

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE EMMER FERREIRA FURMAN

AÇÃO ANTIOXIDANTE DE EXTRATO PADRONIZADO DE *Ginkgo biloba* EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME, SUBMETIDOS À SOBRECARGA OXIDATIVA, *IN VITRO*

CURITIBA

2011

ALINE EMMER FERREIRA FURMAN

AÇÃO ANTIOXIDANTE DE EXTRATO PADRONIZADO DE *Ginkgo biloba* EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PORTADORES DE ANEMIA FALCIFORME, SUBMETIDOS À SOBRECARGA OXIDATIVA, *IN VITRO*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento
Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Maria Suely Soares Leonart

CURITIBA

2011

Aos meus queridos:
Meu esposo Adriano,
Meu filhinho Mateus,
Meus pais Osny e Ivonete,
E minha irmã Alana.

"Para adquirir conhecimento, é preciso estudar; mas para adquirir sabedoria, é preciso observar."

Marilyn vos Savant

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado com uma vida maravilhosa.

Ao meu orientador Professor Aguinaldo José do Nascimento, pela orientação na estatística, formatação do texto e gráficos, com sua inteligência e bom humor.

À minha co-orientadora Professora Maria Suely Soares, por sempre achar um tempinho pra me dar atenção, com suas dicas maravilhosas que contribuíram muito para o texto final. Muito mais pela sua amizade, carinho e apoio.

Ao meu esposo Adriano, pelo amor gigante, pela paciência e compreensão. Pelas palavras de apoio nos dias difíceis e por sua eterna disposição em me tornar uma pessoa melhor. Ao meu filhinho Mateus, pelos chutinhos gostosos que me incentivaram a trabalhar com ainda mais dedicação.

Aos meus pais, Osny e Ivonete, amores da minha vida, que sempre confiaram em mim e me ajudaram a vencer todos os meus desafios, desde pequena. Devo tudo a eles, muito obrigada! À Alana, minha irmãzinha companheira de infância, agradeço pelo carinho e apoio.

Ao colega de trabalho e amigo Professor Railson Henneberg, pelo apoio, compreensão, companheirismo e cooperação no decorrer da pesquisa. À colega de longa data, Priscila Bacarin Hermann, a quem o destino novamente colocou em meu caminho, agradeço imensamente pelo companheirismo e cooperação nos experimentos.

Às bolsistas de iniciação científica, Karina Konell e Rafaela Miravalhes, pela companhia na realização das análises.

Às técnicas do Laboratório Escola Célia do Rocio da Silva Villas-Boas, e por último, Marina Lacerda Mazanek, pela ajuda e apoio prestados. À Irene Ermelindo Santos, técnica do laboratório de Citologia e Hematologia, por sua cooperação e amizade. À Maria da Graça Toledo, farmacêutica da Central Analítica, sempre pronta a ajudar com os equipamentos, com um bom humor contagiante!

Ao Professor Michel Otuki, pela ajuda na padronização da técnica de radicais livres e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR, pela disponibilização do equipamento para realização dos experimentos.

À professora Almeriane Maria Weffort Santos e ao professor Paulo Henrique da Silva, pelas dicas, empréstimo de equipamentos e pelo apoio. À professora Tomoe Nakashima pela orientação e auxílio junto aos seus contatos para doação do extrato de *Gingko biloba* pela Herbarium. A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em

Ciências Farmacêuticas da UFPR que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Gustavo Bertol, farmacêutico da Herbarium, e a toda a equipe da empresa, por acreditarem no trabalho e contribuírem com a doação do extrato.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), por manter as portas abertas e pela doação das amostras utilizadas neste trabalho, principalmente à farmacêutica bioquímica Cinthia Pelissari e à técnica de laboratório Gisele Mueller.

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

A CAPES, pelo apoio financeiro.

A todos a minha mais sincera gratidão.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH – 2,2 - azobis (amidinopropano) dihidroclorato

ATP - adenosina 5´trifosfato

2,3-BPG - 2,3 – bisfosfoglicerato

C - colesterol

CAT - catalase

CD36 - grupamento de diferenciação 36

CD47 - grupamento de diferenciação 47

CD49d - grupamento de diferenciação 49d

DCFH-DA - 2,7 – diclorodihidrofluoresceína diacetato

DCFH - 2,7-diclorodihidrofluoresceína (reduzida)

DTNB - ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico

EGb 761 - extrato padronizado de *Ginkgo biloba* 761

EM - esfingomielina

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO - espécies reativas de oxigênio

FC - fosfatidilcolina

FE - fosfatidiletanolamina

FI - fosfatidilinositol

FL - fosfolipídios

FS - fosfatidilserina

GPA - glicoforina A

GPC - glicoforina C

GSH - glutathiona reduzida

GSH-Px - glutathiona peroxidase

GSSG - glutathiona oxidada

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

Hb - hemoglobina

Hb A - hemoglobina A

Hb F - hemoglobina fetal

Hb S - hemoglobina S

HClO - ácido hipocloroso

IC₅₀ – concentração de inibidor necessária para reduzir a resposta pela metade

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular-1

LDH - lactato desidrogenase

LO• – radical alcóxila derivado de lipídios

LOO• – radical peróxila derivado de lipídios

Meta-Hb - metahemoglobina

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO - óxido nítrico

•O₂⁻ - radical superóxido

¹O₂ - oxigênio singlete

O₃ - ozônio

•OH - radical hidroxila

pH - potencial hidrogeniônico

PI - ponto isoelétrico

R• – radical alquila (poluentes/drogas)

RO•- radical alcóxila (poluentes/drogas)

ROO• - radical peróxila (poluentes/drogas)

SOD - superóxido dismutase

***t*-BHP** - *tert*-butil-hidroperóxido

***t*-BO•** - radical *tert*-butoxila

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VCAM-1 - molécula de adesão às células vasculares-1

RESUMO

O eritrócito é um modelo celular adequado para o estudo do efeito das espécies reativas de oxigênio (ERO) e para a triagem inicial de substâncias antioxidantes, devido a sua simplicidade estrutural, acessibilidade e vulnerabilidade à oxidação. As ERO são formadas fisiologicamente nas células, porém seu excesso está relacionado com o envelhecimento celular e eventos patológicos. A doença falciforme promove uma anemia hemolítica caracterizada pela presença de alta concentração de hemoglobina S, cujas consequências incluem a produção aumentada de ERO e a diminuição da capacidade de defesa antioxidante, acarretando disfunção endotelial, distúrbios de coagulação e hemólise intravascular. No presente trabalho, comparou-se o estado oxidativo dos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme (genótipo SS) e de indivíduos normais (genótipo AA) através da determinação de glutathiona reduzida (GSH), metahemoglobina (meta-Hb) e dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os eritrócitos dos pacientes com anemia falciforme apresentaram um aumento da oxidação da hemoglobina em 1,4 vezes e da peroxidação lipídica em 1,8 vezes, nos seus estados basais. O estudo do estresse oxidativo foi realizado após indução de danos pelos oxidantes *tert*-butil-hidroperóxido (*t*-BHP) e 2,2 - azobis (amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), geradores de radicais livres em modelos celulares. Os eritrócitos de pacientes com anemia falciforme apresentaram maior suscetibilidade ao estresse oxidativo, com maior oxidação da hemoglobina e um dano à membrana lipídica aproximadamente 1,4 vezes maior do que eritrócitos normais. Por fim, testou-se o efeito antioxidante do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761) na prevenção dos danos oxidativos induzidos pelos oxidantes, *in vitro*. Os resultados obtidos ilustram que o EGb 761 apresenta ação antioxidante dose-dependente tanto em eritrócitos de indivíduos normais quanto de pacientes com anemia falciforme, prevenindo parcialmente a peroxidação lipídica da membrana induzida por *t*-BHP (IC₅₀ de 138,4 e 257,0 µg/ml, em eritrócitos AA e SS, respectivamente) inibindo a formação de radicais livres induzida pelo *t*-BHP (IC₅₀ de 4,22 e 13,0 µg/ml, respectivamente) e prevenindo a hemólise induzida por AAPH (IC₅₀ de 2,6 e 6,0 µg/ml, respectivamente). De acordo com os resultados, em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme a dose necessária para realizar o mesmo efeito foi no mínimo 2 vezes maior do que nos eritrócitos de indivíduos normais. Por outro lado, o EGb 761 não conseguiu prevenir a oxidação da hemoglobina e da molécula de GSH nas concentrações testadas. Ensaio clínico são necessários para investigar os possíveis benefícios do EGb 761 como adjuvante terapêutico na anemia falciforme.

Palavras-chave: eritrócitos, *Ginkgo biloba*, estresse oxidativo, compostos azo, *tert*-butilhidroperóxido, anemia falciforme.

ABSTRACT

The erythrocyte is a model for the study of the effect of reactive oxygen species (ROS) and the initial antioxidant screening due to its structural simplicity, accessibility and vulnerability to oxidation. ROS are formed physiologically in cells, but its excess is related to cellular aging and pathological events. Sickle cell disease promotes a hemolytic anemia characterized by the presence of high concentrations of hemoglobin S, whose consequences include the increased production of ROS and decreased antioxidant defense capacity, resulting in endothelial dysfunction, coagulation disorders and intravascular hemolysis. In this work, we compared the oxidative status of erythrocytes from patients with sickle cell anemia (SS genotype) and in normal controls (genotype AA) through the determination of reduced glutathione (GSH), methemoglobin (met-Hb) and serum substances reactives to thiobarbituric acid (TBARS). Erythrocytes of patients with sickle cell anemia had an increase of 1.4 in hemoglobin oxidation and 1.8 times in lipid peroxidation over their basal state. The study on oxidative stress was performed after induction of oxidative damage by *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BHP) and 2,2 - azobis (amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), generators of free radicals in cell models. The erythrocytes of sickle cell patients showed increased susceptibility to oxidative stress, with higher hemoglobin oxidation and lipid membrane damage approximately 1.4 times higher than normal ones. Finally, we tested the antioxidant effect of standardized extract of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in preventing oxidative damage induced by oxidants *in vitro*. The results illustrate that EGb 761 has antioxidant activity in erythrocytes from both normal subjects and patients with sickle cell disease, partially preventing membrane lipid peroxidation (IC₅₀ of 138.4 µg/ml and 257.0 µg/ml, respectively), inhibiting the formation of free radicals (IC₅₀ of 4.22 µg/ml in AA and 13.0 µg/ml in SS) and preventing hemolysis (IC₅₀ de 2.6 µg/ml in AA and 6.0 µg/ml in SS). According to the results, extract antioxidant action was dose-dependent, and in erythrocytes from sickle cell patients the dose required to achieve the same effect was at least twice higher than in erythrocytes of normal individuals. Moreover, EGb 761 failed to prevent oxidation of the hemoglobin and GSH, at the concentrations tested. Clinical trials are needed to investigate the possible benefits of EGb 761 as an adjuvant in sickle cell anemia therapy.

Key-words: erythrocytes, oxidative stress, *Ginkgo biloba*, azo compounds, *tert*-butylhydroperoxide, sickle cell.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA.....	22
FIGURA 2 – ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA A	25
FIGURA 3 – ESTRUTURA DO GRUPO HEME	25
FIGURA 4 – SUPRIMENTOS DE ENERGIA NO ERITRÓCITO	28
FIGURA 5 – ALVOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NA CÉLULA	30
FIGURA 6 – ESQUEMA DO PROCESSO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	31
FIGURA 7 – OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA RESULTANDO EM PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES.....	33
FIGURA 8 – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E PRINCIPAIS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS ERITRÓCITOS.....	35
FIGURA 9 – FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME	39
FIGURA 10 – RELAÇÃO ENTRE HEMÓLISE, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E VASO-OCCLUSÃO NA ANEMIA FALCIFORME.....	42
FIGURA 11 – INTERAÇÕES ADESIVAS ENTRE ERITRÓCITOS E O ENDOTÉLIO, MATRIZ SUBENDOTELIAL E LEUCÓCITOS NA ANEMIA FALCIFORME	43
FIGURA 12 – PERTURBAÇÕES DA MEMBRANA LIPÍDICA DOS ERITRÓCITOS NA ANEMIA FALCIFORME	44
FIGURA 13 – PATOGÊNESE DOS DISTÚRBIOS DE COAGULAÇÃO NA ANEMIA FALCIFORME	45
FIGURA 14 – CONSUMO INTRAVASCULAR AUMENTADO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ANEMIA FALCIFORME	46
FIGURA 15 – MODELO CELULAR DO ERITRÓCITO	49
FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DO <i>t</i> -BHP	51
FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA DO AAPH.....	52

FIGURA 18 – MECANISMO DE REAÇÃO DO FLAVONÓIDE QUERCITINA COM RADICAIS PEROXILA	56
FIGURA 19 – FOLHAS DE <i>Ginkgo biloba</i>	57
FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES DO EGb 761	58
FIGURA 21 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS GINKGOLÍDEOS DO EGb 761	58
FIGURA 22 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BILOBALIDA.....	58
FIGURA 23 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES PARA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO DOS ERITRÓCITOS	67
FIGURA 24 – REAÇÃO ENTRE O DTNB E O GSH	69
FIGURA 25 – PRINCÍPIO DO MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DA Sonda DCFH-DA	72
FIGURA 26 – REAÇÃO QUÍMICA ENTRE O ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA) E O MALONDIALDEÍDO (MDA)	74
FIGURA 27 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS).....	78
FIGURA 28 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) EXPOSTOS AO <i>t</i> -BHP.....	79
FIGURA 29 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS EXPOSTOS AO <i>t</i> -BHP, APÓS INCUBAÇÃO COM EGb	80
FIGURA 30 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EXPOSTOS AO <i>t</i> -BHP, APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761	81
FIGURA 31 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS).....	82
FIGURA 32 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS À AÇÃO DE <i>t</i> -BHP	83

FIGURA 33 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS À AÇÃO DE <i>t</i> -BHP APÓS PRÉVIA INCUBAÇÃO COM EGb 761	84
FIGURA 34 – DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE <i>t</i> -BHP APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761	85
FIGURA 35 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS).....	86
FIGURA 36 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE <i>t</i> -BHP	87
FIGURA 37 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE <i>t</i> -BHP APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761	88
FIGURA 38 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS).....	89
FIGURA 39 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE AAPH	90
FIGURA 40 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE AAPH APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761	91
QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES DO GRUPO SS	125
TABELA 1 – VALORES HEMATOLÓGICOS DOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME DO GRUPO SS.....	125

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 ERITRÓCITO HUMANO MADURO	21
2.1.1 Membrana eritrocitária.....	21
2.1.2 Hemoglobina	23
2.1.3 Metabolismo energético do eritrócito.....	26
2.1.4 Metabolismo oxidativo dos eritrócitos.....	29
2.1.4.1 Dano oxidativo às proteínas e lipídios de membrana.....	30
2.1.4.2 Dano oxidativo à hemoglobina	32
2.1.5 Sistema antioxidante dos eritrócitos.....	34
2.1.5.1 Antioxidantes enzimáticos	34
2.1.5.2 Antioxidantes de baixo peso molecular	36
2.1.6 O eritrócito e a oclusão vascular	37
2.2 ANEMIA FALCIFORME.....	38
2.2.1 Anemia falciforme e fenômenos de vaso-oclusão	42
2.2.1.1 Aumento da adesão celular na anemia falciforme.....	43
2.2.1.2 Distúrbios de coagulação na anemia falciforme	45
2.2.1.3 Alteração na disponibilidade de NO e disfunção endotelial na anemia falciforme.....	46
2.2.1.4 Taxa aumentada de produção de espécies reativas de oxigênio na anemia falciforme	47
2.3 O ERITRÓCITO COMO MODELO EXPERIMENTAL	49
2.3.1 Agentes oxidantes utilizados em modelos experimentais	50
2.3.1.1 <i>tert</i> -Butil-hidroperóxido (<i>t</i> -BHP)	50
2.3.1.2 2,2- azobis (amidinopropano) dihidroclorato (AAPH)	51
2.3.2 Agentes antioxidantes utilizados em modelos experimentais.....	53
2.3.2.1 Agentes quelantes e substâncias antioxidantes endógenas utilizadas como terapia substitutiva	54
2.3.2.2 Sequestradores de radicais livres	55
2.3.2.2.1 Compostos fenólicos	55
2.3.2.3 <i>Ginkgo biloba</i>	57
3 OBJETIVOS	62

3.1 OBJETIVO GERAL	63
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
4 MATERIAL E MÉTODOS	64
4.1 MATERIAL	65
4.2 MÉTODOS	67
4.2.1 Fluxograma	67
4.2.2 Isolamento de eritrócitos	67
4.2.3 Tratamento das amostras com EGb 761	68
4.2.4 Tratamento das amostras com substância oxidante <i>t</i> -BHP	68
4.2.5 Tratamento das amostras com substância oxidante AAPH.....	68
4.2.6 Determinações Laboratoriais.....	69
4.2.6.1 Determinação da concentração de glutathiona reduzida.....	69
4.2.6.1.1 Princípio do Método.....	69
4.2.6.1.2 Técnica.....	69
4.2.6.1.3 Cálculo da concentração do GSH	70
4.2.6.2 Determinação da concentração da metahemoglobina	70
4.2.6.2.1 Princípio do Método.....	70
4.2.6.2.2 Técnica.....	71
4.2.6.2.3 Cálculo	71
4.2.6.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	72
4.2.6.3.1 Princípio do Método.....	72
4.2.6.3.2 Técnica.....	73
4.2.6.3.3 Cálculo	73
4.2.6.4 Determinação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	73
4.2.6.4.1 Princípio do Método.....	73
4.2.6.4.2 Técnica.....	74
4.2.6.4.3 Cálculo	75
4.2.6.5 Determinação das porcentagens de hemólise	75
4.2.6.5.1 Princípio do Método.....	75
4.2.6.5.2 Técnica.....	75
4.2.6.5.3 Cálculo	76
4.2.7 Cálculo da Concentração Inibitória 50% (IC ₅₀)	76
4.2.8 Análise estatística dos resultados obtidos.....	76

5 RESULTADOS.....	77
5.1 Concentração de GSH	78
5.1.1 Concentração de GSH de suspensão de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme	78
5.1.2 Concentração de GSH de suspensão de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme expostos ao <i>t</i> -BHP	79
5.1.3 Concentração de GSH de suspensão de eritrócitos de indivíduos normais incubados com concentrações crescentes de EGb 761 frente a exposição ao <i>t</i> -BHP.....	80
5.1.4 Concentração de GSH de suspensão de eritrócitos de pacientes com anemia falciforme incubados com concentrações crescentes de EGb 761 frente a exposição ao <i>t</i> -BHP.....	81
5.2 Porcentagem de Metahemoglobina	82
5.2.1 Porcentagem de metahemoglobina de suspensões de eritrócitos normais e de pacientes com anemia falciforme	82
5.2.2 Porcentagem de metahemoglobina de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme após exposição ao <i>t</i> -BHP.....	83
5.2.3 Porcentagem de metahemoglobina de suspensões de eritrócitos indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do <i>t</i> -BHP após incubação com EGb 761	84
5.3 Detecção da produção de ERO.....	85
5.3.1 Detecção da produção de ERO de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do <i>t</i> -BHP após incubação com EGb 761	85
5.4 Determinação da Peroxidação Lipídica.....	86
5.4.1 Determinação da peroxidação lipídica de suspensões de eritrócitos normais e de pacientes com anemia falciforme	86
5.4.2 Determinação da peroxidação lipídica de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do <i>t</i> -BHP	87
5.4.3 Determinação da peroxidação lipídica de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do <i>t</i> -BHP após incubação com EGb 761	88

5.5 Determinação das Porcentagens de Hemólise	89
5.5.1 Porcentagens de hemólise de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme	89
5.5.2 Determinação das porcentagens de hemólise de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do AAPH.....	90
5.5.3 Determinação das porcentagens de hemólise de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do AAPH após incubação com EGb 761	91
6 DISCUSSÃO	93
6.1 Estado oxidativo dos eritrócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com anemia falciforme	96
6.2 Estresse oxidativo induzido em eritrócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com anemia falciforme	98
6.2.1 Hemólise induzida por AAPH	98
6.2.2 Estresse oxidativo induzido por <i>t</i> -BHP	99
6.3 Ação antioxidante do EGb 761	100
7 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXOS	119
ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	120
ANEXO 2 – PROTOCOLO CEP/SD	123
ANEXO 3 – CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES DO GRUPO SS	125
ANEXO 4 – CERTIFICADOS DE ANÁLISE DO EGb 761.....	127

1 INTRODUÇÃO

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme foi a primeira doença humana monogênica caracterizada em nível molecular. O defeito apresentado nos eritrócitos resulta da substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da cadeia β da hemoglobina (HIGGS; WOOD, 2008). A doença é causada pela expressão homozigota da hemoglobina S (Hb S), forma estruturalmente anormal da hemoglobina. Em condições de baixa tensão de oxigênio, as moléculas de Hb S polimerizam, levando os eritrócitos à deformação e aumento da rigidez de membrana. Como consequências principais, ocorrem anemia hemolítica crônica e oclusão de pequenos vasos sanguíneos, que levam a dano tecidual por isquemia (TITUS *et al.*, 2004).

As hemoglobinopatias, entre elas a anemia falciforme, apresentam eritrócitos mais predispostos ao ataque de espécies radicalares, por produzirem maior quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000), serem mais suscetíveis à oxidação (CHAVES, 2007) e possuírem menor capacidade de defesa contra a oxidação (FASOLA *et al.*, 2007). O desequilíbrio entre as ações pró e antioxidantes pode levar a um extenso dano oxidativo de componentes da membrana dos eritrócitos (TITUS *et al.*, 2004).

O reconhecimento do papel das ERO na fisiopatologia da anemia falciforme sugere a ação benéfica de agentes que aumentem a capacidade antioxidante total em pacientes e, conseqüentemente, diminuam o acúmulo de dano oxidativo nos eritrócitos.

O extrato das folhas de *Ginkgo biloba* vem sendo utilizado a milhares de anos na medicina chinesa, e atualmente é consumido como fitoterápico na forma de extratos com composições bem definidas. O extrato padronizado de *Ginkgo biloba* 761 (EGb 761) é uma mistura complexa padronizada em 24% de flavonóides e 6% de terpenóides (He *et al.*, 2008).

A ação do EGb 761 como um agente antioxidante foi comprovada por vários autores, utilizando o eritrócito como modelo de estresse oxidativo (KOSE *et al.*, 1997; SARIKCIOGLU; ONER; TERCAN, 2004; FOROUGHINIA; KARIMI, 2007; HE *et al.*, 2008). Entretanto, na revisão de literatura realizada para o

presente trabalho não se encontrou qualquer relato mostrando o efeito do EGb 761 na prevenção dos danos oxidativos na anemia falciforme.

Dessa forma, considerou-se relevante analisar o efeito antioxidante do extrato padronizado do EGb 761 em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), com o intuito de investigar se o extrato pode protegê-los da injúria oxidativa, *in vitro*. Assim, a partir dos resultados deste trabalho se poderia supor se o uso do EGb 761 seria viável como antioxidante *in vivo*, possibilitando uma posterior avaliação do mesmo como possível coadjuvante no tratamento desses pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERITRÓCITO HUMANO MADURO

2.1.1 Membrana eritrocitária

O eritrócito humano é uma célula anucleada, altamente especializada, que apresenta a função vital de transportar oxigênio aos tecidos, através da hemoglobina (DACIE; LEWIS, 1995). O eritrócito precisa de energia - na forma de adenosina trifosfato (ATP), e de coenzimas como nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) - para manter a célula circulando por meses em seu estado funcional frente a exposições repetidas a lesões mecânicas e/ou metabólicas (MACHADO *et al.*, 2009).

O eritrócito é essencialmente composto de solução de hemoglobina envolta em uma membrana lipídica, já que a hemoglobina constitui cerca de 95% da proteína intracelular. Não existem organelas intracelulares, como mitocôndrias, lisossomos e aparelho de Golgi. Sua forma bicôncava aumenta a razão entre superfície e volume, facilitando, portanto, a troca de gases. O período de vida do eritrócito normal corresponde a 120 dias; isto significa que pouco menos de 1% da população de eritrócitos (2 bilhões de células) é substituído diariamente (MURRAY; GRANNER; MAYES, 2006).

A membrana do eritrócito humano é constituída de uma bicamada lipídica com 42% de lipídios, 52% de proteínas e 7% de carboidratos. A organização destes componentes é crítica para a função da membrana (Figura 1).

Os fosfolipídios (FL) e o colesterol não esterificado (C) estão presentes em quantidades aproximadamente equimoleculares (HARRIS, 1991). A distribuição dos FL na bicamada dos eritrócitos é assimétrica: quase toda a esfingomiélna (EM) e fosfatidilcolina (FC), ambas redutoras da fluidez da membrana, são encontradas do lado externo da membrana. Em contraste, fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilserina (FS) e fosfatidilinositol (FI), responsáveis por membranas mais fluidas, são preferencialmente encontrados no lado citosólico da membrana. A distribuição dos lipídios pode estar relacionada com a curvatura da membrana (LODISH, 2004). A estrutura lipídica da membrana é mantida por um sistema de transporte ativo dos FL

através da membrana. A *flipase* transporta ativamente os aminofosfolípidios de fora para dentro, enquanto a *scramblase*, quando ativada, move qualquer um dos FL em todas as direções (STUART; NAGEL, 2004).

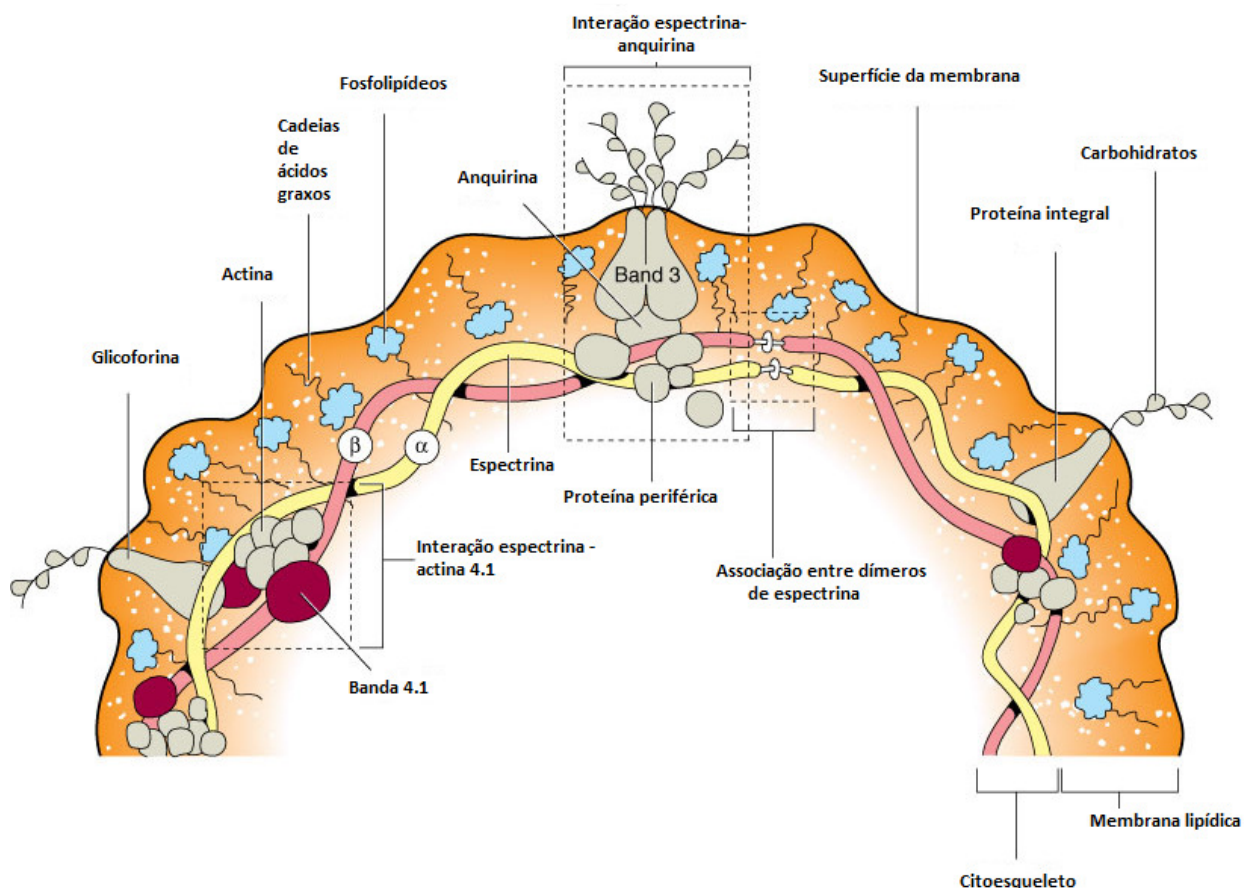


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA

FONTE: RED CELL BIOLOGY (2011) Disponível em:

<http://faculty.washington.edu/calvoc/DocumentsLabM321/Lectures/3RBC.ppt>

Nota: A membrana plasmática é composta de lipídios (fosfolípidios e colesterol), proteínas (integrais e periféricas) e carboidratos.

As proteínas que compõem a membrana eritrocitária são estruturalmente classificadas em integrais ou transmembrana e periféricas ou extra-membrana. Essas últimas proteínas compõem o citoesqueleto, uma verdadeira malha que constitui uma espécie de concha para o material intracelular. O citoesqueleto é responsável pela forma bicôncava normal, ou mesmo anormal, em caso de defeitos genéticos, dos glóbulos vermelhos e representa, por si só, 60% da massa protéica da membrana. As proteínas integrais penetram ou atravessam a bicamada lipídica e interagem com a porção hidrofóbica das moléculas lipídicas. Entre elas estão as

proteínas de transporte, como a banda 3, denominada proteína transportadora de íons; e as glicoforinas A, B, C e D, que possuem receptores de membrana e antígenos, os quais participam do reconhecimento célula-célula na extremidade externa e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com a proteína 4.1 na face interna da membrana. Das diferentes proteínas da membrana eritrocitária, o domínio citoplasmático da banda 3 se destaca como um grande centro organizacional que interage com muitas outras proteínas periféricas ou ligantes: anquirina, considerada a maior ponte para o citoesqueleto espectrina-actina, proteína 4.1, proteína 4.2, aldolase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfofrutoquinase, desoxihemoglobina, tirosinaquinase e hemicromos, que regulam a interação do citoesqueleto com enzimas glicolíticas (MURADOR; DEFFUNE, 2007).

2.1.2 Hemoglobina

A hemoglobina é a proteína presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos e apresenta como principal função o transporte de oxigênio (O_2) por todo o organismo (Figura 2). A sua estrutura é de uma proteína esferóide, globular, formada por quatro subunidades, compostas de dois pares de cadeias globínicas, polipeptídicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa (alfa- α ou zeta- ξ) e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ ou épsilon- ϵ). Cada cadeia polipeptídica da globina é composta por uma sequência de aminoácidos, tendo as cadeias alfa 141 aminoácidos e as cadeias não-alfa, 146. As combinações entre as diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos desde o período embrionário até a fase adulta, produzidas no decorrer das distintas etapas do desenvolvimento humano (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2002).

No adulto, as hemoglobinas constituem arranjos tetraméricos de cadeias alfa com beta ($\alpha_2\beta_2 = \text{Hb A}_1$), alfa com delta ($\alpha_2\delta_2 = \text{Hb A}_2$) e alfa com gama ($\alpha_2\gamma_2 = \text{Hb F}$). Ao nascimento, ainda predomina a hemoglobina Fetal (Hb F), que diminui gradativamente até aproximadamente a vigésima oitava semana de vida, quando as concentrações das hemoglobinas chegam às proporções do adulto, de 96 a 98%

para Hb A₁; de 2,0 a 3,7% para Hb A₂ e de até 1% para Hb F (STAMATOYANNOPOULOS, 1992).

O oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas e não conseguiria ser transportado aos tecidos em quantidades suficientes se fosse simplesmente dissolvido no sangue. No entanto, nenhuma das cadeias laterais das proteínas é adaptada para a ligação reversível das moléculas de oxigênio. Para isso, os organismos exploram as propriedades dos metais, principalmente o ferro, incorporado em um grupo prostético ligado a proteína, chamado de heme (Figura 3). O heme consiste em uma estrutura orgânica complexa em anel, a protoporfirina, a qual se liga um único átomo de ferro no seu estado ferroso (Fe^{2+}). O átomo de ferro possui seis ligações coordenadas, quatro a átomos de nitrogênio, que são parte do sistema achatado do anel da porfirina e duas perpendiculares à porfirina. Os átomos de nitrogênio coordenados (que possuem um caráter doador de elétrons) ajudam a impedir a conversão do ferro do heme ao estado férrico (Fe^{3+}). O Fe^{2+} liga-se ao oxigênio reversivelmente; no estado ferroso, entretanto, ele não se liga ao oxigênio (NELSON; COX, 2006).

A estrutura tetramérica da hemoglobina permite interações cooperativas que são fundamentais para o seu funcionamento. Por exemplo, o 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG) promove a liberação eficiente de O_2 através da estabilização da estrutura quaternária da desoxihemoglobina. As hemoglobinas ligam quatro moléculas de O_2 por tetrâmero. A molécula de O_2 se liga mais rapidamente se outras moléculas de O_2 já estiverem ligadas. Denominado “ligação cooperativa”, esse fenômeno permite que a hemoglobina maximize tanto a quantidade de O_2 transportada sob a PO_2 dos pulmões quanto a quantidade de O_2 liberada sob PO_2 típica dos tecidos periféricos (MURRAY; GRANNER; MAYES, 2006).

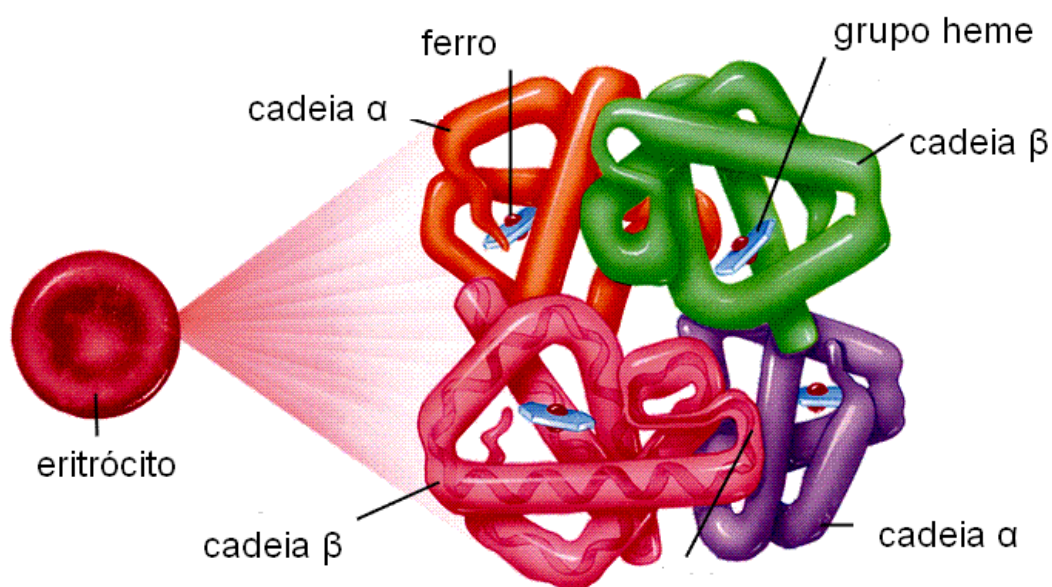


FIGURA 2 – ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA A

FONTE: MADER (1997)

Nota: A molécula de hemoglobina A contém duas cadeias de globina α e duas cadeias de globina β . Cada uma das quatro cadeias polipeptídicas contém uma molécula heme (azul).

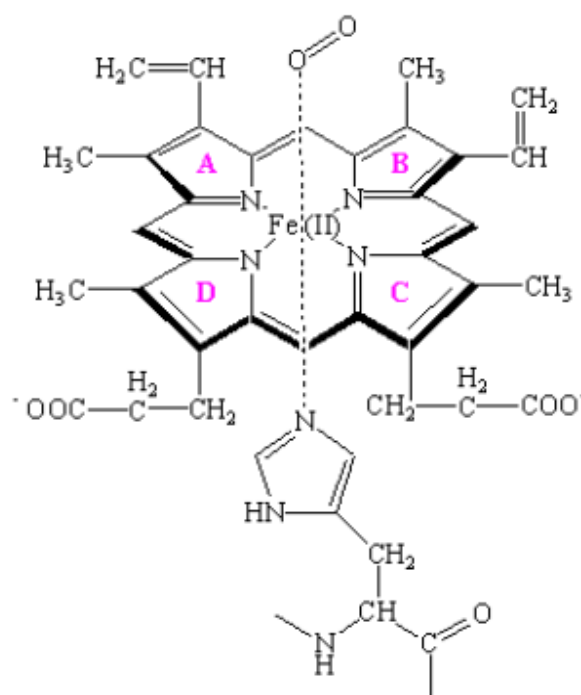


FIGURA 3 – ESTRUTURA DO GRUPO HEME

FONTE: PEÑUELA (2005)

Nota: O grupo heme é o sítio de ligação do oxigênio a hemoglobina. Cada molécula de hemoglobina carrega quatro moléculas de oxigênio.

2.1.3 Metabolismo energético do eritrócito

Eritrócitos humanos, como os da maioria dos animais, não são nucleados. Entretanto, não são metabolicamente inertes. ATP é sintetizado através da glicólise, sendo importante nos processos que auxiliam o eritrócito a manter sua forma bicôncava e nos que regulam o transporte de íons (p. ex.: pela Na^+K^+ ATPase e pela proteína permutadora de ânion e água para dentro e fora da célula). A entrada de glicose nos eritrócitos ocorre por difusão facilitada, através de uma proteína transportadora de glicose ou glicose permease, não insulino-dependente (MURRAY; GRANNER; MAYES, 2006).

Como o eritrócito não possui estrutura mitocondrial ou nuclear para o metabolismo de aminoácidos e lipídios, toda a sua energia resulta da quebra da glicose. Existem três vias metabólicas essenciais para a função do eritrócito, entre elas: a via de Embden-Meyerhof, a via da hexose monofosfato e via da metahemoglobina redutase (CIESLA, 2007), como pode ser observado na Figura 4.

Na via de Embden-Meyerhof ou glicólise, uma molécula de glicose é rompida em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar duas moléculas de piruvato, e a energia da glicose é conservada na forma de ATP e NADH. Todas as enzimas glicolíticas estão no citosol e todos os intermediários são compostos fosforilados com seis ou três átomos de carbono. Nos eritrócitos, é a principal fonte de energia metabólica, e o piruvato formado é reduzido a lactato por meio da via da fermentação do ácido láctico, mesmo em condições aeróbicas, já que, por não possuírem mitocôndrias, não podem oxidar o piruvato a CO_2 (NELSON; COX, 2006).

Na via das hexoses monofosfato, três moléculas de glicose-6-fosfato produzem três moléculas de CO_2 e três açúcares de cinco carbonos, e como a glicólise, também ocorre no citosol (MURRAY; GRANNER; MAYES, 2006). O produto mais importante da via nos eritrócitos é o NADPH reduzido. O eritrócito não utiliza o NADPH como fonte de energia, mas como cofator na redução da molécula de GSSG, sendo a principal proteção contra o estresse oxidativo da célula. A demanda aumentada de NADPH é o principal estímulo para a utilização de glicose-6-fosfato pela via (WINTROBE, 2003). A via da hexose monofosfato é a única fonte de NADPH nos eritrócitos, de modo que a deficiência genética da glicose-6-fosfato desidrogenase, a primeira enzima da via, manifesta-se em uma anemia hemolítica

que afeta aproximadamente 100 milhões de pessoas no mundo inteiro (MURRAY; GRANNER; MAYES, 2006).

A via da metahemoglobina redutase mantém o ferro da molécula de hemoglobina no estado reduzido, de modo que o O₂ possa ser liberado nos tecidos. A enzima é dependente de NADH: na ausência deste, a metahemoglobina acumula-se nos eritrócitos (CIESLA, 2007).

A molécula de 2,3 – bifosfoglicerato (2,3 – BPG), importante modulador da afinidade do oxigênio à molécula de hemoglobina, é sintetizada a partir de intermediários glicolíticos do ciclo de Luebering-Rapoport (WINTROBE, 2003).

Via Embden - Meyerhof
(Via anaeróbica do metabolismo da glicose)

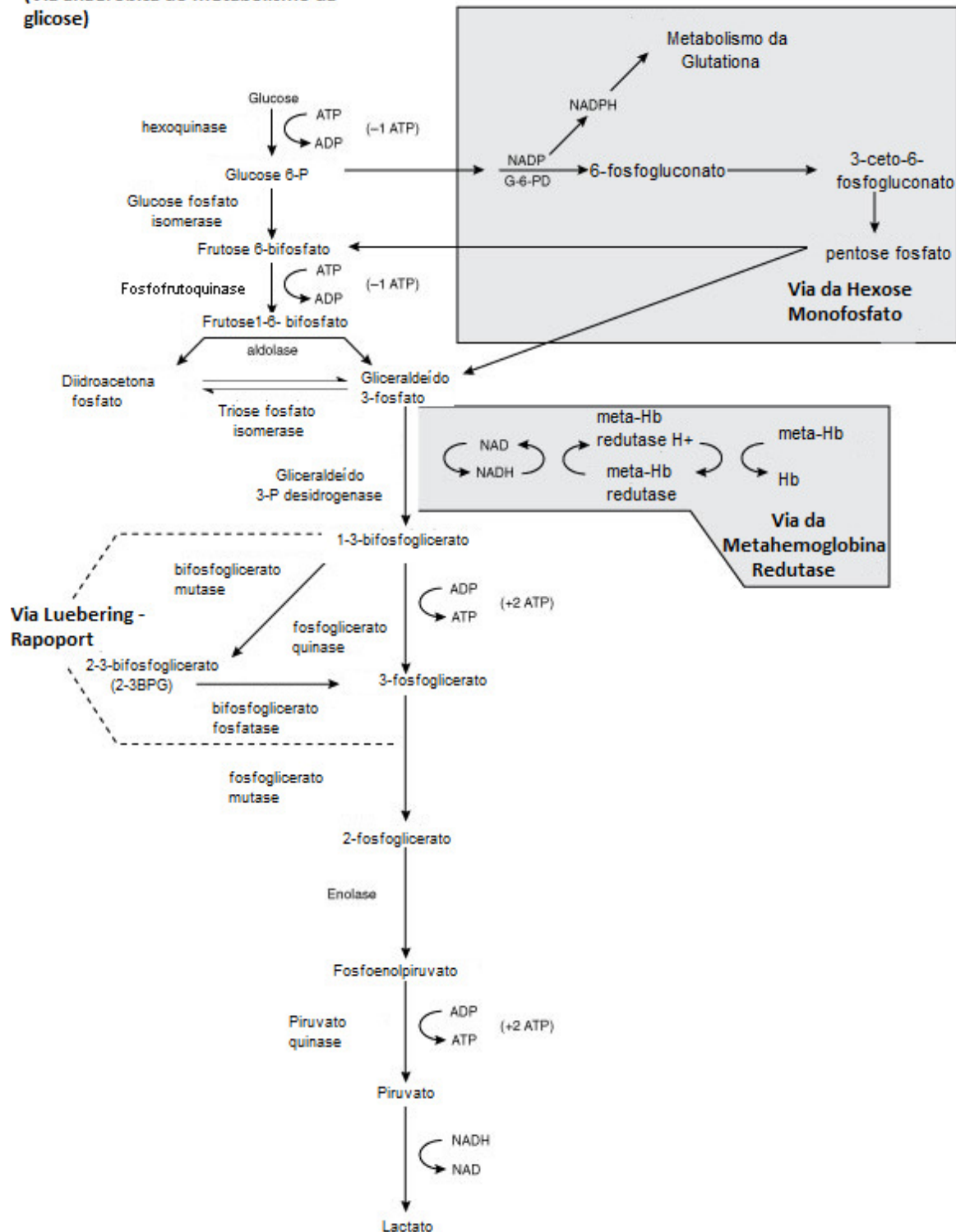


FIGURA 4 – SUPRIMENTOS DE ENERGIA NO ERITRÓCITO

FONTE: RED CELL BIOLOGY (2011). Disponível em:

<http://faculty.washington.edu/calvoc/DocumentsLabM321/Lectures/3RBC.ppt>

Nota: A glicólise ou via de Embden-Meyerhof é a principal via de síntese de ATP no eritrócito.

2.1.4 Metabolismo oxidativo dos eritrócitos

O estado oxidativo da célula é determinado pelo balanço entre os antioxidantes e os pró-oxidantes. Oxidantes são compostos que podem aceitar elétrons, enquanto os redutores doam elétrons. Pró-oxidantes são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN) e são classificados como radicais ou não radicais. Os radicais livres possuem pelo menos um elétron desemparelhado, o que resulta em alta reatividade. Os radicais mais comuns no sistema biológico são óxido nítrico (NO), superóxido (O_2^-), hidroxila ($\bullet OH$), peroxila ($ROO\bullet$) e oxigênio singlete (1O_2). As espécies reativas não radicalares são: ácido hipocloroso (HClO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos orgânicos ($LOO\bullet$), aldeídos, ozônio (O_3) e oxigênio (O_2) (FIBACHI; RACHMILEWITZ, 2008).

No organismo, as ERO e ERN encontram-se envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e membranas, às enzimas, carboidratos e ao DNA (Figura 5). Dessa forma, encontram-se relacionados com várias doenças, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral do paciente (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O eritrócito é um local de relativa abundância de geração e reação de radicais livres por diversos fatores, entre os quais o fato de possuir: concentração elevada de lipídios insaturados na membrana; um rico suplemento de oxigênio; e alta concentração de hemoglobina que pode atuar como promotora de processos oxidativos ((ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). Além disso, por serem células anucleadas, são incapazes de reparar os componentes danificados através da síntese *de novo* (HARRIS, 1991).

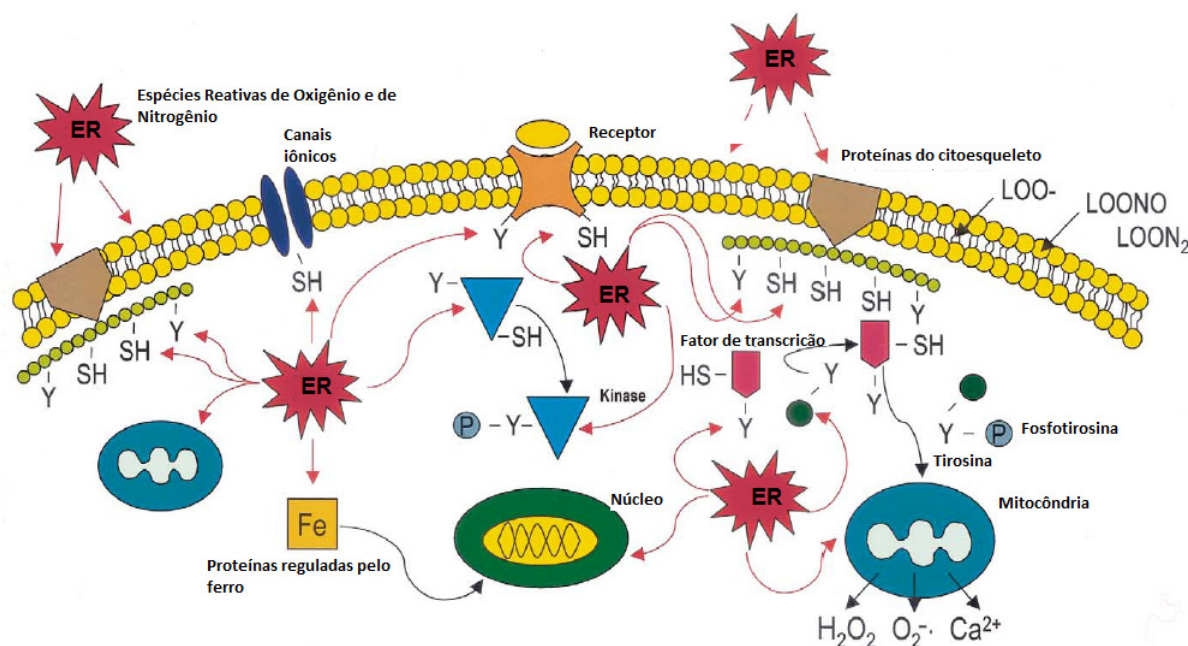


FIGURA 5 – ALVOS DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NA CÉLULA

FONTES: MRUK *et al.* (2002)

Nota: As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ER) podem danificar o DNA e lipídios de membrana, assim como afetar a função protéica, ao reagir com resíduos de metionina, fenilalanina, triptofano, e ativar fatores de transcrição ao reagirem com resíduos de tirosina (Y) e cisteína (SH).

2.1.4.1 Dano oxidativo às proteínas e lipídios de membrana

À medida que o O_2 sofre reduções univalentes, são geradas espécies reativas que constituem os oxidantes responsáveis pela desnaturação dos componentes celulares (PEÒUELA, 2005). O radical $\bullet OH$ é o mais deletério ao organismo, pois reage indiscriminadamente com biomoléculas com altas constantes de velocidade, gerando danos como clivagem de ligações e ligações cruzadas, com consequente perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através de membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Radicais como $\bullet OH$, ferril-Hb, peroxila e alcóxila atacam a cadeia lipídica em ácidos graxos suscetíveis, como o grupo metilênico alílico, abstraindo um átomo de hidrogênio e convertendo-o em novo centro de radical livre ($L\bullet$) – fase de iniciação. Este reage com oxigênio molecular, formando um radical peroxila ($LOO\bullet$), o qual

abstrai hidrogênio de outro lipídio. Na fase de propagação, forma-se um hidroperóxido de lipídio (LOOH) e outro L• que reage com oxigênio, e assim por diante, amplificando o processo. Na fase de terminação, dois radicais se combinam e formam um não-radical. O hidroperóxido de lipídio (LOOH) é uma molécula relativamente estável na temperatura fisiológica, mas pode sofrer outras reações, na maioria degradativas, que produzem aldeídos e alcanos de diferentes pesos moleculares (Figura 6). Entre os produtos estão, o malondialdeído (MDA), alcanos e hidroperóxidos, que são utilizados para monitorar os processos de peroxidação lipídica. O teste mais comum é o colorimétrico, baseado na reação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico, chamado teste do TBA. A peroxidação das membranas biológicas leva a um aumento de sua rigidez e consequente comprometimento das suas funções (AUGUSTO, 2006).

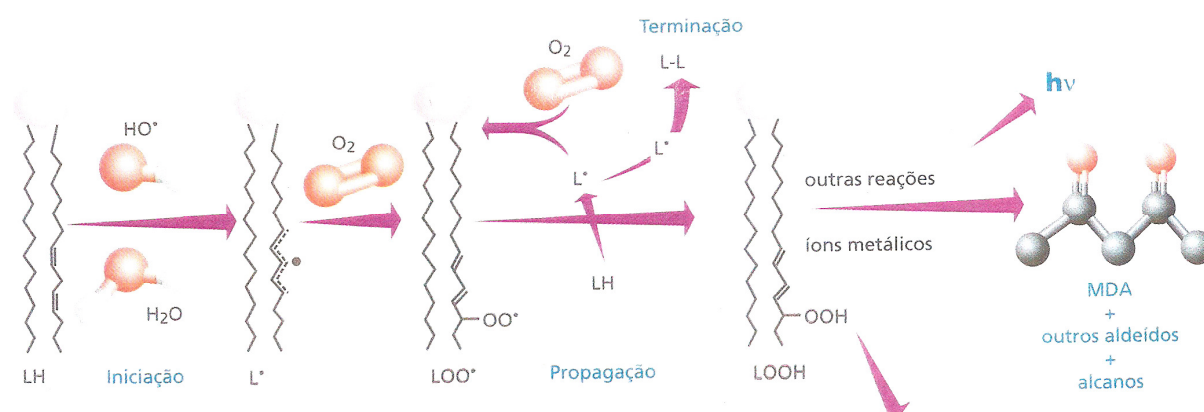


FIGURA 6 – ESQUEMA DO PROCESSO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA
FONTE: AUGUSTO (2006)

Segundo Barreiros, David e David (2006), o H_2O_2 isoladamente é praticamente inócuo, mas pode se difundir facilmente através das membranas celulares e reagir com metais de transição, formando o radical $\cdot\text{OH}$. Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são o Cu^{2+} e o Fe^{2+} , sendo o ferro o de ação mais pronunciada devido a sua maior disponibilidade. A reação do Fe^{2+} com o H_2O_2 (reação de Fenton) pode ser representada de maneira simplificada na equação abaixo:



2.1.4.2 Dano oxidativo à hemoglobina

A ligação do oxigênio na Hb envolve uma substancial migração de carga do ferro do grupo heme, formando um ânion $O_2^{\bullet-}$ como uma sexta ligação coordenada, e um íon ferroso de baixo *spin*. Na desoxigenação da Hb, o elétron compartilhado normalmente retorna ao ferro quando o oxigênio é liberado. O grupo heme está protegido da auto-oxidação por uma região hidrofóbica, mas quando esta região é perturbada, uma ligeira modificação estrutural pode permitir a entrada de pequenos ânions ou água, e o grupo heme perde um elétron, oxidando-se a seu estado de maior *spin*, a meta-Hb, e liberando o radical $O_2^{\bullet-}$ (HARRIS, 1991).

A degradação da Hb é escalonada (Figura 7). À medida que a desnaturação continua, a meta-Hb converte-se em hemicromos. Estes aparecem quando a sexta posição de coordenação do ferro se une de maneira covalente com um ligante na molécula de Hb (histidina distal E7), distorcendo a estrutura terciária da molécula. Os hemicromos podem ser reversíveis ou irreversíveis, dependendo do grau de distorção da molécula, e da capacidade da enzima meta-Hb redutase em reduzi-los. Quando os fenômenos oxidativos promovem a quebra da ligação entre as cadeias α e β , as cadeias polipeptídicas se dissociam em dímeros e monômeros, que precipitam como inclusões intraeritrocitárias denominadas corpos de Heinz, que se unem à membrana e diminuem o tempo de vida do eritrócito (PEÑUELA, 2005).

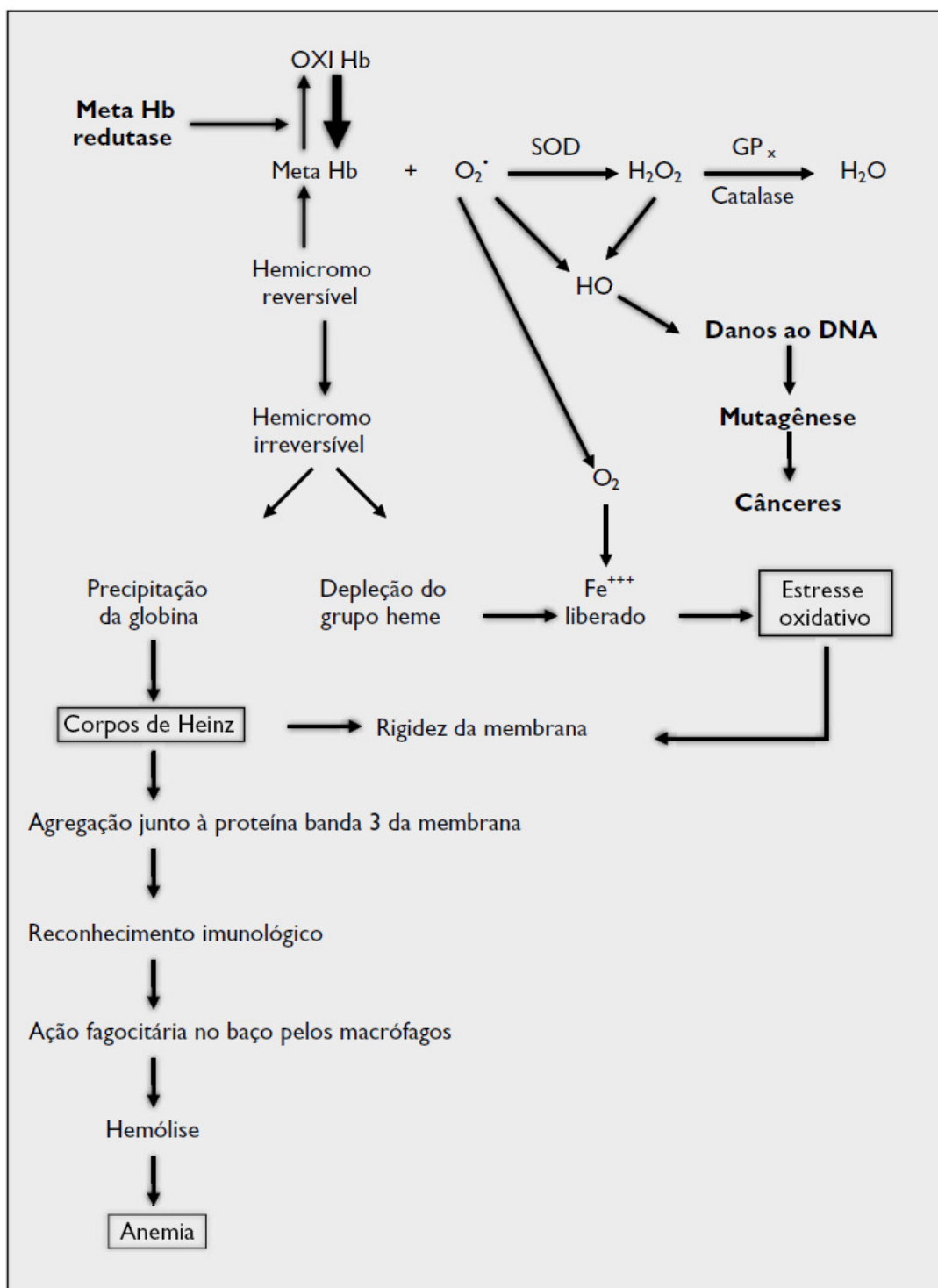


FIGURA 7 – OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA RESULTANDO EM PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

FONTE: NAOUM; SOUZA (2004)

Nota: SOD – superóxido dismutase; GPx – glutaciona peroxidase

2.1.5 Sistema antioxidante dos eritrócitos

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo próprio organismo ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes endógenos agem enzimaticamente, a exemplo da glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), ou não enzimaticamente, a exemplo de GSH, peptídios de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido dihidrolipólico. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos, onde se destacam os flavonóides (compostos aromáticos heterocíclicos de oxigênio amplamente distribuídos nas plantas superiores) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os agentes antioxidantes protegem as células de quatro formas possíveis: a) impedindo a formação de radicais livres; b) interceptando os radicais livres formados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas; c) reparando as lesões causadas pelos radicais; d) proporcionando uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais, com o aumento das enzimas antioxidantes (MAGALHÃES, 2009).

A manutenção dos mecanismos antioxidantes é de extrema importância nos eritrócitos que, ao contrário da maioria das células, não têm capacidade de sintetizar novos lipídios e proteínas para substituir os que foram oxidados. O efeito cumulativo da lesão oxidativa é responsável pelo processo normal de envelhecimento e destruição dos eritrócitos (MACHADO *et al.*, 2009).

2.1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

O eritrócito apresenta vários sistemas enzimáticos que mantêm o estado normal da célula: a) A meta-Hb redutase NADH dependente converte a Hb oxidada em deoxi-Hb; b) A SOD Cu-Zn dependente converte $O_2^{\bullet-}$, formado na auto-oxidação da Hb, a H_2O_2 , o qual tem reatividade limitada; c) A CAT é uma enzima citoplasmática, que decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 e realiza a oxidação de doadores

de H^+ , como metanol, ácido fórmico e formóis, com o consumo de peróxidos (atividade peroxidante); d) A GSH-Px é uma enzima mitocondrial e citoplasmática que detoxifica o H_2O_2 e remove hidroperóxidos lipídicos formados na membrana, utilizando a GSH como cofator; e) A glutatona redutase (GR) NADPH dependente é uma enzima citoplasmática que reduz a glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH) (HARRIS, 1991). As enzimas antioxidantes apresentam cooperação sinérgica para manter os níveis de ERO dentro dos níveis fisiológicos, tal como esquematizado na Figura 8; a catalase e a SOD atuam principalmente em regiões hidrofílicas, enquanto a GSH-Px, em regiões hidrofóbicas (MAGALHÃES, 2009).

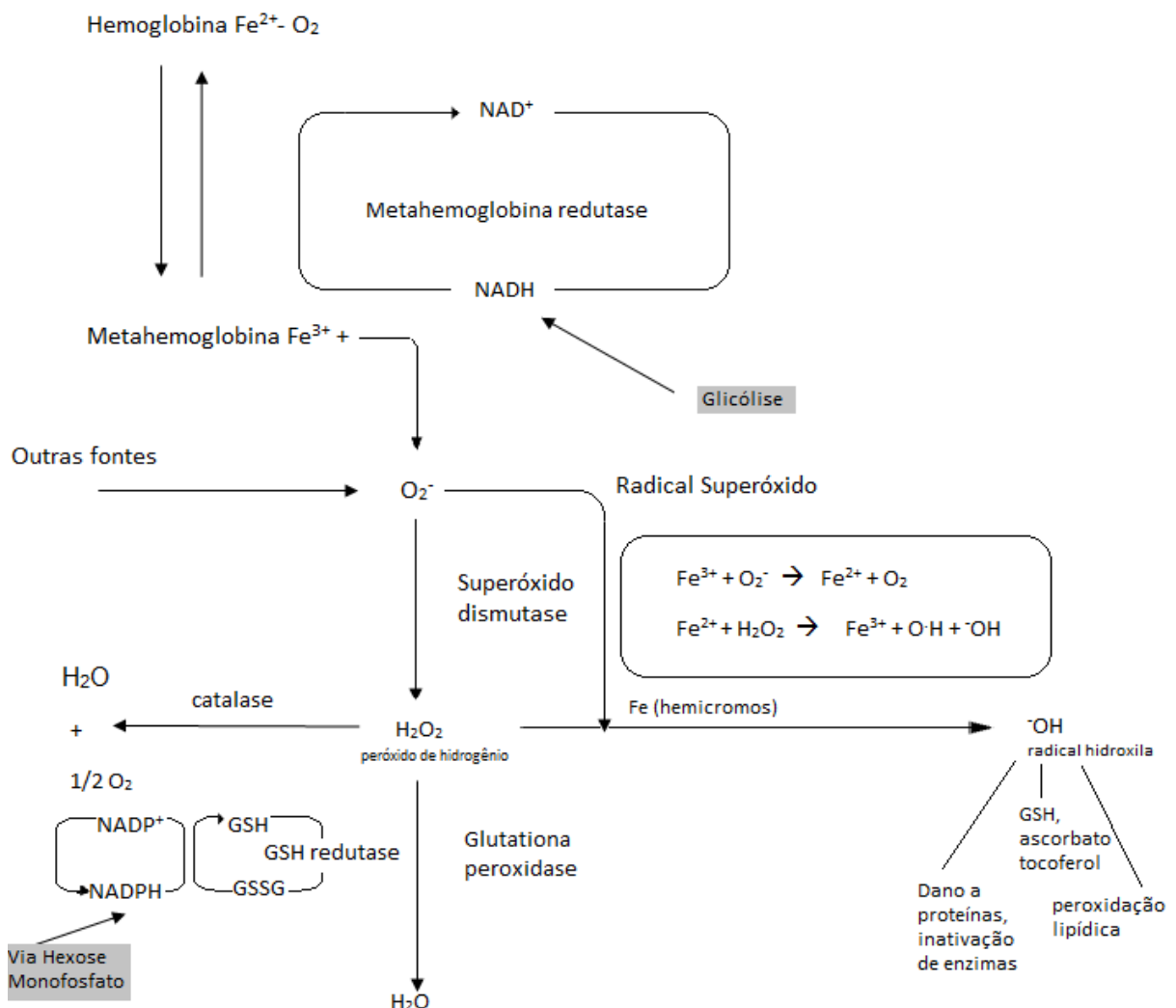


FIGURA 8 – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E PRINCIPAIS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NOS ERITRÓCITOS

FONTE: HARRIS (1991)

Nota: GSH – glutatona reduzida; GSSG – glutatona oxidada.

2.1.5.2 Antioxidantes de baixo peso molecular

O α -tocoferol é um dos antioxidantes mais importantes residentes na membrana, onde funciona como um finalizador de reações em cadeia, interrompendo a propagação dos radicais livres. Os níveis de ácido ascórbico dentro do eritrócito são baixos (0,043 moles/l), mas ele é um dos antioxidantes extracelulares mais importantes ao trabalhar sinergicamente com o tocoferol. Fora da célula, a ceruloplasmina - que age como uma ferro-oxidase - pode agir facilitando a ligação do ferro - normalmente em excesso - à transferrina. A albumina liga-se fortemente ao cobre e fracamente ao ferro, funcionando como um antioxidante de "sacrifício". Sugere-se que a haptoglobina e a hemopexina inibam reações de radicais livres, ligando-se a Hb livre ou grupo heme, e, portanto, prevenindo a decomposição da membrana. O ácido úrico também é um importante antioxidante fisiológico, agindo como um eficiente quelante de íons metálicos (HARRIS, 1991). As tioredoxinas, (TR-(SH)₂) doam equivalentes redutores a proteínas, a GSSG, a H₂O₂, ficando oxidadas (TR-SS), e são em seguida reduzidas pela enzima tioredoxina redutase, utilizando NADPH como cofator (MAGALHÃES, 2009).

A glutathiona reduzida (GSH, γ -glutamilcisteinilglicina), é um tripeptídeo com grupo tiol livre presente em organismos aeróbicos e sintetizada na maioria das células. O tripeptídeo é formado pela condensação, ATP dependente, do ácido glutâmico à cisteína, catalizada pela γ -glutamilcisteinil sintetase; a glicina é adicionada pela glutathiona sintetase. GSH é abundante no citosol, no núcleo e na mitocôndria das células, sendo o principal antioxidante solúvel nesses compartimentos. A GSSG acumula-se dentro das células, e a razão GSH/GSSG é uma boa medida de estresse oxidativo no organismo, sendo mais alta a concentração de GSSG quanto maior o dano oxidativo. As principais ações da GSH contra o estresse oxidativo são: agir como cofator de muitas enzimas contra o estresse oxidativo, como a GSH-Px, a glutathiona-S-transferase, entre outras; participar do transporte de aminoácidos através da membrana plasmática; sequestrar radicais OH⁻ e O₂⁻¹; regenerar a maioria dos antioxidantes, como as vitaminas C e E, a suas formas ativas (VALKO *et al.*, 2007).

2.1.6 O eritrócito e a oclusão vascular

Os eritrócitos possuem propriedades reológicas ímpares, como agregação, deformabilidade e aderência a células endoteliais, que desempenham papéis hemodinâmicos fundamentais. Em condições normais, os eritrócitos se dispersam, sua aderência às células endoteliais é insignificante, e eles são suficientemente deformáveis para possibilitar a perfusão tecidual. Entretanto, quando condições patológicas são associadas com condições de baixo fluxo sanguíneo, como traumas e isquemia; na presença de determinados componentes plasmáticos elevados, principalmente o fibrinogênio; ou mesmo devido a alterações das propriedades dos eritrócitos, em casos de hemoglobinopatias, estresse oxidativo, inflamação ou diabetes; as propriedades reológicas dos eritrócitos se alteram, apresentando um risco circulatório (YEDGAR *et al*, 2002).

A formação de agregados de eritrócitos aumenta a viscosidade do sangue, resultando em aumento da resistência ao fluxo sanguíneo com consequente diminuição da taxa de fluxo. Portanto, uma agregação aumentada tem o potencial de impedir o fluxo sanguíneo nos pequenos vasos, levando à diminuição da perfusão tecidual, isquemia e infarto. Além das alterações hemodinâmicas, os agregados de eritrócitos podem influenciar outras células do sistema vascular: (1) ativando células endoteliais com subsequente aumento no estresse por cisalhamento à parede dos vasos; (2) facilitando a migração plaquetária à parede dos vasos e sua interação com as células endoteliais; e (3) facilitando a marginalização dos leucócitos e sua adesão ao endotélio, contribuindo, portanto, de vários modos com a oclusão vascular (YEDGAR *et al*, 2002).

A aderência dos eritrócitos às células endoteliais vem sendo considerada como um proeminente catalisador da oclusão vascular, particularmente na microcirculação. Alterações na membrana dos eritrócitos em condições patológicas os tornam aderentes, bloqueando os capilares sanguíneos e aumentando o estresse por cisalhamento, podendo ativar o endotélio, principalmente se os eritrócitos estiverem sob maior estresse oxidativo, característico de hemoglobinopatias e diabetes (YEDGAR *et al*, 2002).

A deformabilidade dos eritrócitos refere-se à habilidade das células adaptarem sua forma dinamicamente de acordo com as mudanças no fluxo

sanguíneo, de modo a diminuir sua resistência ao fluxo e possibilitar sua passagem por pequenos vasos. Em condições normais, os eritrócitos, que medem em torno de 7 μm , atravessam capilares com diâmetro de não mais que 3 a 5 μm , suprindo de oxigênio os tecidos. Redução da deformabilidade resulta em perfusão prejudicada e entrega de oxigênio diminuída nos tecidos periféricos, além de estar relacionada com baixa sobrevivência do eritrócito, pois é a característica determinante para o sequestro esplênico (YEDGAR *et al.*, 2002).

O endotélio vascular também possui um papel muito importante no processo inflamatório e de vaso-occlusão. Além de produzir NO, as células endoteliais liberam endotelina-1, um potente vasoconstritor de grandes e pequenas artérias e agente pró-inflamatório, que aumenta as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis e estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias. Estas, por sua vez, estimulam as plaquetas, desencadeando a cascata de coagulação (GRAIDO-GONZALEZ *et al.*, 1998).

2.2 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme foi bioquimicamente caracterizada por Vernon Ingram em 1957, pioneiro no desenvolvimento de uma técnica capaz de definir a sequência primária de uma proteína. A hemoglobina S resulta da substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina, na sexta posição da cadeia β . A nível genético, a mudança é resultado da substituição da base nitrogenada adenina pela timina, no sexto códon da cadeia β , localizado no cromossomo 11. A anemia falciforme refere-se ao estado homozigoto do gene β^S , em que a maior parte da hemoglobina dos eritrócitos é Hb S (PROVAN; GRIBBEN, 2005).

O evento central da doença é a polimerização da Hb S deoxigenada (Figura 9). A Hb S oxigenada tem comportamento idêntico a Hb A em relação à afinidade pelo oxigênio. Entretanto, a modificação da estrutura quaternária da hemoglobina que acompanha a liberação da molécula de oxigênio expõe os resíduos de valina mutantes das cadeias β , e as moléculas de Hb S tendem a aderir uma às outras formando polímeros que distorcem a estrutura da membrana citoplasmática e

resultam em eritrócitos falciformes, forma patognomônica da doença falciforme (BRIDGES; PEARSON, 2008).

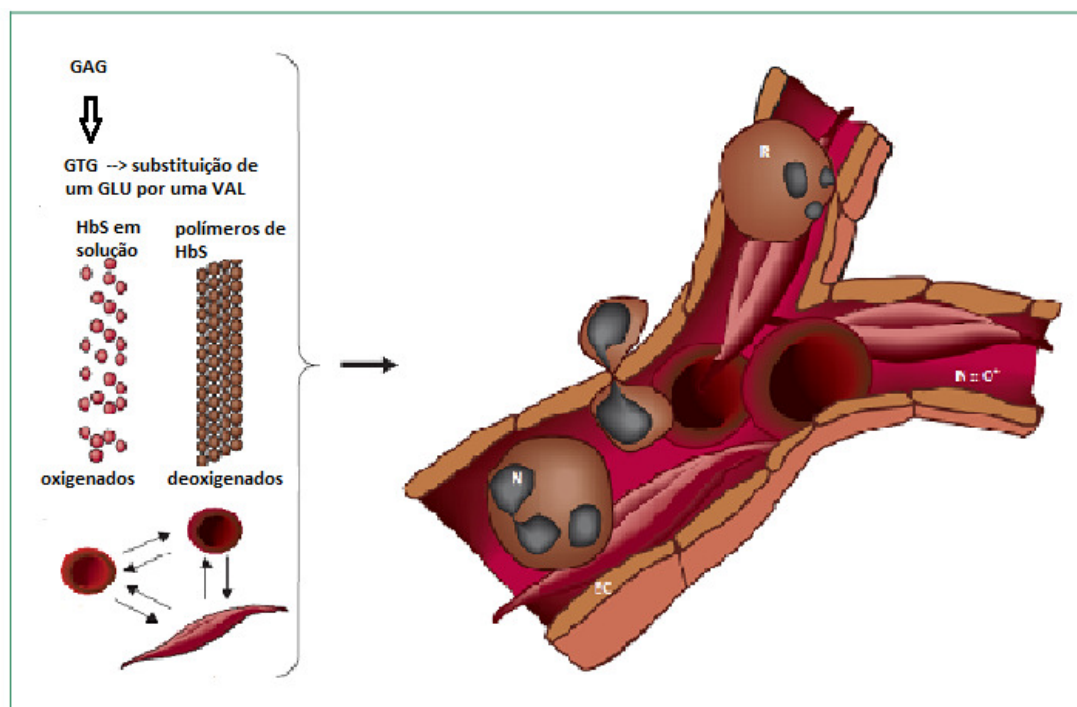


FIGURA 9 – FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME

FONTE: STUART; NAGEL (2004)

NOTA: A simples substituição de um nucleotídeo (GAG→GTG) leva à polimerização da molécula de hemoglobina, em condições de baixa oxigenação, e mudanças na forma do eritrócito.

Os métodos atuais de biologia molecular têm permitido identificar as diferentes mutações dos genes da globina β , definindo vários grupamentos genéticos isolados por enzimas de restrição, que são os chamados haplótipos (COSTA *et al.*, 2006). Dentre eles, os mais conhecidos são: Benin (BEN); República Centro-Africana ou bantu (CAR); Senegal (SEN); Camarões (CAM); saudita ou indú-árabe (ROMERO; RENAULD; VILLALOBOS, 1998).

Como a doença tem alta prevalência na raça negra, no Brasil, a diversidade étnica e a miscigenação contribuíram para a sua importância na saúde pública. Assim, a pesquisa da presença da Hb S foi incluída na triagem neonatal em 2001 pela portaria nº. 822/GM do Ministério da Saúde. No Paraná, segundo dados de Watanabe *et al.* (2008), a prevalência de anemia falciforme é de 2,2/100 mil recém-nascidos, menor que na região centro-oeste, norte e nordeste do país.

A doença falciforme apresenta, clinicamente, anemia crônica grave, crises vaso-oclusivas recorrentes extremamente dolorosas, aumento da susceptibilidade a infecções causadas por microorganismos encapsulados, além de outras manifestações, como: crise aplástica, crise de sequestro esplênica, acidente vascular cerebral, lesões oftálmicas, cardíacas, pulmonares e renais, colelitíase, necrose asséptica da cabeça do fêmur, priapismo, úlcera de perna e alterações no crescimento e no desenvolvimento do paciente acometido. Existe grande heterogeneidade individual quanto à gravidade de cada uma destas alterações, especialmente para complicações vaso oclusivas (COSTA *et al.*, 2006).

A presença associada de α -talassemia ao genótipo da anemia falciforme, os níveis de Hb F e os haplótipos do “cluster” do gene da globina beta têm sido considerados, frequentemente, os fatores determinantes da variabilidade da anemia falciforme (FLEURY, 2007).

A Hb F inibe a polimerização da Hb S através da formação de híbridos assimétricos Hb S/Hb F. Tendências de polimerização de misturas de Hb S e demais hemoglobinas variantes mostram que os resíduos 22, 80 e especialmente o 87 da cadeia γ estão relacionados com os sítios de contato intermolecular que estabilizam os polímeros Hb S desoxigenados (STUART; NAGEL, 2004).

Os haplótipos do tipo Senegal e Saudita estão comumente associados a níveis mais altos de Hb F (acima de 15%) e a um curso clínico mais brando. No haplótipo do tipo Benin, os níveis de Hb F são intermediários (de 5 a 15%) e os benefícios quanto ao curso clínico são menos marcantes. O haplótipo do tipo CAR, por sua vez, apresenta níveis mais baixos de Hb F (abaixo de 5%) e o curso clínico mais grave (FLEURY, 2007).

Tão importantes quanto as variações genéticas, os fatores adquiridos são responsáveis pela variabilidade clínica e pelo prognóstico de pacientes com doença falciforme. O nível socioeconômico e educacional ocupa uma posição central, pois determina variantes que influenciam diretamente na evolução da doença e no seu prognóstico (ZAGO; PINTO, 2007).

A formação de Hb S é um evento monogênico, determinante da polimerização de sua conformação desoxigenada. O processo é indispensável, porém insuficiente para a determinação dos fenótipos, que são multigênicos. Outros eventos, não relacionados ao *locus* do gene da β -globina, participam de processos

patológicos relevantes, como a rápida destruição dos eritrócitos, mas são controlados por genes conhecidos por efetores secundários. O fenômeno de falcização tem condicionantes que o facilitam ou dificultam. Para que as moléculas de Hb S se agreguem é necessário que, além de desoxigenadas, estejam em elevada concentração, o que facilita a sua associação. Além disso, a redução da solubilidade da Hb S e a sua polimerização dependem também do funcionamento de bombas de Na^+K^+ e $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$, da capacidade antioxidante do eritrócito, do grau de desoxigenação da célula, do pH e, principalmente, da concentração de Hb F (STUART; NAGEL, 2004).

O fenômeno de falcização não é instantâneo, mas ocorre após um retardo. Assim, se a hemoglobina voltar a se oxigenar, a falcização não ocorre. Logo, a falcização grosseira de grande porcentagem dos eritrócitos é mais consequência do retardo e da vaso-obstrução do que de sua causa propriamente dita (ZAGO; PINTO, 2007).

A formação de polímeros de Hb S dentro dos eritrócitos tem como consequência múltiplas alterações da célula, como: aumento do cálcio e efluxo de potássio, com perda de água e consequente desidratação celular, aumento da densidade dos eritrócitos, formação de polímeros da Hb com proteínas de membrana, em especial da banda 3, oxidação da Hb com formação de meta-Hb e íon O_2^- , e exposição de moléculas da membrana celular como FS e CD36. A membrana é, assim, o principal espelho onde se refletem as alterações moleculares que estão ocorrendo no interior da célula. Essas modificações têm consequências que as amplificam, levando às manifestações clínicas decorrentes de diversos eventos: a) provocam um aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios que influenciam também os granulócitos e as plaquetas; b) enrijecem a membrana e todo o eritrócito, encurtando sua sobrevivência na circulação, favorecendo a hemólise e a anemia hemolítica; c) provocam lesões microvasculares; d) causam uma depleção de NO que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação; e) ativam a coagulação (ZAGO; PINTO, 2007).

2.2.1 Anemia falciforme e fenômenos de vaso-oclusão

A fisiopatologia da anemia falciforme é marcada por episódios de oclusão vascular, causados pela polimerização da Hb S e obstrução mecânica dos capilares pelos eritrócitos falcizados (Figura 10). Esse fenômeno, porém, é incitado por múltiplos eventos que, juntos, prolongam o tempo de trânsito dos eritrócitos afetados em condições microcirculatórias desfavoráveis (STUART; NAGEL, 2004).

Deste modo, a vaso-oclusão é regida por alguns mecanismos centrais, entre eles o aumento da adesão celular dos elementos sanguíneos ao endotélio, distúrbios na coagulação e alteração na biodisponibilidade do NO (ASLAN; FREEMAN, 2007), os quais serão discutidos nos próximos tópicos.

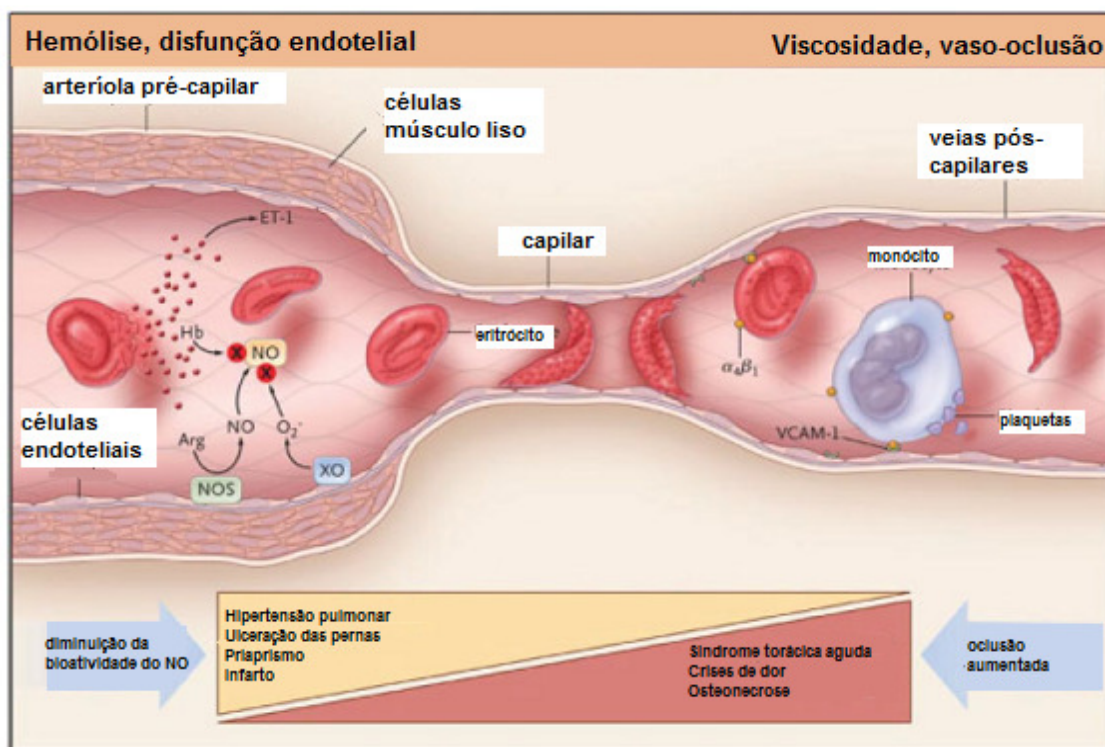


FIGURA 10 – RELAÇÃO ENTRE HEMÓLISE, DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E VASO- OCLUSÃO NA ANEMIA FALCIFORME

FONTE: KATO *et al.* (2009)

Nota: A figura ilustra algumas das vias ativadas na anemia falciforme, incluindo hemólise intravascular e sequestro de NO pela hemoglobina extracelular, contribuindo para uma relativa deficiência de NO, vasoconstrição e ativação endotelial; rigidez do eritrócito conseqüente à polimerização da hemoglobina S, resultando em oclusão vascular; e adesão de reticulócitos falciformes, leucócitos e plaquetas ativados ao endotélio das veias pós-capilares.

2.2.1.1 Aumento da adesão celular na anemia falciforme

Na anemia falciforme, as interações anormais entre eritrócitos e endotélio são um fator de iniciação no desenvolvimento de oclusões microvasculares, fato reforçado pela significativa correlação entre gravidade clínica da doença e extensão da adesão eritrocitária (ASLAN; FREEMAN 2007). Segundo Telen (2000), os eritrócitos falciformes expressam maior número de moléculas de adesão (FS, CD36, CD47, CD49d e VCAM/Lu) na superfície externa da membrana celular do que eritrócitos normais. Essas moléculas favorecem a interação com o endotélio e com outras células, propagando o processo de vaso-occlusão (Figura 11).

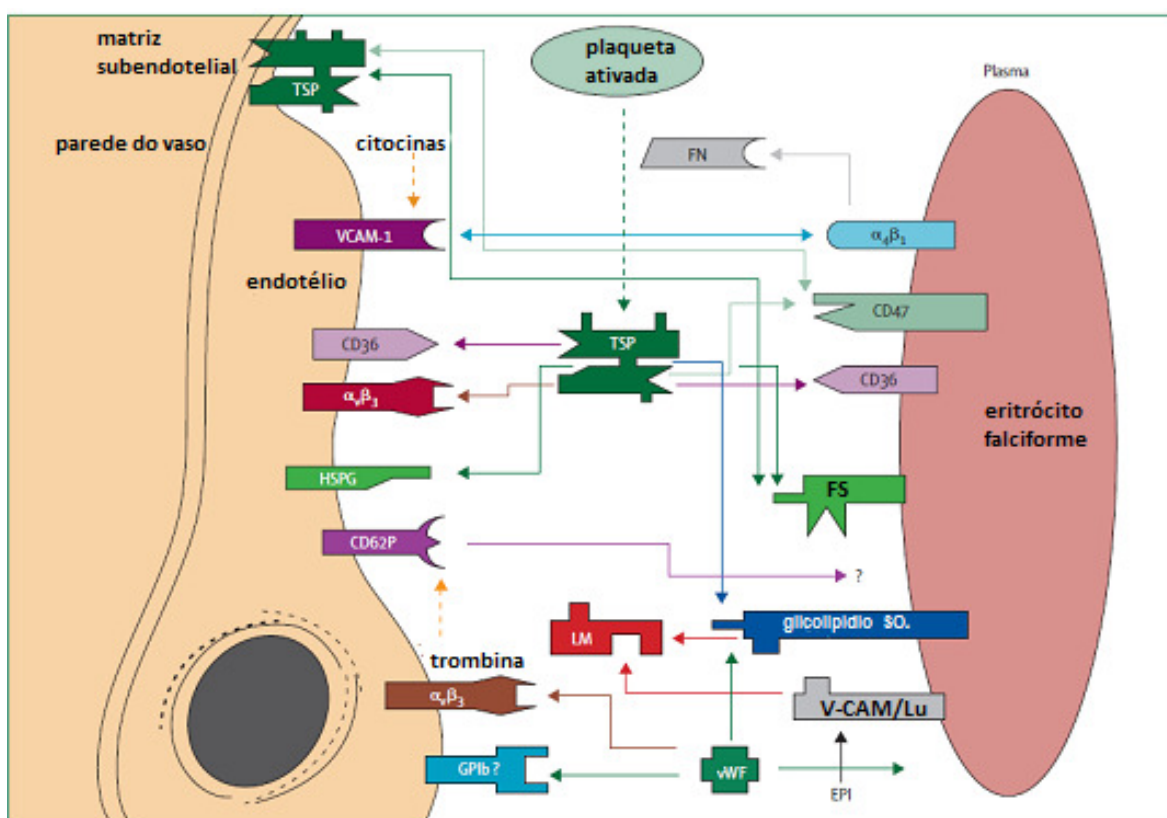


FIGURA 11 – INTERAÇÕES ADESIVAS ENTRE ERITRÓCITOS, ENDOTÉLIO, MATRIZ SUBENDOTELIAL E LEUCÓCITOS NA ANEMIA FALCIFORME
 FONTE: STUART; NAGEL (2004)

Nota: SO₄ glicolípídios: glicolípídios sulfatados; FS: fosfatidilserina; TSP: trombospondina; FN: fibronectina; LM: laminina; VWF: fator de Von Willebrand; HSPG: proteoglicanas de heparan sulfato; EPI: epinefrina; CD62P: selectina-P.

A fosfatidilserina (FS) é uma molécula de adesão presente em maior quantidade na parte interna da membrana celular do que exposta na superfície de eritrócitos normais, mas em uma parcela dos eritrócitos falciformes essa proporção se inverte. Estudos já comprovaram que eritrócitos com maior exposição dessa molécula possuem potencial de adesão celular três vezes maior do que eritrócitos normais, perdendo-se a assimetria da membrana. A FS liga-se ao receptor da fibronectina do endotélio via trombospondina (TSP). Alguns estudos correlacionam a exposição de FS como um dos principais determinantes de aderência celular e da ativação da cascata da coagulação na crise vaso-oclusiva (ZAGO; PINTO, 2007). A exposição de FS pode também exacerbar a anemia devido ao aumento do reconhecimento fagocitário e remoção pelos macrófagos (Figura 12). Causas dessa exposição são: inativação da *flipase*, ativação prematura de apoptose dos eritrócitos na medula, e danos mediados pela falcização. Altas concentrações de Hb F protegem os eritrócitos da externalização de FS em indivíduos portadores de Hb S (STUART; NAGEL, 2004).

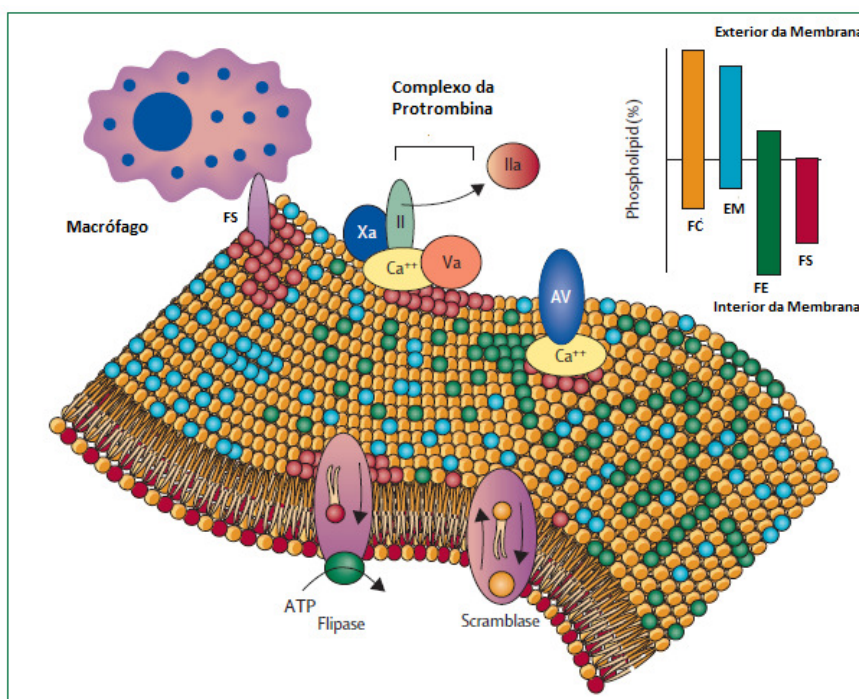


FIGURA 12 – PERTURBAÇÕES DA MEMBRANA LIPÍDICA DOS ERITRÓCITOS NA ANEMIA FALCIFORME

NOTA: EM – esfingomielina; FS – fosfatidilserina; FC – fosfatidilcolina; FE – fosfatidiletanolamina.

FONTE: STUART; NAGEL (2004)

2.2.1.2 Distúrbios de coagulação na anemia falciforme

Múltiplos estudos indicam um estado pró-coagulante nos pacientes com anemia falciforme, induzido pelo aumento da ativação das plaquetas, da geração de trombina e da fibrinólise (Figura 13). O fator tecidual (TF), o principal iniciador fisiológico da coagulação, está significativamente aumentado em pacientes com anemia falciforme. Ao interagir com o fator VII, provoca a hidrólise dos fatores IX e X e desencadeia a cascata da coagulação. Os níveis aumentados de fragmento 1.2 e reduzidos de fator V sugerem um aumento da geração de trombina, a qual quebra os fibrinopeptídeos A e B do fibrinogênio e forma monômeros de fibrina, que polimerizam espontaneamente, formando o coágulo. Já os altos níveis de fibrinopeptídeo A presentes nos pacientes com anemia falciforme indicam uma proteólise aumentada do fibrinogênio. Marcadores plasmáticos de fibrinólise, o dímero-D e o complexo plasmina-antiplasmina, estão significativamente aumentados nos pacientes com anemia falciforme (ASLAN; FREEMAN, 2007).

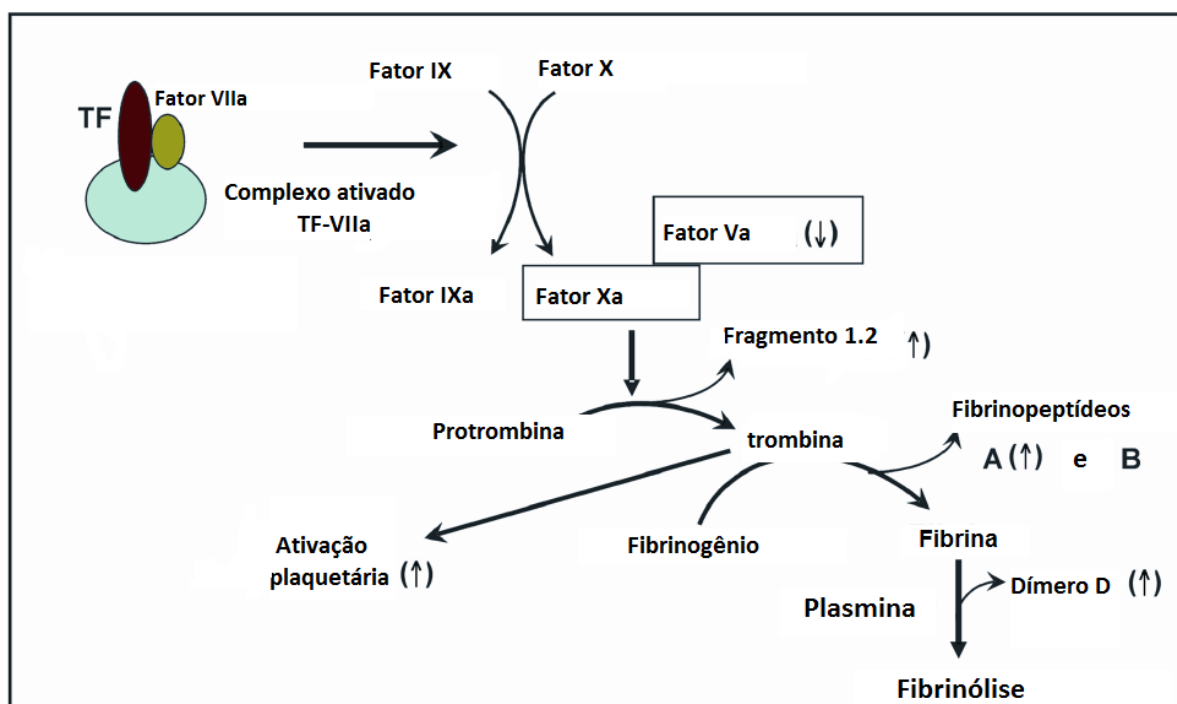


FIGURA 13 – PATOGÊNESE DOS DISTÚRBIOS DE COAGULAÇÃO NA ANEMIA FALCIFORME
 FONTE: ASLAN; FREEMAN (2007)

2.2.1.3 Alteração na disponibilidade de NO e disfunção endotelial na anemia falciforme

Formado pela ação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), o NO difunde-se às células do músculo liso vizinho, onde reage com o íon ferroso do grupo heme da guanilato ciclase, resultando em síntese de cGMP a partir do GTP e relaxamento muscular. A disponibilidade diminuída do NO na anemia falciforme decorre do sequestro do NO pela hemoglobina livre (resultante da hemólise intravascular) e pelo íon superóxido gerado pelo desacoplamento da enzima eNOS, xantina oxidase e NADPH oxidase. O NO liga-se à hemoglobina, dando origem a metahemoglobina e nitrato, enquanto o superóxido reage formando o peroxinitrito (Figura 14). A diminuição do NO na anemia falciforme está relacionada a complicações da doença, como hipertensão pulmonar e acidente vascular cerebral (ASLAN; FREEMAN, 2007).

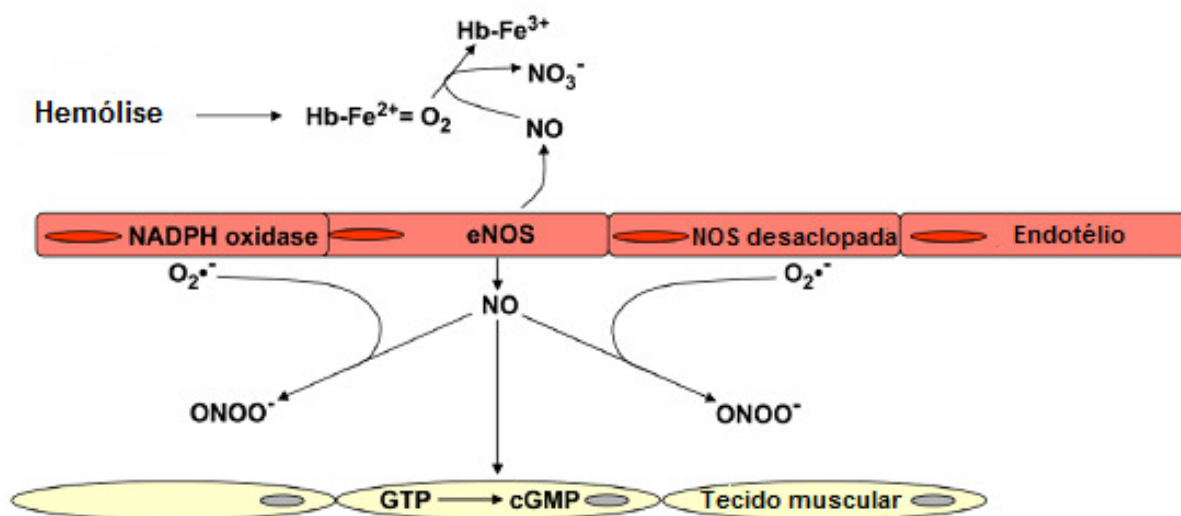


FIGURA 14 – CONSUMO INTRAVASCULAR AUMENTADO DE ÓXIDO NÍTRICO NA ANEMIA FALCIFORME
 FONTE: ASLAN; FREEMAN (2007)

Nota: O íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$) gerado pelo desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), xantina oxidase (XO) e NADPH oxidase, reage com óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). NO também é consumido pela hemoglobina livre no plasma, liberada através da hemólise intravascular.

2.2.1.4 Taxa aumentada de produção de espécies reativas de oxigênio na anemia falciforme

A degradação oxidativa da Hb S é um dos fatores que predispõem ao processo hemolítico das células falciformes, induzindo múltiplas consequências patológicas da doença falciforme. A desoxigenação da Hb S favorece a sua meta-hemoglobinização (meta-Hb S) e a consequente elevação desse pigmento dentro do eritrócito (NAOUM; SOUZA, 2004). A auto-oxidação da Hb S é 1,7 vezes maior do que a taxa fisiológica de auto-oxidação da Hb A (ASLAN; THORNLEY-BROWN, 2000). Quando a concentração de meta-Hb S supera a ação da enzima meta-Hb redutase, é desencadeada a degradação da meta-Hb S, com formação de hemicromos ou subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina S oxidada sob forma de corpos de Heinz (NAOUM; SOUZA, 2004).

Segundo dados de Fasola *et al.* (2007), os pacientes com anemia falciforme apresentam uma capacidade antioxidante total de apenas 50% em relação aos indivíduos controle (Hb A). Os eritrócitos de portadores de Hb S auto-oxidam mais rapidamente, gerando maiores concentrações de O_2^- , H_2O_2 , OH^- e oxidação de lipídios, além de apresentarem atividades de GSH-Px e CAT e concentrações de vitaminas antioxidantes reduzidas, deixando os pacientes com anemia falciforme expostos a maiores riscos de estresse e injúria oxidativa. Esses valores já tinham sido encontrados por Aslan, Thornley-Brown e Freeman (2000), que verificaram que eritrócitos na anemia falciforme geram 2 vezes mais O_2^- , H_2O_2 , OH^- e produtos de oxidação lipídica quando comparados com eritrócitos contendo Hb A. Estudos com eritrócitos de portadores de Hb S reportaram níveis aumentados de SOD e níveis diminuídos de GSH-Px e CAT, sugerindo que o H_2O_2 endógeno pode não ser removido com eficiência.

A degradação oxidativa da Hb S leva à liberação de ERO que altera a distribuição das moléculas de imunoglobulinas aderidas à superfície da membrana eritrocitária. As disposições desordenadas das imunoglobulinas em determinadas regiões da célula falciforme induzem à ação fagocitária dos macrófagos no sistema retículo endotelial, causando hemólise e anemia (NAOUM; SOUZA, 2004).

Nos eritrócitos, o principal alvo do dano oxidativo é a membrana plasmática, que tem seus lipídios oxidados, alterando a fluidez da membrana. Adicionalmente,

existe um aumento na permeabilidade aos íons, inativação de receptores e enzimas, e ligações covalentes entre os lipídios e proteínas (KLINGS; FARBER, 2001).

Em estudo que incluiu indivíduos heterozigotos para a anemia falciforme, observou-se aumento da SOD e da peroxidação lipídica, associados à quase depleção de ácido ascórbico. Esses resultados foram indicativos da constante perda do equilíbrio entre o *status* pró e antioxidante nesses indivíduos (TITUS *et al.*, 2004). Dados de Manfredini *et al.* (2008) comprovaram que, apesar do aumento de enzimas antioxidantes, como SOD e GSH-Px em pacientes homozigotos para a anemia falciforme, não se consegue minimizar o extenso dano oxidativo das proteínas e lipídios de membrana.

Chaves, Leonart e Nascimento (2008) encontraram uma alta suscetibilidade à oxidação em eritrócitos de indivíduos portadores de Hb S (AA<AS<SS). Quando expostos a um agente oxidante como o *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BHP), esses eventos tomam ampla dimensão, observada pelo aumento significativo dos corpos de Heinz, meta-Hb e hemólise e pela depleção de GSH, em relação às células controle normais.

Crescentes evidências indicam o papel do estresse oxidativo nos episódios de oclusão vascular observados na anemia falciforme. A geração aumentada de radicais livres, como o O_2^- , pode levar à inativação do NO, mediador do relaxamento vascular. Como consequência da diminuição do NO e da formação acelerada de ERO, ocorre a expressão aumentada da molécula de adesão das células vasculares (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular (ICAM-1). Eritrócitos de portadores de Hb S apresentam interação aumentada ao endotélio via interações entre integrinas 4.1 dos eritrócitos e VCAM-1 das células endoteliais. A diminuição do relaxamento vascular e a aderência endotelial aumentada contribuem para o fenômeno de vaso oclusão (FASOLA *et al.*, 2007).

Desse modo, a prevenção dos eventos vaso-oclusivos nos pacientes com anemia falciforme pode ser mediada através do uso de antioxidantes, que diminuem a disponibilidade das ERO e seu dano oxidativo consequente.

2.3 O ERITRÓCITO COMO MODELO EXPERIMENTAL

Um sistema eficaz para a triagem inicial de substâncias antioxidantes é o uso de modelos celulares, que são especialmente úteis para estudar os efeitos do estresse oxidativo em termos de toxicidade e respostas adaptativas celulares, bem como comprovar os efeitos reguladores que podem exercer os potenciais antioxidantes em alterações como citotoxicidade, genotoxicidade e reações oxidativas. A limitação deste sistema é de que não reproduz exatamente as condições do organismo, pois se perdem as funções sistêmicas como a endócrina e a nervosa. Porém, em se estando ciente dos seus limites, o modelo celular resulta numa ferramenta útil e muito valiosa na ciência biomédica e farmacêutica (CASADEVALL, 2009).

Os modelos celulares incluem tanto modelos de células isoladas, como o eritrócito, quanto os cultivos celulares. No presente trabalho, escolhemos o eritrócito como modelo celular (Figura 15), já que é uma amostra fácil de se obter e preparar e representa um modelo celular muito simples, sem núcleo ou organelas, resultando excelente para o estudo da toxicidade sobre biomembranas e da defesa antioxidante (CASADEVALL, 2009).

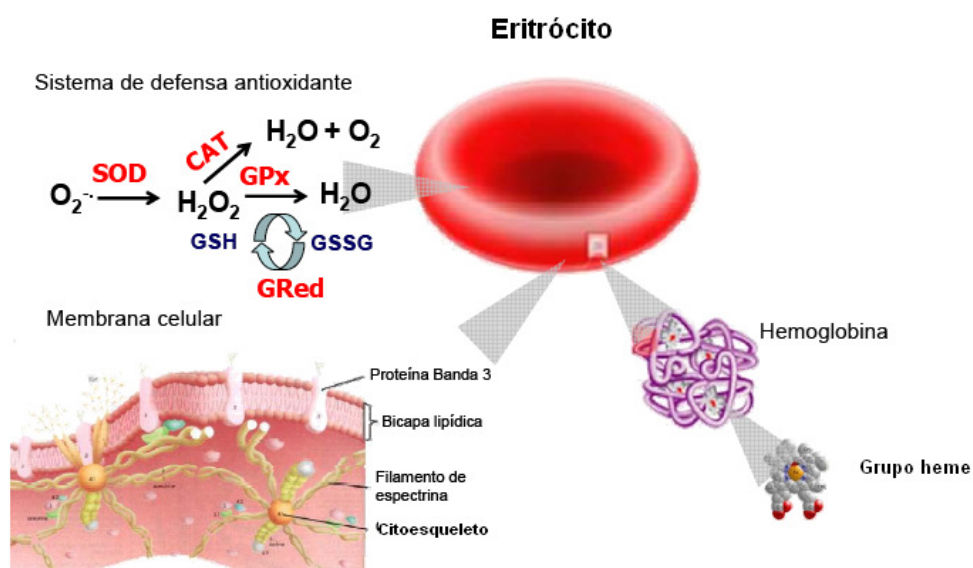


FIGURA 15 – MODELO CELULAR DO ERITRÓCITO

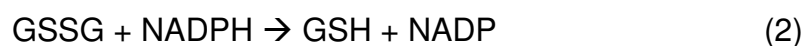
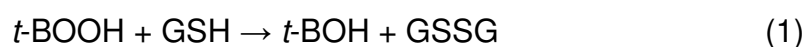
FONTE: CASADEVALL (2009)

2.3.1 Agentes oxidantes utilizados em modelos experimentais

2.3.1.1 *tert*-Butil-hidroperóxido (*t*-BHP)

O *t*-BHP é um peróxido orgânico (Figura 16) amplamente utilizado em processos de oxidação. O processo oxidativo induzido pelo *t*-BHP em eritrócitos pode ser descrito da seguinte forma: rápida oxidação da GSH (30-60 segundos) pela GSHPx; reação entre o *t*-BHP e a hemoglobina celular com formação de radicais livres, que são imediatamente consumidos em reações de peroxidação lipídica (DOMANSKI; LAPSHINA; ZAVODNIK, 2005).

Segundo Trotta, Sullivan e Stern (1983), como o *t*-BHP é uma molécula anfipática, facilmente se difunde pelas membranas do eritrócito. A redução enzimática do *t*-BHP é realizada pela GSH-Px, prevenindo tanto a oxidação da hemoglobina quanto a peroxidação lipídica; sendo que a reação resulta em oxidação do NADPH e estimulação da via das hexoses monofosfato, como demonstrado na equação abaixo:



O *t*-BHP pode, alternativamente, reagir com a hemoglobina, com formação de radicais livres e meta-Hb, como observado na equação abaixo:



A conversão da hemoglobina a meta-Hb é resultado da reação com o hidroperóxido, que se decompõe a radicais *t*-BO \cdot através de uma cisão homolítica. Os produtos da decomposição do *t*-BHP via grupo heme são gerados em regiões muito próximas da membrana, sendo, portanto, promotores da peroxidação lipídica. Os radicais *tert*-butoxila (*t*-BO \cdot) reagem com os lipídios de membrana e iniciam a peroxidação lipídica (LOOH).

Os efeitos do *t*-BHP nas proteínas de membrana dos eritrócitos foram estudados através de eletroforese em gel de poliacrilamida. O oxidante causou diminuição na intensidade das bandas das principais proteínas de membrana, com concomitante formação de um polipeptídeo de alto peso molecular, pelo fenômeno

de *cross-linking*; bem como um aumento da ligação da hemoglobina à membrana. A ação do *t*-BHP foi parcialmente prevenida pela via das hexoses monofosfato (TROTTA; SULLIVAN; STERN, 1983). Enzimas são inibidas pelas ERO formadas, sendo a Ca^{2+} ATPase da membrana dos eritrócitos uma das mais sensíveis (BLAINE-MOORE *et al.*, 1992).

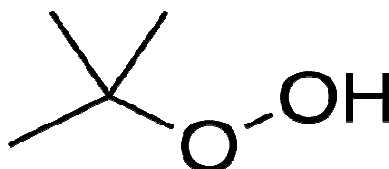


FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DO *t*-BHP

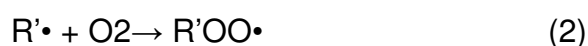
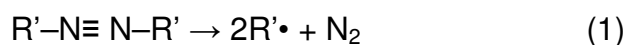
FONTE: SIGMA ALDRICH (2011). Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>

2.3.1.2 2,2- azobis (amidinopropano) dihidrocloro (AAPH)

O AAPH é um azo-composto hidrossolúvel (Figura 17) gerador de radicais livres que atacam a região aquosa da membrana. Os radicais livres gerados por decomposição térmica a 37°C são de uma única espécie e foram identificados como sendo radicais peroxila. A geração de radicais pelo AAPH é tempo e dose dependente, apresentando uma ação oxidante mais lenta em relação ao *t*-BHP. Uma vez gerados no meio extracelular, os radicais atacam a membrana eritrocitária, causando várias alterações oxidativas em lipídeos e proteínas presentes. Demonstrou-se que a hemólise causada pelo AAPH pode ser desencadeada principalmente por dois eventos: a lipoperoxidação e a redistribuição de proteína de banda 3 oxidada na membrana, devido a sua alteração conformacional. Esta redistribuição leva à formação de poros hemolíticos, e o formato característico de disco bicôncavo dos eritrócitos é alterado, em grande parte para o formato esferocítico (SIMÃO; SUZUKAWA, 2007).

Segundo Banerjee *et al.* (2008), quando o AAPH é adicionado como iniciador, decompõe-se à temperatura fisiológica em soluções aquosas, gerando radical alquila ($\text{R}\cdot$), que, em presença de oxigênio, converte-se ao radical peroxila correspondente ($\text{ROO}\cdot$), como representado abaixo:



Em água, a 37° C, a meia vida do AAPH é de cerca de 175 h, sendo que o mesmo gera radicais na taxa de $1,3 \times 10^{-6}$ [AAPH]/s. Esses radicais peroxila induzem a oxidação de lipídios poliinsaturados (LH) das membranas dos eritrócitos, causando uma reação em cadeia denominada peroxidação lipídica, como demonstram as equações abaixo:



Como resultado da peroxidação lipídica, a membrana do eritrócito se danifica e ocorre perda de sua integridade, levando à liberação da hemoglobina e de íons K^+ . Quando compostos antioxidantes estão presentes, podem sequestrar os radicais peroxila convertendo-os em espécies não reativas, e a hemólise pode ser inibida, como segue:



Segundo dados de Dai *et al.* (2006), a adição de AAPH induz rápida hemólise após um período de inibição, provavelmente devido à ação dos antioxidantes nativos presentes no eritrócito, já que em modelos micelares essa inibição não ocorre.

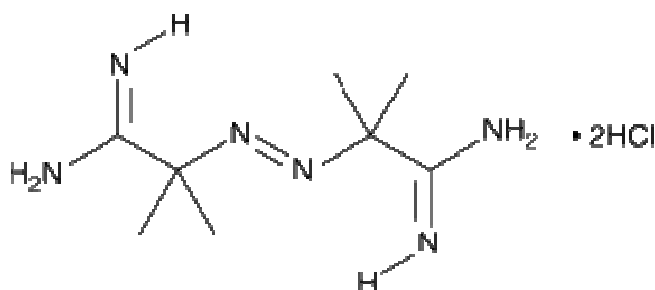


FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA DO AAPH

FONTE: SIGMA ALDRICH (2011). Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>

2.3.2 Agentes antioxidantes utilizados em modelos experimentais

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atrasa ou previne significativamente a oxidação desse substrato. Os antioxidantes podem atuar em diferentes processos da sequência oxidativa e podem possuir mais de um mecanismo de ação. A importância relativa dos antioxidantes que entram em cena quando se geram ERO *in vivo*, depende do tipo de ERO que se forma e, como, onde e que classe de dano se avalia. Para caracterizar a ação antioxidante de um composto, deve-se analisar como este exerce sua atividade, se atua diretamente, através do sequestro de ERO ou inibindo sua geração, ou se está atuando de forma indireta, por *up-regulation* das defesas antioxidantes endógenas. Para avaliar a ação direta dos antioxidantes, que é provavelmente a mais comum *in vivo*, é importante questionar-se sobre: (1) qual biomolécula o antioxidante está protegendo? A quantidade de antioxidante é suficiente para alcançar o substrato *in vivo*? (2) como o antioxidante exerce sua ação protetora? Por sequestro de ERO, prevenindo sua formação, ou reparando o dano que foi produzido? (3) se o mecanismo de ação do antioxidante é por sequestro de ERO, é possível que os radicais derivados da atividade do próprio antioxidante causem algum dano por eles mesmos? (4) pode o antioxidante causar danos em outros sistemas biológicos? (CASADEVALL, 2009).

Experimentos simples podem ajudar a responder algumas dessas perguntas e os resultados obtidos podem caracterizar a atividade do antioxidante estudado e, muitas vezes, permitem descartá-lo como composto de interesse, já que um composto com pouca atividade antioxidante *in vitro*, é improvável que seja muito melhor *in vivo* (CASADEVALL, 2009).

Entre os ensaios mais comumente realizados com eritrócitos encontram-se: (1) determinação da hemólise; (2) determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); (3) determinação da oxidação da hemoglobina a metahemoglobina; (4) determinação do conteúdo de GSH celular; (5) observação da morfologia do eritrócito, que pode apresentar rigidez e alteração da forma da membrana celular sob a ação do agente oxidante; (6) determinação do nível antioxidante dos eritrócitos, através da determinação da atividade enzimática da SOD, CAT, GSH-PX, GR, G6-PD, etc...; (7) análise das proteínas de membrana em eletroforese em gel desnaturizante (SDS-PAGE), que analisa se os antioxidantes

evitam a degradação das proteínas de membrana pelo agente oxidante; (8) medida do conteúdo de ATP nos eritrócitos, que quando expostos ao agente oxidante, tem seus conteúdos diminuídos, ocasionando deformações e alterações do citoesqueleto; (9) avaliação da fluidez da membrana, localizando os compostos estudados nas membranas e seus efeitos na dinâmica dos lipídios nas diferentes regiões da bicamada lipídica, através do uso de sondas fluorescentes em uma técnica denominada anisotropia de fluorescência; (10) fragilidade osmótica; (11) liberação de lactato desidrogenase e potássio; (12) determinação da carga superficial do eritrócito e (13) determinação de glicoproteínas e grupos carbonila de proteínas (CASADEVALL, 2009).

2.3.2.1 Agentes quelantes e substâncias antioxidantes endógenas utilizadas como terapia substitutiva

Chaves (2007) demonstrou as ações protetoras das vitaminas C e E no estresse oxidativo durante o armazenamento de eritrócitos portadores de Hb S. As atividades das enzimas G6-PD e GR foram parcialmente recuperadas em eritrócitos de portadores AS, mas não nos AA, pela ação das vitaminas. Nos estudos de estresse oxidativo provocados por *t*-BHP foram observadas as ações protetoras das vitaminas C e E na formação de corpos de Heinz, meta-Hb e hemólise em eritrócitos AS.

Santos (2008) estudou o efeito da desferoxamina (DFO) e da deferiprona (DFP) no metabolismo oxidativo dos eritrócitos de pacientes β -talassêmicos atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), Brasil, sob a ação pró-oxidativa de *t*-BHP. Concentrações de meta-Hb, GSH, índices de hemólise, bem como atividades das enzimas G6PD e GR foram determinadas. Os índices de oxidação analisados foram maiores nos eritrócitos de indivíduos β -talassêmicos do que nos normais. Tratamentos dos eritrócitos normais e β -talassêmicos com DFO e/ou DFP protegeram contra a oxidação de GSH promovida por *t*-BHP.

2.3.2.2 Sequestradores de radicais livres

2.3.2.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos formam um dos maiores e mais diversos grupos de metabólitos secundários das plantas, e podem ser divididos em dois grupos: flavonóides e não flavonóides, estando ambos presentes em frutas e vegetais. Os flavonóides são pigmentos naturais de baixo peso molecular com uma estrutura base C3-C6-C3. Dependendo da substituição e do nível de oxidação do anel C6, os flavonóides podem ser divididos em 14 classes, sendo os que se incluem na dieta divididos essencialmente em 6: flavonas; flavonóis; flavanonas; flavanóis; antocianidinas; isoflavonas. Geralmente os flavonóides encontram-se na natureza glicosilados, o que promove maior absorção gastrointestinal e maior biodisponibilidade destes compostos. No entanto, os glicosídeos apresentam uma menor atividade anti-radicalar que a aglicona correspondente, o que pode ser justificado, pelo menos em parte, por sua maior hidrofília, que dificulta o acesso do antioxidante à fase lipídica (MAGALHÃES, 2009).

Krukoski *et al.* (2009) estudaram o efeito dos flavonóides quercitina e rutina, da vitamina C e do quelante desferoxamina (DFO) sobre eritrócitos normais expostos ao estresse oxidativo do *t*-BHP. A quercitina preveniu parcialmente o consumo de GSH, mas não evitou a formação de meta-Hb. A rutina, por sua vez, preveniu tanto a oxidação da GSH quanto a formação de meta-Hb. A vitamina C não teve influência sobre a depleção de GSH ou sobre a atividade de G6-PD, mas inibiu parcialmente a formação de meta-Hb e protegeu a atividade da GR. A DFO inibiu parcialmente a oxidação da GSH e da Hb, mas não protegeu a atividade das enzimas GR e G6-PD. Os resultados obtidos sugerem que a vitamina C, DFO e os flavonóides quercitina e rutina contribuem para a diminuição do estresse oxidativo causado pelo *t*-BHP.

Segundo Dai *et al.* (2006), o grupo flavonol 3-OH dos flavonóis é altamente efetivo em estabilizar intermediários das reações radiculares em sua forma desprotonada, permitindo a formação de compostos *p*-quinonóides, como ilustrado na figura 18.

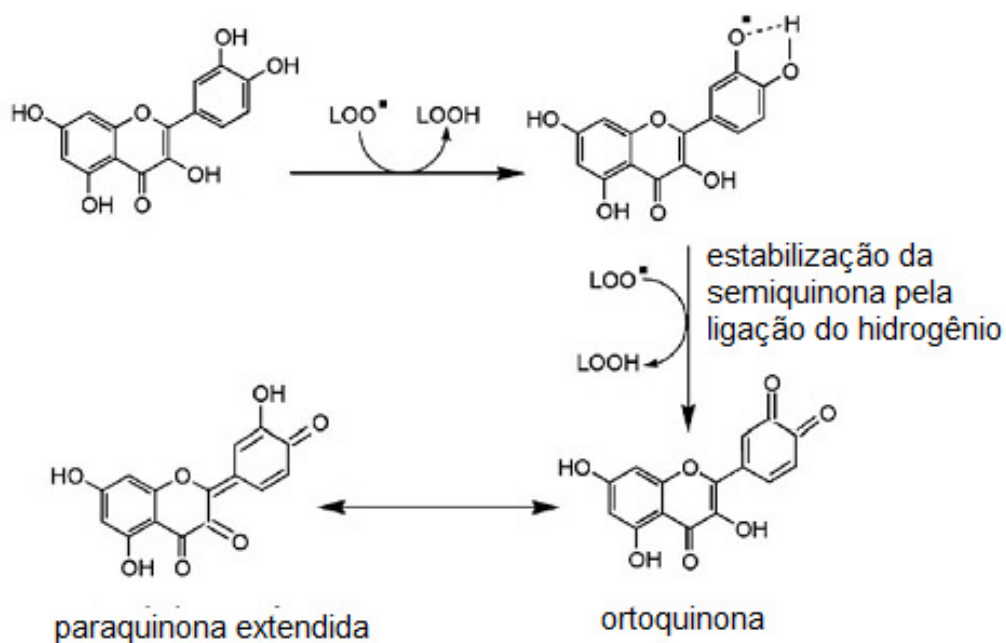


FIGURA 18 - MECANISMO DE REAÇÃO DO FLAVONÓIDE QUERCITINA COM RADICAIS PEROXILA
FONTE: DAI *et al.* (2006)

Dessa forma, a propriedade antioxidante das plantas ricas em flavonóides tem atraído a atenção como suplementos alimentares, pois ao prevenirem o processo oxidativo podem retardar o envelhecimento das células.

2.3.2.3 *Ginkgo biloba*



FIGURA 19 - FOLHAS DE *Ginkgo biloba*

FONTE: *Ginkgo biloba* (2011). Disponível em:
<http://www.latinstock.com.br>

Ginkgo biloba é membro da família Ginkgoaceae. Nativa do sudeste da China é uma árvore ornamental popular em muitas partes do mundo. O extrato das suas folhas vem sendo utilizado na medicina chinesa por milhares de anos no tratamento de inúmeras condições patológicas, incluindo doenças neurológicas, doenças inflamatórias e disfunções do coração e dos pulmões. Hoje em dia, extratos padronizados de composições bem definidas foram desenvolvidos e são mundialmente consumidos como medicamentos fitoterápicos e suplementos alimentares (He *et al.*, 2008).

O Instituto de Drogas e Produtos Medicinais da Alemanha recomenda para uso terapêutico apenas os extratos obtidos a partir de uma mistura de água e acetona, e, na sequência, purificados sem adição de outras substâncias. O extrato deve apresentar concentrações mínimas dos compostos terapeuticamente ativos e eliminar componentes indesejáveis que ofereçam riscos toxicológicos (BARATTO; RODIGHERO; SANTOS; 2010).

Os principais grupos de substâncias do extrato de *Ginkgo biloba* são os flavonóides, os terpenóides e as protoantocianidinas. O EGb 761 é uma mistura complexa padronizada com teor de 24% de glicosídeos flavonóides e 6% de lactonas terpênicas. A fração flavonóide é composta principalmente pela quercetina,

kaempferol, isoramnetina e seus glicosídeos. A fração terpenóide inclui os ginkgolídeos A, B, C e J, assim como a bilobalida (He *et al.*, 2008), As estruturas químicas dos compostos podem ser observadas nas Figuras 20 a 22.

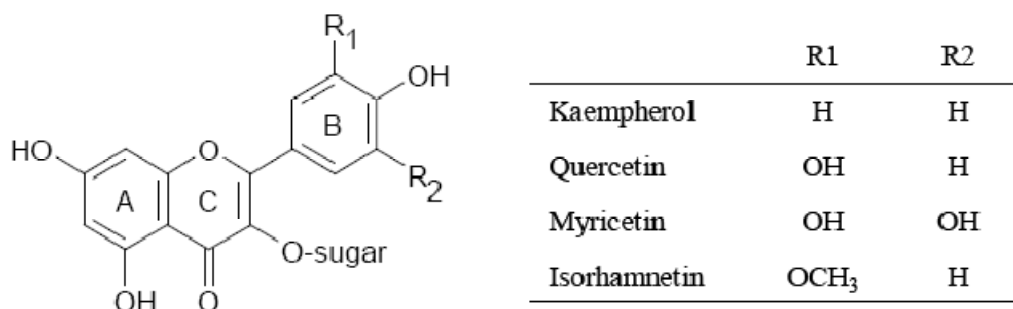


FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS FLAVONÓIDES DO EGB 761
FONTE: KOLTERMANN (2007)

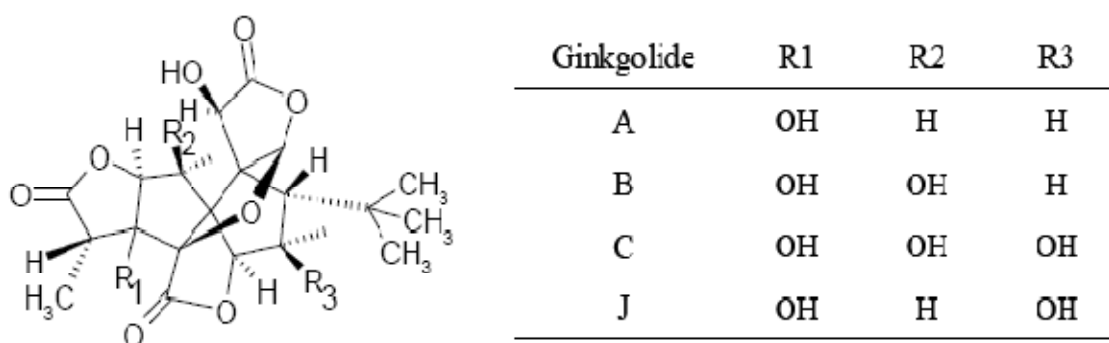


FIGURA 21 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS GINKGOLÍDEOS DO EGB 761
FONTE: KOLTERMANN (2007)

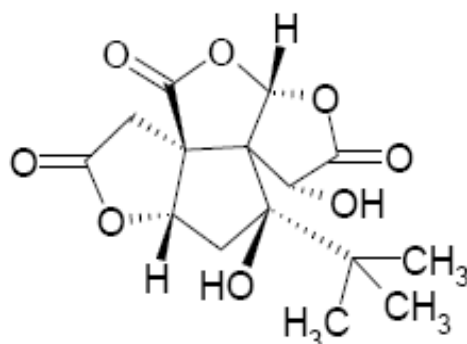


FIGURA 22 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BILOBALIDA
FONTE: KOLTERMANN (2007)

O extrato de *Ginkgo biloba* (EGb 761) tem apresentado ação protetora ao dano oxidativo de membranas de eritrócitos na doença de Behcet (Kose *et al.*, 1997), capacidade antioxidante em eritrócitos com deficiência de G6-PD (Sarikcioglu *et al.*, 2004), e efeito protetor em eritrócitos normais expostos a estresse exógeno (He *et al.*, 2008). Entretanto, sua capacidade protetora ainda não foi estudada em eritrócitos de portadores de anemia falciforme.

O EGb 761 possui atividade sequestradora de radicais livres *in vitro* demonstrado por vários autores. Em uma revisão bibliográfica Droy-Lefaix e Packer (1999) relatam atividades sobre: (1) o ânion superóxido, quando gerado por radiação γ ou por fenazina metosufato-NADH; (2) o radical hidroxila, quando gerado por radiação γ ou ácido di-hidroxi-benzóico; (3) radicais peroxila, através da inibição da peroxidação lipídica induzida por radiação UV; (4) óxido nítrico, através da diminuição dos níveis do RNA de iNOS e diminuição da atividade da enzima NOS, consequentemente diminuindo os níveis de NO.

O efeito antioxidante da fração flavonóide pode ser devido à atuação direta sobre as espécies reativas de oxigênio, mas também através da ação quelante sobre os metais de transição, da expressão de moléculas protéicas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), ou através do aumento dos metabólitos antioxidantes, como a glutatona. A fração flavonóide do extrato parece ser mais efetiva contra os radicais hidroxila do que a fração terpênica. A estrutura química dos flavonóides em geral é composta de um anel aromático e uma ligação dupla. Desse modo, os flavonóides reagem sequestrando preferencialmente os radicais hidroxila. Adicionalmente, a hidroxila fenólica dos flavonóides pode ser capaz de quelar metais de transição pró-oxidantes, consequentemente inibindo a formação de novos radicais hidroxila (SMITH; LUO, 2004).

Lugasi, Horvahovich e Dworschak (1999) demonstraram que o extrato alcoólico de folhas de *Ginkgo biloba* possui forte poder redutor. No extrato preparado, o conteúdo polifenólico foi de 60 mg/100 ml, e apresentou capacidade doadora de hidrogênios dose-dependente, sendo que uma pequena quantidade do extrato foi suficiente para inibir a formação de 50% do radical DPPH. Além disso, o extrato de *Ginkgo biloba* apresentou capacidade quelante ao ligar-se ao cobre, íon catalisador da decomposição de hidroperóxidos lipídicos. Comprovou-se, nas condições experimentais, que o extrato de *Ginkgo biloba* foi um ótimo sequestrador

de radicais livres derivados do peróxido de hidrogênio e que previne a auto-oxidação do ácido linoléico.

A ação do EGb 761 como um antioxidante foi estudada usando vários modelos de estresse oxidativo *in vitro*. Segundo estudos de Rong, Geng e Lau (1996a), a pré-incubação de células vasculares endoteliais com EGb 761 inibe a formação de produtos de peroxidação induzidos por *t*-BHP. O EGb 761 protege as biomembranas da injúria oxidativa, fato demonstrado através da diminuição da liberação da enzima LDH do interior das células; e diminui a perda de viabilidade celular induzido pela injúria oxidativa, comprovado pela técnica do tetrazólio de metiltiazol (MTT).

No mesmo ano, Rong, Geng e Lau (1996b) demonstraram que o efeito antioxidante do EGb 761 está relacionado com a modulação do ciclo redox da glutationa, através do aumento da atividade da enzima GSSG redutase e da biossíntese de GSH. Quando atacadas pelo oxidante *t*-BHP, as células tratadas com EGb foram capazes de resistir à oxidação, devido ao aumento de GSH intracelular. A diminuição da lipoperoxidação e menor liberação de LDH intracelular nessas células também comprova que o EGb exerce uma ação direta sobre o radical peróxido.

Kose *et al.* (1997) demonstraram o potencial antioxidante do EGb 761 na lipoperoxidação, observada pela dosagem de malondialdeído, induzida por peróxido de hidrogênio em eritrócitos de pacientes com a doença de Behcet. O potencial antioxidante do extrato foi proporcional a dose e tempo de incubação.

Com a finalidade de reduzir a suscetibilidade hemolítica dos eritrócitos de pacientes com deficiência de G6-PD, o EGb 761 (250 µg/ml) e a Vitamina E (250 µg/ml) foram utilizados como agentes antioxidantes, e a inibição da formação de TBARS foi comparada. Sem condições de estresse oxidativo, tanto o extrato quanto a vitamina E não mostraram ação contra o dano oxidativo aos eritrócitos. Entretanto, a pré-administração ou a administração concomitante dos antioxidantes com uma fonte de estresse oxidativo, reduziu significativamente a peroxidação lipídica. Conclui-se que o uso da vitamina E ou do EGb 761, benéfica em pacientes expostos a estresse oxidativo exacerbado, deve ser avaliado em indivíduos normais (SARIKCIOGLU; ONER, TERCAN, 2004).

He *et al.* (2008) estudaram as propriedades do EGb em eritrócitos em suspensão com hematócrito 3%, na presença e na ausência de fatores de estresse como presença de peptídeo amilóide ou peróxido, ou mesmo estresse hipotônico. Os resultados sugerem que o EGb possui um efeito duplo, tanto protetor quanto oxidante, dependente da presença de um estresse exógeno, confirmando os dados de Sarikcioglu, Oner e Tercan (2004). O EGb mostrou um efeito protetor aos eritrócitos contra a hemólise induzida pela pressão hipotônica e pelo peptídeo amilóide, demonstrando também proteção contra a lipoperoxidação induzida por peróxidos, assim como ao consumo de GSH e formação de metahemoglobina. Por outro lado, o EGb possui um efeito pró-oxidante em eritrócitos quando aplicado em altas doses (>25 µg/ml), principalmente na ausência de estresse exógeno, aumentando a fragilidade osmótica, mudando a morfologia dos eritrócitos e induzindo o consumo de GSH e a formação de metahemoglobina.

O efeito da suplementação de EGb na inibição da peroxidação lipídica de membranas microssomais *in vivo* foi estudado por Boveris, Galleano e Puntarolo (2007). Os dados apresentados mostram que o EGb possui a capacidade de limitar a peroxidação lipídica e captar radicais livres e, conseqüentemente, proteger ativamente as membranas de danos oxidativos, como demonstrado através da dosagem dos níveis de TBARS. As atividades das enzimas microssomais, a taxa de geração do anion superóxido e a taxa de redução do ferro não foram afetadas no referido estudo.

Bridi, Steffen e Henriques (2001) demonstraram *in vivo* que as enzimas CAT e SOD tiveram aumento significativo da atividade nos animais tratados com EGb 761, com conseqüente diminuição da lipoperoxidação do hipocampo.

Sener *et al.* (2006) investigaram o possível efeito protetor do EGb como agente antioxidante contra a toxicidade do mercúrio em ratos. Os resultados comprovaram o efeito protetor do extrato contra danos oxidativos em tecidos do cérebro, pulmões, fígado e rins, através do monitoramento dos níveis de GSH, atividades da mieloperoxidase, níveis de malondialdeído e de colágeno.

3 OBJETIVOS

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação do EGb 761 sobre o metabolismo oxidativo em eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme, *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o estado oxidativo dos eritrócitos em indivíduos normais e portadores da anemia falciforme, *in vitro*.
- Avaliar o estresse oxidativo dos eritrócitos em indivíduos normais e portadores de anemia falciforme após exposição aos agentes oxidantes *t-BHP* e *AAPH*, *in vitro*.
- Avaliar a proteção antioxidante do EGb 761 em eritrócitos de indivíduos normais e portadores de anemia falciforme, *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As amostras de sangue utilizadas neste trabalho foram coletadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (CEP-SD), sob protocolo CEP/SD 778.113.09.08 e CAAE 0048.0.091.000-09 (ANEXO 2), pelos indivíduos sujeitos da pesquisa ou por seus responsáveis legais.

Para o grupo controle (Grupo AA) coletou-se 20 ml de sangue venoso em EDTA K₃ de 20 voluntários saudáveis, 13 do sexo feminino e 7 do sexo masculino, com idades entre 20 e 50 anos, entre alunos, professores e servidores técnicos administrativos da UFPR. Realizou-se análise de histórico familiar e investigou-se a presença de algum sinal/sintoma de doença hematológica, realizando-se ainda hemograma em analisador Coulter T-890 e teste de solubilidade de hemoglobinas (Método de Naoum, 1999). Foram excluídos do grupo os indivíduos portadores de hemoglobinopatias ou outras doenças hematológicas e os que estavam fazendo uso de algum medicamento oxidante.

Vinte e um pacientes portadores de anemia falciforme, sendo 10 do sexo masculino e 11 do sexo feminino, com idades entre 9 e 51 anos, com predomínio da raça parda e negra, atendidos rotineiramente no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) constituíram o grupo SS. Deste grupo, 17 pacientes recebiam como medicação rotineira a hidroxiuréia, 19 faziam uso de ácido fólico e 6 recebiam deferoxamina, deferiprona ou deferasirox como quelantes de ferro (Anexo 3). As amostras de sangue utilizadas para os experimentos foram as mesmas empregadas para realização dos exames de rotina pré-transfusionais, coletadas em EDTA K₃ e normalmente descartadas após as análises realizadas no Setor de Hematologia do HEMEPAR. Como critério de inclusão, esses pacientes não poderiam ter recebido transfusão de unidades eritrocitárias nos últimos 30 dias. Dos pacientes analisados, 13 não haviam recebido transfusões nos 12 meses anteriores; 3 receberam apenas uma; e 5, duas ou mais.

O extrato seco padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761) foi gentilmente cedido pelo *Herbarium* – Laboratório Botânico, com procedência da Southern Anhui Dapeng Natural Source. O controle de qualidade do extrato foi realizado pela divisão analítica da *Herbarium*, tendo-se constatado que o teor de glicosídeos flavônicos era de 24,7% e o de terpenolactonas, de 7,5%, sendo a cromatografia em camada delgada positiva para rutina e ácido clorogênico; e o teor de ácido ginkgólico, inferior a 5 ppm. O grau de umidade foi de 3,4% e não se observou contaminação microbiológica (certificado de análise 0709/10 de 09 de setembro de 2010 realizado pelo farmacêutico Laerte Dall' Agnol – ANEXO 4).

Os agentes oxidantes empregados foram: AAPH (Sigma Aldrich) e *t*-BHP (Acros Organics).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Fluxograma

Na Figura 23 está representada a sequência de experimentos realizados para desenvolvimento do trabalho:

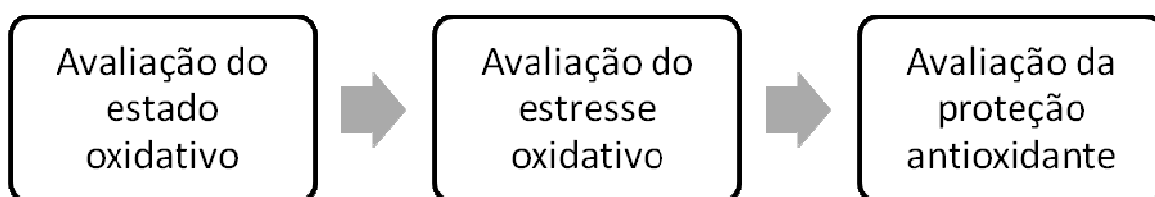


FIGURA 23 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES PARA AVALIAÇÃO DO METABOLISMO OXIDATIVO DOS ERITRÓCITOS

4.2.2 Isolamento dos Eritrócitos

Centrifugou-se as amostras de sangue venoso coletado em EDTA K₃ a 4 °C em 1000 x g por 10 min, retirando-se o plasma e a camada de leucócitos e, em seguida, lavou-se os eritrócitos três vezes, por centrifugação, com solução gelada de NaCl 154 mmoles/l. Ressuspendeu-se os eritrócitos em solução de tampão fosfato salina (PBS) 10 mmoles/l pH 7,4 para valores de volume globular próximos a 40% (para a técnica de determinação de GSH) e a 10% (demais determinações). A confirmação dos valores de volume globular e concentração de hemoglobina foram realizadas em analisador hematológico Coulter T-890.

As suspensões de eritrócitos, preparadas diariamente, foram separadas em alíquotas de 250 µl, as quais foram então centrifugadas por 5 min a 1200 x g, retirando-se o volume de sobrenadante correspondente ao volume de solução reagente a ser adicionado, não se alterando assim o volume globular final.

4.2.3 Tratamento de amostras com EGb 761

Preparou-se uma solução estoque de EGb 761 20 mg/ml em solução hidroglicólica 50% (polipropilenoglicol PA:PBS 10 mmoles/l pH 7,4). O veículo mostrou-se inerte nessa concentração. As suspensões de eritrócitos com volume globular de 10 ou 40%, adicionou-se soluções diluídas de EGb 761 em PBS, de forma a se obter concentrações finais de 0, 5, 10, 25, 50, 100 e 250 µg/ml, de acordo com He *et al.*, 2008, tomando-se o cuidado de retirar do sobrenadante das suspensões de eritrócitos o mesmo volume a ser adicionado. As amostras foram então incubadas por 30 min a 37°C.

4.2.4 Tratamento das amostras com substância oxidante *t*-BHP

O *t*-BHP foi dissolvido em tampão fosfato 67 mmoles/l, pH 7,6, com glicose 200 mg/dl, e adicionado a alíquotas de 250 µl de suspensão de eritrócitos para concentrações finais de 1 a 10 mmoles/l. A incubação variou de 15 a 30 minutos, à temperatura ambiente, sob homogeneização.

4.2.5 Tratamento das amostras com substância oxidante AAPH

O AAPH foi dissolvido em PBS 10 mmoles/l pH 7,4 e adicionado a alíquotas de 200 µl de suspensão de eritrócitos para concentrações finais de 40 mmoles/l. A incubação foi feita por 3 h a 37°C, sob homogeneização.

4.2.6 Determinações Laboratoriais

4.2.6.1 Determinação da concentração de glutathiona reduzida

4.2.6.1.1 Princípio do Método

O método baseia-se no desenvolvimento de cor amarela ao se adicionar ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), conhecido como reagente de Ellman, a compostos de sulfidril. DTNB e GSH reagem formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e GSSG (Figura 24).

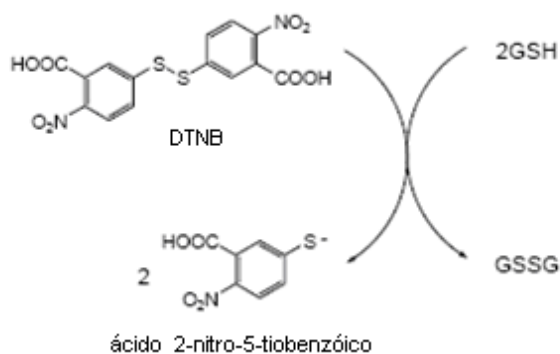


FIGURA 24 – REAÇÃO ENTRE O DTNB e a GSH

FONTE: DOJINDO (2009)

Disponível em <<http://www.dojindo.com>>

4.2.6.1.2 Técnica

A concentração da glutathiona reduzida foi determinada pelo método de Beutler (1984), modificado. Suspensões de eritrócitos a 40% foram separadas em alíquotas de 250 µl em microtubos *Eppendorf*, adicionando-se *t*-BHP para concentração final de 10 mmoles/l e incubando-se à temperatura ambiente por 15 min, sob homogeneização. Para testar a proteção da hemólise pelo EGb 761, as amostras foram previamente incubadas com 50 µl de concentrações crescentes do extrato (0, 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/ml), em triplicata. Analisaram-se amostras sem tratamento como controle.

Adicionou-se 50 µl de suspensão de eritrócitos a 40%, com determinações prévias de hemoglobina, a 500 µl de água deionizada, deixando-se à temperatura ambiente por 5 min para completar a hemólise.

Adicionou-se 750 µl de solução precipitante (ácido metafosfórico 1,67 g; EDTA dissódico 0,2 g, NaCl 30 g; água q.s.p. 100 ml), homogeneizando-se e deixando em repouso por 5 min. Substituindo a filtração em papel quantitativo da técnica original, após homogeneização as amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 5 min. Adicionou-se 500 µl do sobrenadante límpido a 2,0 ml de solução recente de Na₂HPO₄ 300 mmoles/l. Leu-se a absorbância a 412 nm, adicionou-se 250 µl do reagente DTNB (DTNB 200 mg/l em tampão de citrato dissódico 10 g/l pH 8,0) e agitou-se por inversão. A cor desenvolve-se rapidamente e permanece estável por 10 min. Procedeu-se a nova leitura a 412 nm. O branco foi preparado com salina ou plasma ao invés de sangue total.

4.2.6.1.3 Cálculo da Concentração de GSH

Para calibração do equipamento, preparou-se uma curva padrão de absorbância versus concentração de GSH (mmoles/l), com diluições a partir de uma solução mãe 1,62 mmoles/l de GSH.

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

4.2.6.2 Determinação da Concentração de Metahemoglobina

4.2.6.2.1 Princípio do Método

O método, proposto por Naoum *et al.* (2004), fundamenta-se nas absorbâncias específicas das moléculas de oxi-Hb e meta-Hb naturalmente presentes nos eritrócitos, estabilizadas em solução tamponada de baixa molaridade e com pH 6,8, similar ao ponto isoelétrico da Hb.

4.2.6.2.2 Técnica

Suspensões de eritrócitos a 10% foram separadas em alíquotas de 250 µl em microtubos *Eppendorf*, adicionando-se *t*-BHP para concentração final de 1 mmol/l; incubadas sob homogeneização a temperatura ambiente por 15 min. Para testar a proteção da oxidação da hemoglobina pelo EGb 761, as amostras foram previamente incubadas, em triplicata, com 50 µl de concentrações crescentes do extrato (0, 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/ml). Analisou-se amostras sem tratamento como controle.

Após incubação, preparou-se o hemolisado. Em um tubo identificado como A, adicionou-se 100 µl de suspensão de eritrócitos a 10% a 100 µl de saponina 1%. Agitou-se a mistura para provocar hemólise. A seguir, adicionou-se 1 ml de tampão fosfato 60 moles/l, pH 6,8. Homogeneizou-se a solução por inversão. Em um tubo B, adicionou-se 100 µl da solução do tubo A a 1 ml do tampão fosfato. Homogeneizou-se por inversão e realizou-se a leitura da absorbância do tubo A a 630 nm e do tubo B, a 540 nm, utilizando o tampão fosfato como branco (espectrofotômetro CINTRA 10).

4.2.6.2.3 Cálculo

$$\% \text{ de MetaHb} = \frac{[\text{A}] \text{ Tubo A} \times 100}{[\text{A}] \text{ Tubo A} + ([\text{A}] \text{ Tubo B} \times 10)}$$

Onde,

[A] – Medida da absorbância

Obs.: O coeficiente 10 se deve à diluição realizada no tubo B (300 µl do tubo A: 3 ml do tampão fosfato), para obter sensibilidade técnica na leitura espectrofotométrica da oxi-Hb em 540 nm.

Os valores de referência para adultos normais para essa técnica são de 1,92 a 3,88 % de meta-Hb.

4.2.6.3 Detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

4.2.6.3.1 Princípio do método

A detecção de ERO intracelulares foi realizada através do uso de uma sonda lipossolúvel, 2,7 – diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), que se difunde para dentro das células, e no citosol é deacetilada por esterases, formando 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), a qual se torna disponível para agir como substrato aos radicais livres formados no meio intracelular (Figura 25). Após oxidação pelos radicais livres (DCF), a sonda emite fluorescência, que é medida em fluorímetro. A técnica apresenta alta sensibilidade de detecção de ERO e a sonda utilizada apresenta especificidade aumentada ao H₂O₂. O método descrito abaixo é adaptado de López-Revuelta *et al.*, 2006.

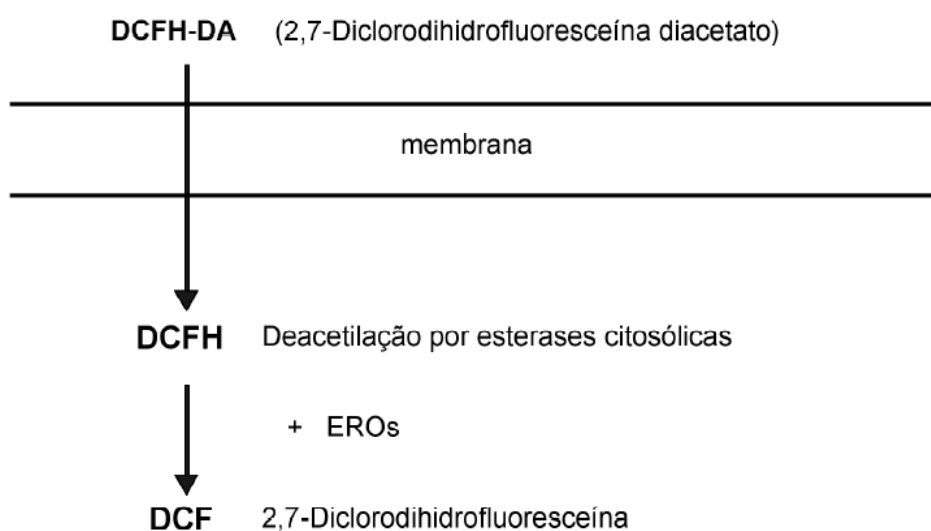


FIGURA 25 - PRINCÍPIO DO MECANISMO DE FUNCIONAMENTO DA Sonda DCFH-DA
FONTE: SILVEIRA (2004)

4.2.6.3.2 Técnica

A suspensão de eritrócitos a 10% foi incubada com 5 µl de sonda DCFH-DA 10 µmoles/l por 30 min a 37 °C, sob agitação, na ausência de luz. Após incubação com a sonda, a suspensão de eritrócitos foi diluída 1:10 em PBS 10 mmoles/l pH 7,4 e incubada com concentrações crescentes de EGB 761 em placas de 96 poços por 30 min a 37 °C. Analisou-se amostras sem tratamento como controle. As determinações foram realizadas em quadruplicata. O agente oxidante *t*-BHP foi adicionado na concentração de 75 µmoles/l e, após 15 min, a placa foi submetida à leitura em 488 nm (excitação) e 528 nm (emissão) em fluorímetro Synergy HT (Biotek) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia da UFPR.

4.2.6.3.3 Cálculo

A produção de ERO (%) foi obtida através da comparação entre as Unidades de Fluorescência do DCF/mg de hemoglobina de cada amostra, em relação a amostra exposta ao *t*-BHP na ausência de antioxidante, considerado como 100% de produção de ERO, e assinalado como controle.

4.2.6.4 Determinação da peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

4.2.6.4.1 Princípio do Método

O princípio deste ensaio está na reação dos produtos de peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico, formando um produto colorido rosa, que pode ser monitorado espectrofotometricamente de 532 a 535 nm. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malondialdeído (MDA), com 3 átomos de carbono. Neste ensaio, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA, em pH 1-2 e a 100°C, formando uma base de Schiff (Figura 26).

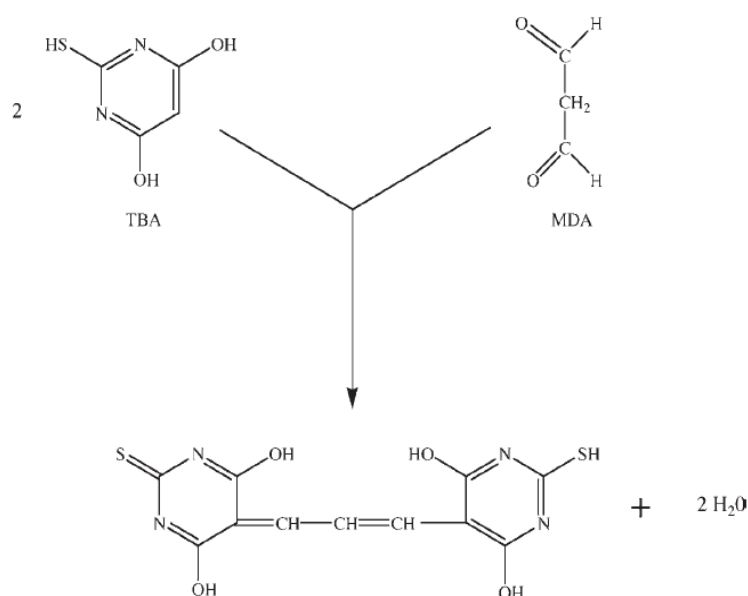


FIGURA 26 – REAÇÃO QUÍMICA ENTRE ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA) E O MALONDIALDEÍDO (MDA).

FONTE: WILLIANSON; HENSLEY; FLOYD (2003)

4.2.6.4.2 Técnica

Empregou-se a técnica de Stocks e Dormandi (1971). A 600 µl de suspensão de eritrócitos 10%, adicionou-se soluções com concentrações crescentes de EGb 761, em triplicata, incubando-se por 30 min a 37 °C, e acrescentou-se *t*-BHP

para concentração final de 2 mmoles/l, mantendo-se por 15 min à temperatura ambiente, sob homogeneização. A reação oxidativa foi paralisada pela adição 250 µl de ácido tricloroacético 25%. Após homogeneização, centrifugou-se por 1 min. A 600 µl do sobrenadante, adicionou-se a mesma quantidade de ácido tiobarbitúrico 10 g/l em NaOH 0,05 moles/l. Esta solução foi aquecida a 100 °C por 15 min, verificando-se a formação do produto colorido. A proteção do EGb 761 contra a peroxidação lipídica foi observada em determinação da absorbância a 532 nm, após resfriamento das amostras, descontando-se a absorbância da amostra a 600 nm, para eliminar interferentes. Analisaram-se ainda amostras sem tratamento, como controle.

4.2.6.4.3 Cálculo

$$\text{TBARS} = \frac{[A]_{532} - [A]_{600}}{156 \times [\text{Hb}] \times 1000}$$

Onde,

[A] – Medida da absorbância; [Hb] – concentração de hemoglobina

Obs: Para o cálculo, foram levados em conta a concentração da hemoglobina da suspensão de eritrócitos (g/dl) e o coeficiente de extinção molar de 156/(mmoles x cm), sendo os resultados expressos em nmoles de TBARS/g de hemoglobina.

4.2.6.5 Determinação das porcentagens de hemólise

4.2.6.5.1 Princípio do método

A suscetibilidade aumentada ao estresse oxidativo ocasionado por fatores externos ou pela auto-oxidação da hemoglobina leva a uma série de eventos que culminam no aumento da concentração da hemoglobina extracelular no sobrenadante das suspensões dos eritrócitos. O método descrito abaixo é adaptado de Banerjee *et al.*, 2008.

4.2.6.5.2 Técnica

Suspensões de eritrócitos a 10% foram separadas em alíquotas de 200 µl em microtubos *Eppendorf*, adicionando-se 200 µl de AAPH para concentração final de 40 mmol/l e submetidos à incubação a 37 °C por 3 h. Para testar a proteção da hemólise pelo EGb 761, as amostras foram previamente incubadas com 100 µl de concentrações crescentes do extrato (0, 5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/ml), em triplicata. Analisaram-se amostras sem tratamento como controle.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 1200 x g por 5 min, e a extensão da hemólise foi determinada espectrofotometricamente através da medida da absorbância do sobrenadante a 540 nm, em leitor de placas de Elisa Thermoplate. Como referência, os eritrócitos foram tratados com água destilada e a absorbância do hemolisado foi considerada como 100%.

4.2.6.5.3 Cálculo

A hemólise (%) foi obtida através da comparação entre as absorbâncias de cada tubo, em relação à absorbância da amostra exposta ao *t*-BHP na ausência de antioxidante, considerado como 100% de hemólise, e assinalado como controle.

4.2.7 Cálculo da Concentração Inibitória 50% (IC₅₀)

A concentração inibitória 50% é a concentração de inibidor necessária para reduzir a resposta pela metade. Foi calculada através da construção de uma curva dose-resposta da ação do *Ginkgo biloba*, em planilhas de Excel 2007, para as técnicas que apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

4.2.8 Análise estatística dos resultados obtidos

Os dados resultantes dos experimentos foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA inteiramente casualizada e fatorial), seguida do teste de Tukey para comparação de pares de médias, teste t para amostras pareadas e análise de correlação. A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Concentração de GSH

5.1.1 Concentração de GSH de suspensão de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme

Determinou-se a concentração basal de GSH de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS), conforme ilustrado na Figura 27.

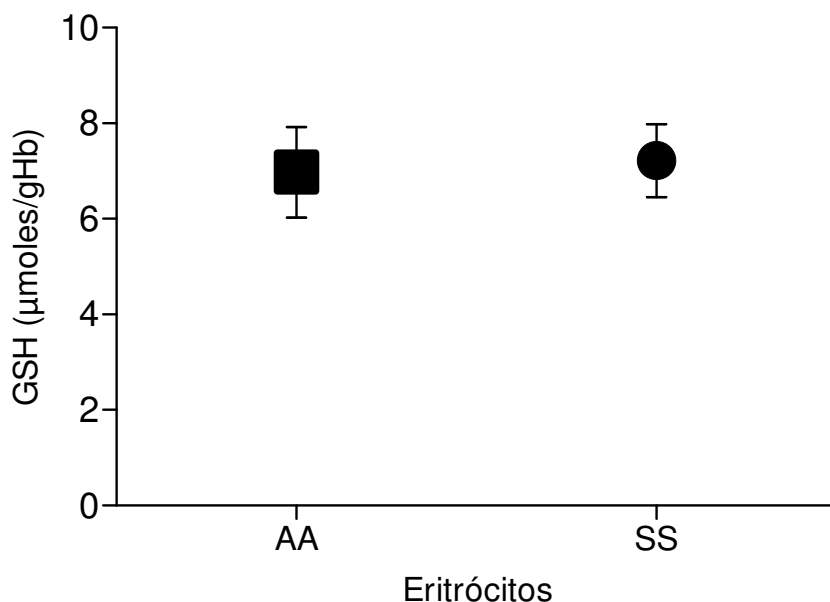


FIGURA 27 - CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS)

Nota: Concentração de GSH em eritrócitos de suspensões de eritrócitos (hematócrito 40%) de 30 indivíduos normais e de 9 pacientes com anemia falciforme, analisando-se em triplicata, (n=90 e n=27, respectivamente) pelo método de Beutler (1984) modificado. Obteve-se valores médios de $6,98 \pm 0,95$ e de $7,22 \pm 0,76$ μmoles/g Hb, respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p > 0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.1.2 Concentração de GSH de suspensão de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme expostos ao *t*-BHP

Determinou-se a concentração de GSH de suspensões de eritrócitos indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS) após exposição ao *t*-BHP, conforme demonstrado na Figura 28.

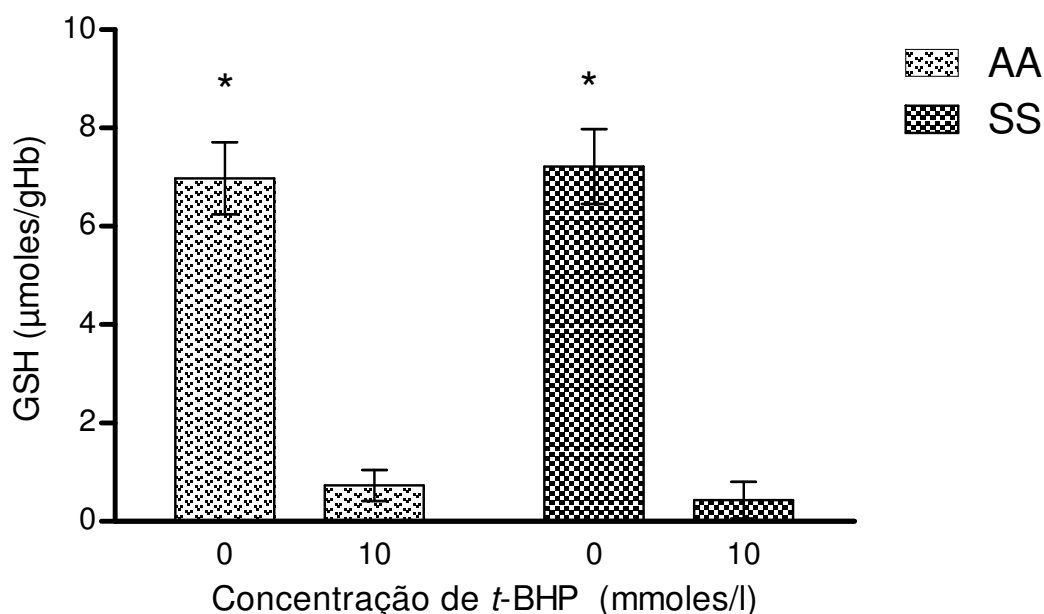


FIGURA 28 - CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) EXPOSTOS AO *t*-BHP.

Nota: Dosagem de GSH em suspensão de eritrócitos (hematócrito 40%) de 5 indivíduos normais e de 5 pacientes com anemia falciforme, analisados em triplicata (n=15) após exposição ao *t*-BHP 10 mmoles/l por 15 min, pelo método de Beutler (1984), modificado.

* Diferença estatisticamente significativa entre os controles do tratamento e os basais (ANOVA, $p < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre os dois grupos após tratamento.

5.1.3 Concentração de GSH de suspensão de eritrócitos incubados com concentrações crescentes de EGb 761 frente a exposição ao *t*-BHP

Determinou-se a concentração de GSH de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais após exposição ao *t*-BHP, previamente incubados com concentrações crescentes de EGb 761 (Figura 29).

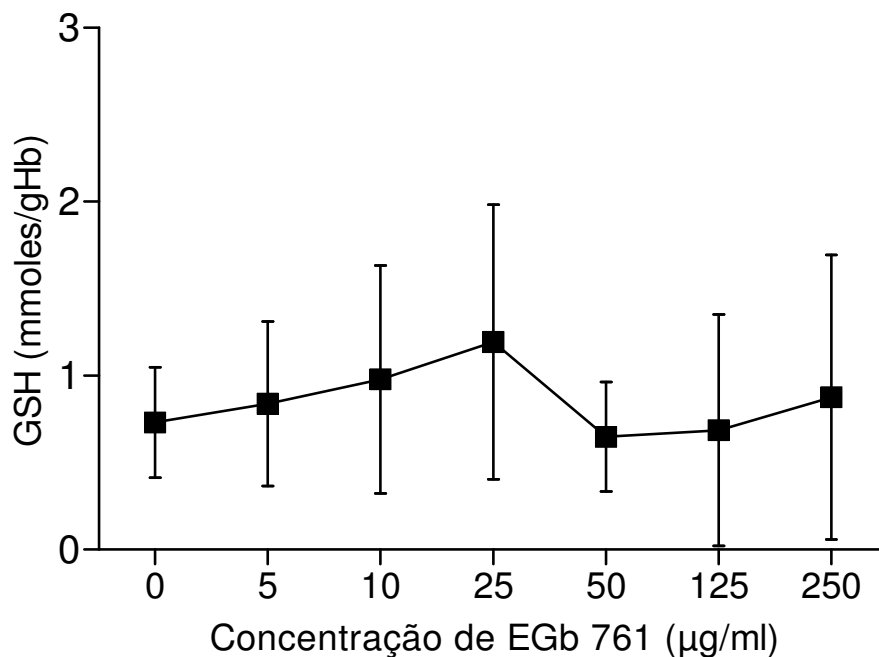


FIGURA 29 - CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS EXPOSTOS AO *t*-BHP, APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761

Nota: Dosagem de GSH em suspensão de eritrócitos (hematócrito 40%) de 5 indivíduos normais, analisados em triplicata (n=15) após exposição ao *t*-BHP 10 mmoles/l por 15 min, e prévia incubação a 37°C com concentrações crescentes de EGb 761 por 30 min, pelo método de Beutler (1984), modificado.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com EGb 761 (ANOVA, $p > 0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.1.4 Concentração de GSH de suspensão de eritrócitos de pacientes com anemia falciforme incubados com concentrações crescentes de EGb 761 frente a exposição ao *t*-BHP

Determinou-se a concentração de GSH de suspensões de eritrócitos de pacientes com anemia falciforme após exposição ao *t*-BHP, previamente incubados com concentrações crescentes de EGb 761 (Figura 30).

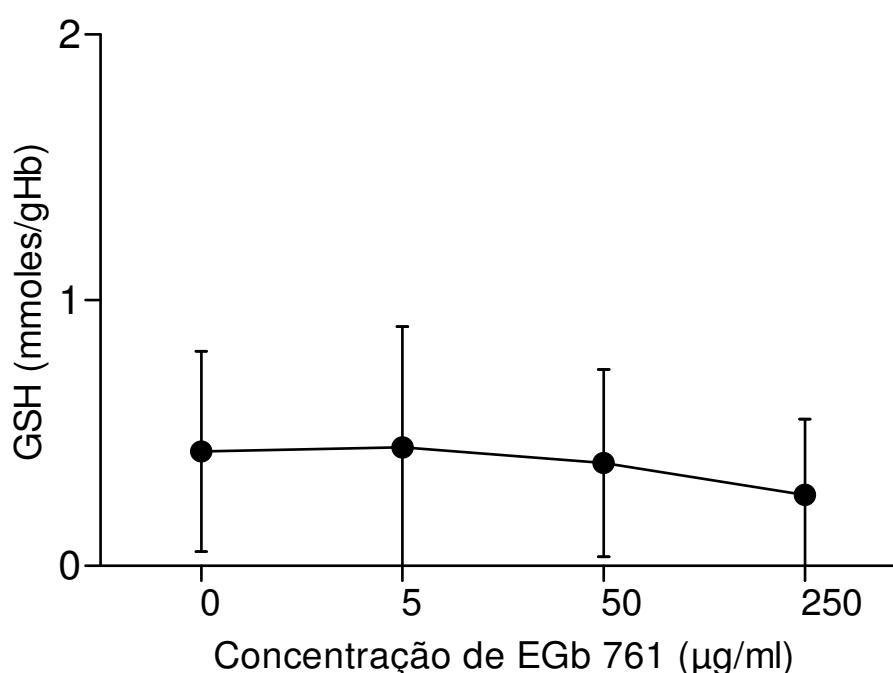


FIGURA 30 - CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EXPOSTOS AO *t*-BHP, APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761

Nota: Dosagem de GSH em suspensão de eritrócitos (hematócrito 40%) de 5 pacientes com anemia falciforme, analisados em triplicata (n=15) após exposição ao *t*-BHP 10 mmoles/l por 15 min, após prévia incubação a 37°C com concentrações crescentes de EGb 761 por 30 min, pelo método de Beutler (1984), modificado.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com EGb 761 (ANOVA, $p > 0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.2 Porcentagem de Metahemoglobina

5.2.1 Porcentagem de metahemoglobina de suspensões de eritrócitos normais e de pacientes com anemia falciforme

Determinou-se a porcentagem de meta-Hb basal de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS), como pode ser observado na Figura 31.

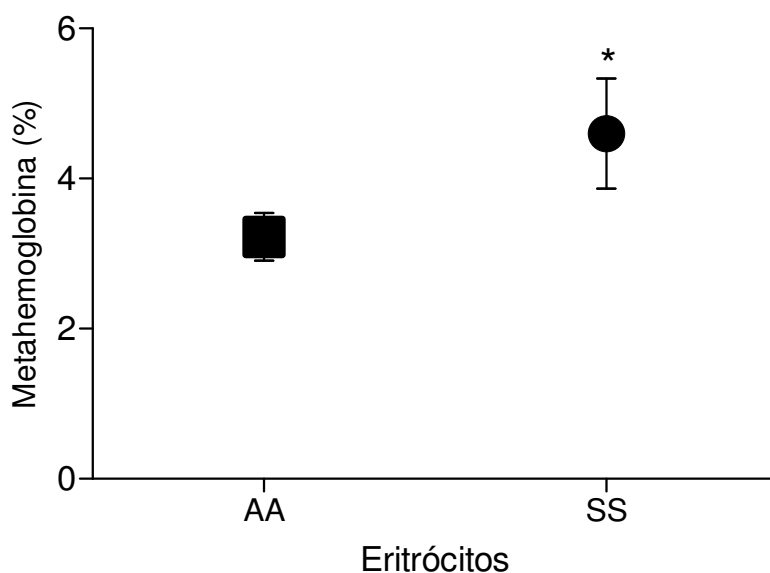


FIGURA 31 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS)

Nota: porcentagem de meta-Hb de suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais e de 5 pacientes com anemia falciforme, analisando-se em triplicata, encontrando-se valores médios de $3,22 \pm 0,32$ e $4,60 \pm 0,73\%$, respectivamente, pelo método de Naoum *et al.* (2004).

* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.2.2 Porcentagem de metahemoglobina de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme após exposição ao *t*-BHP

Determinou-se a porcentagem de meta-Hb de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS) após exposição ao *t*-BHP (Figura 32).

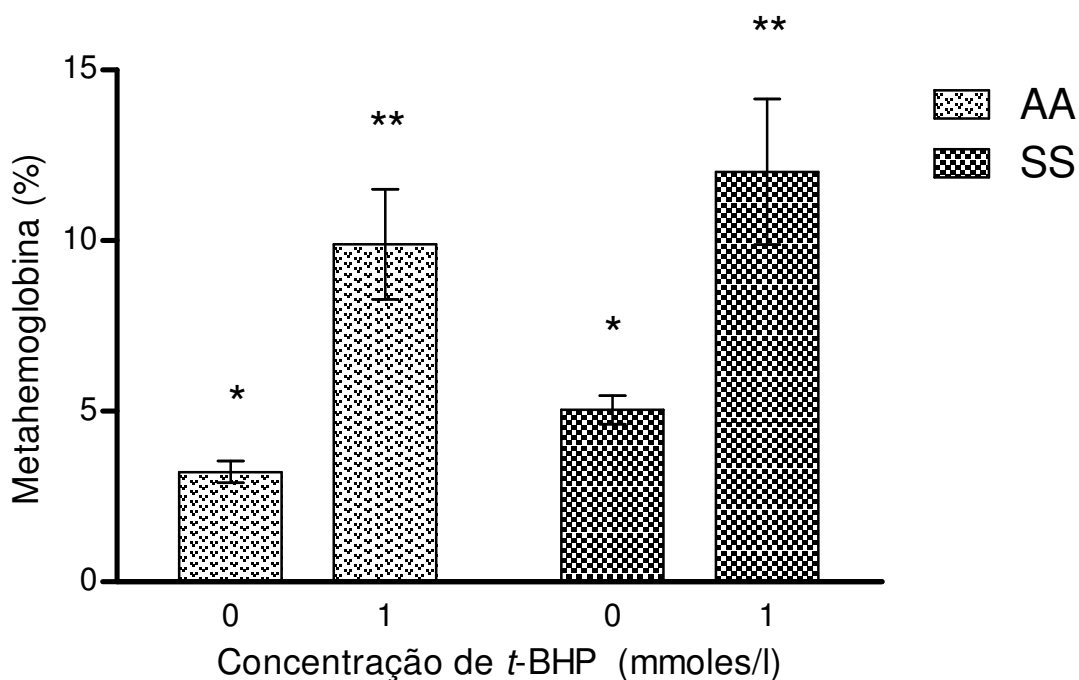


FIGURA 32 – PORCENTAGEM DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS À AÇÃO DE *t*-BHP

Nota: Porcentagem de meta-Hb de suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais e de 5 pacientes com anemia falciforme, analisando-se em triplicata (n=15), após incubação à temperatura ambiente com *t*-BHP 1 mmol/l, por 15 min, analisados pelo método de Naoum *et al.* (2004).

* Diferença estatisticamente significativa entre os basais e os tratados (ANOVA, $p < 0,05$).

** Diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos após tratamento.

5.2.3 Porcentagem de metahemoglobina de suspensões de eritrócitos indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do *t*-BHP após incubação com EGb 761

Determinou-se a porcentagem de meta-Hb de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS) após exposição a *t*-BHP, previamente incubados com concentrações crescentes de EGb 761 (Figura 33).

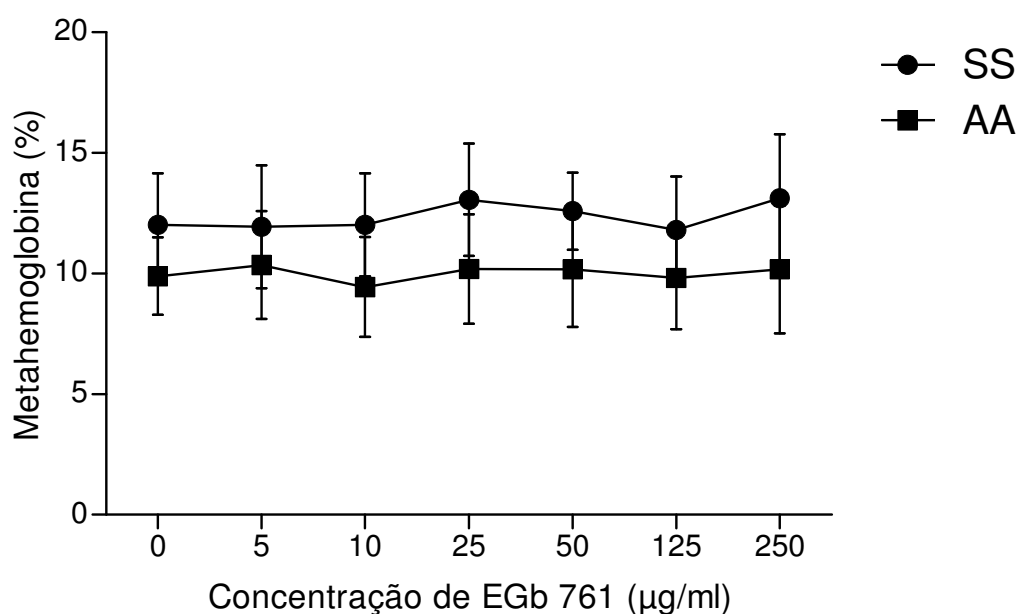


FIGURA 33 – PORCENTAGEM DE META-HB EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS À AÇÃO DE *t*-BHP APÓS PRÉVIA INCUBAÇÃO COM EGb 761

Nota: Porcentagem de meta-Hb de suspensões de eritrócitos AA e SS (hematócrito 10%) de 5 pacientes, analisando-se em triplicata (n=15), após incubação a temperatura ambiente com *t*-BHP 1 mmol/l, por 15 min, previamente incubados com concentrações crescentes de EGb 761, analisados pelo método de Naoum *et al.* (2004).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com EGb 761 (ANOVA, $p > 0,05$).

As barras de erro representam o desvio padrão.

5.3 Detecção da produção de ERO

5.3.1 Detecção da produção de ERO em suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do *t*-BHP após incubação com EGb 761

Detecção da produção de ERO em suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS) submetidos ao estresse oxidativo de *t*-BHP após incubação com concentrações crescentes de EGb 761 (Figura 34).

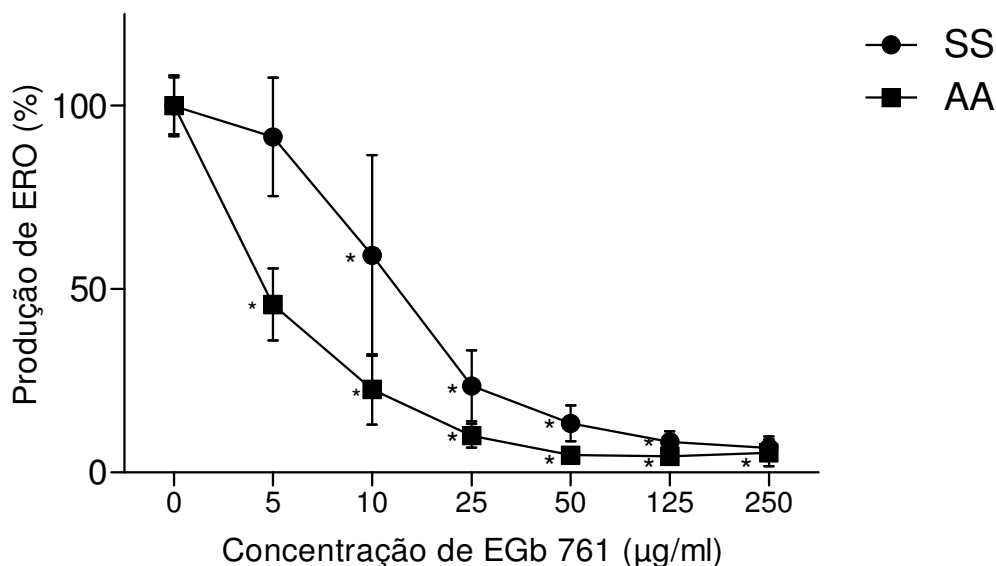


FIGURA 34 – DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ERO EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE *t*-BHP APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761

Nota: Produção de ERO (%) detectadas em suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais e de 5 pacientes com anemia falciforme, submetidos ao estresse oxidativo de 75 µmoles/l de *t*-BHP, analisados em quadruplicata (n=20) após incubação a 37°C com concentrações crescentes de EGb 761 por 30 min, em relação ao controle (concentração de EGb 761 = 0), analisados pelo método de López-Revuelta *et al.*, 2006, adaptado.

*Diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA, $p < 0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.4 Determinação da Peroxidação Lipídica

5.4.1 Determinação da peroxidação lipídica de suspensões de eritrócitos normais e de pacientes com anemia falciforme

Determinou-se a peroxidação lipídica basal de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS), como pode ser observado na Figura 35.

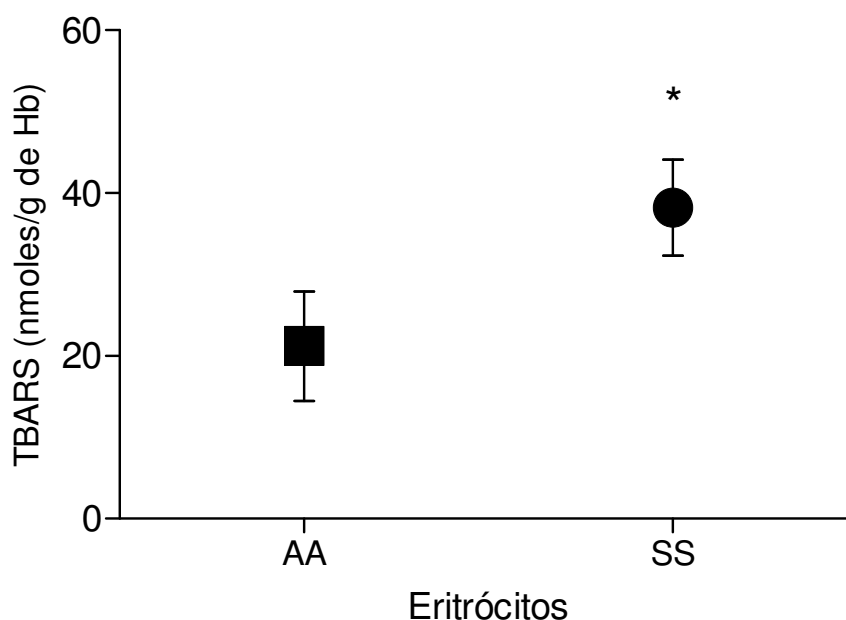


FIGURA 35 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS)

Nota: Peroxidação lipídica de suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais (AA), em triplicata (n=15) e de 5 pacientes com anemia falciforme (SS), em duplicata (n=10), encontrando-se valores médios de $21,2 \pm 6,7$ e $38,2 \pm 5,9$ nmoles de TBARS/g Hb, respectivamente, pelo método de Stocks e Dormandi (1971)

* Diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p < 0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.4.2 Determinação da peroxidação lipídica de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do *t*-BHP

Peroxidação lipídica em suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS) submetidos ao estresse oxidativo de *t*-BHP (Figura 36).

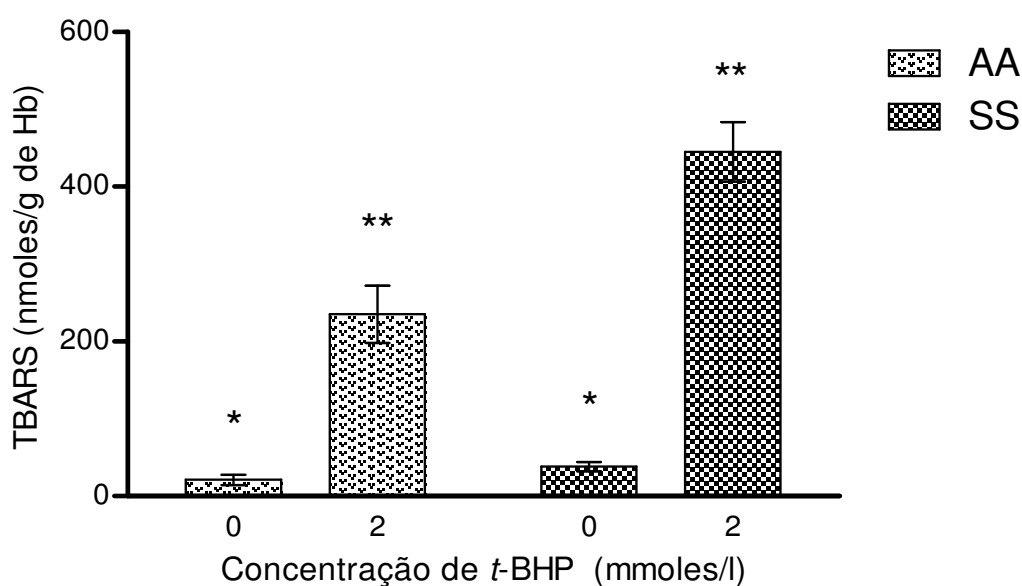


FIGURA 36 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE *t*-BHP

Nota: Peroxidação lipídica determinada em suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais (AA), em triplicata (n=15) e de 5 pacientes com anemia falciforme (SS), em duplicata (n=10) submetidos ao estresse oxidativo de 2 mmoles/l de *t*-BHP após incubação a 37°C com concentrações crescentes de EGb 761 por 30 min, analisados pelo método de Stocks e Dormandi (1971)

* Diferença estatisticamente significativa entre os basais e os tratados (ANOVA, $p < 0,05$).

** Diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos após tratamento.

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.4.3 Determinação da peroxidação lipídica de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do *t*-BHP após incubação com EGb 761

Peroxidação lipídica em suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS) submetidos ao estresse oxidativo de *t*-BHP após incubação com concentrações crescentes de EGb 761 (Figura 37).

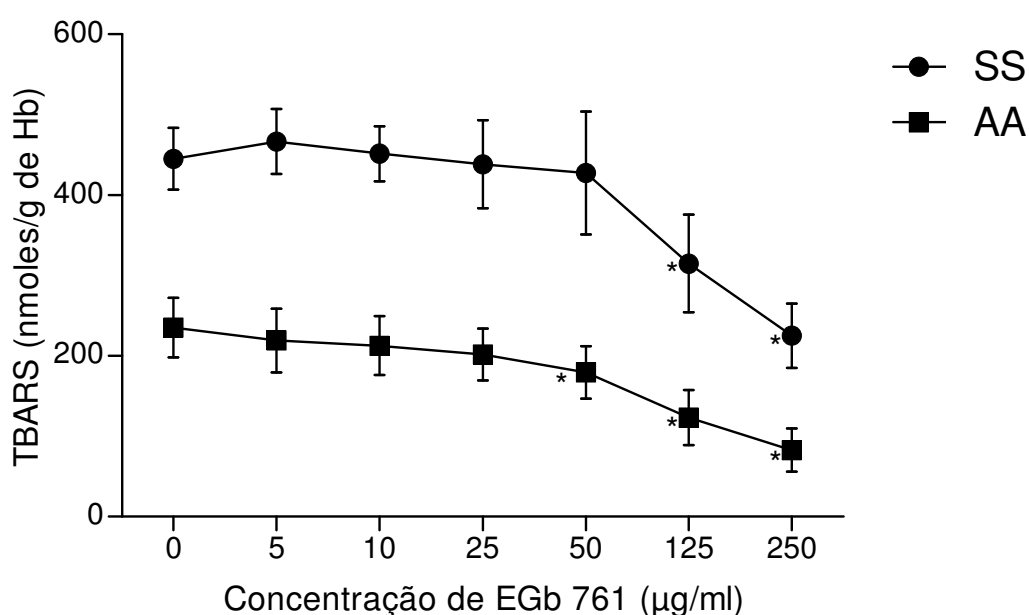


FIGURA 37 – PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE *t*-BHP APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761

Nota: Peroxidação lipídica determinada em suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais (AA), em triplicata (n=15) e de 5 pacientes com anemia falciforme (SS), em duplicata (n=10) submetidos ao estresse oxidativo de 2 mmoles/l de *t*-BHP após incubação a 37°C com concentrações crescentes de EGb 761 por 30 min, analisados pelo método de Stocks e Dormandi (1971)

*Diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles (ANOVA, p<0,05).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.5 Determinação das Porcentagens de Hemólise

5.5.1 Porcentagens de hemólise de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme

Determinou-se a porcentagem de hemólise basal de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS), como pode ser observado na Figura 38.

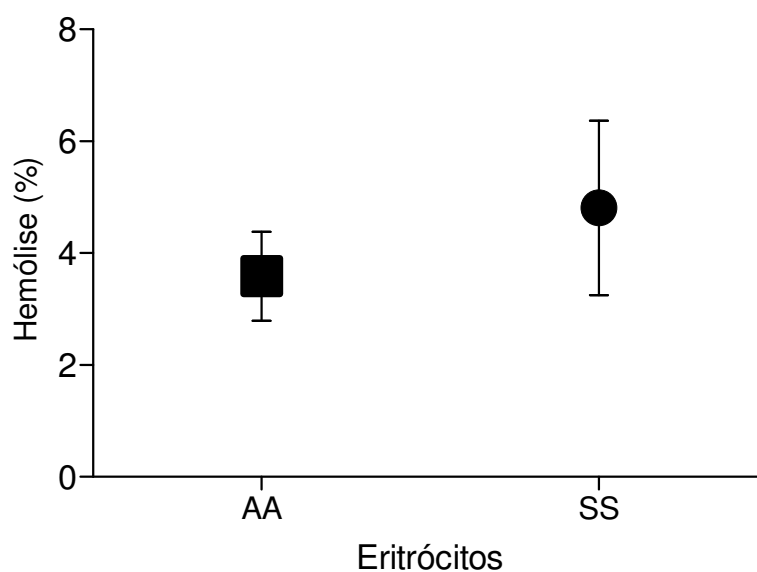


FIGURA 38 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS)

Nota: Porcentagens de hemólise de suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais e 2 pacientes com anemia falciforme, analisando-se em triplicata ($n=15$ e 6 , respectivamente), após lavagem e incubação a 37°C por $3,5$ h encontrando-se valores de $3,59 \pm 0,80$ (AA) e $4,81 \pm 1,56\%$ (SS), analisados pelo método de Banerjee *et al.*, 2008.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (ANOVA, $p>0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.5.2 Determinação das porcentagens de hemólise de suspensões de eritrócitos de indivíduos normais submetidos ao estresse oxidativo do AAPH

Porcentagens de hemólise em suspensões de eritrócitos lavados de indivíduos normais (AA) e de pacientes com anemia falciforme (SS) submetidos ao estresse oxidativo de AAPH, como pode ser observado na Figura 39.

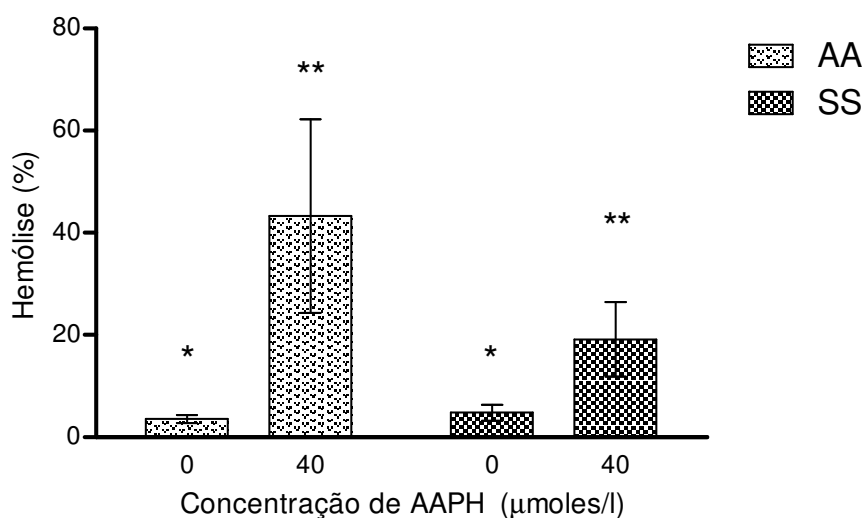


FIGURA 39 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE AAPH APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761

Nota: Porcentagens de hemólise determinadas em suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais (AA) e 2 pacientes com anemia falciforme (SS) submetidos ao estresse oxidativo de 40 µmoles/l de AAPH por 3,5 h, analisados em triplicata (n=15 e n=6) pelo método de Banerjee *et al.* (2008).

* Diferença estatisticamente significativa entre os basais e os tratados de cada grupo (ANOVA, $p < 0,05$).

** Diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos após tratamento (ANOVA, $p < 0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5.5.3 Determinação das porcentagens de hemólise de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo do AAPH após incubação com EGb 761

Porcentagens de hemólise em suspensões de eritrócitos lavados de 5 indivíduos normais e 5 pacientes com anemia falciforme submetidos ao estresse oxidativo de AAPH após incubação com concentrações crescentes de EGb 761 (Figura 40).

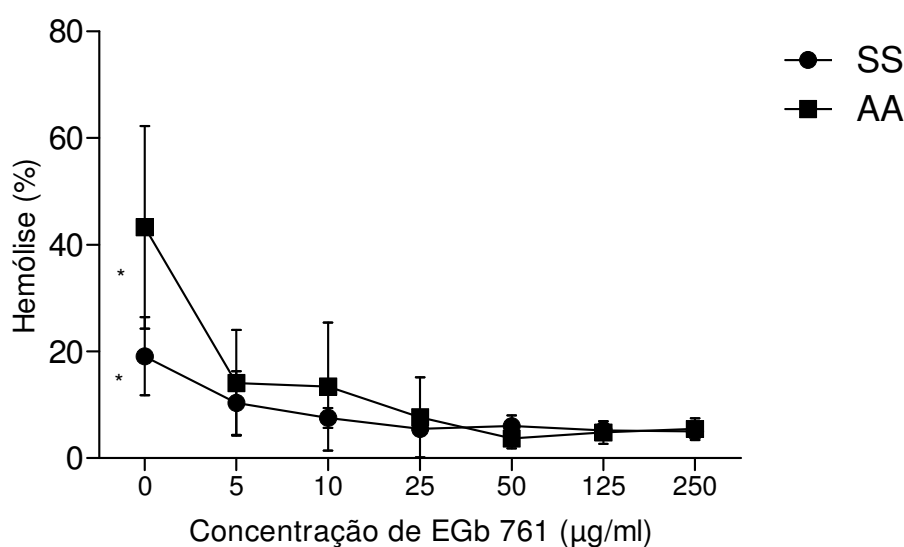


FIGURA 40 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS INDIVÍDUOS NORMAIS (AA) E DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME (SS) SUBMETIDOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE AAPH APÓS INCUBAÇÃO COM EGb 761

Nota: Porcentagens de hemólise determinadas em suspensões de eritrócitos (hematócrito 10%) de 5 indivíduos normais (AA) e de 2 pacientes com anemia falciforme (SS) submetidos ao estresse oxidativo de 40 µmoles/l de AAPH após incubação a 37°C com concentrações crescentes de EGb por 30 min, analisados em triplicata pelo método de Banerjee *et al.* (2008).

* Diferenças estatisticamente significativas entre o controle e todos os tratamentos com EGb 761, no grupo AA e SS (ANOVA, $p < 0,05$).

As barras de erro representam os desvios padrões.

5 DISCUSSÃO

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os modelos celulares são eficazes para triagem inicial de substâncias antioxidantes, e incluem tanto células isoladas, como o eritrócito, quanto os cultivos celulares. No presente trabalho, escolhemos o eritrócito como modelo celular, devido à fácil obtenção e manuseio das amostras, e por serem células muito simples, sem núcleo ou organelas (CASADEVALL, 2009).

No eritrócito são relativamente abundantes a geração e a ação de radicais livres. Por isso, o mesmo possui uma rede de mecanismos de defesa altamente evoluída e bem integrada, que o capacita a suportar o estresse oxidativo. Mutações congênitas da hemoglobina que resultem na doença falciforme tornam os eritrócitos muito suscetíveis à injúria mediada por radicais livres (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). Além disso, os eritrócitos desses pacientes apresentam uma capacidade antioxidante total reduzida em 50% (FASOLA *et al.*, 2007), que resulta na frequente perda do equilíbrio entre os estados pró e antioxidante (TITUS *et al.*, 2007).

A geração de hidroperóxidos *in vivo* tem sido conhecida como um mecanismo importante de citotoxicidade em várias doenças humanas. A habilidade do eritrócito em limitar a extensão do dano oxidativo pode estar relacionada com sua capacidade de inativar tais radicais. Estudos prévios *in vitro* comprovam a ação oxidativa do *t*-BHP em eritrócitos, levando à formação de meta-Hb, oxidação da GSH, formação de corpos de Heinz e peroxidação lipídica (CESQUINI, 2003; CHAVES, 2007; SANTOS, 2008; KRUKOSKI *et al.*, 2009).

Neste trabalho, estudou-se o metabolismo oxidativo de eritrócitos normais e de pacientes portadores de anemia falciforme, analisando-se o efeito de oxidantes e a proteção por extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761).

A escolha do EGb 761 foi baseada em vários estudos que, utilizando o eritrócito como modelo de estresse oxidativo, comprovaram sua ação antioxidante, bem como pelo fato de ainda não existirem relatos na literatura sobre seu efeito em eritrócitos de pacientes portadores de anemia falciforme, nosso objeto de estudo.

Entre os vários solventes, optou-se por solubilizar o extrato seco padronizado de *Ginkgo biloba* 761 em soluções hidroglicólicas 50%. O

propilenoglicol é um excelente solvente para muitos produtos orgânicos insolúveis em água. Ele é um líquido claro, incolor, ligeiramente viscoso e completamente miscível em água, além de apresentar baixa toxicidade, sendo amplamente utilizado em alimentos, fármacos e cosméticos (DOW CHEMICAL CO, 2003).

Em relação à metodologia empregada para este estudo, algumas ponderações se tornam relevantes para a análise dos resultados obtidos.

O método utilizado para a determinação de meta-Hb foi o de Naoum *et al.* (2004), que é econômico, simples, estável e apresenta menos riscos ao analista do que o de Evelyn e Malloy (1938), por não utilizar cianeto, tóxico ao ambiente laboratorial. De acordo com Naoum *et al.* (2004), existe correlação linear positiva entre as duas metodologias ($r=0,903$), com distribuições de seus valores dentro dos padrões gaussianos esperados. Camargo *et al.* (2007) encontraram correlação entre o método de Naoum *et al.* e o de Hegesh *et al.* (1970), considerado por Dusse (1996) como mais preciso e eficiente que o de Evelyn e Malloy (1938).

Nas técnicas empregadas para a determinação de porcentagem de hemólise, meta-Hb, radicais livres e TBARS, padronizou-se o uso de suspensões de eritrócitos a 10%, o que tornou possível testar várias concentrações do extrato de EGb 761, em detrimento do pequeno volume coletado dos pacientes com anemia.

Na técnica de GSH, entretanto, para respeitar a sensibilidade do método, foi necessário utilizar suspensões de eritrócitos a 40%. Uma alteração no método de extração, substituindo-se filtração por centrifugação, permitiu reduzir em 80% o volume das alíquotas utilizadas em relação ao método original. Ao testar a modificação da técnica em suspensões de eritrócitos de 15 indivíduos saudáveis, verificou-se que o método empregado apresentou boa correlação ($r^2 = 0,88$) e médias idênticas (teste t, $p>0,05$) para amostras pareadas, com o original de Beutler (1984).

6.1 Estado oxidativo dos eritrócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com anemia falciforme

O estado basal oxidativo dos eritrócitos normais e falciformes foi avaliado através da concentração do antioxidante endógeno GSH; bem como da avaliação do dano oxidativo à hemoglobina (meta-Hb) e à membrana lipídica (TBARS).

Em desordens hemolíticas como a anemia falciforme, o eritrócito por si só pode ser o principal determinante do ambiente redox global. Está bem estabelecido que eritrócitos de pacientes com anemia falciforme possuem concentrações aumentadas de espécies reativas de oxigênio quando comparadas com eritrócitos normais (MORRIS *et al.*, 2008).

Muitos fatores são responsáveis pela diversidade clínica e laboratorial dos pacientes com anemia falciforme, entre eles sexo, idade, haplótipos e níveis de hemoglobina fetal (COSTA *et al.*, 2006). O grupo de pacientes com anemia falciforme atendido no HEMEPAR está sujeito a diversos regimes de tratamento (Anexo 3); entre eles, terapia transfusional, ácido fólico, indutores de Hb F (hidroxiuréia), ou quelantes de ferro (deferasirox, deferiprona e/ou deferoxamina). Esta última droga tem apresentado, *in vitro*, um efeito considerável na proteção dos eritrócitos contra a oxidação da hemoglobina (CESQUINI, 2003; SANTOS, 2008). A associação de ácido fólico, hidroxiuréia e deferasirox está relacionada com níveis diminuídos de peroxidação lipídica (TORRES *et al.*, 2009). A variação genética não foi levada em consideração para análise dos resultados, mas sabe-se que os diversos haplótipos da doença influenciam os níveis de hemoglobina F, assim como o estado oxidativo dos pacientes. Apesar da heterogeneidade fenotípica, o grupo de pacientes estudado apresentou poucas variações em relação aos seus índices hematimétricos (Anexo 3).

Os pacientes com anemia falciforme possuem uma tendência a apresentar menores concentrações de GSH eritrocitárias (CHAN; CHOW, XIU, 1999; ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000; CHAVES, 2007). Apesar disso, a diferença de concentração não foi significativa quando comparada com nosso grupo controle (Figura 27), resultado também não encontrado por outros autores (RICE-EVANS; OMORPHOS; BAYSAL, 1986; SOMJEE *et al.*, 2004). Estes valores discordantes

poderiam ser explicados pela heterogeneidade laboratorial e clínica dos portadores de anemia falciforme, descrita acima.

Por sua vez, a porcentagem de meta-Hb, produto da oxidação da hemoglobina, foi aproximadamente 1,4 vezes maior nas suspensões de eritrócitos dos pacientes com anemia falciforme ($4,6 \pm 0,7\%$) em relação aos eritrócitos de indivíduos saudáveis ($3,2 \pm 0,3\%$), (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 31). Em 1986, Rice-Evans, Omorphos e Baysal encontraram um aumento de aproximadamente 2 vezes de meta-Hb em eritrócitos de pacientes de anemia falciforme. Aslan, Thornley e Freeman (2000) citam um aumento de 1,7 vezes da auto-oxidação da hemoglobina em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme em relação aos de indivíduos saudáveis.

A membrana plasmática é um local crítico para a ação de radicais livres e reações oxidativas, com ácidos graxos poliinsaturados e proteínas transmembrana, contendo aminoácidos suscetíveis aos danos oxidativos. A peroxidação lipídica da membrana foi determinada em eritrócitos pela avaliação dos TBARS, e demonstrou-se que os lipídios de membrana dos eritrócitos apresentam uma tendência aumentada à oxidação nos pacientes com anemia falciforme ($38,2 \pm 5,9$ nmoles de TBARS/g Hb), com valores 1,8 vezes maiores se comparados aos de eritrócitos de indivíduos normais ($21,2 \pm 6,7$ TBARS/g Hb) (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 35). Rice-Evans, Omorphos e Baysal (1986) e Hebbel (1991) encontraram aproximadamente a mesma taxa de aumento de peroxidação em eritrócitos de pacientes portadores de anemia falciforme.

De acordo com relatos na literatura, em eritrócitos de pacientes com doença falciforme a ligação da Hb à membrana no processo oxidativo é muito mais pronunciada, de modo que a concentração de ferro da face citosólica chega a ser três vezes maior em relação a eritrócitos normais (CESQUINI, 2003), resultando em uma lesão da membrana conseqüentemente maior.

Desse modo, pode-se afirmar, após a avaliação do estado oxidativo dos eritrócitos falciformes que, pelo fato de estarem sujeitos a um nível de ERO basal maior do que os eritrócitos normais, estão expostos a um dano oxidativo mais extenso, exigindo uma maior proteção antioxidante endógena e exógena para conseguir estabelecer o equilíbrio oxidativo e evitar complicações resultantes do comprometimento da função vascular.

6.2 Estresse oxidativo induzido em eritrócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com anemia falciforme

6.2.1 Hemólise induzida por AAPH

Konell (2010) verificou em microscopia eletrônica de varredura (MEV), que o *t*-BHP promove alterações morfológicas nos eritrócitos, dose dependentes. No entanto, estes autores observaram reduzido efeito hemolítico deste agente nas concentrações e tempo de incubação estudados (1 a 2 mmoles/l, por 30 min), com poucos esferócitos - formas pré-hemolíticas, e porcentagem elevada de discócitos - formas normais. Desse modo, com o intuito de se obter melhor análise das diferenças entre eritrócitos normais e de pacientes portadores de anemia falciforme, optou-se por substituir o *t*-BHP por AAPH, um oxidante com potente efeito hemolítico. Em estudos em andamento neste laboratório, o AAPH tem apresentado alterações morfológicas relevantes.

O AAPH é um composto azo hidrossolúvel, que atua na fase aquosa da membrana. No presente trabalho, quando suspensões de eritrócitos normais, na concentração de 10%, foram incubadas durante 3h a 37°C na ausência de AAPH, houve pouca hemólise (3%) (Figura 38), mas na presença de 40 mmoles/l de AAPH, induziu-se cerca de 40% de hemólise em eritrócitos normais (Figura 39), expressivamente mais elevada ($p < 0,05$) que o controle não submetido à oxidação, e considerada satisfatória para estudar um possível efeito protetor do EGb 761. Banerjee *et al.* (2008), após incubar suspensões de eritrócitos normais a 5% com 50 mmoles/l de AAPH a 37°C por 3 horas, encontrou valores de aproximadamente 50% de hemólise.

Os eritrócitos do grupo SS, quando expostos às mesmas concentrações de AAPH por 3 horas, apresentaram em torno de 20% de hemólise (Figura 39), valor significativamente menor ao apresentado no grupo controle. A hemólise basal (eritrócitos lavados e incubados sem AAPH) não apresentou diferença em relação aos eritrócitos normais (Figura 38). Em experimentos de Tatum e Chow (1996), o AAPH também induziu menor grau de hemólise em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme quando comparados ao grupo controle, e os eritrócitos SS foram mais resistentes à hemólise induzida por estresse osmótico. Os eritrócitos do grupo

SS, quando expostos às mesmas concentrações de AAPH por 3 horas, apresentaram em torno de 20% de hemólise (Figura 39), valor significativamente menor ao apresentado no grupo controle.

6.2.2 Estresse oxidativo induzido por *t*-BHP

O *t*-BHP foi utilizado como indutor de estresse oxidativo nas determinações de ERO, GSH, meta-Hb e peroxidação lipídica, após prévia padronização das condições experimentais de concentração e tempo de exposição.

Ao incubar a suspensão de eritrócitos normais por 15 min com 75 μ moles/l de *t*-BHP, houve um aumento de cerca de 20 vezes da geração de radicais livres no interior da célula, (ANOVA, $p < 0,05$), provavelmente derivados do radical *t*-BO \cdot .

A concentração inicial de GSH nos eritrócitos de indivíduos saudáveis diminuiu de $6,98 \pm 0,94$ para $0,73 \pm 0,32$ μ mol/g Hb, após uma rápida exposição (15 min) a 10 mmoles/l de *t*-BHP – valor significativamente menor que no estado basal (ANOVA, $p < 0,05$) (Figura 28). Estes dados sugerem que a oxidação de GSH a GSSG é uma etapa importante na defesa do eritrócito contra o *t*-BHP.

Os eritrócitos de pacientes com anemia falciforme foram oxidados sob as mesmas condições experimentais que os de indivíduos saudáveis, considerando-se o volume globular, a concentração do oxidante e o tempo de oxidação, e as taxas de oxidação foram comparadas. Em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, a concentração inicial de GSH diminuiu de $7,22 \pm 0,84$ para $0,43 \pm 0,38$ μ moles/g Hb, após exposição (15 min) a 10 mmoles/l de *t*-BHP – e, como nos eritrócitos do grupo AA, quase chegou à depleção de GSH (Figura 28).

Após 15 min de exposição ao *t*-BHP 1 mmol/l, uma rápida oxidação da hemoglobina foi notada, aumentando os níveis de meta-Hb dos eritrócitos em aproximadamente 3 vezes ($9,9 \pm 1,6\%$), como ilustrado na Figura 32.

A porcentagem de meta-Hb formada em eritrócitos SS foi de $11,6 \pm 2,1$, significativamente maior do que em eritrócitos normais (Figura 32). Esses resultados concordam com os de Chaves (2007), de acordo com os quais, a presença da Hb S, tanto na forma hetero como homozigótica, ocasionou eventos oxidativos em dimensão significativamente maior.

A peroxidação lipídica induzida pelo *t*-BHP (2 mmoles/l) nos eritrócitos de indivíduos saudáveis resultou na elevação dos níveis de TBARS em cerca de 11 vezes (Figura 36).

A maior suscetibilidade à oxidação da hemoglobina em eritrócitos SS foi acompanhada por maiores danos da membrana lipídica, sendo 43% maior nos eritrócitos do grupo SS do que nos eritrócitos controle, como pode ser observado na Figura 36. Os danos oxidativos aos lipídios de membrana dos eritrócitos dos pacientes portadores de anemia falciforme induzidos pelo *t*-BHP foram numericamente maiores ($445,2 \pm 38,4$ nmoles de TBARs/g de Hb) em relação aos danos em eritrócitos normais ($235,1 \pm 37,1$ nmoles de TBARs/g de Hb). Esses valores representam um aumento de cerca de 11 vezes, tanto em eritrócitos de pacientes quanto nos controles, em relação ao seus níveis basais.

Assim, a suplementação dietética dos pacientes com extrato de *Ginkgo biloba*, rico em compostos fenólicos, pode vir a proteger a membrana do eritrócito da injúria oxidativa mediada por radicais livres, tornando-se um aliado terapêutico no tratamento dos pacientes com anemia falciforme ao prolongar o tempo de vida dos seus eritrócitos na circulação.

6.3 Ação antioxidante do EGb 761

A escolha do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* baseou-se no fato de ser uma planta já caracterizada como antioxidante e extensivamente estudada em relação as suas propriedades farmacológicas em humanos.

A incubação prévia da suspensão de eritrócitos com concentrações crescentes de EGb 761 teve por objetivo inibir a ação dos oxidantes *in vitro*, através de mecanismos antioxidantes já definidos, como o sequestro de radicais livres pelos compostos fenólicos, indução de enzimas antioxidantes, quelação de metais de transição e reciclagem de metabólitos antioxidantes, como a GSH (RONG; GENG; LAU, 1996b; DROY-LEFAIX; PACKER, 1999; LUGASI; HORVAHOVICH; DWORSCHAK, 1999; SMITH; LUO, 2004).

Em testes preliminares, ao se incubar suspensões de eritrócitos de indivíduos normais por até 1 h com 5 a 250 $\mu\text{g/ml}$ de EGb 761 a 37^o C, não se

observou alterações dos valores basais de GSH, meta-Hb, bem como não houve indução de hemólise.

O EGb 761 conseguiu prevenir parcialmente a peroxidação lipídica da membrana, tanto em eritrócitos de indivíduos saudáveis quanto de pacientes com anemia falciforme, de forma dose-dependente. Em eritrócitos de indivíduos saudáveis, a pré-incubação com concentrações de 50 µg/ml do EGb 761 inibiu em 23,7% a peroxidação lipídica, chegando a inibi-la em 64,7%, quando a concentração utilizada foi de 250 µg/ml (ANOVA, $p < 0,05$). Em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, a inibição máxima da peroxidação foi de 49,4%, ao incubá-los com 250 µg/ml de EGb 761, enquanto a concentração de até 25 µg/ml não apresentou diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$), (Figura 37). A concentração inibitória 50% (IC_{50}) do EGb 761, ou seja, a concentração do extrato necessária para inibir 50% da peroxidação lipídica induzida pelo agente oxidante, *in vitro*, foi de 138,4 µg/ml em eritrócitos do grupo AA; e de 257,0 µg/ml, em eritrócitos do grupo SS. He *et al.* (2008) conseguiram inibir a peroxidação lipídica em eritrócitos normais com concentrações ≥ 75 µg/ml, quando os eritrócitos foram expostos a 1 mmol/l de *t*-BHP.

Como pode ser observado na Figura 34, todas as concentrações de EGb 761 inibiram a produção de ERO quando os eritrócitos normais foram expostos ao *t*-BHP 75 µmoles/l, por 15 min. A proteção chegou a 95,6% quando a concentração de EGb 761 utilizada foi de 125 µg/ml. Em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, concentrações ≥ 10 µg/ml inibiram significativamente as ERO (ANOVA, $p < 0,05$), sendo que a inibição máxima foi de 93,2% (250 µg/ml de EGb 761), (Figura 34). Em eritrócitos normais, o EGb 761 apresentou uma atividade maior, sendo a IC_{50} de 4,22 µg/ml, enquanto nos eritrócitos do grupo SS, a IC_{50} foi de 13,0 µg/ml, mais do que o dobro da dose necessária para atingir os mesmos efeitos alcançados no grupo controle.

O EGb 761 apresentou uma considerável ação anti-hemolítica ao prevenir a hemólise em baixas concentrações (5 µg/ml em eritrócitos do grupo AA e SS). A proteção foi dose-dependente, atingindo-se valores máximos de inibição na concentração de 25 µg/ml do extrato em eritrócitos normais e com anemia falciforme (Figura 40). Em eritrócitos normais, concentrações maiores que 50 µg/ml não apresentaram maior efeito protetor, como também não induziram mais hemólise, contrastando com resultados de He *et al.* (2008). Tais autores obtiveram uma curva

de hemólise na forma de U, ou seja, enquanto baixas concentrações de EGb 761 protegeram, aquelas acima de 25 µg/ml foram indutoras de hemólise. Os autores sugerem que os efeitos tóxicos ou benéficos exibidos pelo extrato de Ginkgo biloba em um modelo celular dependem das condições do ensaio e da dose utilizada, sendo que altas doses podem induzir dano celular, particularmente na ausência de um estresse exógeno, já que a oxidação de compostos polifenólicos pode levar a formação de semiquinonas, quinonas e radicais fenoxila com efeitos pró-oxidantes.

Konell (2010) observou em MEV que eritrócitos expostos por 60 min ao EGb 761, não tomavam a forma pré-hemolítica - esferócitos – quando comparados aos de um grupo controle. A IC₅₀ do extrato no grupo controle foi aproximadamente 2 vezes menor (2,6 µg/ml) do que nos eritrócitos dos pacientes com anemia falciforme (6,0 µg/ml).

Entre os mecanismos de ação do EGb 761, o sequestro de radicais livres e a quelatação de metais de transição estão bem documentadas (RONG; GENG; LAU, 1996b; DROY-LEFAIX; PACKER, 1999; LUGASI; HORVAHOVICH; DWORSCHAK, 1999; SMITH; LUO, 2004). Outro possível mecanismo que pode contribuir com sua atividade antioxidante pode ser a habilidade em estabilizar as membranas através da diminuição da sua fluidez. Segundo Arora *et al.*, 2000, os flavonóides, assim como o colesterol e o α-tocoferol, penetram no *core* hidrofóbico da membrana e causam uma diminuição da fluidez dessa região da membrana. A localização dos flavonóides no interior da membrana e suas ações resultantes sobre a fluidez poderiam, por impedimento estérico, reduzir a difusão dos radicais livres e, desta forma, diminuir a cinética das reações dos radicais livres.

Nas concentrações testadas, o extrato não conseguiu prevenir ou reverter a oxidação da GSH e da hemoglobina, não havendo diferenças nos resultados obtidos entre as amostras tratadas e o controle (ANOVA, $p > 0,05$), tanto em eritrócitos de indivíduos saudáveis quanto de pacientes com anemia falciforme (Figuras 29, 30 e 33), contrastando com dados de He *et al.* (2008), que conseguiram prevenir a oxidação da GSH pelo *t*-BHP com concentrações de EGb 761 de 25 µg/ml e da hemoglobina, com concentrações de 50 µg/ml, em eritrócitos normais.

O baixo grau de proteção à oxidação da hemoglobina e da GSH sugere uma baixa concentração do extrato no citosol da célula. Desta forma, pode-se supor que

o extrato teria apresentado uma ação preferencial sobre a membrana do eritrócito, protegendo-a da ação dos radicais livres.

Desse modo, a efetiva inibição da hemólise induzida pelo AAPH possivelmente decorreu do sequestro dos radicais peroxila pelos flavonóides presentes no extrato de *Ginkgo biloba*, que protegeu os lipídios, e possivelmente as proteínas de membrana, da peroxidação, aumentando a resistência da membrana à destruição por radicais livres. O fato de a ação hemolisante do AAPH estar restrita a modificações de proteínas e lipídios de membrana, e não estar relacionada à modificação intra-eritrocitária da hemoglobina (LENFANT *et al.*, 2005), aliado aos dados apresentados de não proteção da hemoglobina e do GSH à ação do *t*-BHP, reforça a idéia de que o EGb 761 agiu principalmente sobre a membrana, apresentando uma ação limitada sobre o citosol da célula.

De acordo com os resultados apresentados, os eritrócitos de indivíduos com anemia falciforme precisaram, em média, de uma dose duas vezes maior de antioxidante, em relação ao grupo controle, para prevenir em 50% o dano oxidativo induzido pelo oxidante *in vitro*. A necessidade de uma maior concentração da droga no grupo SS decorre do fato de que os eritrócitos deste grupo estão sujeitos a um maior estresse oxidativo endógeno e, quando expostos a uma fonte externa agravante do estresse, consomem um maior número de moléculas antioxidantes para conseguirem reverter o quadro oxidativo.

A ação do extrato de *Ginkgo biloba* como um agente antioxidante em eritrócitos já havia sido comprovada por vários autores (KOSE *et al.*, 1997; SARIKCIOGLU; ONER; TERCAN, 2004; FOROUGHINIA; KARIMI, 2007; HE *et al.*, 2008), mas na revisão de literatura realizada para o presente trabalho não se encontrou qualquer relato do efeito do extrato na prevenção dos danos oxidativos na anemia falciforme, como demonstrado no presente trabalho.

A anemia falciforme é uma doença crônica para a qual não há cura conhecida. Mais esforço deve ser concentrado, portanto, sobre o atendimento adequado aos pacientes, de modo a garantir uma maior e melhor sobrevida. A importância da alimentação adequada no cuidado aos pacientes portadores de doenças crônicas tem atraído uma crescente atenção nos últimos anos. Porém, os pacientes portadores de doença falciforme apresentam uma variabilidade clínica complexa, tanto do ponto de vista metabólico quanto nutricional, refletida na

intensidade e na frequência das crises vaso-oclusivas. O que está claro é que devido ao alto *turnover* de seus eritrócitos, esses pacientes apresentam um estado de hipercatabolismo em relação aos indivíduos saudáveis, com necessidades aumentadas de energia, de nitrogênio e de micronutrientes, como vitaminas A, C e E, piridoxina, riboflavina, zinco e selênio (ENWONWU, 1988).

A intervenção nutricional representa uma abordagem terapêutica segura para a anemia falciforme, sendo que uma suplementação antioxidante combinada poderia oferecer benefícios adicionais. Os antioxidantes agem como uma rede de cooperação, através de uma série de reações redox. Interações entre o ácido ascórbico e a glutatona, e entre o ácido ascórbico e compostos fenólicos são bem conhecidas (CHAN; CHOW; CHIU, 1999). Porém, um sequestrador de radicais livres pode se tornar um radical livre quando oxidado, de modo que o uso de apenas um antioxidante pode vir a ser desastroso (OHNISH; OHNISHI; OGUNMOLA, 2000). Desse modo, no tratamento da anemia falciforme, seria interessante o uso de uma terapia antioxidante combinada, associando-se os efeitos do EGb 761 com os da vitamina C, por exemplo, que tem apresentado importante ação inibitória sobre o estresse oxidativo, em estudos *in vitro* (CESQUINI, 2003; AMER *et al.*, 2005; CHAVES, 2008). Somando-se esta conduta aos efeitos protetores dos quelantes de ferro já utilizados na terapia de pacientes portadores de anemia falciforme, o seu tratamento poderia ser ainda mais eficiente.

O extrato de *Ginkgo biloba* pode ainda apresentar outros efeitos benéficos em pacientes com anemia falciforme, além da ação antioxidante; entre eles, a prevenção de fenômenos de vaso-oclusão. Segundo Kato *et al.* (2009) a vasculopatia na anemia falciforme está implicada no desenvolvimento de hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral, ulceração das pernas e priapismo, bem como particularmente associada com a severidade do quadro hemolítico e outras disfunções crônicas nos órgãos desses pacientes.

As duas principais frações do EGb 761, a dos terpenóides e a dos flavonóides, possuem propriedades distintas e são responsáveis pela ação farmacológica polivalente do extrato. Os flavonóides, ao sequestrarem os radicais livres, aumentam o tempo de meia vida do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), promovendo o relaxamento de vasos. Os terpenóides, por sua vez, são antagonistas dos fatores de ativação plaquetária (PAF), capazes de reduzir a

ativação e a agregação plaquetárias e, conseqüentemente, melhorar a circulação sanguínea (SMITH; LUO, 2004). Adicionalmente, o EGb 761 promove melhora do fluxo sanguíneo ao aumentar a deformabilidade e diminuir a agregação eritrocitária, diminuindo a viscosidade sanguínea (CHAN; XIA; FU, 2007).

Desse modo, a ação conjunta das frações químicas do EGb 761 alia a diminuição do estresse oxidativo com uma possível melhora do quadro de disfunção endotelial; o presente trabalho se dispôs a investigar a ação antioxidante do extrato, mas abre horizontes para futuros estudos, relacionando o EGB 761 com uma possível melhora do fluxo sanguíneo em pequenos vasos, reduzindo o número de eventos de vaso-obstrução nos pacientes com anemia falciforme, através de mecanismos diversos.

7 CONCLUSÕES

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Na avaliação do metabolismo oxidativo em eritrócitos de indivíduos normais (Grupo AA) e de pacientes com anemia falciforme atendidos no HEMEPAR (Grupo SS), *in vitro*, observou-se:

- a) Em condições basais, os eritrócitos dos pacientes do Grupo SS apresentaram maior estresse oxidativo endógeno, demonstrado pelo aumento da meta-Hb e de TBARS em relação ao Grupo AA. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos para os valores de GSH.
- b) Os eritrócitos dos pacientes do Grupo SS apresentaram maior suscetibilidade à oxidação, evidenciada por maiores níveis de meta-Hb e TBARS em relação ao Grupo AA, quando expostos a um estresse oxidativo exógeno. Os eritrócitos dos pacientes apresentaram um menor grau de hemólise quando expostos ao AAPH, em relação ao grupo controle.
- c) A pré-incubação dos eritrócitos com o EGb 761 inibiu totalmente a hemólise e a produção de ERO induzidas pelos agentes oxidantes AAPH e *t*-BHP, respectivamente; e parcialmente, a produção de TBARS induzida pelo *t*-BHP. A ação antioxidante do EGb 761 foi dose-dependente, tanto em eritrócitos do Grupo SS quanto do Grupo AA, com IC₅₀ pelo menos duas vezes maior nos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, em relação aos normais. O EGb 761 não apresentou atividade protetora sobre o GSH nem sobre a molécula de hemoglobina, nas concentrações testadas.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que o EGb 761 possui a capacidade de prevenir parcialmente os danos oxidativos induzidos *in vitro*, tanto em eritrócitos de indivíduos normais como em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme. Ensaio clínico são necessários para investigar os possíveis benefícios do EGb 761 como adjuvante terapêutico no tratamento da anemia falciforme.

REFERÊNCIAS

Referências

REFERÊNCIAS

AMER, J.; GHOTI, H.; RACHMILEWITZ, E.; KOREN, A.; LEVIN, C.; FIBACH, E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **British Journal of Hematology**, v.132, p.103-113, 2005.

ARORA, A. BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Arquivos of Biochemistry and Biophysics**, v.373, n.1, p.102-109, 2000.

ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Redox-Dependent Impairment of Vascular Function in Sickle Cell Disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.1469-1483, 2007.

ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Annals New York Academy of Sciences**. New York, v.899, p.375-391, 2000.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de textos, 2006.

BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v.174, p.134-139, 2008.

BARATTO, L.; RODIGHERO, J.; SANTOS, C. *Ginkgo biloba*: o chá das folhas é seguro? **Ciência Hoje**. v. 45, n. 266, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J.P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v.29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 3. ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984. 188p.

BLAINE MOORE, R. HULGAN, T.; GREEN, J.; JENKINS, L. Increased Susceptibility of the Sickle Cell Membrane $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ -ATPase to t Butylhydroperoxide: Protective Effects of Ascorbate and Desferal. **Blood**, v.79, n.5, p.1334-1341, 1992.

BOVERIS, A.; GALLEANO, M.; PUNTAROLO, S. *In vivo* supplementation with *Ginkgo biloba* protects membranes against lipid peroxidation. **Phytotherapy research**, v. 21, p.735-740, 2007.

BRIDI, R.; STEFFEN, V.; HENRIQUES, A. Investigação da atividade antioxidante do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGb 761) em ratos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.2, 2001.

CAMARGO, T.M.; ALVES, M.I.F.A.; OLIVEIRA, S.J.O.; SHITARA, E.S.; OSHIMA FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, p.95-98, 2007.

CASADEVALL, V.U. **Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo em modelos celulares.** Barcelona, 2009. Facultat de Farmàcia – Departament de Fisiologia - Universitat de Barcelona.

CESQUINI, M. **Efeitos de flavonóides no eritrócito de indivíduos normais e de pacientes com anemia falciforme.** São Paulo, 2003. Dissertação (Mestrado – Área de Bioquímica) – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas.

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.

CHAN, P.; XIA, Q.; FU, P. Ginkgo Biloba Leave Extract: Biological, Medicinal, and Toxicological Effects. **Journal of Environmental Science and Health**, v.25, n.3, p.211- 244, 2007.

CHAVES, M. A. F. **Ação antioxidante das vitaminas C e E no processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de hemoglobina S.** Curitiba, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas) – Universidade Federal do Paraná.

CHAVES, M.A.F.; LEONART, M.S.S.; NASCIMENTO, A.J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**, v.13, n.3, p.187-192, 2008.

CIESLA, B. **Hematology in practice.** Davis Company, 2007.

COSTA, P.J.M.S.; VILELA, R.Q.B.; CIPOLOTTI, R., FIGUEIREDO, M.S. Diversidade clínica e laboratorial no haplótipo bantu da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, p.40-44, 2006.

DAI, F.; MIAO, Q.; ZHOU, B.; YANG, L; LIU, Z. Protective effects of flavonols and their glycosides against free radical-induced oxidative hemolysis of red blood cells. **Life Sciences**, v. 78, p.2488–2493, 2006.

DOMANSKI, A.V.; LAPSHINA, E.A.; ZAVODNIK, I.B. Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. **Biochemistry**, v.70, n.7, p.761-9, 2005.

DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES. Rockville, 2009. **Total glutathione assay kit**. Bula de produto. Disponível em <<http://dojindo.com>>. Acesso em 23/02/2011.

DOW CHEMICAL COMPANY. Michigan, 2003. **A guide to glycols**. Catálogo de produto. Disponível em <<http://www.dow.com>>. Acesso em 23/02/2011.

DROY-LEFAIX, M.; PACKER, L. Antioxidant Properties of *Ginkgo biloba* Extract: Egb 761. In **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. Academic Press, 1999.

DUSSE, L.M.S.; SILVA, Z.L.; LAGES, G.F.G.; ALVAREZ LEITE, E.M. Estudo comparativo de métodos analíticos para dosagem de metemoglobina no sangue. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 28, p.68-70, 1986.

ENWONWU, C. Nutritional support in sickle cell anemia: Theoretical considerations. **Journal of The National Medical Association**, v.80, p.139-144, 1988.

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.

FASOLA, F.; ADEDAPO, K.; ANETOR, J.; KUTI, M. Total Antioxidants Status and Some Hematological Values in Sickle Cell Disease Patients in Steady State. **Journal of the National Medical Association**, v.99, n.8, p.891-893, 2007.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Current Molecular Medicine**, v.8, p.609-619, 2008.

FLEURY, M. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n.2, p 89-93, 2007.

FOROUGHINIA, F.; KARIMI, M. The protective effects of *Ginkgo biloba* extract in decreasing hemolysis of RBC in Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient patients. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 29, n.7, p.511-512, 2007.

GALIZA NETO, G. C., PITOMBEIRA, M. S. Aspectos Moleculares da Anemia Falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2002.

Ginkgo biloba. Disponível em <<http://latinstock.com.br>>. Acesso em fevereiro de 2011.

GRAIDO-GONZALEZ, E.; DOHERTY, J.C.; BERGREEN, E.W.; ORGAN, G.; TELFER, M.; McMILLEN, M. Plasma Endothelin-1, Cytokine, and Prostaglandin E2 Levels in Sickle Cell Disease and Acute Vaso-Occlusive Sickle Crisis. **Blood**, v.82, p.2551-2555, 1998.

GREER, J.P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.N. **Wintrobe's Clinical Hematology**, 11.ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2003.

HARRIS, J.R. **Blood Cell Biochemistry**. London: Plenum Press, 1991.

HE, J. LIN, J.; LI, J.; ZHANG, J.H.; SUN, X.M.; ZENG, C.M. Dual effects of *Ginkgo biloba* leaf extract on human red blood cells. **Nordic Pharmacological Society**. v.104, p.138-144, 2008.

HEBBEL, R.P. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology . **Blood**, v.77, p.214-237, 1991.

HEGESH, E.; GRUENER, R.N.; COHEN, S.; BOCHKOVSKY, R.; SHUVAL, H.I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. **Clinica Chimica Acta**, v.30, p. 679- 682, 1970

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Genetic complexity in sickle cell disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.33, p 11595-11596, 2008.

HILLMAN, R.S; FINCH, C.A. **Manual da série vermelha**. São Paulo: Editora Santos, 2001.

KATO, G.J. HEBBEL, R.P.; STEINBERG, M.H.; GLADWIN, M.T.. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American Journal of Hematology**, v.84, n.9, p.618-625, 2009.

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

KOLTERMANN, A. **Influence of Ginkgo biloba extract EGb 761 on signaling pathways in endothelial cells**. München, 2007. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

KONELL, K. **Microscopia eletrônica de varredura na avaliação de eritrócitos humanos normais e de pacientes portadores de anemia falciforme submetidos a estresse oxidativo**. Curitiba, 2010. Iniciação Científica. (Graduanda em farmácia) - Universidade Federal do Paraná, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

KOSE, K.; DOGAN, P.; ASCIOGLU, M. ASCIOGLU, O. *In vitro* antioxidant effect of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) on lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in erythrocytes of Behcet`s patients. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v. 75, p.253-258, 1997.

KRUKOSKI, D.W; COMAR, S.R; CLARO, L.M.; LEONART, M.S.; do NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamin C, deferoxamine, quercetin and rutin against tert-butyl hydroperoxide oxidative damage in human erythrocytes. **Hematology**, v. 14, n.3, p. 168-172, 2009.

LENFANT, F. *et al.* Effects of an oxidative stress on human hemoglobin: a multiwavelength visible spectrometric study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.59, p.230-232, 2005.

LODISH, H. **Molecular Cell Biology**. W.H. Freeman and Company. 5.ed. 2004.

LÓPEZ-REVUELTA, A.; SÁNCHEZ-GALLEGO, J.; HERNÁNDEZ- HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ-YAGGE, J.; LLANILO, M.; Increase in vulnerability to oxidative damage in

cholesterol-modified erythrocytes exposed to t-BuOOH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1734, p.74-85, 2006.

LUGASI, A.; HORVAHOVICH, P.; DWORSCHAK, E. Additional information to the *in vitro* antioxidant activity of *Ginkgo biloba* L. **Phytotherapy Research**, v, 13, p.160-162, 1999.

MACHADO, L.P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M.S.; SILVEIRA, V.F.; YONEZAWA, L.A.; Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos de interesse na Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.8, p.84-94, 2009.

MADER, S. **Inquiry to life**. MacGraw Hill Companies, 8.ed. 1997.

MAGALHÃES, A.S.M. **Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller, na danificação oxidativa em eritrócitos humanos**. Porto, 2009. Monografia (Licenciatura em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa.

MANFREDINI, V.; LAUERMANN, L.; GRIEBELER, I.H.; SANTINI, A.P.; BRANDÃO, V.D.M.; WAGNER, S.; CASTRO, S.M. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **Journal of the National Medical Association**, v. 100, n.8, p. 897-902, 2008.

MORRIS, C. SUH, J.H.; HAGAR, W.; LARKIN, S.; BLAND, D.A.; STEINBERG, M.H.; VICHINSKY, E.P.; SHIGENAGA, M.; AMES, B.; KUYPERS, F.A.; KLINGS, E.S.. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v.111, p.403-410, 2008.

MRUK, D.D.; SILVESTRINI, B.; MO, M.; CHENG, C.Y. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. **Contraception**, v.65, p.305-311, 2002.

MURADOR, P. DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hematologia**, v.29, n.2, p.168-178, 2007.

NAHAVANDI, M.; TAVAKKOLI, F.; HASAN, S.P.; WYCHE, M.Q.; CASTRO, O. Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v.34, p.134-148, 2004.

NAOUM, P.C. **Eletroforese**. Editora Santos. 2ed. 1999.

NAOUM, P.C., SOUZA, P.C. Avaliação dos produtos de degradação oxidativa de Hb S nos genótipos SS, SF (S/β talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 249-59, 2004.

NAOUM, P.C. RADISPIEL, J.; MORAES, M.S.. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.26, p.19-22, 2004.

OHNISH, S.; OHNISHI, T.; OGUNMOLA, G.B. Sickle cell anemia: A potencial nutritional approach for a molecular disease. **Nutrition**, v.16, p.330-338, 2000.

PEÑUELA, O. A. Hemoglobina: Una molécula modelo para el investigador. **Colombia Médica**, v. 36, n.3, p.215-224, 2005.

RED CELL BIOLOGY: Erythropoiesis, Apoptosis, and Metabolism. Disponível em: <<http://faculty.washington.edu/calvoc/DocumentsLabM321/Lectures/3RBC.ppt>>. Acesso em 10/02/2011.

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

ROMERO, W.E.R.; RENAULD, G.F.S.; VILLALOBOS, C. Haplotipos de la hemoglobina S: importância epidemiológica, antropológica y clínica. **Revista Panamericana de Salud Publica/Panamerican Journal of Public Health**, San José, v.3, p.1-8, 1998.

RONG, Y.; GENG, Z.; LAU, B. *Ginkgo biloba* attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p.121-127, 1996a.

RONG, Y.; GENG, Z.; LAU, B. *Ginkgo biloba* modulates glutathione redox cycle in vascular endothelial cells. **Nutrition Research**, v. 16, p.1913-1923, 1996b.

SANTOS, A.F. **Ação de desferoxamina e deferiprona em eritrócitos de portadores de β-talassemias submetidos à sobrecarga oxidativa de terc-butilhidroperóxido, *in vitro***. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestrado – Área de Análises Clínicas) –Universidade Federal do Paraná.

SARIKCIOGLU, S.; ONER, G.; TERCAN, E. Antioxidant effect of EGb 761 on hydrogen peroxide-induced lipoperoxidation of G-6-PD deficient erythrocytes. **Phytotherapy Research**, v.18, p.837-840, 2004.

SENER, G.; KABASAKAL, L.; ATASOY, B.M.; ERZIK, C.; VELIOĞLU-OĞÜNÇ, A.; CETINEL, S.; GEDIK, N.; YEĞEN, B.C. *Ginkgo biloba* extract protects against ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats. **Pharmacological Research**. v.53, p.241-252, 2006.

SIGMA ALDRICH. Saint Louis, 2011. Catálogo de Produtos. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-service-home/product-catalog.html>>. Acesso em 10/02/2011.

SILVEIRA, L. Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.48, n.6, p.812-822, 2004.

SIMÃO, A. N.; SUZUKAWA, A. A. Consumo de Oxigênio, estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes como ferramenta para estudo do mecanismo de injúria oxidativa pré-hemolítica. **Interbio**, v.1 n.1, p. 21-26, 2007.

SMITH, J.V.; LUO, Y. Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v 61, p.465-472, 2004.

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

SONATI, M., COSTA, F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, v.84, p.S40-S51, 2008.

STAMATOYANNOPOULUS, J. Future prospects for treatment of hemoglobinopathies. **West Journal of Medicine**, v.157, p.631-636, 1992.

STOCKS, J.; DORMANDY, T.L. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. **Brazilian Journal of Hematology**, v. 20, p.95-111, 1971.

STUART, M.J., NAGEL, R.L. Sickle cell disease. **Lancet**, v. 364, p. 1343-1360, 2004.

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

TELEN, M.J. Red blood cell surface adhesion molecules: their possible roles in normal human physiology and disease. **Seminars in Hematology**, v.37, n.2, p.130-142, 2000.

TITUS, J.; CHARI, S. GUPTA, M.; PAREKH, N. Pro-oxidant and antioxidant status in patients of sickle cell anemia. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.19, n.2, p.168-172, 2004.

TORRES, L. S.; BELINI JUNIOR, E.; MONTINERI, J. M.; SILVA, D. G. H.; CANÇADO, R. D. ; RICCI JUNIOR, O.; BONINI-DOMINGOS, C.R. **Peroxidação lipídica em doentes falciformes sob uso de hidroxíureia e quelantes de ferro.** In: V Simpósio Brasileiro de Doença Falciforme e Outras Hemoglobinotias, 2009, Belo Horizonte. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. v. 31. p. 27-27, 2009.

TROTTA, R.; SULLIVAN, S.G.; STERN, A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. **Biochemical Journal**, v. 212, p.759-772, 1983.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p.44-84, 2007.

WATANABE, A. M.; PIANOVSKI, M. A. D.; NETO, J. Z.; LICHTVAN, L. C. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA; E. A., DOMINGOS, M. T.; WITTIG, E. O. Prevalência da hemoglobina S no Estado do Paraná, Brasil, obtida pela triagem neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.24, n.5, p. 993-1000, 2008.

WILLIANSO, K.S; HENSLEY, K.; FLOYD, R. Fluorometric and Colorimetric Assessment of Thiobarbituric Acid-Reactive Lipid Aldehydes in Biological Matrices. In: **Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress**. Totowa: Humana Press, 2003.

YEDGAR, S.; KOSHKARYEV, A.; BARSHEIN, G. The red blood cell in vascular occlusion. **Pathophysiology Haemostasis and Thrombosis**, v. 32, p. 263-268, 2002.

ZAGO, M.A.; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, n.3, p.207-214, 2007.

ANEXOS

**ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de portadores de hemoglobina S

Investigador responsável: Railson Henneberg – professor do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná.

Pesquisadora colaboradora: Aline Emmer Ferreira – farmacêutica do Laboratório Escola da UFPR

Local da pesquisa: Laboratório de Citologia e Hematologia Clínica e Laboratório Escola - UFPR

Telefone para contato: (41) 3360-4084 ou (41) 3360-4088, de segunda a sexta, das 8 as 12h e das 13 as 17h.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto “Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de portadores de hemoglobina S”, coordenado pelo pesquisador Railson Henneberg. A anemia falciforme é uma doença que passa dos pais para os filhos e altera os glóbulos vermelhos, células do sangue que circulam por todo o corpo, transportando oxigênio através de um pigmento chamado hemoglobina, que dá a cor vermelha ao sangue. Os glóbulos vermelhos são células arredondadas e elásticas, enquanto o glóbulo vermelho com hemoglobina (S) pode ficar com forma de meia lua ou foice, daí o nome falciforme. Essas células têm sua membrana alterada e rompem-se mais facilmente, causando anemia hemolítica. Já o traço falciforme significa apenas que a pessoa herdou de seu pai ou sua mãe a hemoglobina S, mas não desenvolveu a doença.

Este projeto tem por objetivo estudar as alterações em pacientes com anemia ou traço falciforme e como evitá-las. Para participar, você deve autorizar a coleta de seu sangue, único momento de desconforto. Se você é portador de anemia falciforme, seu sangue será coletado no ambulatório do banco de sangue em que você faz seu acompanhamento periódico, e após sua autorização, 10 mL de sangue será acrescentado ao volume coletado para os exames pré-transfusionais de rotina. Se você é aluno ou funcionário da UFPR e deseja participar da padronização das técnicas, um volume de 20 mL de seu sangue será coletado no Laboratório Clínico-Escola da UFPR. Em ambos os casos, o tubo de sangue será identificado com um código, portanto seu nome não será divulgado. Não haverá benefício direto aos voluntários, mas sim indiretos, por proporcionar avanços científicos relacionados ao conhecimento da doença em questão.

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar o seu consentimento sem penalização. Lembrando que não haverá nenhum custo ou benefício financeiro a você pela participação no estudo.

Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial. Os dados coletados serão usados para a avaliação do estudo. Membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância. Se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

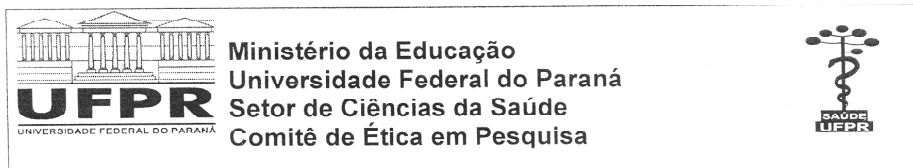
Se tiver alguma dúvida com relação ao estudo, você poderá entrar em contato com os pesquisadores pelos telefones citados. Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante ou depois do estudo.

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL (Se menor ou incapacitado)	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA

ANEXO 2 – PROTOCOLO CEP/SD

Anexos



Curitiba, 28 de outubro de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Railson Henneberg

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de portadores hemoglobina S**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 26 de agosto de 2009 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 28 de outubro de 2009.

Registro CEP/SD: 778.113.09.08 CAAE: 0048.0.091.000-09

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 28/04/2010.

Atenciosamente

Prof.ª Dr.ª Liliana Maria Labronici
 Coordenadora do Comitê de Ética em
 Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª Dr.ª Liliana Maria Labronici
 Coordenadora do Comitê de Ética
 em Pesquisa - SD/UFPR



Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP 80060-240
 Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Anexos

**ANEXO 3 – CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES DO
GRUPO SS**

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES DO GRUPO SS (n= 21)

Paciente	Idade	Sexo	Raça	Tratamento	Necessidade de transfusões*
1	11	M	parda	AF/HDU	1
2	13	M	parda	AF/HDU	0
3	19	M	ND	AF/HDU	0
4	14	M	ND	AF/HDU	1
5	38	F	negra	AF/HDU	0
6	25	F	negra	AF/HDU	0
7	27	M	branca	HDU	0
8	23	M	branca	AF/HDU	0
9	11	F	parda	AF/HDU/Q	4
10	28	F	branca	AF	5
11	23	F	negra	AF/HDU/Q	1
12	21	F	negra	AF	2
13	14	F	negra	AF/HDU/Q	3
14	16	F	branca	AF	0
15	23	F	parda	AF/HDU/Q	0
16	51	M	branca	AF	0
17	29	F	negra	AF/HDU	0
18	14	F	branca	AF/HDU/Q	2
19	14	M	branca	AF/HDU	0
20	9	F	branca	AF/HDU/Q	0
21	15	M	ND	AF/HDU	0

Nota: ND - não descrito; AF – ácido fólico; HDU – hidroxiuréia; Q – quelantes de ferro;

* necessidade de transfusões no último ano.

Centro de Hematologia e Hematologia do Paraná, Curitiba-PR, 2010.

TABELA 1 – VALORES HEMATOLÓGICOS DOS PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME DO GRUPO SS (n= 21)

	Hemoglobina (g/dl)	HCT (%)	RBC (10 ⁶ /μl)	WBC (10 ⁶ /μl)	PLT (10 ⁶ /μl)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (5%)
Média	8,7	26,5	2,6	10,7	548,3	102,3	33,7	33,0
D.P.	1,2	3,7	0,6	4,3	299,8	12,8	4,5	0,9

D.P. - Desvio padrão

Centro de Hematologia e Hematologia do Paraná, Curitiba-PR, 2010.

ANEXO 4 – CERTIFICADOS DE ANÁLISE DO EGb 761

Southern Anhui Dapeng Natural Source Co., Ltd

471 Place (2nd Project), Jixi County, Anhui Province
 Tel: 0086-563-8415888 Fax: 0086-563-8415666


CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product name: Ginkgo Biloba Extract **Batch No.:100125**
Mfg. Date: Jan 25, 2010 **Quantity: 500kg**
Exp. Date: Jan 24, 2012

Test Items	Test Standard	Test Results
Description	Fine, light yellow brown powder Taste bitter	conforms
Total flavone glycosides	Min.24.0%	25.70%
Quercetin		13.47%
Kaempferol		10.31%
Isorhamnetin		1.92%
Total ginkgolides(lactones)	Min.6.0%	6.33%
Ginkgolides A		2.16%
Ginkgolides B		1.14%
Ginkgolides C		0.82%
Bilobalides		2.21%
Ginkgolic Acid	Max.10ppm	Max. 10ppm
Bulk density	0.57-0.66g/ml	0.60g/ml
Loss on drying	Max.4.0%	3.10%
Ethanol residue	Negative	conforms
Residues of other solvents	Negative	conforms
Insolubles in ethanol	Negative	conforms
Heavy metals	Max.10ppm	Max. 10ppm
Arsenic	Max.2ppm	1.57ppm
Ignited ash	Max.1.5%	0.98 %
Mesh size	NLT 100%80mesh	conforms
Total bacterials count	Max.1000CFU/g	conforms
Yeast & mould	Max.100CFU/g	conforms
E.Coli	Negative	conforms
Salmonella	Negative	conforms
Redimental pesticide	Negative	conforms

Storage: Dry place at a room temperature, until 40° C. Protect from Sunlight

Conclusion: It meets the requirement of CP standard.

Quality Supervisor: 

Certificado de Análise

0709/10

Página 1/1

Colombo, 09 de Setembro de 2010

INFORMAÇÃO GERAL

Código: 10321
 Descrição do Produto: Extrato seco de ginkgo
 Lote: 356850

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

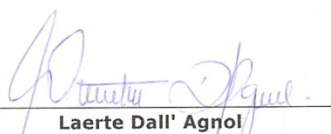
ANALISES	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Aparência	Pó fino	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Cor	Amarelo	De acordo

CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS

ANALISES	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Teor glicosídeos flavônicos	22,0 a 27,0	24,7%
Teor de terpenolactonas	5,4 a 12,0%	7,5%
CCD	Positivo para rutina e ácido clorogênico	Positiva
Teor de ácido ginkgólico	Max. 5 ppm	0
Umidade	Maximo 6,0%	3,4%

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

ANALISES	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas	Máx. 10 ³ UFC/g	< 10 ¹ UFC/g
Contagem de Bolores e Leveduras	Máx. 10 ² UFC/g	< 10 ¹ UFC/g
Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência
Pesquisa de <i>Salmonella sp</i>	Ausência	Ausência
Pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência
Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausência



 Laerte Dall' Agnol
 Gerente da Qualidade
 CRF 9-5623

Furman, Aline Emmer Ferreira

Ação antioxidante de extrato padronizado de *Ginkgo biloba* em eritrócitos de indivíduos normais e de portadores de anemia falciforme, submetidos à sobrecarga oxidativa, *in vitro* / Aline Emmer Ferreira Furman. Curitiba, 2011. 129 f.; 30 cm.

Orientador: Aguinaldo José do Nascimento

Co-Orientadora: Maria Suely Soares Leonart

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Eritrócitos. 2. *Ginkgo biloba*. 3. Estresse oxidativo. 4. Composto azo. 5. Anemia falciforme. I. Título. II. Nascimento, Aguinaldo José do. III. Leonart, Maria Suely Soares.

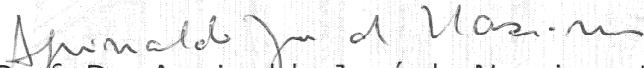
CDD 615.32

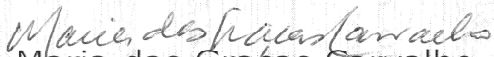
TERMO DE APROVAÇÃO


ALINE EMMER FERREIRA FURMAN

Título: Ação antioxidante de extrato padronizado de *Ginkgo biloba* em eritrócitos de indivíduos normais e de portadores de anemia falciforme submetidos à sobrecarga oxidativa, *in vitro*

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Prof. Dr. Aginaldo José do Nascimento
Orientador


Prof. Dr. Maria das Graças Carvalho
Universidade Federal de Minas Gerais


Profª. Drª. Silvia Maria Suter Correia Cadena
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de março de 2011.