.347-349. 1987.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. *Clinical Haematology*, v. 11, p. 163-84, 1998.

STRONCEK,D.F.; RAINER, T.; SHARON, V.; BYRNE, K.M.; NOGUCHI, C.T.; KLEIN, H.G.; SCHECHTER, A.N.; LEITMAN, S.F. Sickle Hb polymerization in RBC components from donors with sickle cell trait prevents effective WBC reduction by filtration. **Transfusion**, v. 42 (11), p. 1466-1672. 2002.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. New York: W.H.Freeman and Company, 1995. p. 131-135.

SULLIVAN, S. G.; STERN, A. Effects of ascorbate on methaemoglobin reduction in intact red cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 213, n. 2, p. 590-594, 1982.

TAKASU, J.; UYKIMPANG, R. SUNGA, M.A. et al. Aged garlic extract is a potential therapy for sickle-cell anemia. **Journal Nutr.** v.136 (mar). Suppl 3 - p. 803S-805S. 2006.

TATUM, V.; CHOW, C. Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. **Free Radical Research**, London, v. 25, n. 2, p. 133-139, 1996.

TAVAZZI, B.; DI PIERRO, D.; AMORINI, A.M.; FAZZINA, G.; TOTTOBENE, M.; GIARDINA, B.; LAZZARINO, G. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. **European Journal Biochemistry**, Belfast, v. 267, p. 684-689, 2000.

TROTTA, R.J.; SULLIVAN, S.G.; STERN, A. Lipid peroxidation and hemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butylhydroperoxide. Dependence on glucose metabolism and hemoglobin status. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 679, p. 230-237. 1981.

VAN DER ZEE, J., BARR, D.P., MASON, R.P. **Free Rad. Biol. Med.** v.20. p.199-206. 1996.

VAN KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W.G. Standardization of hemoglobinometry. The hemiglobocyanide method. **Clinical Chemistry Acta.** Amsterdam. v6. p.538-545. 1961.

VEIGA, S.; VAITHIANATHAN, T. Massive intravascular sickling after exchange transfusion with sickle cell trait blood. **Transfusion.** v.3. p. 387-391. 1963.

WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B. **The thalassemias syndromes.** 3 ed. Blackwell scientific publication. Oxford. 1981.

WESTERMAN, M.P.; ZHANG, Y.; McCONNELL, J.P. et al. Ascorbate levels in red blood cells and urine in patients with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology.** v.65, n.2 (oct). p.174-175. 2000.

WINTERBOURN, C.C. Protection by ascorbate against acetylphenylhydrazine-induced Heinz body formation in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes. **British Journal of Hematology.** London, v. 41. p. 245-252. 1979.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative desnaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Seminars in Hematology**, New York, v. 27(1), p. 41-50, 1990.

WHO. Prevention and Control of Haemoglobinopathies. **World Health Organization.** Geneva. 31 pp. 1993.

WU, G.; FANG, Y.Z.; YANG, S.; LUPTON, J.R.; TURNER, N.D. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**. v.134, p. 489-492. 2004.

YANG, M.S.; YU, L.C.; RUPTA, R.C. Analysis of changes in energy and redox status in HepG2 hepatoma and C6 glioma cells upon exposure to cadmium. **Toxicology**. v. 201, p. 105-113. 2004.

YANG, M.S.; CHAN, H.W.; YU, L.C. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities are partially responsible for determining the susceptibility of cells to oxidative stress. **Toxicology**. v. 226, p. 126-130. 2006.

ZAGO, M.A.; PASQUINI, R. **Princípios e Fundamentos de Hematologia**. 1 ed. Artmed. São Paulo. 2001.

ZOU, C.G.; AGAR, N.S.; JONE, G.L.; Oxidative insult in sheep red blood cells induced by T-butyl hydroperoxide: the role of glutathione and glutathione peroxidase. **Free Radical Research**. V. 34(1). p. 45-56. 2001.