

DANIEL WITCHMICHEN KRUKOSKI

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO E
DESFEROXAMINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS ISOLADOS
SUBMETIDOS A SOBRECARGA OXIDATIVA POR TERC-
BUTILHIDROPERÓXIDO**

**Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica, Programa
de Pós-graduação em Bioquímica,
Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José
do Nascimento**

**Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Maria
Suely Soares Leonart**

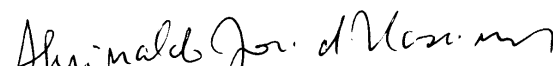
CURITIBA


2006

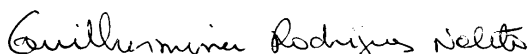
DANIEL WITCHMICHEN KRUKOSKI


**AÇÃO ANTIOXIDANTE DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO E
DESFEROXAMINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS ISOLADOS
SUBMETIDOS A SOBRECARGA OXIDATIVA POR TERC-
BUTILHIDROPERÓXIDO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora formada pelos professores:


Prof. Dr. Aginaldo José do Nascimento (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR


Prof.ª Eva Gunilla Skare Carnieri
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR


Prof.ª Dr.ª Guilhermina Rodrigues Noletto
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR


Prof.ª Dr.ª Lia Nakao
PUC - PR

Curitiba, 15 de fevereiro de 2006

*Custa tanto ser uma pessoa plena,
que muito poucos são aqueles que têm a
luz ou a coragem de pagar o preço...*

*É preciso abandonar por completo a
busca da segurança e correr o risco de
viver com os dois braços...*

*É preciso cortejar a dúvida e a escuridão
como preço do conhecimento...*

*É preciso ter uma vontade obstinada no
conflito, mas também uma capacidade de
aceitação total de cada consequência do
viver e do morrer"*

Morris L. West

Para os meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Aguinaldo José 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 Maria Suely Soares, pelo carinho maternal e por seus conhecimentos, que me incentivaram em todas as horas.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Bioquímica Clínica, em especial ao professor Geraldo Picheth, pelo acesso irrestrito aos equipamentos e pelos conhecimentos compartilhados.

A todos os professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que, de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica.

À aluna de doutorado Luiza Araújo, pelo pronto auxílio na realização das densitometrias em eletroforese.

À funcionária Irene Ermelino Santos do Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica, pelo constante bom-humor e disponibilidade em cooperar.

A Prof^a Almeriane W. Santos, pelos conhecimentos transmitidos e cooperação.

Aos meus pais Sérgio e Lizete, por terem me dado a vida e condições para lutar pelo meu sucesso, e à minha irmã Deborah, pelo apoio e amizade.

Àqueles que, gentilmente, doaram sangue para a execução dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Citologia e Hematologia, em especial a Caroline Prochaska, Christian Siebra, Ângela Florão e Jeanine Nardin, pela amizade e companheirismo.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 O ERITRÓCITO HUMANO	2
1.1.1 A Membrana Eritrocitária.....	2
1.1.2 Metabolismo Eritrocitário	4
1.2 RADICAIS LIVRES E SUBSTÂNCIAS OXIDANTES.....	4
1.2.1 Sistema Antioxidante do Eritrócito	5
1.2.2 Sobrecarga Oxidativa em Eritrócitos e suas Consequências.....	8
1.2.3 Substâncias Oxidantes Usadas como Modelos Experimentais.....	11
1.3 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES	12
1.3.1 Ácido L- Ascórbico na Prevenção de Sobrecarga Oxidativa.	13
1.3.2. Ação Antioxidante do Mesilato de Deferoxamina.	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 COLETA	19
3.1.1 Amostras para Determinação de Metahemoglobina e Glutaciona Reduzida.....	19
3.1.2 Amostras para Determinação de Atividade Enzimática e Eletroforese de Proteínas:	19
3.2 ISOLAMENTO DOS ERITRÓCITOS	19
3.2.1 Lavagem dos eritrócitos	19
3.2.2 Filtração da Suspensão de Eritrócitos:.....	20
3.3 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	20
3.3.1 Incubação de Eritrócitos com Vit C	20
3.3.2 Incubação de Eritrócitos com DFO	20
3.3.3 Incubação de Amostras com Antioxidantes e Controles com terc- butilhidroperóxido	21
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA	21
3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).	22
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE ERITROCITÁRIO	23
3.6.1 Preparo de Hemolisado.....	23
3.6.2 Dosagem da Hemoglobina do Hemolisado:	23
3.6.3 Determinação da Atividade Enzimática de Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6- PD).....	24
3.6.4 Determinação de atividade enzimática de Glutaciona Redutase (GR)	25
3.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS SDS- PAGE.....	26
3.7.1 Preparo do Estroma Eritrocitário (<i>ghosts</i>)	26
3.7.2 Determinação da Concentração de Proteínas dos <i>ghosts</i>	26
3.7.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Duodecil Sulfato de Sódio (SDS PAGE)	26
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES	57
7 REFERÊNCIAS	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSE E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS HUMANOS.....	7
FIGURA 2 - OXIDAÇÃO NO ERITRÓCITOS	11
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA C.....	13
FIGURA 4 - ESTRUTURA DA DESFEROXAMINA	15
FIGURA 5 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP).....	29
FIGURA 6 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) E SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 2 mmols.l ⁻¹	30
FIGURA 7 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO), SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 2 mmols.l ⁻¹	31
FIGURA 8 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmols.l ⁻¹	32
FIGURA 9 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO), SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmols.l ⁻¹	33
FIGURA 10 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 2 mmols.l ⁻¹ , EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ANTIOXIDANTES ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) OU MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO).....	34
FIGURA 11 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmols.l ⁻¹ , EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ANTIOXIDANTES ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) E/OU MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO).....	35
FIGURA 12 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIDANTE DE T-BUTIL HIDROPERÓXIDO (TBHP) 1mmol.l ⁻¹	36
FIGURA 13 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM	

	ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C), SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 1mmol.l ⁻¹	37
FIGURA 14 -	CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO), SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 1mmol.....	38
FIGURA 15 -	CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE AÇÃO DO OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO 1mmol.l ⁻¹ , EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS PRÉ- INCUBADOS COM MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO) E/OU ÁCIDO L-ASCÓRBICO (vit. C	39
FIGURA 16.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLICOSE 6-FOSFATO DESHIDROGENASE (G-6PD) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T- BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 1 A 5 mmoles.l ⁻¹	40
FIGURA 17 -	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T- BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 1 A 7 mmoles.l ⁻¹	41
FIGURA 18 –	ATIVIDADE DE GLUCOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G 6- PD) EM ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmoles.l ⁻¹ . 42	
FIGURA 19 –	ATIVIDADE DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T- BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmoles.l ⁻¹	43
FIGURA 20 –	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL - SULFATO DE SÓDIO (SDS - PAGE) DE MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS ISOLADAS DE ERITRÓCITOS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE T- BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) E DE ANTIOXIDANTES ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) OU MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO).	44
FIGURA 21 –	ANÁLISE DE DENSITOMETRIA DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL - SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) DE MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS ISOLADAS DE ERITRÓCITOS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE T BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) E DE ANTIOXIDANTES L-ÁCIDO ASCÓRBICO (Vit. C) OU MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO)	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - adenosina 5' trifosfato
ADP - adenosina 5' trifosfato
2,3-BPG - 2,3-bisfosfoglicerato
BPGM – bisfosfogliceromutase
BPGP – bisfosfoglicerato fosfatase
DNA - ácido desoxirribonucléico
d.d.p. – diferença de potencial
DFO – mesilato de desferoxamina
DTNB - 5, 5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
FAD – flavina adenina dinucleotídeo fosfato
FADH - flavina adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
GAPD – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G6-PD - glicose 6-fosfato desidrogenase
GR – glutationa redutase
GSH - glutationa reduzida
GSH-Px - glutationa peroxidase
GSSG - glutationa oxidada
Hb - hemoglobina
Hk - hexoquinase
IgG - imunoglobulina G
LDH – lactato desidrogenase
MDA - malonildialdeído
MetaHb - metahemoglobina
NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

PBS - tampão fosfato salino

PFK – fosfofrutoquinase

6-PGD - 6 – fosfogliconato desidrogenase

PGI – fosfoglicose isomerase

PGK – fosfoglicerato quinase

PGM - fosfogliceratomutase

PK – piruvato quinase

q.s.p. – quantidade suficiente para

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de duodecil sódico

SOD - superóxido dismutase

TBHP – terc -butilhidroperóxido

TPI – triose fosfato isomerase

Vit. C - vitamina C

RESUMO

A lesão decorrente de sobrecarga oxidativa em eritrócitos ocorre por geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que ocasionam consumo de glutathiona reduzida (GSH), o principal antioxidante da célula. O comprometimento do sistema de destoxificação redox pode levar à oxidação da hemoglobina a metahemoglobina, culminando com a desnaturação das cadeias de globina e precipitação junto à membrana, bem como a alterações na atividade das enzimas da glicólise e do ciclo das pentoses. Além disso, reações oxidativas em proteínas da membrana podem causar danos estruturais ao eritrócito, provocando hemólise. O objetivo deste trabalho foi investigar a ação oxidante do *terc*-butilhidroperóxido (TBHP) em eritrócitos humanos normais, associada ao efeito protetor antioxidante da vitamina C (Vit. C) e da desferroxamina (DFO). Sangue venoso foi colhido em solução citrato-fosfato-dextrose (CPD) ou EDTA 1 mg.ml⁻¹ como anticoagulantes, após consentimento informado, de 8 indivíduos considerados normais. Os eritrócitos isolados foram pré-incubados em vit. C 1 a 60 mmoles.l⁻¹ e/ou DFO 1 mmol.l⁻¹ e incubados em TBHP 1 a 7 mmoles.l⁻¹ em tampão PBS 66 mmoles.l⁻¹ pH 7,4. O TBHP (2 e 5 mmoles.l⁻¹) ocasionou a formação de metahemoglobina, a depleção de GSH e a diminuição das atividades de G6-PD e de GR, porém não causou danos às proteínas da membrana detectáveis por SDS-PAGE. A Vit. C (5 a 60 mmoles.l⁻¹) inibiu parcialmente a formação de metahemoglobina por TBHP (2 e 5 mmoles.l⁻¹), não influenciou na depleção de GSH por TBHP (1 mmol.l⁻¹), protegeu a GR, mas não a G6-PD de dano oxidativo por TBHP (5 mmoles.l⁻¹). A DFO (1 a 4 mmoles.l⁻¹) inibiu parcialmente a formação de metahemoglobina por TBHP (5 mmoles.l⁻¹), influenciou na depleção de GSH por TBHP 1 mmol.l⁻¹, nas concentrações de 1, 3 e 4 mmoles.l⁻¹, além de não proteger a GR e a G6-PD de dano oxidativo por TBHP (5 mmoles.l⁻¹). Quando se pré-incubou os eritrócitos em Vit. C (20 e 40 mmoles.l⁻¹) e DFO (1 mmol.l⁻¹) não se observou sinergismo ou antagonismo entre ambos. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que tanto a vit C quanto a DFO são capazes de proteger parcialmente a oxidação de compostos fundamentais para o metabolismo eritrocitário.

ABSTRACT

The erythrocytes lesions due to oxidative stress happen by generation of free radicals and reactivate oxygen species that consume large amount of reduced glutation (GSH), the main antioxidant of the cell. The commitment of the detoxification redox system can not prevent the hemoglobin to oxidate to methemoglobin, ending up in globin chain denaturation and its precipitation on the membrane, as well as alterations in the activities of glycolysis and pentose pathways enzymes. Oxidative reactions of membrane proteins can cause structural damages to the erythrocytes, causing hemolysis. The aim of this work was to investigate the oxidative action of the terc-butylhydroperoxide (TBHP) in normal human erythrocytes, associated to the protecting antioxidant effect of the vitamin C (vit. C) and desferroxamine (DFO). Venous blood was colleted in citrate-phosphate-dextrose (CPD) solution, as anticoagulant, from healthy adult individuals after informed consent. The isolated erythrocytes were pre-incubated in 60 mmoles.l^{-1} vit. C or 1 mmol.l^{-1} DFO and incubated in 1 to 7 mmoles.l^{-1} TBHP in 66 mmoles.l^{-1} phosphate buffer solution (PBS), pH7,4. TBHP (2 and 5 mmoles.l^{-1}) caused the methemoglobin formation, the depletion of GSH and the decrease on G6-PD and GR activities, but it did affect on the membrane proteins detected from SDS-PAGE. Vit. C (5 to 60 mmoles.l^{-1}), inhibited partially the methemoglobin formation by TBHP (2 and 5 mmoles.l^{-1}), it had no influence in the depletion of GSH by TBHP (1 mmol.l^{-1}), and it protected GR, but not G6-PD from oxidative damage by TBHP (5 mmoles.l^{-1}). DFO (1 to 4 mmoles.l^{-1}) partially inhibited the methemoglobin formation by TBHP (5 mmoles.l^{-1}), and it influenced in the depletion of GSH by TBHP 1 mmol.l^{-1} . In concentrations of 1, 3 and 4 mmoles.l^{-1} , it didnt protect GR and G6-PD from oxidative damage by TBHP (5 mmoles.l^{-1}). When the erythrocytes were pre-incubated with vit. C (20 and 40 mmoles.l^{-1}) and DFO (1 mmol.l^{-1}) it was not observed synergism or antagonism between them. The results obtained in this work suggest that vit C as well as DFO are capable to partially protect the oxidation of important components of the erythrocyte metabolism.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ERITRÓCITO HUMANO

O eritrócito humano maduro é uma célula simples, que vive aproximadamente 120 dias na circulação periférica, com flexibilidade fisiológica notável. Sua função essencial é transportar oxigênio para os tecidos através da hemoglobina (DACIE & LEWIS, 1995).

Acentuadas particularidades metabólicas e estruturais caracterizam o eritrócito maduro. A partir de células progenitoras da medula óssea, ocorre o processo de diferenciação do eritrócito, que perde, por exocitose, núcleo e organelas, como retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos. Dessa forma, o eritrócito maduro é incapaz de sintetizar proteínas, e não possui metabolismo aeróbico (NAOUM,1997). O resultado é uma célula em forma de disco bicôncavo de aproximadamente 8 μm de diâmetro, com características de deformabilidade e superfície ideais para o transporte e a trocas de gases com os tecidos. Conseqüentemente, o eritrócito torna-se o suporte físico que envolve as moléculas de hemoglobina, assegurando que estas desempenhem seu papel fisiológico com máxima eficiência (LEE et al., 1999).

O eritrócito é um excelente modelo experimental, dada a facilidade de sua obtenção e preservação, bem como o interesse pelos processos fisiopatológicos que nele ocorrem. Distúrbios causados por alterações genéticas, como hemoglobinopatias e eritroenzimopatias, e exposição a agentes externos químicos e físicos, podem resultar em uma diminuição na vida média do eritrócito, muitas vezes relacionada a processos oxidativos (FERRALI et al. 1992; LEONART, 1994, GRELIER et al., 2001).

1.1.1 A Membrana Eritrocitária

A membrana tem um papel chave na manutenção da forma do eritrócito, sendo constituída por 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos. Entre os lipídios, o colesterol e os fosfolipídios estão organizados em bicamada, em quantidades quase equimolares (HARRIS,1991). Os tipos

predominantes de fosfolipídios são a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilserina, na face interna da membrana; a fosfatidilcolina e a esfingomiéline, mais abundantes na face externa da membrana (LEHNINGER et al., 1995). Em geral, substâncias de baixa polaridade atravessam livremente a membrana do eritrócito, enquanto moléculas polares dependem de transporte através de sítios especializados.

As proteínas presentes na membrana eritrocitária são classificadas em integrais e periféricas. As proteínas integrais estão imersas em forma de blocos, enquanto as periféricas, que constituem o citoesqueleto, encontram-se fixadas à face interna da bicamada lipídica, interligadas entre si. (HANDIN et al., 1995). As proteínas periféricas são representadas pelas espectrinas, anquirinas, bandas 4.1, 4.2, 4.9, 5, aducina, bandas 6 e 7. A interação dessas proteínas do citoesqueleto com a bicamada lipídica e com as proteínas integrais da membrana são responsáveis pela flexibilidade e deformabilidade do eritrócito. As proteínas integrais, representadas pela banda 3, glicoforinas e banda 4.5, têm funções diversas, entre elas transporte iônico, ancoragem da membrana ao citoesqueleto, além de ser local para a ligação de antígenos, enzimas e hemoglobina (HANDIN et al., 1995). A separação destas proteínas pode ser feita por eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

O controle da forma eritrocitária depende de fatores como a interação entre citoesqueleto e bicamada lipídica, da disponibilidade energética e de agentes externos (LANGE E SLAYTON, 1982).

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 da rigidez da membrana, as formas anteriores podem transformar-se em uma célula

danificada irreversivelmente e altamente suscetível à hemólise, o esferócito (SIMMONS, 1997).

1.1.2 Metabolismo Eritrocitário

O metabolismo eritrocitário é inteiramente dependente do catabolismo da glicose. A entrada dessa molécula para o meio intracelular ocorre por intermédio de transportadores de membrana tipo GLUT1, independentes de insulina (GANONG, 1999). Mais de 95% da glicose consumida pelo eritrócito é metabolizada através da via de Embden-Meyerhof ou glicólise anaeróbica, gerando adenosina-5'-trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e lactato, a partir da glicose-6-fosfato. As enzimas reguladoras da glicólise são a hexoquinase, a fosfofrutoquinase e a piruvato quinase, as quais são submetidas a complexa modulação alostérica (GRIMES,1980). O ATP é necessário para a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e da morfologia eritrocitária. A energia liberada por esse composto é utilizada indiretamente para a regeneração de compostos vitais para o eritrócito, tais como glutatona reduzida (GSH), NADH, flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e adenosina-5'-monofosfato (AMP) (BEUTLER,1984). A partir de intermediários da via glicolítica, ocorre a produção de 2,3-bisfosfoglicerato, um composto que modula a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio molecular (OSKI & PAPADOULOS,1970). Baixos níveis de ATP acarretam modificações danosas para a célula, tais como a diminuição da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase e a da capacidade de síntese e reaciliação de fosfolipídeos (GRIMES,1980)

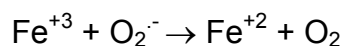
1.2 RADICAIS LIVRES E SUBSTÂNCIAS OXIDANTES

Denominam-se radicais livres as espécies químicas, em geral de alta reatividade, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Eles são gerados constantemente nos sistemas biológicos por diversas fontes, como auto-oxidação, radiações e reações enzimáticas.

O conceito de espécies reativas de oxigênio é mais amplo e compreende não apenas radicais livres como também espécies químicas não radicalares com potencial oxidante.

As espécies reativas de oxigênio que apresentam maior relevância em sistemas biológicos são o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, por serem continuamente geradas em processos fisiológicos e apresentarem potencial deletério às células. (CHEESMAN & SLATER, 1996)

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode ser formado pela redução do oxigênio molecular. Por dismutação, este pode dar origem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 é um agente oxidante, mas não é essencialmente reativo. Seu papel reside principalmente como fonte de radicais hidroxil ($\cdot OH$), especialmente na presença de metais de transição como Fe e Cu. (CHEESMAN & SLATER, 1996; MOSLEN & SMITH, 1996). De acordo com a reação de Fenton, observa-se o preposto:



Os radicais $\cdot OH$ são extremamente reativos, sendo capazes de se combinar com um grande número de moléculas. Aparentemente, são os radicais livres mais nocivos aos sistemas biológicos (RICE-EVANS et al., 1984).

1.2.1 Sistema Antioxidante do Eritrócito

O eritrócito dispõe de aparelhagens metabólica e estrutural especializadas, para manter a hemoglobina no seu estado funcional. Desta forma, transporta grande quantidade de oxigênio de forma relativamente segura para a sua integridade, graças a um complexo sistema de destoxificação, que previne o acúmulo de radicais livres e de outras espécies altamente reativas. O principal tampão redox do eritrócito é a GSH, um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína, sendo esse último aminoácido portador do grupo sulfidríla (SH), grupo empregado nas reações de óxido-redução nas quais a molécula participa (LEHNINGER et al., 1995; STRYER, 1996). A função da GSH é manter componentes diversos da

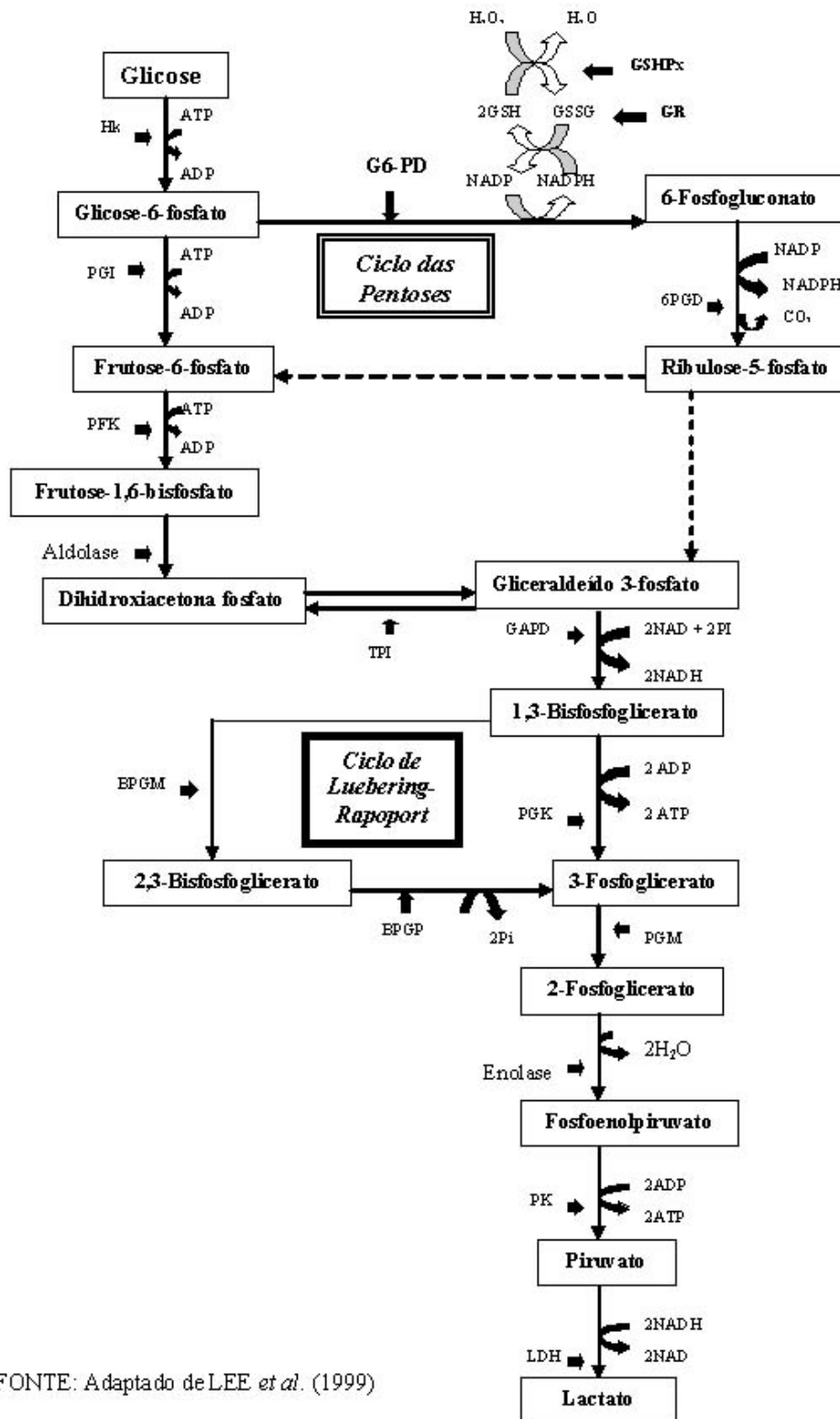
célula em estado reduzido, especialmente proteínas e íons Fe^{++} de grupos heme. A GSH também atua como um nucleófilo, com reatividade para se combinar com várias drogas, gerando metabólitos que facilitam a excreção urinária ou biliar desses xenobióticos (ESTEVEZ et al.,1994). O mecanismo redox de remoção de peróxidos e de outros derivados reativos do O_2 envolve a oxidação da GSH, gerando o dímero denominado glutathiona oxidada (GSSG). A reação de dimerização da GSH é catalisada pela glutathiona peroxidase (GSHPx), uma das raras enzimas que utilizam o elemento selênio. A regeneração da GSSG por redução é realizada pela glutathiona redutase (GR), que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como fonte de elétrons. O NADPH é gerado em uma via alternativa do metabolismo da glucose, o ciclo das pentoses fosfato ou via das hexoses monofosfato. Deficiências ou comprometimentos nas enzimas deste metabolismo, especialmente a glucose-6-fosfato desidrogenase, aumentam enormemente a suscetibilidade do eritrócito ao estresse oxidativo (JANDL,1996).

Outra enzima importante é a superóxido dismutase (SOD), que forma peróxido de hidrogênio a partir do ânion superóxido. O peróxido de hidrogênio é removido pela catalase. A hemoglobina auto-oxidada pode ser convertida à desoxihemoglobina pela metahemoglobina redutase, uma enzima NADH dependente (HARRIS,1991).

Eritrócitos dispõem ainda de aparelhagem metabólica necessária para transferir equivalentes redutores através de sua membrana para o meio extracelular. A atividade de oxirredutase transmembrana está relacionada à manutenção do estado redox de proteínas, neutralização de agentes oxidantes externos e reciclagem da vitamina E na membrana (MAY, 1999).

Mecanismos secundários para a eliminação de produtos de oxidação também estão presentes nos eritrócitos. Foi comprovada a existência de serina-proteases de 80kDa na superfície de eritrócitos submetidos a dano oxidativo por xantina oxidase/ Fe^{3+} . Tal protease é fracamente ligada à membrana do eritrócito, sendo provavelmente originária do citosol. Entretanto, comprovou-se que a afinidade pela membrana citoplasmática, bem como a

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)

atividade proteolítica dessa enzima é incrementada pela oxidação de proteínas da membrana, fato demonstrado pelo aumento da taxa de degradação de espectrinas modificadas oxidativamente (FUJINO *et al.*, 1998).

1.2.2 Sobrecarga Oxidativa em Eritrócitos e suas Consequências

O estudo dos mecanismos de lesão tecidual decorrentes da ação de substâncias oxidantes é de grande importância para a compreensão das formas de dano celular, que a cada dia são mais implicadas em processos patológicos e tóxicos. Além disso, o conhecimento da ação de tais substâncias permite o eficiente direcionamento do uso preventivo de antioxidantes.

Apesar de apresentar poderosos mecanismos de defesa, o eritrócito não tem capacidade de reparar danos à sua membrana citoplasmática. A peroxidação lipídica é um processo complexo pelo qual fosfolipídios da membrana celular reagem com espécies reativas de oxigênio para formar hidroperóxidos, seguido de uma série de reações propagativas. Os hidroperóxidos e dienos conjugados formados se decompõem, formando compostos como malonildialdeído (CHEESMAN & SLATER, 1996). As cadeias laterais de ácidos graxos polinsaturados podem tornar-se oxidativamente modificadas. A medida da lipoperoxidação pode ser feita através de diversos métodos analíticos, sendo o mais comum a dosagem de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malonildialdeído.

As proteínas do eritrócito também podem ser modificadas no processo oxidativo, ocorrendo um acúmulo intracelular de proteínas desnaturadas que o eritrócito não tem meios de metabolizar (HARRIS, 1991). A hemoglobina é uma proteína globular, com estrutura quaternária, formada por quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas do tipo α e duas do tipo β . A cada uma dessas cadeias está coordenado um grupo heme, com um átomo de ferro em estado ferroso (Fe^{++}). A manutenção do estado de oxidação ferroso é fundamental para a preservação da estrutura e da função da hemoglobina. Em situações normais, a molécula de hemoglobina pode se auto-oxidar aproximadamente 10^7 vezes por dia (NAOUM, 1997). Qualquer situação patológica que diminua a defesa antioxidante pode provocar um desequilíbrio no processo de destoxificação de radicais livres. Quando o eritrócito é submetido a estresse oxidativo, pode ocorrer a oxidação da hemoglobina e a formação de complexos

de ferro (RICE EVANS & BAYSAL,1987). A ligação do oxigênio à hemoglobina pode levar ao aparecimento de íons superóxido e à formação de metahemoglobina. Ao elevar-se a concentração de metahemoglobina a níveis tais que os mecanismos de redução não sejam suficientes para reconvertê-la a oxihemoglobina, inicia-se a formação de hemicromos, pela depleção do heme oxidado. O domínio citoplasmático das proteínas da banda 3 do citoesqueleto possui uma alta afinidade pelos hemicromos (LEE et al.,1999). A precipitação de hemicromos junto da membrana eritrocitária favorece a formação de agregados de alto peso molecular, resultantes de sua interação com proteínas da banda 3. Tal fato é notado com maior facilidade em doenças que resultam em maior suscetibilidade a danos oxidativos. Em portadores de β -talassemia, por exemplo, foram isolados agregados protéicos de mais de 4.000 kDa (MANNU et al.,1995). Em eritrócitos de indivíduos com anemia falciforme, entretanto, a proteína que apresenta maior propensão à oxidação é a banda 4.1, atingindo níveis de até 20%, inclusive com mudanças na carga elétrica da membrana (SCHWARTZ et al.,1987). Isto pode ser decorrente da capacidade dos eritrócitos falcêmicos de gerar até duas vezes mais radicais livres do que eritrócitos normais, fato correlacionado principalmente à liberação de ferro livre pelas moléculas de HbS desnaturadas. Além disso, a precipitação de oligômeros de alto peso molecular pode gerar complexos imunorreativos na membrana do eritrócito, favorecendo a ligação de imunoglobulinas e a opsonização, o que culmina com a remoção dos eritrócitos pelo sistema fagocítico mononuclear (MANNU et al.,1995).

Alterações na fluidez e na deformabilidade do eritrócito podem culminar com a associação de hemoglobina desnaturada junto à membrana celular (HARRIS, 1991). Evidências indicam que os hemicromos se aderem à face citosólica da membrana, por interações hidrofóbicas (LOW et al. 1986) ligando-se à parte protéica da membrana, especificamente à banda 3, anquirina e glicoforina, promovendo o agrupamento das mesmas na camada interna da membrana (WAUGH et al., 1992). A precipitação de agregados protéicos junto da membrana citoplasmática forma os chamados corpos de Heinz. Tais inclusões podem ser observadas ao microscópio óptico mediante coloração

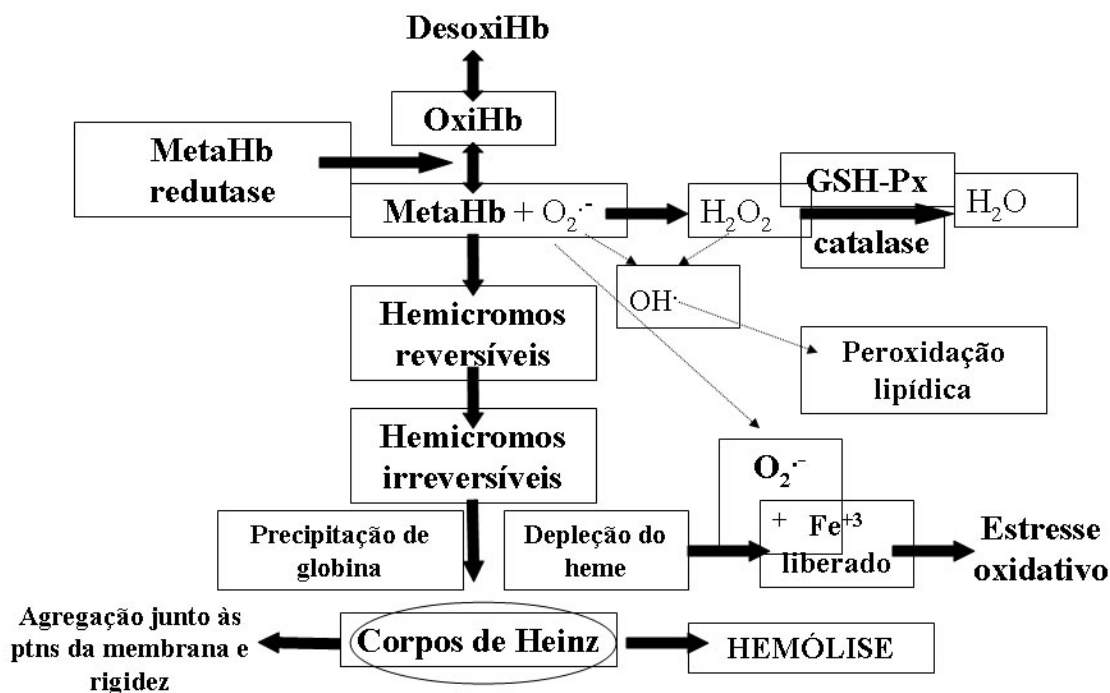
com cristal violeta ou azul de cresil brilhante (BEUTLER, et al.,1995), sendo visualizados como inclusões globulares de aproximadamente 3 μ m.

O heme oxidado, por sua vez, tem afinidade pela albumina plasmática, gerando um composto de característica cor parda (SIMMONS, 1997). Em certas preparações de tecidos, como homogeneizados de cérebro e medula espinhal, demonstrou-se que a heme livre inibiu a Na/K ATPase. O uso de um quelante de ferro anulou essa inibição enzimática, revelando que a liberação do ferro pode ser um processo preponderante para o dano tecidual (MOSLEN & SMITH, 1996).

A determinação da atividade de G6-PD em hemolisados de eritrócitos tornou-se um procedimento relativamente comum em pacientes com crises hemolíticas a investigar, especialmente após doença aguda ou administração de drogas. Aproximadamente 2% da população mundial possui deficiência de G6-PD, em geral um distúrbio genético ligado ao sexo e que pode apresentar variáveis graus de manifestações clínicas (HENRY,1993). Outra enzima do ciclo das pentoses fosfato, a 6-fosfogluconato desidrogenase (6P-GD) , também pode ser quantificada, embora deficiências em 6P-GD ainda não tenham um papel totalmente esclarecido em crises hemolíticas. Algumas anemias hemolíticas têm sido atribuídas à deficiência de GR, uma doença transmitida através de herança autossômica recessiva. Incubação com oxidantes como o cromato causou diminuição na atividade de GR, o que pode ter sido influenciado pela depleção de NADPH intracelular (ROTHKRANTZ et al., 2002). Compostos nitroaromáticos podem inibir GR, influenciando diretamente na capacidade da célula em neutralizar espécies reativas de oxigênio (GRELLIER et al.,2001). Hidroxilaminas são agentes oxidantes que apresentam como efeito mais característico a inibição de G6-PD e de GR (SPOOREN et al., 1998). G6-PD pode sofrer uma adaptação para que a resposta à exposição a oxidantes seja mais eficaz (OBRIEN et al., 2000). Deficiências de GSHPx também foram indicadas como fator de aumento à suscetibilidade para hemólise. Em células NIH3T3, cultivadas com superexpressão de G6-PD, verificou-se um aumento significativo do metabolismo antioxidante, através da elevação de níveis de GSH e NADPH.

Como resultado, a suscetibilidade das células à ação de oxidantes foi consideravelmente diminuída (KUO & TANG 1997).

Figura-2: OXIDAÇÃO NO ERITRÓCITO



1.2.3 Substâncias Oxidantes Usadas como Modelos Experimentais

Diversas substâncias têm sido usadas como modelos para causar injúria oxidativa aos mais diferentes sistemas biológicos, como: primaquina, hidrazinas, compostos nitroaromáticos, paracetamol e seus derivados oxidados, cromato, entre outros (NICOTERA et al., 1990; KUO & TANG, 1997; SCHENELMANN et al., 1999; LEE et al., 1999; FERNANDES et al., 2000; CLARO et al., 2005).

O terc-butilhidroperóxido vem sendo utilizado como um modelo de agente oxidante sobre eritrócitos, especialmente para se avaliar a sobrecarga oxidativa em proteínas eritrocitárias (MOORE et al., 1989; SUZUKI et al., 1987; RICE-EVANS et al., 1985; LII & HUNG, 1997; CHEN et al., 2000). A ação do terc butil-hidroperóxido em concentração de $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ 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 $0,2 \text{ mmol.l}^{-1}$, levaram a modificações nas proteínas citosólicas, contudo, sem formação de oligômeros de alto peso molecular (RICE-EVANS et al., 1985). Na concentração de $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, 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 ratos, o terc-butil hidroperóxido 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 cofator necessário para a atividade de GSH-Px (SUZUKI et al., 1988).

1.3 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

Compostos de baixo peso molecular que atuam na remoção preventiva de radicais livres e de outras espécies reativas de oxigênio também são muito importantes para a manutenção do equilíbrio redox na célula. Pode-se citar compostos como os tocoferóis (vitamina E), compostos polifenólicos, como as antocianidinas e os flavonóides, o ácido L-ascórbico (vitamina C) e quelantes de ferro.

A vitamina E mostra-se mais efetiva na proteção da membrana das células, devido às suas características lipofílicas. Com grande capacidade de seqüestro de radicais livres e grande estabilidade do radical tocoferoxil resultante, a vitamina E mostrou-se eficaz na prevenção de hemólise oxidativa (MAY et al., 1998), especialmente na presença de co-antioxidantes que a

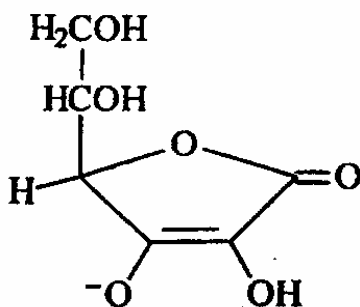
regeneram continuamente. Dentre esses co-antioxidantes, destaca-se a vitamina C (CHAN *et al.*, 1999).

Compostos polifênicos como flavonóides também têm atividade antioxidante comprovada, sendo capazes de penetrar no eritrócito e destoxificar radicais $\cdot\text{OH}$ e peroxil, além de inativar outras substâncias deletérias. Os flavonóides também são capazes de quelar metais, podendo inibir o dano oxidativo resultante da reação de Fenton (FERRALI *et al.*, 1997) 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 terc-butil hidroperóxido e cloridrato de fenilhidrazina, fato revelado pelo decréscimo na formação de metahemoglobina e de corpos de Heinz (COMAR *et al.*, 2002).

1.3.1 Ácido L- Ascórbico na prevenção de sobrecarga oxidativa.

O Ácido L- Ascórbico ou vitamina C é uma cetolactona hidrossolúvel não sintetizada pelo organismo humano, sendo necessário um aporte diário na dieta. O transporte do ascorbato no plasma dá-se na sua forma oxidada, de desidroascorbato, através de receptores GLUT 1. Uma vez dentro da célula, o desidroascorbato pode ser reduzido a ascorbato por meio de diversos artifícios metabólicos. Mecanismos de redução, que envolvem enzimas NADH e NADPH dependentes, tioredoxinas que transportam equivalentes redutores de GSH, além de reações não enzimáticas com GSH e ácido lipóico (MAY *et al.*, 1998).

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA C.



FONTE: MAY (1999).

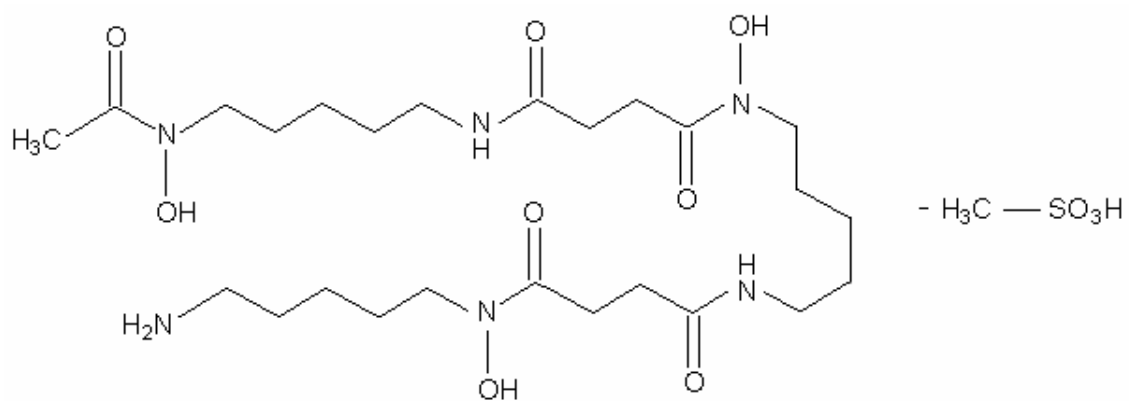
A vitamina C é um antioxidante eficiente por várias razões. O ascorbato e seu produto após a perda de um elétron, o radical ascorbil, apresentam potenciais de redução baixos e podem interagir com grande parte dos radicais livres e outros oxidantes relevantes encontrados em sistemas biológicos, doando elétrons e íons hidreto (BUETTNER, 1993). O radical ascorbil apresenta grande estabilidade devido à ressonância em sua estrutura, facilitando sua dismutação em dehidroascorbato (DHA), evitando posteriores reações propagativas (FREI, 1999). A vitamina C pode ainda atuar regenerando outros compostos de caráter antioxidante presentes na célula, como vitamina E e GSH (MAY,1998; HALLIWEL, 1999; FERNANDES et al., 2000).

Paradoxalmente, observou-se que a vitamina C pode funcionar como um potente pró-oxidante, especialmente na presença de metais de transição, como o Fe. A redução destes metais de transição revelou ser capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, especialmente OH[·] e hidroperóxidos. Há controvérsias sobre a relevância de tais eventos *in vivo*, uma vez que os sistemas biológicos têm um complexo sistema de “seqüestro” de metais livres, como as proteínas ferritina, tranferrina e ceruloplasmina (HALLIWELL, 1996; CHAN et al. 1999).

1.3.2. Ação Antioxidante do Mesilato de Deferoxamina.

O mesilato de deferoxamina (DFO) (Desferal[®], Ciba-Geigy) é um composto capaz de quelar o Fe, sendo largamente utilizado na terapêutica para o tratamento de doenças que envolvem o excesso de Fe e a descompartimentalização do mesmo (GOODMAN,1996) . O envolvimento de íons ferrosos na reação de Fenton, como fonte de radicais hidroxil sugere que o DFO pode ter um efetivo antioxidante, por impedir o desdobramento da referida reação (DAILLY et al, 1998; RICE EVANS et al., 1987; FERNANDES et al., 2000, HALLIWELL, 1985).

FIGURA 4- ESTRUTURA QUÍMICA DA DESFEROXAMINA



2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

No presente trabalho utilizou-se eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa por terc-butilhidroperóxido *in vitro*, com a finalidade de:

- a) Investigar a ação de DFO e vitamina C na proteção contra o dano oxidativo sobre a molécula de hemoglobina, através da determinação da formação de metahemoglobina.
- b) Investigar a ação de DFO e vitamina C na proteção das proteínas de membrana e do citoesqueleto, através de eletroforese de proteínas SDS-PAGE.
- c) Investigar a ação de DFO e vitamina C no metabolismo antioxidante do eritrócito, através da dosagem de GSH.
- d) Investigar a ação de DFO e vitamina C sobre o sistema antioxidante enzimático do eritrócito, pela determinação de atividade de G6-PD e GR.

3 MATERIAL E MÈTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA

Obeve-se sangue venoso humano de 8 indivíduos adultos com idades entre 20 e 29 anos, sendo 5 do sexo masculino e 3 do sexo feminino, após consentimento informado de acordo com o Anexo 1, como aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

3.1.1 Amostras para determinação de metahemoglobina e glutathiona reduzida:

Coletou-se, 10 ml de sangue venoso, utilizando-se EDTA dissódico ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) como anticoagulante.

3.1.2 Amostras para determinação de atividade enzimática e eletroforese de proteínas:

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

3.2 ISOLAMENTO DOS ERITRÓCITOS

3.2.1 Lavagem dos Eritrócitos:

Em centrífuga refrigerada (HERMLE modelo Z323K) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrifugou-se o sangue coletado a $1200 \times g$ por 10 min, retirando-se a camada de leucócitos (*buffy-coat*). Em seguida, lavou-se a suspensão de eritrócitos obtida com solução gelada de $\text{NaCl } 154 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ por três vezes.

3.2.2 Filtração da Suspensão de Eritrócitos:

Esse procedimento visou a retenção dos leucócitos na coluna de filtragem. Pesou-se 1,5 g de mistura equiquantitativa de celulose microcristalina e α -celulose, transferindo-a para uma seringa plástica descartável de 20 ml, sem êmbolo. A coluna resultante foi compactada mecanicamente, umedecendo-a com solução de NaCl 154 mmol.l⁻¹ gelada. Em seguida, adicionou-se a suspensão de eritrócitos, eluindo-a com NaCl 154 mmol.l⁻¹. Coletou-se o filtrado em tubo volumétrico graduado resfriado. Completou-se o volume com tampão fosfato pH 7,4 e glucose 200 mg.ml⁻¹ para resultar em uma suspensão com hematócrito de aproximadamente 45%

3.3 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Incubação de Eritrócitos com Vit. C

À suspensão de eritrócitos obtida após lavagem e filtração (item 3.2.2), adicionou-se ácido L-ascórbico 500 mmol.l⁻¹ solubilizado em solução tampão fosfato 66 mmol.l⁻¹, pH 7,8, a fim de se obter concentrações finais de 1 a 60 mmol.l⁻¹. Os controles foram incubados apenas com solução tampão. A homogeneização foi realizada por inversão em homogeneizador PHOENIX HS22 por 60 min.

3.3.2 Incubação de Eritrócitos com DFO

À suspensão de eritrócitos obtida no item 3.2.2, adicionou-se DFO dissolvido em NaCl 154 mmol.l⁻¹ a fim de se obter concentrações finais de 1 a 4 mmol.l⁻¹. Os controles foram incubados apenas com solução tampão. A homogeneização foi realizada por inversão em homogeneizador PHOENIX HS22 por 60 min.

3.3.3 Incubação de Amostras com Antioxidantes e Controles com terc-butilhidroperóxido (TBHP)

As suspensões obtidas nos itens 3.3.1 e 3.3.2 foram submetidas à ação oxidativa de terc-butilhidroperóxido, dissolvido em NaCl 154 mmol.l⁻¹, para concentrações de 1 a 7 mmol.l⁻¹. A incubação foi realizada sob constante homogeneização por inversão em homogeneizador PHOENIX HS22 por até 120 min.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA

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

Em um tubo de ensaio adicionou-se 100 µl de suspensão de eritrócitos a 10 ml de solução tampão fosfato 16 mmol.l⁻¹, pH 6,6. Realizou-se a homogeneização por inversão e, após 5 min, procedeu-se à leitura espectrofotométrica (A) em comprimento de onda de 630 nm, utilizando-se como branco água destilada. Nessa primeira leitura, a absorvância corresponde à metahemoglobina e outras substâncias cromógenas para o comprimento de onda de 630 nm.

Em seguida, adicionou-se 50 µl de uma solução de cianeto neutralizado (NaCN 10 g.dl⁻¹ e ácido acético 12 g.dl⁻¹ na proporção 1:1). Após 5 min, a homogeneizou-se e 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 solução tampão fosfato 66 mmol.l⁻¹ pH 6,6. Após a homogeneização, a leitura (D) foi realizada em 540 nm, usando-se como branco 10 ml de tampão fosfato 66 mmol.l⁻¹ pH 6,6, adicionando-se 50 µl de solução NaCN 10 g/dl e 50 µl de solução K₃[Fe(CN)₆] 20 g.dl⁻¹. 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:

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

Onde:

F = Fator de correção que varia para cada espectrofotômetro utilizado, é a média dos fatores obtidos para as 5 amostras de sangue utilizadas.

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).

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

Em um tubo de ensaio hemolisou-se 200 µl de suspensão de eritrócitos em 2 ml de água destilada. Adicionou-se uma alíquota de 200 µl de hemolisado a 10 ml de reativo de Drabkin para se estimar a concentração de hemoglobina por método espectrofotométrico (VAN KAMPEN & ZIJLSTRA, 1961)

Em seguida, adicionou-se 2 ml do hemolisado a 3 ml de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico, 0,2 g de EDTA dissódico, 30 g de NaCl e água destilada q.s.p 100 ml). Após 5 min, realizou-se a filtração em papel filtro com grau de porosidade 50.

Adicionou-se uma alíquota de 1 ml do filtrado obtido a uma solução de Na₂HPO₄ 300 mmoles.l⁻¹. Após a homogeneização, procedeu-se a leitura espectrofotométrica a 412 nm (A1). Logo depois, adiciona-se 1 ml de solução de DTNB (ácido 2-dinitrobenzóico) 0,05% ao sistema, realizando-se nova leitura a 412 nm (A2).

A concentração de GSH pode ser expressa em micromoles de GSH por grama de hemoglobina, de acordo com a fórmula:

$$C = \frac{(A2-A1) \times E1 \times 101}{Hb}$$

Onde:

Hb= concentração de hemoglobina da amostra

E1= fator de correção para coeficiente de extinção molar do complexo cromógeno GSH-DTNB.

Os valores de referência em adultos normais são de $7,57 \pm 1,04 \mu\text{moles/g}$ de Hb (BEUTLER,1984)

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE ERITROCITÁRIO

3.6.1 Preparo de Hemolisado

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 a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 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 a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior utilização.

3.6.2 Dosagem da Hemoglobina do Hemolisado

Adicionou-se 200 μl 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 concentração de hemoglobina conhecida, na diluição usual de 1:251. Procedeu-se a leitura a 540 nm, em espectrofotômetro SIEL 500S.

3.6.3 Determinação da Atividade Enzimática de Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6-PD).

Empregou-se o protocolo a seguir:

Reagente	Quantidade (μl)
Tris-HCl-EDTA 0,5 mol.l ⁻¹ pH 8,0	100
MgCl ₂ 0,1mol.l ⁻¹	100
NADP 2mmoles.l ⁻¹	100
Hemolisado 1:20	20
H ₂ O	680

Incubou-se por 10 min a 37°C.

G6-P 6 mmoles.l ⁻¹	100
-------------------------------	-----

Tipo: Cinética com Fator
Unidade: U.g⁻¹ 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

3.6.4 Determinação de Atividade Enzimática de Glutathiona Redutase (GR)
segundo o protocolo a seguir:

Reagente	Quantidade(μl)
Tris-HCl-EDTA 1 mol.l ⁻¹ pH 8,0	50
Hemolisado 1:20	10
H ₂ O	790
FAD, 10 μmoles. l ⁻¹	100

Incubou-se a 37°C por 10 min

GSSG 33 mmoles.l ⁻¹	100
--------------------------------	-----

Incubou-se a 37°C por 10 min.

NADPH 2 mmoles.l ⁻¹	50
--------------------------------	----

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: ΔA = variação de absorbância média por minuto
 10⁵ = diluição
 6,22 = coeficiente de absortividade molar do NADPH
 10 = volume de reação
 [Hb] = concentração de hemoglobina do hemolisado em gramas
 por decilitro

3.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA DE ERITRÓCITOS SDS-PAGE.

3.7.1 Preparo do Estroma Eritrocitário (*ghosts*) pelo método de DODGE et al., 1963 modificado.

Após diversos tratamentos dos eritrócitos com antioxidantes ou oxidantes, isolou-se as proteínas de membrana. A suspensão de eritrócitos foi adicionada a uma solução tampão fosfato de lise hipoosmolar 5 mmol.l⁻¹ pH 8,0 na proporção de 1:40 e fluoreto de metil-sulfonil (PMSF) 0,2 mmol.l⁻¹, como inibidor de proteases. Os hemolisados obtidos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C a 17.000 x g. As proteínas obtidas foram submetidas a sucessivas lavagens com tampão de lise, seguidas de centrifugações, até que se obteve o estroma aparentemente livre de hemoglobina.

O estroma obtido foi aliquoteado e conservado em *freezer* a -70°C até a realização das eletroforeses.

3.7.2 Determinação da Concentração de Proteínas dos *Ghosts* obtidos.

Os estromas eritrocitários obtido no item 4.7.1 tiveram suas concentrações protéicas estimadas pelo método de LOWRY et al., 1951.

3.7.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Duodecil Sulfato de Sódio (SDS PAGE)

Realizou-se a separação de proteínas de membrana eritrocitária pelo método de LAEMMLI (1970) modificado.

Preparou-se o gel de corrida com concentração de 10% de acrilamida / N,N'-metileno-bis-acrilamida (30:0,8 g), em meio tamponado com Tris-HCl 375mmoles.l⁻¹, pH 8,8, com SDS a 0,1%, entre duas placas de vidro de 10x10cm, isoldas por separadores de acrílico, presas por grampos e vedadas com agarose 2%. A polimerização da acrilamida deu-se através da reação com persulfato de amônio, utilizando como catalisador a tetraetileno-diamida

(TEMED). O gel resultante teve comprimento aproximado de 10 cm, com espessura de 6 mm. Sobre o gel de corrida, preparou-se o gel de alinhamento com concentração de 3% de acrilamida / N,N'-metileno-bis-acrilamida (30:0,8g), em meio tamponado com Tris-HCl 125 mmol.l⁻¹, pH 6,8, com SDS a 0,1%. A polimerização ocorreu pelo método usado no gel de corrida. No gel de alinhamento, utilizou-se molde plástico para se obter cavidades de aplicação de amostras. O comprimento do gel de alinhamento obtido foi de 1,5cm. Empregou-se um sistema vertical, com cubas de acrílico para a eletroforese.

Adicionou-se as proteínas do estroma eritrocitário em solução solubilizante contendo 2 g.dl⁻¹ de SDS, 10 ml.dl⁻¹ glicerol, 5 g.dl⁻¹ de ditioneitol e 0,001 g.dl⁻¹ de azul de bromofenol, em meio tamponado com Tris-HCl 0,065 mol.l⁻¹ pH 6,8. A mistura foi submetida a banho-maria fervente por 5 min, para completa desnaturação e solubilização das proteínas.

Preencheu-se as cavidades do gel de alinhamento com o estroma eritrocitário solubilizado, contendo aproximadamente 80 µg de proteínas. Realizou-se a corrida eletroforética em d.d.p de 20 volts, corrente de intensidade de 3 A, durante 16-20h, utilizando-se solução tampão glicina 0,192 mol.l⁻¹ – tris 0,025 mol.l⁻¹, pH 8,3, nos eletrodos. Após a corrida, o gel foi corado com solução azul de Coomassie 0,05%. Após clarificação com ácido acético a 10%, as bandas foram quantificadas por densitometria.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

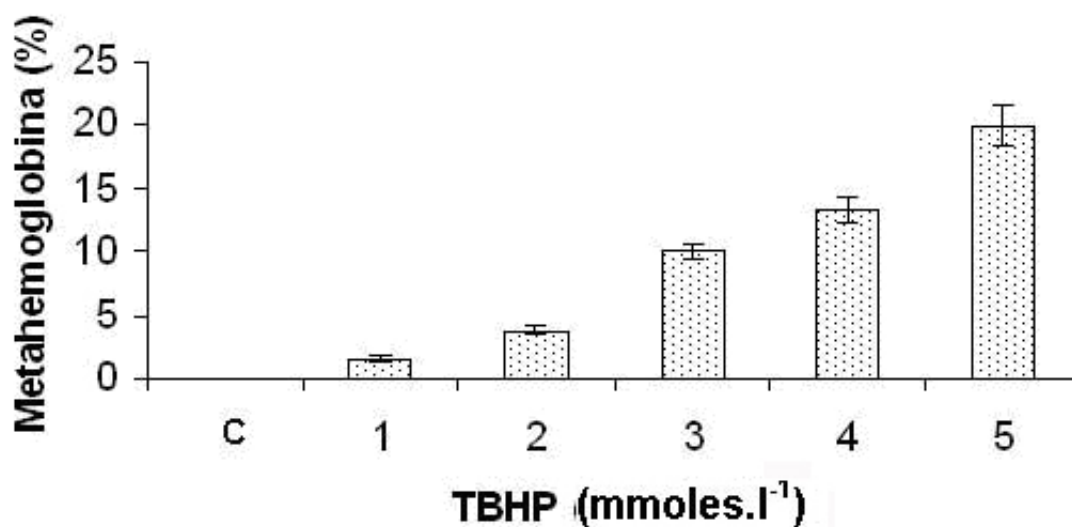
Os dados foram submetidos à análise de variância seguida do teste de Tukey para a comparação de pares de médias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

A Figura 5 apresenta a formação de metahemoglobina (%) em eritrócitos humanos submetidos a ação de TBHP, em concentrações de 1 a 5 mmoles.l^{-1} . Observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas, em relação aos controles não tratados.

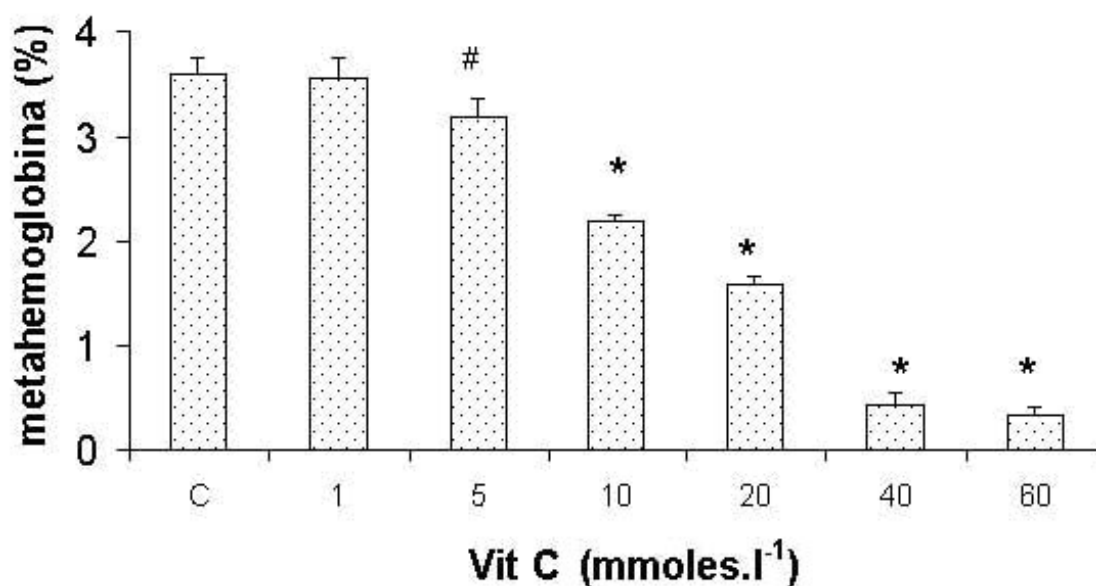
FIGURA 5 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP).



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à ação de TBHP (controle)
n= 12, sendo 4 amostras em triplicatas independentes.
A formação de metahemoglobina foi estimada após ação de TBHP por 30 min.
A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 6 apresenta a formação de metahemoglobina (%) em eritrócitos humanos pré-incubados com Vit. C, em concentrações de 1 a 60 mmoles.l^{-1} , após a ação oxidante de TBHP 2 mmoles.l^{-1} durante 30 min. Observou-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para as concentrações a partir de 10 mmoles.l^{-1} de Vit C em relação ao controle. Considerando-se $p < 0,10$, a concentração de 5 mmoles.l^{-1} também se apresenta estatisticamente diferente do controle.

FIGURA 6 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) E SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 2 mmoles.l^{-1}



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à pre-incubação com Vit. C (controle).

n = 12, sendo 4 amostras em triplicatas independentes.

A formação de metahemoglobina foi estimada após ação de TBHP 2 mmoles.l^{-1} por 30 min.

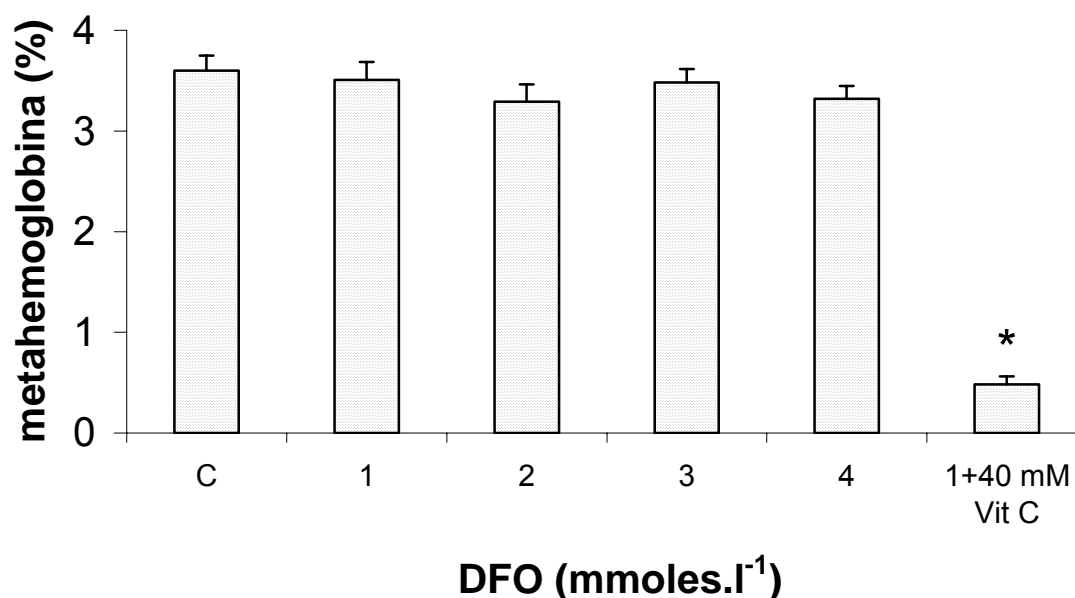
* representa diferença estatística significativa para $p < 0,05$.

representa diferença estatística significativa para $p < 0,10$.

A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 7 apresenta a formação de metahemoglobina (%) em eritrócitos humanos pré-incubados com DFO, em concentrações de 1 a 4 mmoles.l^{-1} , após a ação oxidante de TBHP 2 mmoles.l^{-1} durante 30 min. Não se observou diferenças estatisticamente significativas entre as amostras pré-incubadas com DFO e o controle. Nesse experimento realizou-se ainda a investigação de um possível sinergismo entre Vit. C e DFO, com uma amostra pré-incubada com ambos os antioxidantes, com concentração de Vit. C 40 mmoles.l^{-1} e DFO mmoles.l^{-1} . Observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) desta amostra em relação ao controle e demais amostras pré-incubadas com DFO.

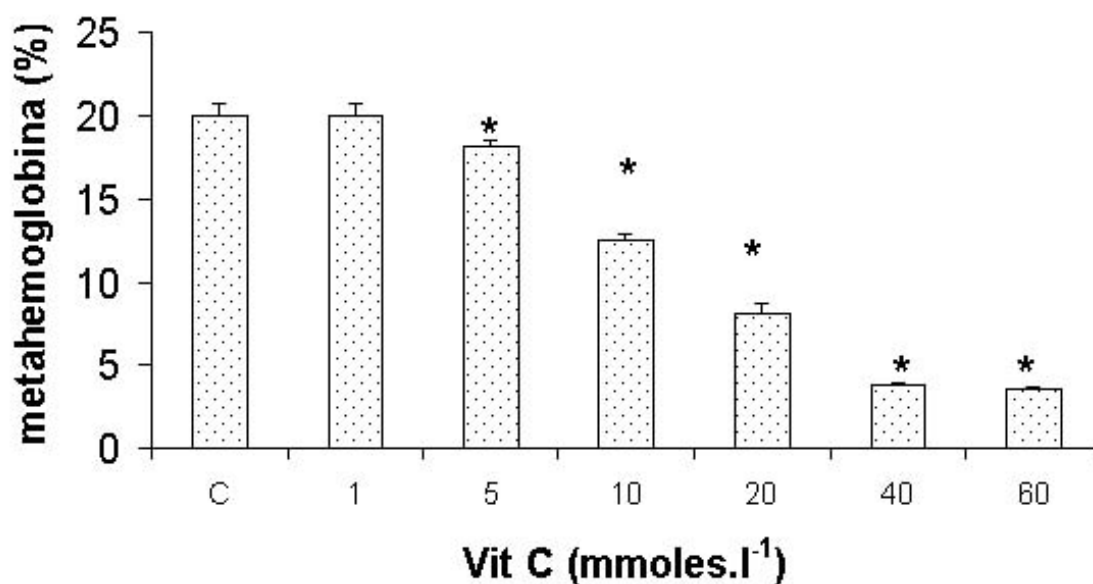
FIGURA 7 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO), SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 2 mmoles.l^{-1}



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à pre-incubação com DFO (controle).
n= 12, sendo 4 amostras em triplicatas independentes.
A formação de metahemoglobina foi estimada após ação de TBHP 2 mmoles.l^{-1} por 30 min.
* representa diferença estatística significativa para $p < 0,05$.
A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 8 apresenta a formação de metahemoglobina (%) em eritrócitos humanos pré-incubados com Vit. C, em concentrações de 1 a 60 mmoles.l^{-1} , após a ação oxidante de TBHP 5 mmoles.l^{-1} durante 30 min. Observou-se diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle ($p < 0,05$) para as concentrações a partir de 5 mmoles.l^{-1} de Vit. C.

FIGURA 8 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmoles.l^{-1}



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à pre-incubação com Vit. C (controle).

n= 12, sendo 4 amostras em triplicatas independentes.

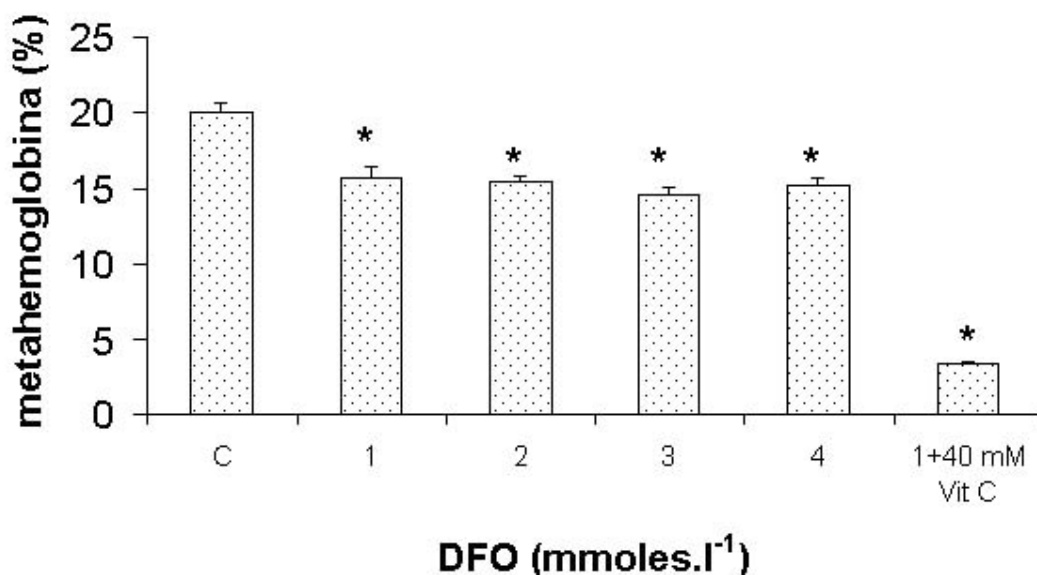
A formação de metahemoglobina foi estimada após ação de TBHP 5 mmoles.l^{-1} por 30 min.

* representa diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$

A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 9 apresenta a formação de metahemoglobina (%) em eritrócitos humanos pré-incubados com DFO, em concentrações de 1 a 4 mmoles.l^{-1} , após a ação oxidante de TBHP 5 mmoles.l^{-1} durante 30 min. Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as amostras pré-incubadas com DFO e o controle. Nesse experimento realizou-se ainda a investigação de um possível sinergismo entre Vit. C e DFO, com uma amostra pré-incubada com ambos os antioxidantes, com concentração de Vit. C 40 mmoles.l^{-1} e DFO 1 mmol.l^{-1} . Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) desta amostra em relação ao controle e demais amostras pré-incubadas com DFO.

FIGURA 9 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO), SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmoles.l^{-1} .



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à pre-incubação com DFO (controle).

N = 12, sendo 4 amostras em triplicatas independentes.

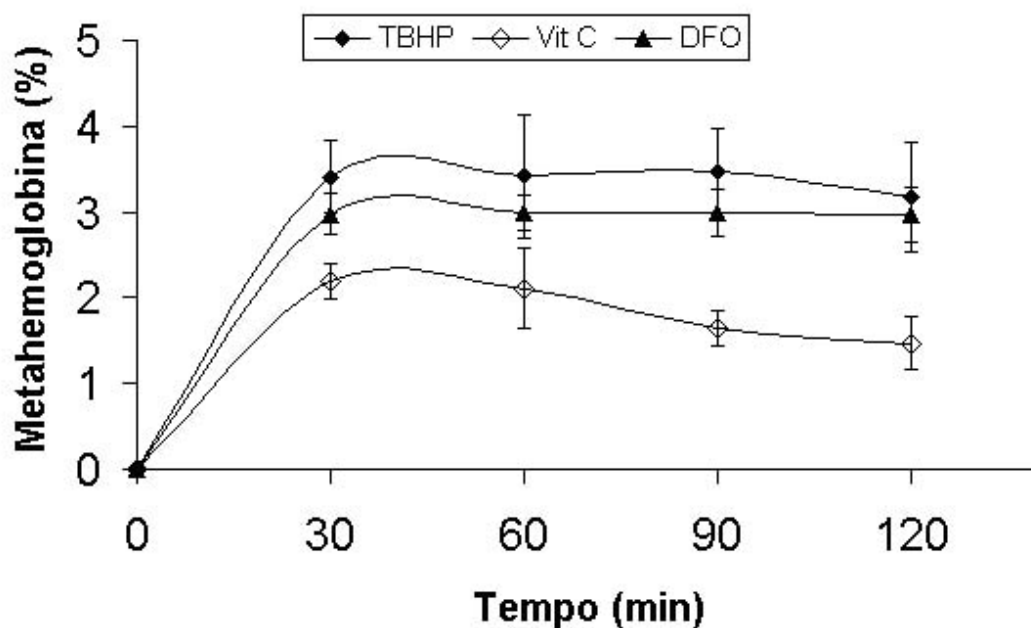
A formação de metahemoglobina foi estimada após ação de TBHP 2 mmoles.l^{-1} por 30 min.

* representa diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 10 apresenta a curva de formação de metahemoglobina em função do tempo, após a exposição a TBHP 2 mmoles.l⁻¹. Nas amostras que foram pré-incubadas com antioxidante Vit. C 20 mmoles.l⁻¹, houve inibição parcial da formação de metahemoglobina, além de uma diminuição gradual da concentração de metahemoglobina após 90 min da adição de TBHP 2 mmoles.l⁻¹. Nas amostras que foram pré-incubadas com antioxidante DFO 1 mmol.l⁻¹, não houve decréscimo significativo nas percentagens de metahemoglobina em relação ao controle, além de não se observar diminuição na concentração de metahemoglobina em função do tempo.

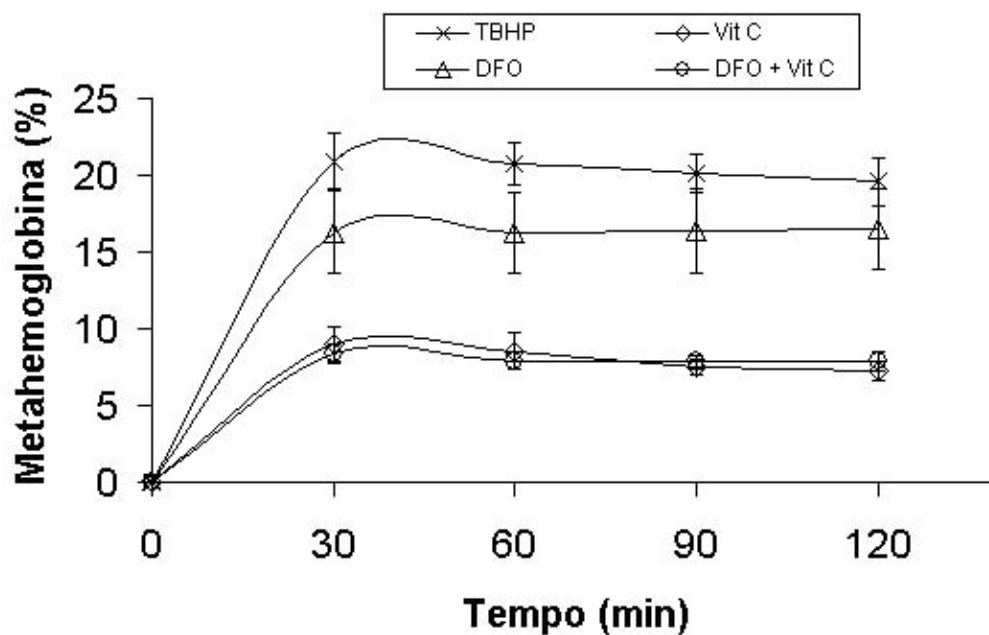
FIGURA 10 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 2 mmoles.l⁻¹, EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ANTIOXIDANTES ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) OU MESILATO DE DESFERROXAMINA (DFO).



NOTAS: TBHP - controle sem pré-incubação com antioxidantes; Vit. C - amostras pré-incubadas com Vit. C 20 mmoles.l⁻¹; DFO - amostras pré-incubadas com DFO 1 mmol.l⁻¹.
n=9, sendo 3 amostras em triplicatas independentes.
A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 11 apresenta a curva de formação de metahemoglobina em função do tempo, após a exposição a TBHP 5 mmoles.l^{-1} . Nas amostras que foram pré-incubadas com antioxidante Vit. C 40 mmoles.l^{-1} , houve inibição parcial da formação de metahemoglobina. Nas amostras que foram pré-incubadas com antioxidante DFO 1 mmol.l^{-1} , também houve decréscimo significativo nas percentagens de metahemoglobina em relação ao controle. Em amostras pré-incubadas com DFO 1 mmoles.l^{-1} e Vit. C 40 mmoles.l^{-1} ocorreu diminuição significativa da formação de metahemoglobina, mas com valores estatisticamente semelhantes ao de eritrócitos pré-incubados apenas com Vit. C 40 mmoles.l^{-1} .

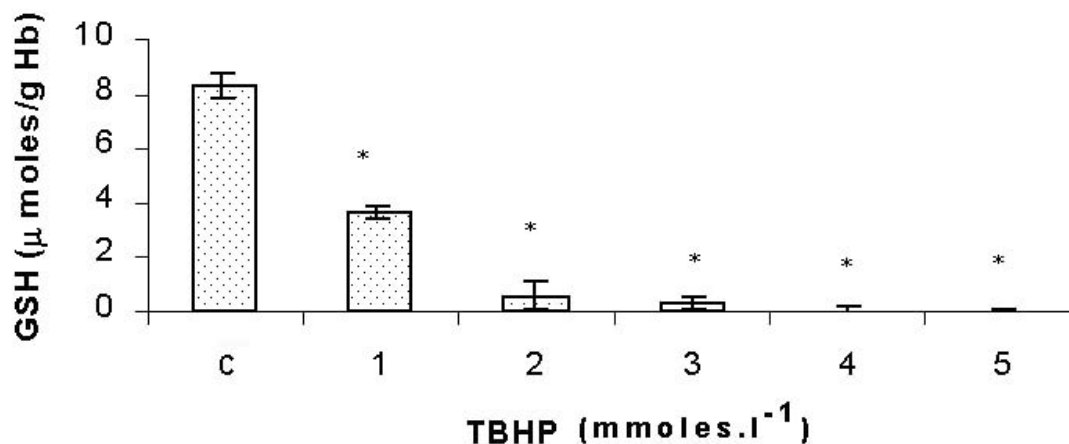
FIGURA 11 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA (%) EM FUNÇÃO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmoles.l^{-1} , EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ANTIOXIDANTES ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) E/OU MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO).



NOTAS: TBHP - controle sem pré-incubação com antioxidantes; Vit. C - amostras pré-incubadas com ácido L-ascórbico 40 mmoles.l^{-1} ; DFO - amostras pré-incubadas com mesilato de desferoxamina 1 mmol.l^{-1} ; DFO + Vit. C - amostras pré-incubadas com mesilato de desferoxamina 1 mmol.l^{-1} e ácido L-ascórbico 40 mmoles.l^{-1} . n=9, sendo 3 amostras em triplicatas independentes. A barra de erro representa o desvio padrão.

Na Figura 12 estão representados os valores de concentração de GSH em eritrócitos submetidos à ação de TBHP em concentrações de 1 a 5 mmoles.l^{-1} . Notou-se diferenças estatisticamente significativas para todas as concentrações testadas em relação ao controle.

FIGURA 12 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO OXIDANTE T-BUTIL HIDROPERÓXIDO (TBHP) 1mmol.l^{-1} .



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à ação de TBHP (controle).

n= 9, sendo 3 amostras em triplicatas independentes.

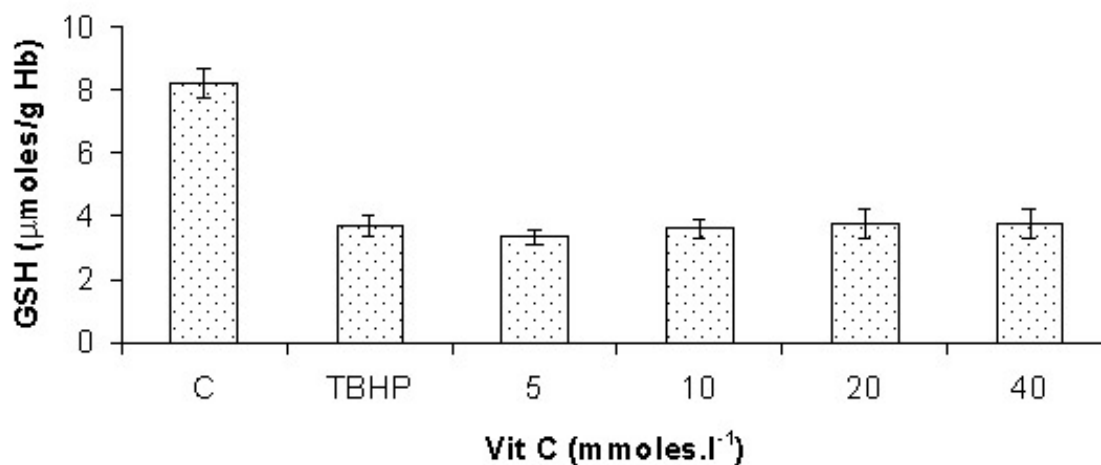
A concentração de GSH foi estimada após ação de TBHP por 30 min.

* representa diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 13 apresenta a concentração de GSH em eritrócitos humanos pré-incubados com Vit. C 5 a 40 mmoles.l^{-1} , após a ação de oxidante TBHP 1mmol.l^{-1} . Não se observou diferenças significativas das amostras em quaisquer concentrações em relação ao controle de oxidação TBHP.

FIGURA 13 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C), SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 1mmol.l^{-1} .

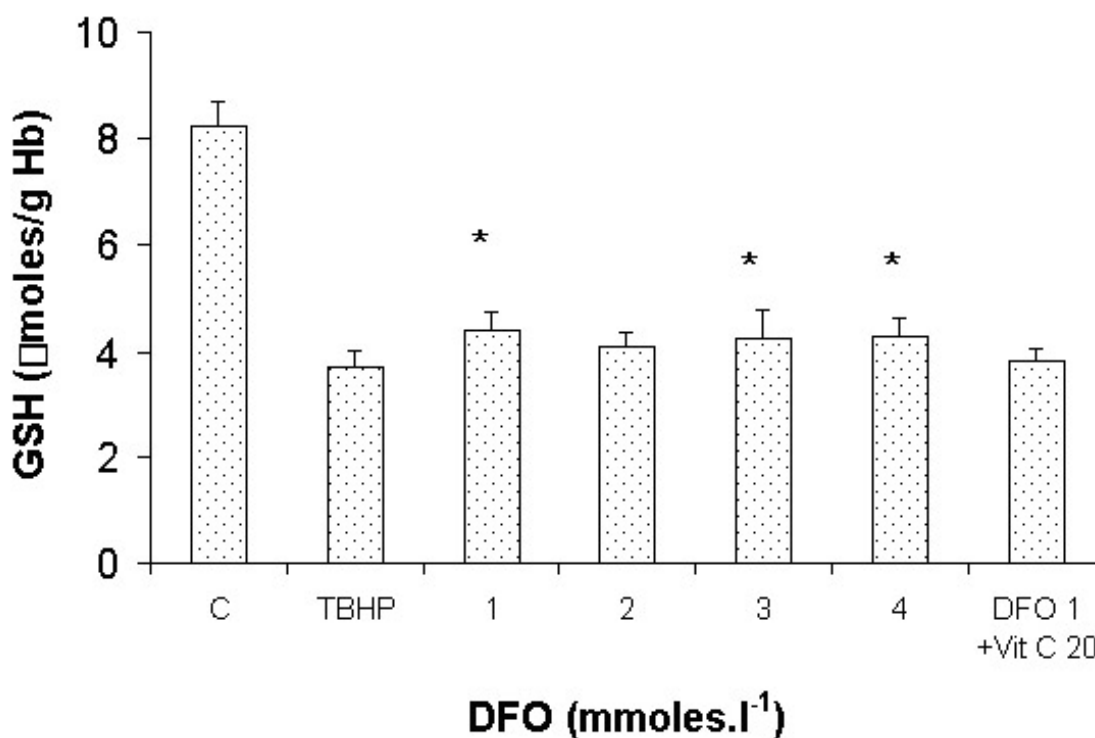


NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à ação de TBHP (controle).
TBHP - eritrócitos não pré-incubados com Vit. C (controle de oxidação).
n= 9, sendo 3 amostras em triplicatas independentes.
A concentração de GSH foi estimada após ação de TBHP por 30 min.
A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 14 apresenta a concentração de GSH em eritrócitos humanos pré-incubados com DFO 1 a 4 mmoles.l^{-1} , após a ação de oxidante TBHP 1mmol.l^{-1} .

Observou-se diferenças estatisticamente significativas das amostras nas concentrações de DFO 1, 3 e 4 mmoles.l^{-1} , em relação ao controle de oxidação TBHP.

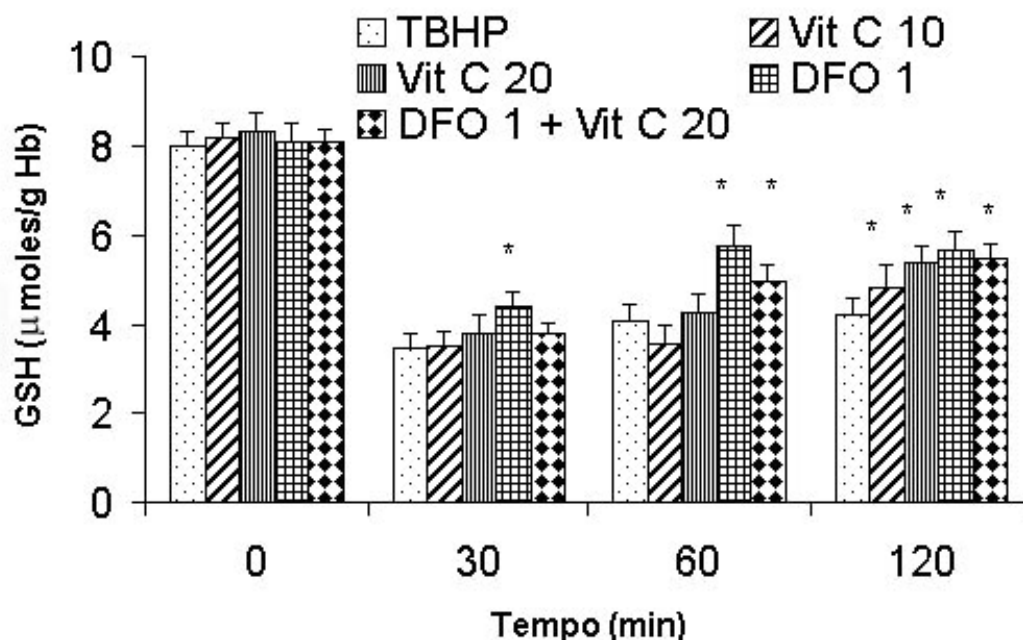
FIGURA 14 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS, PRÉ-INCUBADOS COM MESILATO DE DESFEROXAMINA (DFO), SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 1mmol.l^{-1}



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à ação de TBHP (controle).
TBHP - eritrócitos não pré-incubados com DFO (controle de oxidação).
 $n=9$, sendo 3 amostras em triplicatas independentes.
A concentração de GSH foi estimada após ação de TBHP por 30 min.
* representa diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).
A barra de erro representa o desvio padrão.

A Figura 15 apresenta a concentração de GSH em eritrócitos submetidos a tratamento prévio com antioxidantes Vit. C e DFO em função do tempo, após ação oxidante de TBHP 1mmol.l^{-1} . Em comparação ao controle TBHP, as amostras pré-tratadas com DFO 1mmol.l^{-1} tiveram recuperação significativamente maior da concentração de GSH a partir de 30 min. Amostras com DFO 1mmol.l^{-1} e Vit. C 20 mmoles.l^{-1} apresentaram essa recuperação a partir do tempo 60min, enquanto as amostras Vit C 10 mmoles.l^{-1} e Vit. C 20 mmoles.l^{-1} mostraram diferenças estatisticamente significativas apenas para o tempo de 120 min.

FIGURA 15 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE AÇÃO DO OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO 1mmol.l^{-1} , EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS PRÉ-INCUBADOS COM MESILATO DE DESFERROXAMINA (DFO) E/OU ÁCIDO L-ASCÓRBICO (vit. C).



NOTAS: TBHP - controle sem pré-incubação com antioxidantes; Vit. C - amostras pré-incubadas com ácido L-ascórbico 20mmoles.l^{-1} ; DFO- amostras pré-incubadas com mesilato de desferroxamina 1mmol.l^{-1} ; DFO + Vit. C- amostras pré-incubadas com mesilato de desferroxamina 1mmol.l^{-1} e ácido L-ascórbico 20mmoles.l^{-1} .

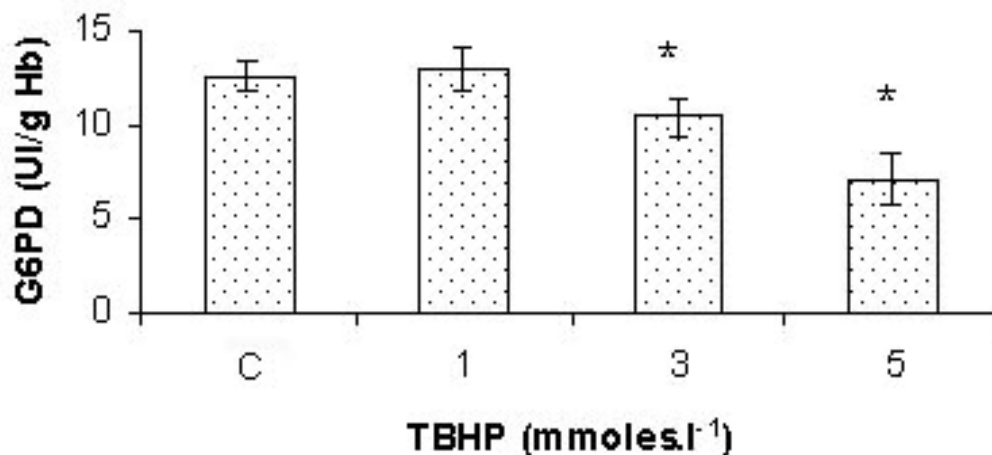
n=9, sendo 3 amostras em triplicatas independentes.

Representa diferença significativa para o controle TBHP para o mesmo intervalo de tempo ($p < 0,05$).

A barra de erro representa o desvio padrão.

Na Figura 16 estão representadas as atividades de G6-PD em eritrócitos humanos normais, após a ação de TBHP. As concentrações de TBHP 3 e 5 mmoles.l^{-1} causaram um decréscimo significativo na atividade enzimática.

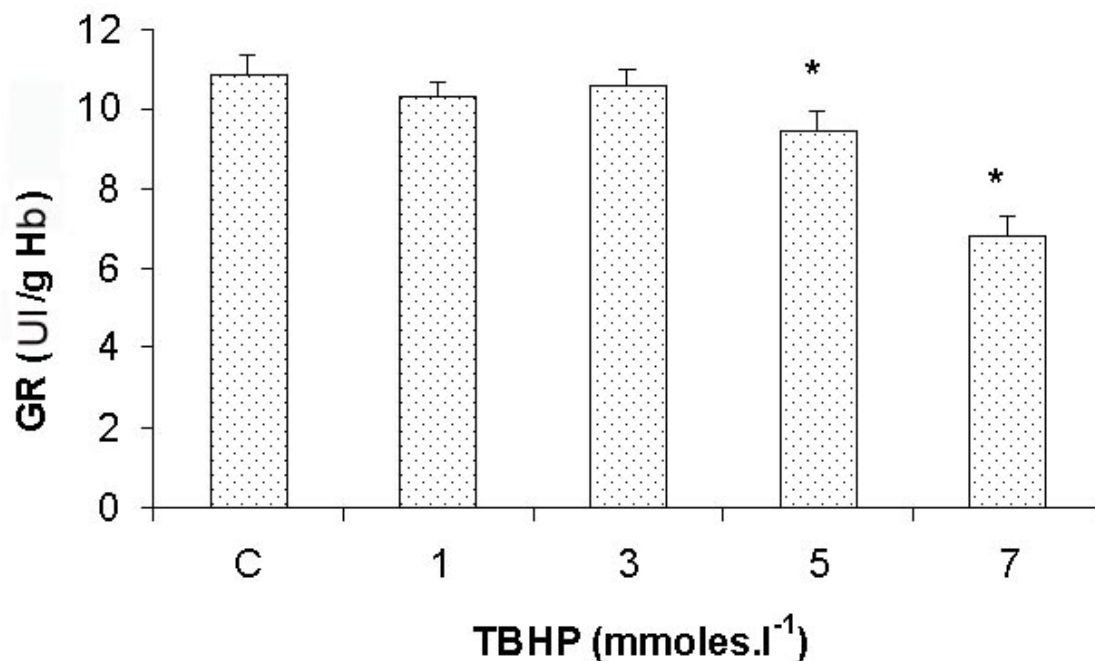
FIGURA 16. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLICOSE 6-FOSFATO DESHIDROGENASE (G-6PD) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 1 A 5 mmoles.l^{-1} .



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à ação de TBHP (controle) $n=6$, sendo 3 amostras em duplicatas independentes. A atividade enzimática foi estimada após ação de TBHP por 30 min. * representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$). A barra de erro representa o desvio padrão.

Na Figura 17 estão representadas as atividades de GR em eritrócitos humanos normais, após a ação de TBHP. As concentrações de TBHP 5 e 7 mmoles.l^{-1} causaram um decréscimo significativo na atividade enzimática.

FIGURA 17 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T- BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 1 A 7 mmoles.l^{-1}



NOTAS: C - eritrócitos não submetidos à ação de TBHP (controle).

n= 6, sendo 3 amostras em duplicatas independentes.

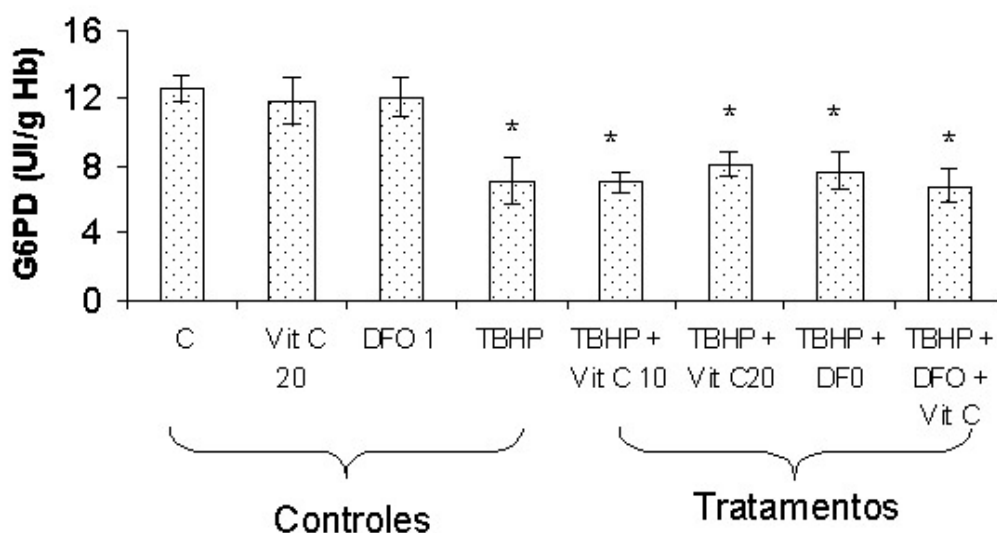
A atividade enzimática foi estimada após ação de TBHP por 30 min.

* representa diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

A barra de erro representa o desvio padrão.

Na Figura 18 estão representados os valores de atividade enzimática de G6-PD eritrócitos humanos normais submetidos a tratamentos com antioxidantes.

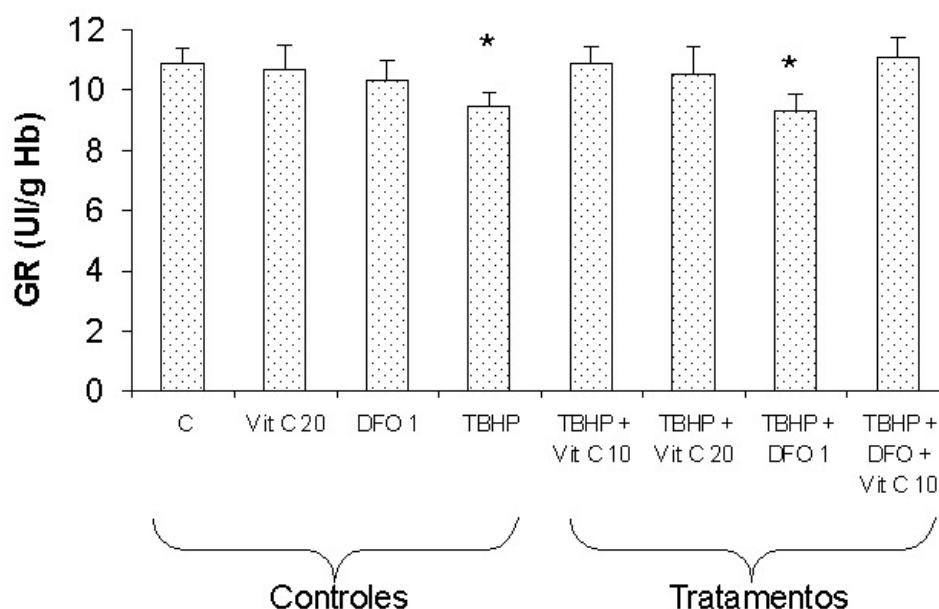
FIGURA 18 – ATIVIDADE DE GLUCOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G 6- PD) EM ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS A AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmoles.l⁻¹.



NOTAS. Controles: C - Controle sem tratamento com antioxidantes; Vit C 20 – Controle incubado com Vit C 20 mmoles.l⁻¹; DFO 1 - Controle incubado com DFO mmoles.l⁻¹; TBHP - Controle de oxidação com TBHP 5 mmoles.l⁻¹;
 Tratamentos: TBHP+ Vit. C 10 – Amostras pré-tratadas com Vit. C 10 mmoles.l⁻¹, com ação de TBHP 5 mmoles.l⁻¹ ; TBHP+ Vit. C 20 – Amostras pré-tratadas com Vit. C 20 mmoles.l⁻¹; TBHP + DFO – Amostras pré-tratadas com DFO 1mmol.l⁻¹ com ação de TBHP 5 mmoles.l⁻¹. TBHP + DFO + Vit. C – Amostras pré-tratadas com Vit C 20 mmoles.l⁻¹ e DFO 1mmol.l⁻¹, com ação de BHP 5 mmoles.l⁻¹.
 n= 6, sendo 3 amostras em duplicatas independentes.
 A atividade enzimática foi estimada após ação de TBHP por 30 min.
 * representa diferença estatística significativa em relação ao controle (p < 0,05).
 A barra de erro representa o desvio padrão

Na Figura 19 estão representadas as atividades de glutatona redutase em eritrócitos humanos normais, após a ação de TBHP.

FIGURA 19 – ATIVIDADE DE GLUTATONA REDUTASE EM ERITRÓCITOS HUMANOS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) 5 mmoles.l⁻¹.



NOTAS. Controles: C - Controle sem tratamento com antioxidantes; Vit C 20 – Controle incubado com Vit. C 20 mmoles.l⁻¹; DFO 1 - Controle incubado com DFO mmoles.l⁻¹; TBHP - Controle de oxidação com TBHP 5 mmoles.l⁻¹;

Tratamentos: TBHP+ Vit. C 10 – Amostras pré-tratadas com Vit. C 10 mmoles.l⁻¹, com ação de TBHP 5 mmoles.l⁻¹; TBHP+ Vit. C 20 – Amostras pré-tratadas com Vit. C 20 mmoles.l⁻¹; TBHP + DFO – Amostras pré-tratadas com DFO 1mmol.l⁻¹ com ação de TBHP 5 mmoles.l⁻¹. TBHP + DFO + Vit. C – Amostras pré-tratadas com Vit C 20 mmoles.l⁻¹ e DFO 1mmol.l⁻¹, com ação de BHP 5 mmoles.l⁻¹.

n= 6, sendo 3 amostras em duplicatas independentes.

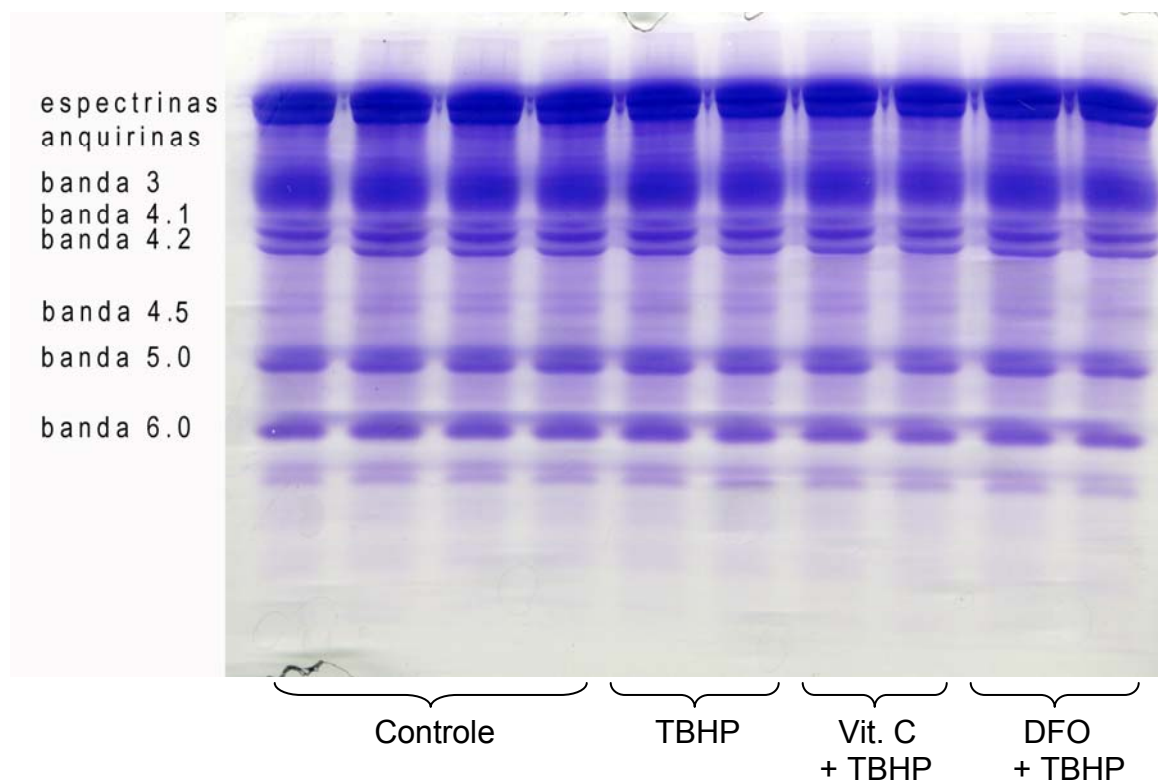
A atividade enzimática foi estimada após ação de TBHP por 30 min.

* representa diferença estatística significativa em relação ao controle (p < 0,05).

A barra de erro representa o desvio padrão

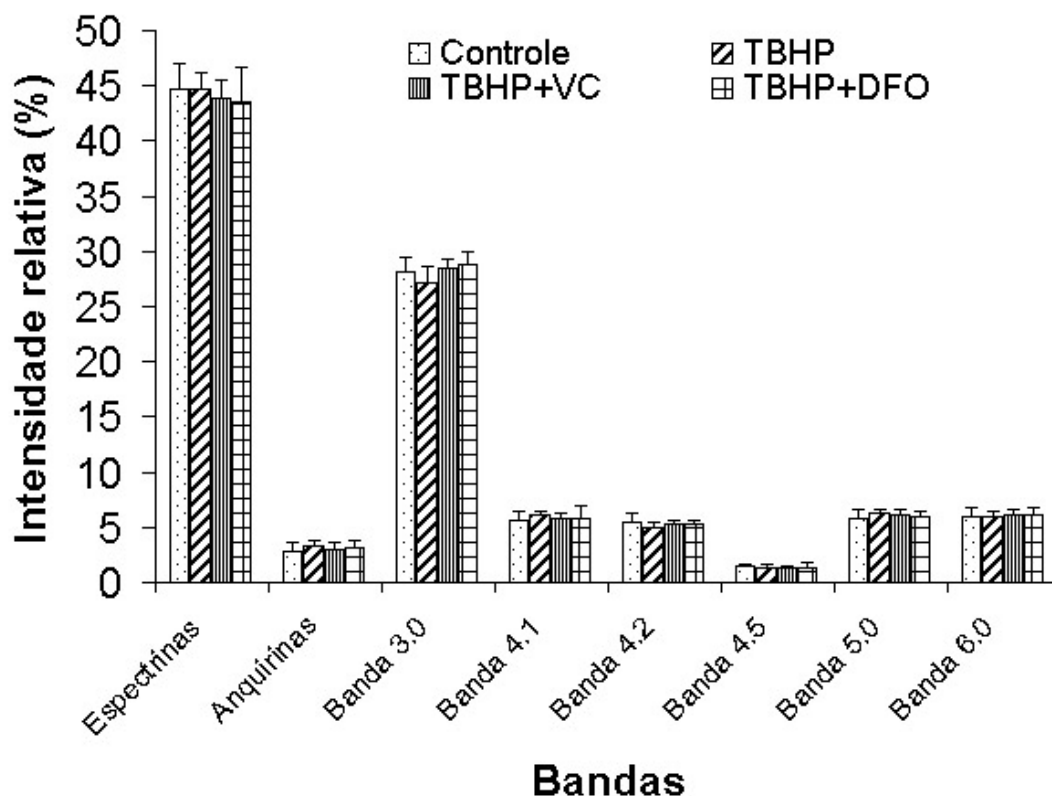
Nas Figuras 20 e 21 estão ilustrados os resultados da eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) de membranas isoladas de eritrócitos humanos normais submetidos à ação de TBHP 3 mmoles.l⁻¹, em amostras pré-incubadas com antioxidantes Vit. C 20 mmoles.l⁻¹ e DFO 1 mmol.l⁻¹.

FIGURA 20 – ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL - SULFATO DE SÓDIO (SDS - PAGE) DE MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS ISOLADAS DE ERITRÓCITOS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE T-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) E DE ANTIOXIDANTES ÁCIDO L-ASCÓRBICO (Vit. C) OU MESILATO DE DESFERROXAMINA (DFO).



TBHP - Controle – eritrócitos sem tratamento; TBHP – eritrócitos incubados com TBHP 3 mmoles.l⁻¹; Vit. C + TBHP - amostras pré-incubadas com Vit. C 20 mmoles.l⁻¹; DFO + TBHP - amostras pré-incubadas com DFO 1 mmol.l⁻¹.

FIGURA 21 – ANÁLISE DE DENSITOMETRIA DE ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL - SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) DE MEMBRANAS ERITROCITÁRIAS ISOLADAS DE ERITRÓCITOS SUBMETIDOS À AÇÃO DE OXIDANTE T BUTILHIDROPERÓXIDO (TBHP) E DE ANTIOXIDANTES L-ÁCIDO ASCÓRBICO (Vit. C) OU MESILATO DE DESFERROXAMINA (DFO).



NOTAS: Controle - eritrócitos sem tratamento (n=8); TBHP - controle de oxidação com TBHP 3 mmoles.l⁻¹ (n=4); TBHP + DFO – amostras pré-tratadas com DFO 1mmol.l⁻¹ com ação de TBHP 3 mmoles.l⁻¹ (n=4); TBHP+ Vit. C – amostras pré-tratadas com Vit. C 20 mmoles.l⁻¹ com ação de TBHP 3 mmoles.l⁻¹ (n=4)

* representa diferença estatística significativa em relação ao controle (p < 0,05).

A barra de erro representa o desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Para a realização de experimentos com eritrócitos, optou-se por empregar tampão fosfato $66 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ pH 7,4, com glucose $200 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ para as suspensões de células a serem utilizadas. Tal meio apresenta condições satisfatórias para manutenção da atividade metabólica do eritrócito durante a realização dos experimentos. Definiu-se o hematócrito em aproximadamente 45% para a realização dos experimentos, baseando-se no fato de que as técnicas utilizadas são, em geral, padronizadas para sangue total humano. Na literatura, relata-se experimentos de ação oxidativa com suspensões de eritrócitos com hematócrito entre 1% a 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, 2002; CLARO et al., 2005)

Para se estudar a ação de substâncias de caráter antioxidante em eritrócitos humanos intactos, foi relevante a escolha da natureza do agente oxidante e da sua concentração.

O TBHP é um hidroperóxido orgânico largamente utilizado e considerado como adequado para estudos de oxidação, incluindo ação oxidativa sobre eritrócitos humanos (DEUTICKE et al., 1987; BEPPU et al., 1990; CAPRARI et al., 1994).

A concentração escolhida para a solução estoque de TBHP foi de $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ em NaCl $154 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, com a qual se pôde trabalhar com a adição de volumes da ordem de microlitros nas suspensões de eritrócitos, evitando-se interferências no tamponamento do meio. Diversas concentrações finais de TBHP foram testadas nas suspensões de eritrócitos e os experimentos relacionados são discutidos a seguir.

A formação de metahemoglobina evidenciada nos experimentos mostrados na Figura 5 indica a capacidade oxidante do TBHP em concentrações de $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, observando-se valores de até 20%. Com base nos

resultados obtidos, decidiu-se empregar as concentrações de TBHP 2 mmoles.l^{-1} e 5 mmoles.l^{-1} nos experimentos subseqüentes.

Conforme exemplificado pela Figura 12, as mesmas concentrações de TBHP foram utilizadas para se investigar o efeito desse oxidante sobre os níveis do principal antioxidante intracelular, a GSH. Após a ação de TBHP por 30 min, as concentrações de GSH diminuíram radicalmente, sendo que a partir de 2 mmoles.l^{-1} de TBHP, observou-se uma depleção quase total de GSH. Com base nos dados obtidos, foi escolhida a concentração de 1 mmol.l^{-1} de TBHP para a realização dos demais experimentos envolvendo dosagens de GSH em amostras com antioxidantes.

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^{-1} . COMAR (2002) observou que a exposição de eritrócitos humanos a TBHP resulta na formação de metahemoglobina em concentrações de até 35 %, além de depleção de GSH e formação de corpos de Heinz.

O uso da Vit. C como antioxidante baseia-se no importante papel desempenhado por esse composto nos sistemas biológicos, especialmente como fornecedor de equivalentes redutores para os sistemas de destoxificação redox. Existem evidências de um papel ambíguo, indicando uma possível atividade pró-oxidante, dependendo da concentração e do meio testado (FERNANDES et al., 2000, HALLIWELL, 1985).

Para se estabelecer a faixa de concentração em que a atividade da Vit. C se mostra efetiva na proteção do eritrócito, procedeu-se ao experimento detalhado na Figura 6. Concentrações de 1 a 60 mmoles.l^{-1} de Vit. C foram utilizadas para avaliar a proteção ao dano oxidativo por TBHP 2 mmoles.l^{-1} . A formação de metahemoglobina foi parcialmente inibida nas amostras pré-incubadas com Vit. C 5, 10, 20, 40 e 60 mmoles.l^{-1} . Apenas a concentração de 1 mmol.l^{-1} de Vit. C não se mostrou eficaz na prevenção da oxidação da hemoglobina. No experimento subseqüente, utilizou-se um protocolo semelhante, mas com oxidante TBHP 5 mmoles.l^{-1} (Figura 8). As mesmas concentrações de Vit. C que se mostraram

efetivas no experimento com TBHP 2 mmoles.l^{-1} causaram diminuição significativa na formação de metahemoglobina por TBHP 5 mmoles.l^{-1} . Observou-se um comportamento próximo do dose-dependente até a concentração de 40 mmoles.l^{-1} de Vit. C. Com Vit. C 60 mmoles.l^{-1} , não houve acréscimo de proteção em relação a Vit. C 40 mmoles.l^{-1} .

CLARO et al. (2005) demonstraram a capacidade da Vit. C na proteção da molécula de hemoglobina ao dano oxidativo por fenilhidrazina, evidenciando inibição na formação de metahemoglobina em concentrações de Vit. C a partir de 0,5 mmoles.l^{-1} . DEN BOER et al. (1992) também evidenciaram a diminuição da formação de metahemoglobina em eritrócitos de ratos. DOTSCH et al. (1998) estabeleceram a concentração mínima efetiva de Vit. C de 10 mmoles.l^{-1} para eritrócitos humanos submetidos a ação oxidativa por óxido nítrico. CALABRESE et al. (1982) afirmaram que ascorbato pode aumentar a concentração de metahemoglobina em eritrócitos humanos, fato não evidenciado em qualquer experimento realizado no presente trabalho.

Para se verificar a ação de Vit. C nos níveis de GSH em eritrócitos submetidos a sobrecarga oxidativa, procedeu-se aos experimentos ilustrados na Figura 13. Nenhuma das concentrações de Vit. C testadas logrou evitar a depleção de GSH decorrente da ação de TBHP 1 mmol.l^{-1} . Esses dados são concordantes com os obtidos por CLARO et al. (2005), que demonstraram que Vit. C não causava diminuição no gasto de GSH decorrente da incubação de eritrócitos com fenilhidrazina.

A fim de elucidar as concentrações em que DFO apresenta atividade antioxidante, realizou-se os experimentos cujos resultados estão ilustrados nas Figuras 7 e 9. Para a concentração de TBHP 2 mmoles.l^{-1} (Figura 7), DFO entre 1 e 4 mmoles.l^{-1} não demonstrou capacidade de diminuir a formação de metahemoglobina. Paralelamente, no mesmo experimento, tentou-se averiguar um sinergismo ou antagonismo entre Vit. C e DFO, tratando-se amostras com ambos os antioxidantes. Ocorreu diminuição significativa na formação de metahemoglobina em relação ao controle, mas não em relação a amostras pré-tratadas com Vit. C 40 mmoles.l^{-1} (Fig.6)

Os experimentos referentes aos resultados exibidos na Figura 9 são semelhantes aos da Figura 7, porém com concentração de TBHP aumentada para 5 mmol.l⁻¹. Desta vez, entretanto, todas as concentrações de DFO testadas causaram uma diminuição significativa na formação de metahemoglobina. Na amostra pré-tratada com os dois antioxidantes, verificou-se diminuição significativa na formação de metahemoglobina em relação ao controle, mas não em relação a amostras pré-tratadas com Vit. C 40 mmol.l⁻¹ (Fig.8).

Para investigar a ação de DFO nos níveis de GSH de eritrócitos submetidos a ação oxidativa por TBHP 1 mmol.l⁻¹, realizou-se os experimentos cujos resultados estão ilustrados na Figura 14. As concentrações de DFO de 1, 3 e 4 mmol.l⁻¹ mostraram ser capazes de inibir parcialmente o gasto de GSH. Para a concentração de 2 mmol.l⁻¹ de DFO, não se observou variação significativa em relação ao controle. No experimento em que se procurou investigar um possível sinergismo entre DFO e Vit. C, não se observou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

FERNANDES et al. (2000) observaram que o pré-tratamento de eritrócitos humanos com DFO 4 mmol.l⁻¹ inibiu a formação de TBARS após a ação oxidante de dicromato de potássio 8 mmol.l⁻¹. HARTLEY e RICE-EVANS (1992) demonstraram a capacidade de DFO para remover o ferro liberado no meio extracelular após oxidação de hemoproteínas, inibindo assim a propagação do dano oxidativo. Grupos heme liberados das cadeias de globina podem passar através da bicamada lipídica, bem como se associar à membrana (ATAMNA e GISNBURG,1995). DFO tem pouca capacidade de atravessar a membrana, sendo encontrado no citosol do eritrócito em quantidades mínimas (LLOYD et al, 1991). Desta forma, é mais efetiva sua ação em situações de sobrecarga oxidativa em que o acúmulo de grupos heme e ferro livre na parte externa de membranas pode potencializar o estresse oxidativo (REPKA et al.1993)

Após a definição das concentrações de trabalho, mais adequadas do oxidante TBHP e dos antioxidantes Vit. C e DFO, procurou-se verificar se o tempo de exposição ao oxidante influi nas concentrações de metahemoglobina e de GSH.

Na figura 10 estão detalhados os resultados dos experimentos de determinação de metahemoglobina, para tratamentos com e sem antioxidantes, em função do tempo ação de TBHP 2 mmoles.l^{-1} . Não se observou variação na concentração de metahemoglobina nas amostras controle e DFO 1 mmol.l^{-1} ao longo de 120 min de exposição ao oxidante. Para as amostras com Vit. C 20 mmoles.l^{-1} , no entanto, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa a partir de 90 min.

Os experimentos cujos resultados são mostrados na Figura 11 são semelhantes aos da Figura 10, mas a determinação de metahemoglobina foi procedida após ação de TBHP 5 mmoles.l^{-1} . Amostras controle e DFO 1 mmol.l^{-1} não apresentaram diminuição na concentração de metahemoglobina ao longo de 120 min. Para as amostras com Vit. C 20 mmoles.l^{-1} , no entanto, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa a partir de 90 min. O mesmo ocorreu na amostra pré-tratada com os dois antioxidantes (DFO 1 mmol.l^{-1} e Vit. C 20 mmoles.l^{-1}), verificando-se diminuição significativa na concentração de metahemoglobina, valor estatisticamente semelhante ao da amostra pré-incubada com Vit. C 20 mmoles.l^{-1} .

Em eritrócitos, Vit. C pode doar equivalentes redutores à metahemoglobina redutase-NADH dependente que, por sua vez, reduz a metahemoglobina. Paralelamente, Vit. C pode reduzir a metahemoglobina independentemente desta enzima, utilizando equivalentes redutores do ciclo das pentoses (SULLIVAN e STERN, 1982; MANSOURI e LURIE, 1993). Por isso, Vit. C foi cogitada como possível tratamento para a metahemoglobinemia (MANSOURI & LURIE, 1993).

Também investigou-se a capacidade de recuperação de GSH nos eritrócitos, em função do tempo (Figura 15). Trinta minutos após a ação do oxidante TBHP 1 mmol.l^{-1} , a concentração de GSH nas amostras com DFO 1 mmol.l^{-1} já se apresentava significativamente superior em relação ao controle. No tempo de 60 min, a amostra com DFO 1 mmol.l^{-1} e Vit. C 20 mmoles.l^{-1} também atingiu valores com diferenças estatísticas em relação ao controle. Apenas no tempo de 120 min, as amostras com Vit. C 10 e 20 mmoles.l^{-1} mostraram

recuperação na concentração de GSH, com valores estatisticamente diferentes do controle.

MAWATARI e MEURAKAMI (2001) demonstraram que, em eritrócitos humanos submetidos a ação de TBHP 1 mmol.l^{-1} ocorre recuperação parcial da concentração de GSH a partir de 15 min após a oxidação. COMAR (2002) comprovou que antioxidantes com propriedades quelantes, como o flavonóide quercitina, podem influir positivamente na recuperação de GSH após dano oxidativo por TBHP. Há evidências de que GSH pode estar envolvida na destruição não enzimática de grupamentos ferriheme associados à membrana, causando a liberação de íons ferrosos no meio (ATAMNA & GINSBURG 1995). A ação de DFO na remoção de grupos férricos associados à membrana permite sugerir que o aumento de GSH intracelular em amostras com DFO advém do menor gasto com a destruição não enzimática de ferriheme na célula. Embora seja um antioxidante efetivo na proteção do eritrócito, a Vit. C não causa diminuição imediata no gasto de GSH. Possivelmente, este fato está relacionado ao mecanismo de influxo de Vit. C para dentro do eritrócito. O ascorbato presente no plasma é transportado para dentro da célula, principalmente na sua forma oxidada, o desidroascorbato. Uma vez dentro da célula, o desidroascorbato é reduzido por um mecanismo que envolve o gasto de GSH (SULLIVAN & STERN, 1982).

Um possível sinergismo entre Vit. C e DFO não foi evidenciado. DAILLY et al., 1998 haviam relatado efeitos sinérgicos entre antioxidantes de potencial redutor, como o ascorbato, e quelantes de ferro. No entanto, para as concentrações testadas não foi observado tal efeito no presente trabalho.. Tampouco foi observado efeito antagônico entre as duas substâncias. A redução de íons férricos do meio extracelular por oxirredutases transmembrana dependentes de ácido ascórbico pode estar relacionada a alterações na eficiência do mecanismo de quelação de ferro pela DFO (MAY & QU, 1999), porém, os resultados obtidos não evidenciaram esta hipótese.

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. Na Figura 16 fica demonstrada a capacidade do TBHP em reduzir a atividade de G6-PD de eritrócitos, quando empregado em concentrações de 3 mmoles.l^{-1} e 5 mmoles.l^{-1} . A atividade de GR também foi parcialmente inibida, porém, apenas para as concentrações de 5 mmoles.l^{-1} e 7 mmoles.l^{-1} de TBHP. Evitou-se utilizar TBHP 7 mmoles.l^{-1} em outros experimentos, devido à visibilidade de hemólise nas amostras tratadas com essa concentração de oxidante.

Na Figura 18, para os tratamentos com antioxidantes Vit. C e DFO, não se obteve êxito na manutenção da atividade de G6-PD em eritrócitos submetidos a ação oxidante de TBHP 5 mmoles.l^{-1} . Os controles com Vit. C e DFO revelaram que eritrócitos incubados com essas substâncias apresentam atividades de G6-PD normais em relação a eritrócitos sem tratamento algum.

Para os experimentos que envolveram a atividade de GR em relação aos tratamentos com antioxidante, observou-se efeito benéfico da Vit. C 10 e 20 mmoles.l^{-1} na proteção ao dano oxidativo por TBHP 5 mmoles.l^{-1} , enquanto DFO 1 mmol.l^{-1} não foi capaz de impedir o decréscimo de atividade enzimática. Também nesse caso, os controles Vit. C e DFO revelaram que eritrócitos incubados com essas substâncias apresentam atividades de GR normais em relação a eritrócitos sem tratamento algum.

LEONART (1994), ao estudar o envelhecimento de eritrócitos humanos em adenina-dextrose-salina-manitol (ADSOL) e em meio de conservação de eritrócitos (meio CE) a 4° C durante 22 semanas, observou que as atividades de G6-PD e GR diminuíram exponencialmente, mantendo cerca de 80% e de 75% dos valores iniciais após 5 semanas, respectivamente.

Em eritrócitos submetidos a oxidação e com níveis de malondialdeído elevados, observou-se diminuição da atividade enzimática. As enzimas mais sensíveis a esse processo são a G6-PD e acetilcolinesterase (JAIN e HOCHSTEIN, 1980). DESFORGES *et al.* (1960) demonstraram que um produto da oxidação da acetilfenil-hidrazina pode inibir a atividade de G6-PD em hemolisados de eritrócitos normais

TABATABAY e FLOYD (1994) comprovaram que a GR tem atividade significativamente diminuída quando exposta a agentes oxidantes como ozônio,

oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio. O dano não foi inibido por antioxidantes do tipo seqüestradores de spin.

Na Figura 21 está representada a análise de densitometria das bandas de eletroforese de proteínas de membrana (SDS-PAGE). Na análise das concentrações relativas das bandas protéicas, as amostras incubadas com TBHP 3 mmol.l⁻¹, submetidas ou não a tratamentos prévios com Vit. C ou DFO, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Estes resultados são concordantes com BEPPU et al (1990), que não observaram o aparecimento de ligações cruzadas e agregados de alto peso molecular em membranas de eritrócitos submetidos a ação de TBHP 4 mmol.l⁻¹. CHAKRABARTI et al., 1990 demonstraram que a ação do oxidante cloridrato de fenilhidrazina em concentrações de 0,2 a 1,0 mmol.l⁻¹ sobre membranas eritrocitárias isoladas causou um aumento de ligações cruzadas entre proteínas, afetando de forma mais intensa as espectrinas e a banda 3, além de causar danos variáveis às bandas 4.1, 4.2 e 5. Ocorreu inibição da formação de agregados protéicos de alto peso molecular em estromas eritrocitários isolados, após a adição de certas enzimas do sistema antioxidante, como a SOD e catalase, sugerindo que o sistema antioxidante enzimático do eritrócito pode ser suficiente para a proteção de proteínas de membrana.

Ao se comparar os resultados obtidos neste experimento com os relatados por outros autores, é válido afirmar que o processo oxidativo pode ou não ser evidenciado por alterações das proteínas de membrana eritrocitárias através da metodologia utilizada. Em algumas situações, proteínas de membrana oxidativamente modificadas são mais suscetíveis à remoção por proteases do que ao acúmulo em níveis detectáveis (WAUGHT et al., 1999).

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que o TBHP é um oxidante capaz de causar danos à estrutura e ao metabolismo eritrocitários e que Vit. C e DFO mostraram-se capazes de inibir etapas diferentes do dano oxidativo ao eritrócito. Não se notou, entretanto, evidências de sinergismo ou antagonismo com o emprego de Vit. C e DFO em conjunto.

A fim de se aprofundar o estudo do tema abordado, outros parâmetros podem ser investigados, tais como a determinação de outros marcadores de oxidação e de enzimas ligadas ao metabolismo oxidativo e energético, tanto em eritrócitos de indivíduos normais, quanto de portadores de doenças hemolíticas. O uso de outros agentes de oxi-redução também pode ser considerado.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

No estudo sobre o processo oxidativo em suspensões de eritrócitos humanos, observou-se que:

- a) O TBHP, em concentrações entre 1 e 7 mmoles.l^{-1} ,
 - ocasionou a formação de até 20% de metahemoglobina,
 - causou depleção de 50 a 100% de GSH,
 - provocou diminuição de 20 a 50% das atividades de G6-PD e de GR,
 - não causou danos às proteínas da membrana detectáveis por SDS-PAGE;
- b) A pré-incubação dos eritrócitos com Vit. C 1 a 60 mmoles.l^{-1} ,
 - em concentrações de 5 a 60 mmoles.l^{-1} , inibiu parcialmente, de 5 a 80%, a formação de metahemoglobina por TBHP 2 e 5 mmoles.l^{-1} ,
 - não influenciou na depleção de GSH por TBHP 1 mmol.l^{-1} ;
 - protegeu a GR, mas não a G6-PD de dano oxidativo por TBHP 5 mmoles.l^{-1} ;
- c) A pré-incubação dos eritrócitos em DFO 1 a 4 mmoles.l^{-1} ,
 - inibiu parcialmente, em 20%, a formação de metahemoglobina por TBHP 5 mmoles.l^{-1} ,
 - influenciou na depleção de GSH por TBHP 1 mmol.l^{-1} , em concentrações de 1, 3 e 4 mmoles.l^{-1} , mantendo níveis de cerca de 4,5 $\mu\text{moles/g Hb}$ de GSH,
 - não protegeu a GR e a G6-PD de dano oxidativo por TBHP 5 mmoles.l^{-1} ;
- d) A pré-incubação dos eritrócitos em Vit. C 20 e 40 mmoles.l^{-1} e DFO 1 mmol.l^{-1} , não revelou sinergismo ou antagonismo entre os dois antioxidantes.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que tanto a Vit. C quanto a DFO são capazes de proteger parcialmente a oxidação de compostos fundamentais para o metabolismo eritrocitário.

7 REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ATAMNA, H.; GINSBURG, H. Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 42, p. 24876-24883, 1995.

BEPPU, M.; TAKANASHI, M.; MURAKAMI, K.; 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, 131p.

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

BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Sant 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. L-51

BUETTNER G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.300, p535-43, 1993

CALABRESE, E. J.; MOORE, G. S.; McCARTHY, M. S. Ascorbic acid enhances the occurrence of copper-induced methemoglobin formation in normal human erythrocytes in vitro. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 29, p. 704-708, 1982.

CAPRARI, P.; BOZZI, A.; MALORNI, W.; BOTTINI, A.; IOSI, F.; SANTINI, M. T.; SALVATI, A. M. Junctional sites of erythrocyte skeletal proteins are specific targets of *tert*-butylhydroperoxide oxidative damage. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 94, p. 243-258, 1994.

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.

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

CHAKRABARTI, S.; SONAYE, B.; NAIK, A.; NADKARNI, B. Erythrocyte membrane protein damage by oxidation products of phenylhydrazine. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Marrickville, v. 35, n. 2, p. 255-263, 1995.

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

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. **Radicais livres em medicina**. Rio de Janeiro: Ed. Interlivros, 1996. p. 4-5.

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. 407-13, 1999.

CLARO, L.M.; LEONART, M.S.; NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamins C and E on oxidative process in human erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**. Guildford: V.230, p 1-5, 2005.

COMAR, S.R.. **Ação de quercetina, rutina e extrato hidroalcolico de Vitis vinifera em eritrocitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa**..Curitiba, 2003. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Parana

DACIE, J.; LEWIS, S. M. **Practical haematology**. 8. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995. 453p.

DAILLY, E.; URIEN, S.; TILLEMENT, J.P.; Chain-breaking antioxidants and ferriheme-bound drugs are synergistic inhibitors of erythrocyte membrane peroxidation **Free radical research**, London v.28, p.205-14, 1998

DEN BOER, P. J.; BLEEKER, W. K.; RIGTER, G.; AGTERBERG, J.; STEKKINGER, P.; KANNEGIETER, L. M.; BAKKER, J. C. Intravascular reduction of methemoglobin in plasma of the rat in vivo. **Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnology**, [S.L.], v. 20, p. 647-650, 1992.

DESFORGES, J. F.; KALAW, E.; GILCHRIST, P. Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by hemolysis inducing drugs. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 55, p. 757-761, 1960.

DEUTICKE, B.; HELLER, K. B.; HAEST, C. W. M. Leak formation in human erythrocytes by the radical-forming oxidant t-butylhydroperoxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 854, p. 169-183, 1986.

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

DODGE, J. T.; 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.

DÖTSCH, J.; DEMIRAKÇA, S.; CRYER, A.; HÄNZE, J.; KÜHL, P. G.; RASCHER, W. Reduction of NO-induced methemoglobinemia requires extremely high doses of ascorbic acid in vitro. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 24, p. 612-615, 1998.

ESTEVEZ, F.; DE ANGELO, T.; VESSEL, E. Basal and paracetamol-depleted glutathione from human lymphocytes. **Acta Physiol. Pharmacol. Latino Americana**, v. 44, p.48-54,1994.

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.

FERNANDES, M. A. S.; GERALDES, C. F. G. C.; OLIVEIRA, C. R.; ALPOIM, M. C. Chromate-induced human erythrocytes haemoglobin oxidation and peroxidation: influence of vitamin E, vitamin C, salicylate, deferoxamine, 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. **The Biochemical Journal**, London, v.285, p. 295-301, 1992.

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

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

FUJINO, T.; ISHIKAWA,T.; INOUE, M.; BEPPU, M.; KIKUGAWA, K. Characterization of membrane-bound serine protease related to degradation of oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdan, v.1374, p. 47-55; 1998.

GANONG, W. **Review of Medical Physiology** 19.ed. Appleton e Lange, Stamford, 1999.

GOODMAN,A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996

GRELLIER P, SARLAUSKAS J, ANUSEVICIUS Z, MAROZIENE A, HOUEE-LEVIN C, SCHREVEL J, CENAS N. Antiplasmodial activity of nitroaromatic and quinoidal compounds: redox potential vs. inhibition of erythrocyte glutathione reductase. **Archives Biochemistry and Biophysics**. New York, v393, n2, p:199-206,2001.

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

KUO, W.Y.;TANG T.K.; Effects of G6PD overexpression in NIH3T3 cells treated with tert-butyl hydroperoxide or paraquat. **Free radical biology & medicine**, London, v.24, p 1130-8, 1998.

HALLIWELL, B. Antioxidant defence 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**, London, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B. Use of desferrioxamine as a 'probe' for iron-dependent formation of hydroxyl radicals. Evidence for a direct reaction between desferal and the superoxide radical. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 34(2), p. 229-33, 1985.

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

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,. v. 3: Erythroid Cells. Cap. 7. 1991

HARTLEY,A.; RICE –EVANS, C.; The chelation of nonheme Iron within Sickle Erythrocytes by the Chelator CP094. **Archieves Biochemistry and Biophysics**. New York, v. 297, p377-382,1982 :

HENRY, J.B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 18.ed. São Paulo; Manole, 1993.

JAIN, S. K.; HOCHSTEIN, P. Polymerization of membrane components in ageing red blood cells. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, New York, v. 92, p. 247-254, 1980.

JANDL, J. H. **Blood**: textbook of hematology. 2. ed. Boston: Brown and Company, p. 505-506, 1996. LOW, P. S.; WAUGH, S. M. The role of hemoglobin desnaturation and band 3 clustering in blood red cell. **Science**, Washington, p. 227-231, 1985.

LANGE, Y; SLAYTON J.M.; Interaction of cholesterol and lysophosphatidylcholine in determining red cell shape. **Journal of lipid research**, v.23-8 p.1121-1127, 1982.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227(259), p.680-5, 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.

LEHNINGER, A.; NELSON, B.; COX, M. **Princípios de Bioquímica**. Sarvier, 3. ed., São Paulo, 1995.

LEONART, M. S. S. **Estudos sobre a preservação de eritrócitos**. São Paulo, 1994. 131p. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

LII, C. K.; HUNG, C. N. Protein thiol modifications of human red blood cells treated with t-butyl hydroperoxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1336(2), p. 147-156, 1997.

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.

LOW, P. S.; WAUGH, S. M. The role of hemoglobin desnaturation and band 3 clustering in blood red cell. **Science**, Washington, p. 227-231, 1985.

MANNU, F.;ARESE, P.; CAPPELLINI, M.D.; FIORELLI, G.; CAPPADORO, M.; GIRIBALDI, G.;TURRINI, F.; Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band-3 alterations in beta-thalassemia intermedia erythrocytes.**Blood**,London v.86-5 p. 2014-20, 1995.

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

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

MAY, J. M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 13, p. 995-1006, 1999.

MAY, J. M.; QU, Z.; MENDIRATTA, S. Protection and recycling of α -tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 349, p. 281-289, 1998.

MOORE, R.B.;BRUMMITT, M.L; MANKAD, V.N.; Hydroperoxides selectively inhibit human erythrocyte membrane enzymes. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York v. 273, p. 527-34 1989

MOSLEN, M.T.; SMITH, C.V. **Radicais Livres: Mecanismos de Lesão Tecidual**. Interlivros, 1.ed, Rio de Janeiro, 1996.

NICOTERA,P.; HINDS,T.; NELSON,S.; VICENZI,F. Diferencial effects of arilating and oxidizing analogs of N-acetyl-p-benzoquinonimine on red blood cells membrane proteins. **Archieves of biochemistry and biophysics**. New York, v. 283, p.200-205, 1990.

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

O'BRIEN PJ, SLAUGHTER MR, SWAIN A, BIRMINGHAM JM, GREENHILL RW, ELCOCK F, BUGELSKI PJ. Repeated acetaminophen dosing in rats: adaptation of hepatic antioxidant system. **Hum Exp Toxicol** v.5,p:277-83,2000.

OSKI, F.A.; DELIVORIA-PAPADOULOS, M. The red cell, 2,3-diphosphoglycerate, and tissue oxygen release. **Journal of Pediatrics.**, St.Louis, v. 77, p.941-956, 1970.

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**. London v.82, p.3204-3210, 1993.

RICE-EVANS, C. A. Iron-mediated oxidative stress in erythrocytes. In: HARRIS; J. R. **Blood cell biochemistry**. New York, Plenum Press, 1991.

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

RICE-EVANS, C.; BAYSAL, E.; PASHBY, D.P.; HOCHSTEIN, P. t- Butyl hydroperoxide-induced perturbations of human erythrocytes as a model for oxidant stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam,v. 815, p. 426-432, 1984.

ROTHKRANTZ-KOS S, DRENT M, VUIL H, DE BOER M, BAST A, WOUTERS EF, ROOS D, VAN DIEIJEN-VISSER MP. Decreased redox state in red blood cells from patients with sarcoidosis. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis** Jun;19(2):114-20.2002.

SCHWARTZ, R.S.;RYBICKI, A.C.;HEATH, R.H.;LUBIN, B.H.; Protein 4.1 in sickle erythrocytes. Evidence for oxidative damage. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 262-32 p.15666-72, 1987.

SCHNELLMANN, J.; PUMFORD, N.; KUSEWITT, D.; BUCCI, T.; Deferoxamine delays the development of the hepatotoxicity of acetaminophen in ice. **Toxicological Letters**,v.106, p.79-88 1999.

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

SPOOREN,A; EVELO, C.Only the glutathione dependent antioxidant enzymes are inhibited by haematotoxic hydroxylamines. **Hum Exp Toxicol** v.10, p:554-9,1998.

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 methemoglobin reduction in intact red cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 213, n. 2, p. 590-594, 1982.

SUZUKI, T.; DALE, G.L.; BEUTLER, E.; The absence of gamma-glutamyltransferase in erythrocyte membranes. **Clinica chimica acta**; v.168 p.347-9, 1987.

TABATABAIE, T.;FLOYD, R.A.; Susceptibility of glutathione peroxidase and glutathione reductase to oxidative damage and the protective effect of spin trapping agents. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York v. 314, p. 112-9, 1994.

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

VAN DER ZEE, J.; VAN STEVENINCK, J.; KOSTER, J. F.; DUBBELMAN, T. M. A. R. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 980, p. 175-180, 1989.

VAN KAMPEN, E.J.; ZIJLSTRA, W. G. Standardization of hemoglobinometry. 1961. The hemiglobocyanide method. **Clinical Chemistry Acta**, Amsterdam, v.6, p. 538-545, 1961.

WAUGH, S. M.; WALDER, J. A.; LOW, P. S. Partial characterization of the copolymerization reaction of erythrocytes membrane band 3 with hemichromes. **Biochemistry**, Washington, v. 26(6), p. 1777-83, 1987.

ANEXO 1

DECLARAÇÃO

- a) O objetivo desta pesquisa é:
Estudar a ação de antioxidantes sobre eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa.
- b) Caso você participe desta pesquisa, serão realizados exames, para os quais será necessária coleta de amostras de sangue.
- c) Em procedimentos deste tipo você poderá encontrar algum desconforto, principalmente relacionado a coleta de sangue por punção venosa.
- d) Os benefícios esperados são: Melhor compreensão de mecanismos de hemólise decorrente de estresse oxidativo e do uso de antioxidantes.
- e) Estarão garantidas todas as informações que você queira receber, antes, durante e após o estudo.
- f) Sua participação é voluntária. Você tem liberdade de recusar ou retirar o seu consentimento em qualquer momento
- g) As informações relacionadas poderão ser inspecionados por profissionais e autoridades legais sem, no entanto, que em qualquer momento deixem de ter caráter confidencial.
- h) Nenhuma das despesas para a realização da pesquisa será de responsabilidade do doador.
- i) Pela participação, você não receberá qualquer quantia em dinheiro.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____, li o texto acima e compreendi a natureza e a finalidade do estudo ao qual fui convidado a participar. A explicação menciona os riscos e os benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão. Eu concordo em participar voluntariamente deste estudo
Curitiba, ____ de _____ de 2005