

LIGIA MARIA CLARO

**AÇÃO *IN VITRO* DAS VITAMINAS C e E EM ERITRÓCITOS  
HUMANOS SUBMETIDOS À SOBRECARGA OXIDATIVA  
INDUZIDA PELO CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA**

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

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo José do  
Nascimento

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Suely Soares

CURITIBA

2002

**“Ação *in vitro* das vitaminas C e E nos eritrócitos humanos submetidos à sobrecarga oxidativa induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina”**

por

**LÍGIA MARIA CLARO**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Banca Examinadora formada pelos Professores**



**Prof. Dr. Aguiinaldo José do Nascimento (Orientador/Presidente)**



**Prof. Dr. Orlando Cesar de Oliveira Barretto (Titular/USP)**



**Prof.<sup>a</sup> Dra. Vânia Manfredini Alcântara (Titular/UFPR)**

**Curitiba, 26 de junho de 2002**

## **LIGIA MARIA CLARO**

Farmacêutica Bioquímica graduada pela Universidade Federal do Paraná em maio de 1999. Atuação no Projeto 'Núcleo de Investigação Laboratorial de Anemias Hemolíticas' como bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq – UFPR) durante o período de 1996 a 1999. Atualmente, professora substituta da Disciplina de Hematologia II do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

*De tudo ficaram três coisas:*

*A certeza de que estamos sempre começando...*

*A certeza de que precisamos continuar...*

*A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...*

*Portanto, devemos:*

*Fazer da interrupção um caminho novo...*

*Da queda um passo de dança...*

*Do medo, uma escada...*

*Do sonho, uma ponte...*

*Da procura, um encontro...*

*Fernando Pessoa*

*Aos meus pais, Luzia e Messias, por sempre acreditarem no meu sucesso e terem me dado como herança, o estudo.*

*Ao meu irmão Junior, pelo carinho.*

*Ao Christian, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Aguinaldo José do Nascimento, pela amizade inestimável, disponibilidade, paciência, dedicação e pelos conhecimentos em estatística e informática.

À minha co-orientadora e eterna professora, Maria Suely Soares, por ter estendido as mãos quando dei meus primeiros passos no caminho da Ciência. Agradeço o apoio, a confiança, a dedicação e acima de tudo, a sua preciosa amizade.

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

À colega de curso e amiga, Juliana Ferreira de Moura, pelo desprendimento em emprestar seu computador, ajuda inestimável na realização deste trabalho.

Ao professor Obdúlio Gomes Miguel, pelo apoio no início deste curso.

À Regina Montrez, secretária do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela atenção dispensada durante a realização do curso.

À professora Almeriane Maria Weffort Santos, pela ajuda com as fotos, pelos conhecimentos em Hematologia, companheirismo, entusiasmo e alegria.

Ao amigo e colega de curso, Samuel Ricardo Comar, pela amizade e companheirismo ao longo do Curso, pela troca de idéias e momentos de descontração.

À amiga e colega, Andréa Emília Marques Stingham, pelo carisma, pela amizade constante e desprendimento em ajudar em todos os momentos, principalmente na elaboração desta dissertação.

À Irene Ermelino Santos, funcionária do Laboratório de Citologia Clínica do Curso de Farmácia da UFPR, pela presença constante e pelo auxílio e cooperação na lavagem do material usado nos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Citologia Clínica, em especial a Caroline Luise Prochaska e Fernanda Emendörfer, bolsistas de Iniciação Científica, pela amizade e disponibilidade em ajudar.

Aos alunos e professores do Laboratório de Farmacognosia I e II do Curso de Farmácia, em especial ao professor Cid Aimbiré Moraes Santos, por facilitarem o acesso ao espectrofotômetro durante toda a realização deste trabalho.

Aos professores responsáveis pelo Laboratório de Bioquímica Clínica I e II do Curso de Farmácia, pelo livre acesso ao laboratório.

Aos professores do Laboratório de Parasitologia Clínica do Curso de Farmácia, pelo empréstimo do microscópio, ajuda valiosa na realização das fotos.

Aos professores do Laboratório de Fitoquímica do Curso de Farmácia, pelo acesso irrestrito aos seus equipamentos.

Às amigas Glória Yoshie Nitta e Geisa Tavares Tencatti por sempre me incentivarem a continuar.

À Casa da Estudante Universitária de Curitiba (CEUC), por ter me abrigado durante toda a graduação e parte da pós-graduação.

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

A Deus, que me deu forças para continuar e vencer mais este desafio.

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | viii |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....  | x    |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....  | xi   |
| <b>RESUMO</b> .....  | xiii |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | xiv  |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 01   |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 04   |
| 2.1 ERITRÓCITO HUMANO MADURO .....   | 05   |
| 2.1.1 Membrana Eritrocitária .....   | 05   |
| 2.1.2 Hemoglobina .....  | 07   |
| 2.1.3 Metabolismo Energético .....   | 07   |
| 2.1.4 Hemólise .....   | 09   |
| 2.2 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO .....   | 10   |
| 2.3 O ERITRÓCITO HUMANO E O ESTRESSE OXIDATIVO .....                                       | 13   |
| 2.3.1 Oxidação da Hemoglobina .....  | 14   |
| 2.3.2 Peroxidação Lipídica e Oxidação de Proteínas da Membrana .....                       | 16   |
| 2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE DO ERITRÓCITO .....   | 17   |
| 2.4.1 Vitamina C .....   | 20   |
| 2.4.2 Vitamina E .....   | 22   |
| 2.4.3 Interação Entre Vitaminas C e E .....  | 23   |
| 2.5 DOENÇAS HEMOLÍTICAS CORRELACIONADAS COM O ESTRESSE OXIDATIVO .....                     | 25   |
| 2.5.1 Eritrócitos com Sensibilidade Aumentada ao Estresse Oxidativo .....                  | 25   |
| 2.5.2 Eritrócitos sob Ação de Drogas Oxidantes .....                                       | 27   |
| 2.6 USO DE VITAMINA C e E NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS<br>HUMANAS .....            | 28   |
| <b>3 OBJETIVO</b> .....  | 30   |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 32   |
| 3.1 COLETA .....   | 33   |
| 3.2 ISOLAMENTO DOS ERITRÓCITOS .....   | 33   |
| 3.3 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES .....                            | 33   |
| 4.3.1 Amostras com Vitamina C (Ácido L-Ascórbico) .....                                    | 33   |
| 4.3.2 Amostras com Vitamina E (Acetato de $\alpha$ -Tocoferol) .....                       | 34   |
| 4.3.3 Amostras Tratadas com Vitamina C e Vitamina E .....                                  | 34   |
| 4.4 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM SUBSTÂNCIA OXIDANTE CLORIDRATO<br>DE FENIL-HIDRAZINA ..... | 35   |
| 4.4.1 Amostras Tratadas com Vitamina C ou Vitamina E .....                                 | 35   |
| 4.4.2 Amostras Tratadas com Vitamina C e Vitamina E .....                                  | 35   |
| 4.4.3 Amostras Controle Tratadas com Cloridrato de Fenil-hidrazina .....                   | 35   |
| 4.5 CONTAGEM DE CORPOS DE HEINZ .....  | 36   |
| 4.6 DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA .....                                      | 36   |
| 4.7 DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA GSH .....  | 38   |
| 4.7.1 Preparo do Hemolisado .....  | 38   |
| 4.7.2 Dosagem da Concentração da Hemoglobina .....   | 39   |
| 4.7.3 Dosagem da Concentração de GSH .....   | 39   |
| 4.7.4 Cálculos e Valores de Referência .....   | 39   |
| 4.8 DETERMINAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE HEMÓLISE .....  | 40   |
| 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 41   |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....  | 43   |
| <b>6 DISCUSSÃO</b> .....   | 63   |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....  | 74   |
| <b>8 REFERÊNCIAS</b> .....   | 77   |
| <b>9 ANEXO</b> .....   | 90   |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 01 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA GLICÓLISE, DO CICLO DAS PENTOSE E DO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT EM ERITRÓCITOS.....   | 08 |
| FIGURA 02 - ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA C.....  | 20 |
| FIGURA 03 - ESTRUTURA QUÍMICA DO $\alpha$ -TOCOFEROL.....   | 22 |
| FIGURA 04 - FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 0,3 A 5 mM.....   | 44 |
| FIGURA 05 - FOTOMICROGRAFIA DE ERITRÓCITOS CONTENDO CORPOS DE HEINZ FORMADOS PELA AÇÃO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....   | 45 |
| FIGURA 06 - FOTOMICROGRAFIA DE ERITRÓCITOS CONTENDO CORPOS DE HEINZ FORMADOS PELA AÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 5 mM.....   | 45 |
| FIGURA 07 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 0,3 A 5 mM.....   | 46 |
| FIGURA 08 - CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 0,3 A 5 mM.....                                | 48 |
| FIGURA 09 - PORCENTAGENS MÉDIAS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS SUBMETIDOS À AÇÃO DE FENIL-HIDRAZINA 0,3 A 5 mM.....   | 50 |
| FIGURA 10 - FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO VITAMINA C 10 A 90 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....                    | 50 |
| FIGURA 11 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO VITAMINA C 0,5 A 5 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....                    | 51 |
| FIGURA 12 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO VITAMINA C 10 A 90 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....                    | 52 |
| FIGURA 13 - CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C 0,5 A 80 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM..... | 53 |
| FIGURA 14 - PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C 10 A 90 mM.....   | 54 |

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 15 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C 10 A 90 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....                     | 55 |
| FIGURA 16 - FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA E 3 A 80 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....                   | 56 |
| FIGURA 17 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA E 0,1 A 2 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM. ....                 | 57 |
| FIGURA 18 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA E 3 A 80 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....                   | 58 |
| FIGURA 19 - CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA E 0,1 A 35 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....  | 59 |
| FIGURA 20 - FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C E VITAMINA E COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....                | 60 |
| FIGURA 21 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C E VITAMINA E COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.....                | 61 |
| FIGURA 22 – CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C E VITAMINA E COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM..... | 62 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1 – TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS SOB A AÇÃO DO CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA EM RELAÇÃO AO CONTROLE, COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM OXIDANTE ..... | 47 |
| TABELA 2 – TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS SOB A AÇÃO DO CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA EM RELAÇÃO AO CONTROLE, COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM OXIDANTE .....         | 49 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATP - adenosina 5' Trifosfato  
ADP - adenosina 5' Difosfato  
CF - cloridrato de fenil-hidrazina  
2,3-BPG - 2,3-bisfosfoglicerato  
BPGM – bisfosfogliceromutase  
BPGP – bisfosfoglicerato fosfatase  
DNA - ácido desoxirribonucléico  
DTNB - 5, 5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)  
FAD – flavina adenina dinucleotídeo fosfato  
FADH - flavina adenina dinucleotídeo fosfato reduzido  
GAPD – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
G6-PD - glicose 6-fosfato desidrogenase  
GR – glutationa redutase  
GSH - glutationa reduzida  
GSH-Px - glutationa peroxidase  
GSSG - glutationa oxidada  
Hb - hemoglobina  
Hbe - hemoglobina extracelular  
Hk - hexoquinase  
IgG - imunoglobulina G  
LDH – lactato desidrogenase  
LDL - lipoproteína de baixa densidade  
MDA - malonildialdeído  
MetaHb - metahemoglobina  
NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido  
NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido  
PBS - tampão fosfato salino

PFK – fosfofrutoquinase

6PGD - 6 – fosfogliconato desidrogenase

PGI – fosfoglicose isomerase

PGK – fosfoglicerato quinase

PGM - fosfogliceratomutase

PK – piruvato quinase

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

SOD - superóxido dismutase

TPI – triose fosfato isomerase

VC - vitamina C

VE - vitamina E

## RESUMO

No eritrócito humano maduro, o estresse oxidativo provoca a desnaturação da hemoglobina e a formação de complexos de ferro que, possivelmente, ocasionam anormalidades da membrana eritrocitária e contribuem para a destruição prematura do eritrócito. O eritrócito está equipado com um sistema antioxidante dependente de glutathiona reduzida (GSH), vitaminas C e E, enzimas, entre outros. Este trabalho tem por objetivo estudar a ação oxidante de cloridrato de fenil-hidrazina (CF) sobre o eritrócito humano, associada ao efeito protetor antioxidante de vitamina C (VC) e de vitamina E (VE). Coletou-se sangue venoso de indivíduos saudáveis, em EDTAK<sub>3</sub>. Lavou-se os eritrócitos em tampão fosfato-salino (PBS) três vezes por centrifugação a 1500 x g, ressuspendendo-os em PBS em volume globular de 35%. Submeteu-se os eritrócitos à ação oxidante de CF durante 20 minutos, com ou sem pré-incubação durante 60 minutos com VC e/ou VE. Realizou-se a contagem de corpos de Heinz em técnica preconizada por BEUTLER *et al.* (modificada por CLARO *et al.*, **Rev. Bras. Anál. Clin.**, **30**: 94, 1998). Determinou-se a concentração de metahemoglobina em técnica de EVELYN e MALLOY (modificada por BEUTLER *et al.*, **Hematology**, 1995); a concentração de GSH [BEUTLER *et al.*, **J. Lab. Clin. Med.**, **61**: 882, 1963] e a porcentagem de hemólise [PELISSARI *et al.*, **Rev. Bras. Anál. Clin.**, **25**: 14, 1993]. Observou-se um aumento da formação de corpos de Heinz (6,1-97,6%) e de metahemoglobina (2,4-21,6%) em função da concentração de CF (0,3-5 mM). A concentração de GSH diminuiu (4,05-2,67  $\mu$ moles/g Hb) e não se observou hemólise significativa em função do aumento de CF (0,3-5 mM). A formação de corpos de Heinz de  $21,6 \pm 3,8\%$  por CF 1 mM foi inibida (8,4-0,2%) em função da concentração VC (10-90 mM). A VC (0,5-80 mM) diminuiu a formação de metahemoglobina induzida por CF 1 mM. Porém, na concentração de 90 mM, a VC não só pareceu perder o efeito antioxidante, como também provocou o aumento da formação de metahemoglobina. A VC (0,5-80 mM) não recuperou a GSH depletada por CF 1 mM. A VC (10-90 mM) provocou hemólise significativa (1,2; 1; 0,9 e 1,1%) nas concentrações de 10, 20, 80 e 90 mM; porém, em presença de CF 1 mM, provocou índices de hemólise mais significativos a partir de 30 mM (1,9%), e altas porcentagens em 80 e 90 mM (3,5 e 8,3%). A formação de corpos de Heinz de  $20,3 \pm 1,3\%$  por CF 1 mM foi inibida (19-7,2%) em função da concentração de VE (0,1-80 mM). A VE (0,1-2 mM) diminuiu a formação de metahemoglobina induzida por CF 1 mM. Entre 3-80 mM de VE não houve efeito sobre a concentração da metahemoglobina formada por CF 1 mM. A VE (0,1-35 mM) não recuperou a GSH depletada por CF 1 mM. Ao se investigar uma possível ação sinérgica entre VC e VE, nas concentrações de 2 e 20 mM, na proteção contra a oxidação por CF 1 mM, observou-se que a presença de VE e VC juntas não contribuiu para aumentar o efeito inibitório sobre a formação de corpos de Heinz ou para inibir a diminuição de GSH, e reduziu a eficiência na inibição da formação de metahemoglobina. De um modo geral, os resultados obtidos sugerem que VC e VE contribuem para a diminuição do estresse oxidativo causado por CF. Porém, não se observou ação sinérgica entre ambas.

## ABSTRACT

In the mature human erythrocyte, the oxidative stress produces the oxidation of the hemoglobin and the formation of complexes of iron and products of the hemoglobin denaturation, that possibly cause abnormalities on erythrocyte membrane and they contribute to the premature erythrocyte destruction. The erythrocytes have an antioxidant system, dependent on reduced glutathione (GSH), vitamins C and E, and enzymes, among others. The aim of this work was to study the oxidative action of phenylhydrazine hydrochloride (CF) on the human erythrocyte, associated to the antioxidant protective effect of vitamin C (VC) and vitamin E (VE). Venous blood was collected in EDTAK<sub>3</sub>, from healthy individuals. The erythrocytes were washed three times in phosphate-saline buffer (PSB) by centrifugation at 1500 x g, resuspended in PSB in order to obtain 35% globular volume, and then submitted to the oxidative action of CF for 20 minutes, with or without previous incubation for 60 minutes with VC, VE or both. Heinz bodies were evaluated according to BEUTLER *et al.* [modified by CLARO *et al.*, **Rev. Bras. Anál. Clin.**, **30**: 94, 1998]. It was determined the methemoglobin concentration [EVELYN & MALLOY, modified by BEUTLER *et al.*, **Hematology**, 1995], GSH concentration [BEUTLER *et al.*, **J. Lab. Clin. Med.**, **61**: 882, 1963] and the hemolysis percentage [PELISSARI *et al.*, **Rev. Bras. Anál. Clin.**, **25**: 14, 1993]. Increase on Heinz bodies' formation (6.1 - 97.6%) and methemoglobin (2.4-21.6%) were observed as a function of the concentration of CF (0.3-5 mM). The concentration of GSH decreased (4.05 - 2.67  $\mu$ moles/g Hb) and the hemolysis percentage did not modify as function of the increase of CF (0.3-5 mM). Heinz bodies' formation of  $21.6 \pm 3.8\%$  by CF 1 mM was inhibited (8.4-0.2%) as function of the VC concentration (10-90 mM). VC (0.5-80 mM) decreased the methemoglobin formation induced by CF 1 mM. In the concentration of 90 mM, VC, not only it seemed to lose the antioxidant effect, but it promoted the increase on the methemoglobin formation. VC (0.5-80 mM) did not recover the GSH depleted by CF 1 mM. VC produced significant hemolysis (1.2; 1; 0.9 and 1.1%), respectively at concentrations of 10, 20, 80 and 90 mM. But, in the presence of CF 1 mM the hemolysis indexes were more accentuated from 30 mM (1.9%) to 80 and 90 mM (3.5 and 8.3%). Heinz bodies' formation of  $20.3 \pm 1.3\%$  by CF 1 mM was inhibited (19-7.2%) as function of the concentration of VE (0.1 - 80 mM). VE (0.1-2 mM) decreased the methemoglobin formation induced by CF 1 mM. In the range of 3-80 mM VE did not lowered the concentration of the methemoglobin formed by CF 1 mM. VE did not recover the GSH depleted by CF 1 mM. When investigated a possible synergic action between VC and VE, at concentrations of 2 and 20 mM, in the protection against the oxidation by CF 1 mM, it was observed that the presence of VE together with VC, did not increase its inhibiting effect over the formation of Heinz bodies, they showed decreased efficiency in the inhibition of the methemoglobin formation and did not contribute to inhibit the decrease of GSH. In general, the results obtained suggest that VC and VE contribute to the decrease of the oxidative stress caused by CF, but no synergic action was observed.

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres são espécies químicas, geralmente muito reativas, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e são produzidos continuamente nas células aeróbias como produtos intermediários do metabolismo (ANDERSON; PHILLIPS, 1999). Os organismos superiores desenvolveram sistemas antioxidantes eficientes contra os danos resultantes da ação destes radicais. Quando, porém, existe um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de radicais livres em favor destes últimos, ocorre o chamado estresse oxidativo, o qual está relacionado a inúmeras condições fisiopatológicas como isquemia, trauma nervoso, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e câncer (KEHRER, 2000; TAVAZZI *et al.*, 2000).

O eritrócito humano maduro é excepcionalmente vulnerável ao perigo de um ambiente aeróbio, pois é carregado com ferro e lipídios insaturados, elementos que contribuem para a formação de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente, sobrecarga oxidativa (HEBBEL, 1986). Esta sobrecarga causa a formação de complexos de ferro e de produtos da desnaturação da hemoglobina, que possivelmente ocasionam anormalidades da membrana eritrocitária e contribuem para a destruição prematura do eritrócito (HATHERILL *et al.*, 1991).

Para a manutenção do estado reduzido da célula, o eritrócito possui várias formas de defesa antioxidante, entre elas, a ação de substâncias coletoras de radicais livres e de sistemas enzimáticos. A glutathiona reduzida (GSH), a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADPH) e as vitaminas C e E são alguns dos antioxidantes não enzimáticos (FREI, 1999; TAVAZZI *et al.*, 2000).

Quando as defesas antioxidantes estão limitadas, os mecanismos de redução não são hábeis para atenuar eficientemente as conseqüências do aumento da auto-oxidação da hemoglobina. Estas modificações incluem a diminuição de enzimas, GSH, vitamina E, entre outras. Modificações similares têm sido relatadas em condições nas quais há envolvimento de mecanismos oxidativos, como anemia falciforme, deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6-PD), talassemias, entre outras (CHAN *et al.*, 1999). Alguns medicamentos de uso corrente podem levar o eritrócito a

um estresse oxidativo, com danos irreversíveis ao mesmo, como é o caso de alguns analgésicos, drogas antimaláricas e algumas drogas usadas no tratamento do câncer (MALEC *et al.*, 1994; TÜKEL, 1995). A fenil-hidrazina é um exemplo clássico de droga que induz dano oxidativo. Esta droga, usada historicamente contra a policitemia vera, mostrou produzir, *in vivo*, hemólise intravascular associada à metahemoglobinemia e formação de corpos de Heinz (STERN, 1989).

O emprego de vitaminas C e E e de outros antioxidantes pode inibir a hemólise oxidativa em eritrócitos. A vitamina E é conhecida como o mais potente antioxidante da membrana eritrocitária, onde previne a peroxidação lipídica. A vitamina C tem reconhecido papel como antioxidante e coletora de radicais livres. Essas vitaminas podem interagir através da capacidade da vitamina C em reciclar a vitamina E. Alguns estudos demonstraram que a suplementação com vitamina E pode melhorar os sintomas clínicos de indivíduos portadores de anemias hereditárias, que apresentam aumento do estresse oxidativo, como a anemia falciforme e deficiência de G6-PD (CHAN *et al.*, 1999).

Observando-se as características das vitaminas C e E e o processo oxidativo envolvido em diversas doenças hematológicas, considerou-se relevante o estudo da ação antioxidante de vitaminas C e E em eritrócitos submetidos a sobrecarga oxidativa por fenil-hidrazina.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ERITRÓCITO HUMANO MADURO

O eritrócito humano maduro é uma célula altamente especializada, anucleada, sem organelas e que vive cerca de 120 dias na circulação. Possui flexibilidade fisiológica notável, transportando oxigênio (O<sub>2</sub>) aos tecidos através da hemoglobina (DACIE; LEWIS, 1995).

As propriedades morfofisiológicas do eritrócito, as patologias eritrocitárias, a sua preservação *in vitro*, bem como a facilidade para a sua obtenção contribuem para a sua ampla utilização como modelo experimental (FERRALI *et al.*, 1992).

#### 2.1.1 Membrana Eritrocitária

A membrana do eritrócito humano é constituída de uma bicamada lipídica com 40% de lipídios, 52% de proteínas e 8% de carboidratos (DODGE *et al.*, 1963; HAEST, 1982). A organização destes componentes é crítica para a função da membrana. Os lipídios são compostos principalmente por colesterol não esterificado e fosfolipídios, em concentrações equimoleculares. Os fosfolipídios estão arranjados na bicamada com as suas cabeças polares voltadas para fora, onde interagem com o ambiente aquoso dos meios intra e extracelulares, enquanto as cadeias hidrofóbicas estão orientadas para o interior da bicamada (HARRIS, 1991; ALBERTS *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1999).

A distribuição dos fosfolipídios e dos glicolipídios na bicamada é assimétrica e sua arquitetura é mantida através da interação entre grupos sulfidril das proteínas e de atividades enzimáticas (CATANIA; CAIMI, 1992). Os glicolipídios estão presentes na face externa da bicamada, junto com fosfatidilcolina, esfingomiéline e fosfatidiletanolamina, enquanto fosfatidilserina e fosfatidilinositídeos estão na face interna (HARRIS, 1991; ALBERTS *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1999).

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

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

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

### 2.1.2 Hemoglobina

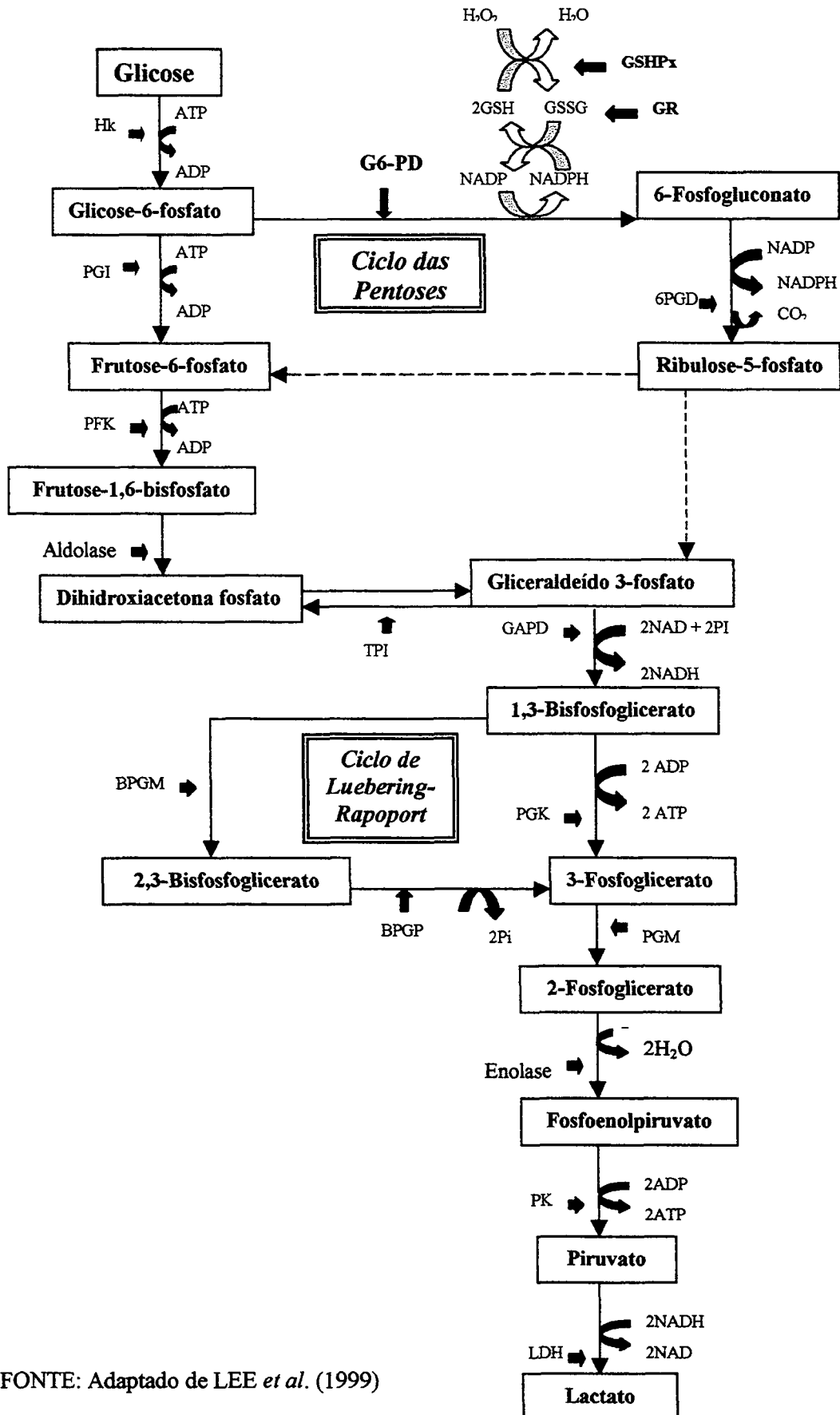
A hemoglobina, proteína transportadora de O<sub>2</sub>, ions hidrogênio (H<sup>+</sup>) e outros gases como o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), constitui cerca de 95% das proteínas presentes no citosol do eritrócito. As outras proteínas são enzimas requeridas para a produção de energia e para a manutenção da hemoglobina na forma reduzida, seu estado funcional (LEE *et al.*, 1999).

A molécula de hemoglobina é composta por quatro cadeias polipeptídicas, as globinas, arranjadas de forma tetraédrica. A hemoglobina A, presente em maior quantidade no adulto, é constituída por cadeias do tipo  $\alpha$  e  $\beta$ . Cada uma dessas quatro cadeias contém um grupo prostético, o heme, o qual está localizado em fendas apolares próximas da face externa da molécula, uma em cada subunidade. O grupamento heme é constituído de um átomo de ferro (Fe) e um anel tetrapirrólico, a protoporfirina. O Fe, na sua forma ferrosa (Fe<sup>+2</sup>), é capaz de ligar-se a uma molécula de O<sub>2</sub> e de liberá-lo aos tecidos quando há aumento do pH, da temperatura e da concentração de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). Este último é um fosfato orgânico produzido no ciclo de Luebering-Rapoport, um desvio da via glicolítica exclusivo do eritrócito (STRYER, 1995; LEE *et al.*, 1999).

### 2.1.3 Metabolismo Energético

No eritrócito, a manutenção da forma, bem como da estrutura da membrana e da hemoglobina dependem de duas vias para a produção de compostos altamente energéticos: a via glicolítica anaeróbia ou via de Embden-Meyerhof e a via aeróbia do ciclo das pentoses (Figura 1), também chamada de via das hexose monofosfato (JANDL, 1996; LEE *et al.*, 1999). Em situações normais, aproximadamente 90% da glicose é metabolizada pela via anaeróbia e 10% pela via aeróbia. Entretanto, em situações de estresse oxidativo, esse quadro pode se inverter (SCHUSTER *et al.*, 1988).

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



FONTE: Adaptado de LEE *et al.* (1999)

Na via glicolítica anaeróbia, três importantes produtos são formados: nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), um cofator na reação da metahemoglobina redutase; o ATP, importante para a manutenção das bombas de íons; e o 2,3-BPG, que atua sobre a função da hemoglobina. Entre as onze enzimas que atuam na glicólise, três são particularmente importantes na regulação da via glicolítica anaeróbia, a fosfofrutoquinase (PFK), a piruvato quinase (PK) e a hexoquinase (Hk) (LEE *et al.*, 1999).

O produto mais importante do ciclo das pentoses é o NADPH, que mantém os níveis normais de GSH, a qual é capaz de impedir a oxidação de lipídios e de proteínas, em especial da hemoglobina (JAIN *et al.*, 1983; CHAN *et al.*, 1999). O NADPH é gerado quando a glicose 6-fosfato, oriunda da via glicolítica anaeróbia, é oxidada até ribose 5-fosfato (STRYER, 1995).

A utilização de NADPH é o principal estímulo para a utilização de G6-PD pelo ciclo das pentoses. Alguns agentes redutores tais como, azul de metileno, cisteína, ascorbato e outros, podem estimular em até vinte vezes o ciclo das pentoses, presumivelmente por causar a oxidação da GSH. Esta flexibilidade metabólica permite ao eritrócito responder a estresses oxidativos inesperados (DAVIDSON; TANAKA, 1972).

#### 2.1.4 Hemólise

O termo hemólise abrange todos os mecanismos diretos e indiretos que causam a destruição do eritrócito (JANDL, 1996).

Durante o envelhecimento do eritrócito ocorrem mudanças como: diminuição da velocidade da glicólise, depleção de intermediários de alta energia e de atividades enzimáticas, susceptibilidade aumentada ao estresse oxidativo ocasionado por fatores externos ou pela auto-oxidação da hemoglobina e formação do antígeno senescente, o qual ocasiona a formação de um anticorpo IgG autólogo. Quando o eritrócito torna-se senescente, é retirado da circulação através de mecanismos de fragmentação, eritrofagocitose e lise osmótica (SEAMAN *et al.*, 1980).

A eritrofagocitose é a forma mais comum de destruição de eritrócitos senescentes. Os anticorpos IgG autólogos ligam-se a receptores nos macrófagos esplênicos, ocasionando a retirada dos eritrócitos da circulação. Na fragmentação, ocorre perda de pedaços da membrana devido a traumas na circulação ou devido a inclusões no interior do eritrócito (LEE *et al.*, 1999).

Aproximadamente 90% dos eritrócitos são destruídos através da hemólise extravascular, que acontece principalmente no baço. Este tipo de hemólise é mais sensível às células que sofreram alguma injúria, seja ela oxidativa ou da membrana. A hemólise intravascular é responsável por 10% da destruição dos eritrócitos (JANDL, 1996).

## 2.2 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são espécies químicas, geralmente muito reativas, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. São produzidos continuamente nas células como produtos intermediários do metabolismo (ANDERSON; PHILLIPS, 1999). Os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbias são o O<sub>2</sub> e seus radicais (CHEESEMAN; SLATER, 1996).

A transição de nosso planeta para uma biosfera com O<sub>2</sub> abundante permitiu a evolucionária proliferação de organismos com vias metabólicas altamente energéticas. Estes acontecimentos requisitaram um fluxo seguro de O<sub>2</sub> do ambiente para os tecidos (ANDERSON; PHILLIPS, 1999). No homem, bem como em outros animais, o transporte e o metabolismo do O<sub>2</sub> passaram a ser então, de responsabilidade do Fe, que desempenha seu papel através da hemoglobina, citocromos e mioglobina. A importância metabólica do Fe reside na facilidade com que ele transfere elétrons para o O<sub>2</sub>. Entretanto, a exposição das células aos radicais livres do O<sub>2</sub> é uma consequência inevitável da existência aeróbia (HEBBEL 1986; HALLIWELL, 1999; NOGUCHI *et al.*, 2000).

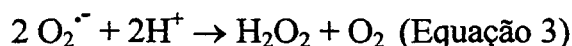
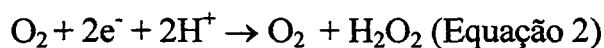
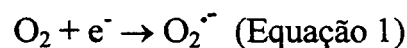
As espécies reativas do O<sub>2</sub> são produzidas em organismos vivos através da redução parcial do O<sub>2</sub> molecular, sob condições patológicas e fisiológicas. Estes

radicais possuem a capacidade de reagir não especificamente com um vasto número de compostos como proteínas, lipídios, DNA, entre outros. Essas espécies químicas estão habitualmente envolvidas com estresse oxidativo (KEHRER, 2000; TAVAZZI *et al.*, 2000), o qual é definido como uma ruptura do equilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes em favor destes últimos, levando a danos celulares ou teciduais (CHEN *et al.*, 2000; KEHRER, 2000).

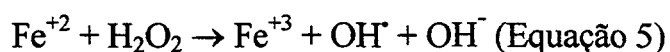
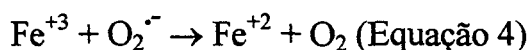
Existem muitas fontes, *in vivo*, de espécies reativas do O<sub>2</sub>, como por exemplo, auto-oxidação, reações fotoquímicas e enzimáticas, envolvendo compostos endógenos e vários xenobióticos. Há uma infinidade de enzimas capazes de gerar espécies reativas do O<sub>2</sub>, entre elas citocromo P450 redutases, oxidases, peroxidases, lipoxigenases e desidrogenases (FINKEL, 1999). Sob condições normais, a fonte principal de radicais livres é o ‘escape’ eletrônico das cadeias de transporte, como aquelas da mitocôndria, para o O<sub>2</sub> molecular, gerando ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (CHEESEMAN; SLATER, 1996). Em células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos, pode ocorrer a formação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em resposta a organismos e partículas estranhos (ANDERSON; PHILLIPS, 1999).

As principais espécies de O<sub>2</sub> formadas são O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical hidroxil (OH<sup>•</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e peróxidos lipídicos. Estes compostos têm uma meia vida muito curta mas mesmo assim, podem causar graus variados de toxicidade na célula, levando a lesões transitórias ou permanentes (SALTMAN, 1989).

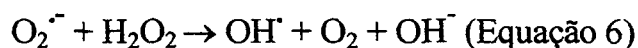
O ânion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é formado a partir da redução do O<sub>2</sub> pela transferência de um elétron (e<sup>-</sup>) doado pela hemoglobina, citocromos, quinonas, tióis ou metais de transição (Equação 1). Uma remoção de dois elétrons pode levar à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Equação 2). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser gerado também pela reação de dois O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, em uma reação chamada de dismutação (Equação 3), que ocorre espontaneamente ou é catalisada por superóxido dismutase (SOD) (SALTMAN, 1989; CHEESEMAN; SLATER, 1996).



O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um agente oxidativo, mas não essencialmente reativo. O seu papel principal reside no fato de ser uma fonte de radicais  $\text{OH}^\cdot$  na presença de metais de transição (Fe, Cu) como catalisadores (Equação 4 e 5). Na ausência desses metais, o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  são prontamente removidos (CHEESEMAN; SLATER, 1996).



A reação abaixo (Equação 6), chamada de reação de Haber-Weiss, é a soma das equações 4 e 5 e só foi considerada de importância biológica após o reconhecimento dos radicais livres. A reação é termodinamicamente desfavorável em sistemas biológicos, justificando a necessidade dos metais de transição como catalisadores para que a mesma aconteça. A reação de Haber-Weiss é considerada o principal mecanismo pelo qual o  $\text{OH}^\cdot$  é gerado em sistemas biológicos (LIOCHEV, 1999; KEHRER, 2000).



O  $\text{OH}^\cdot$  é extremamente reativo e parece ser o mais tóxico radical envolvido no estresse oxidativo, combinando-se rapidamente com uma vasta gama de moléculas biológicas (SALTMAN, 1989; KEHRER, 2000).

As espécies reativas do  $\text{O}_2$  podem oxidar bases do DNA ou lesá-lo diretamente, interferindo com os mecanismos de reparo, afetando a divisão celular ou mediando a ativação de carcinógenos. Essas espécies reativas do  $\text{O}_2$ , principalmente o  $\text{OH}^\cdot$ , têm o potencial de modular o desenvolvimento de câncer ou desequilibrar as funções celulares durante eventos tóxicos não carcinogênicos (KLAUNIG *et al.*, 1998).

Muitas classes de biomoléculas podem ser lesadas pelos radicais livres porém, os lipídios são os mais susceptíveis. A destruição oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, conhecida como peroxidação lipídica, é particularmente lesiva porque se processa como uma reação em cadeia. As duplas ligações encontradas nos ácidos graxos poliinsaturados são os alvos para o ataque dos radicais livres. A subtração de

um átomo de hidrogênio de uma dessas duplas ligações fornece um radical de ácido graxo que interage prontamente com o O<sub>2</sub> molecular, o qual é um diradical, formando o radical peroxil lipídico. Os radicais peroxil formados são carreadores da reação, pois podem oxidar mais moléculas de ácidos graxos e iniciar novas reações em cadeia, produzindo hidroperóxidos lipídicos. Estes são instáveis e podem se decompor em malonildialdeído (MDA) e outros aldeídos. Essas reações em cadeia progredem lesando canais iônicos, inativando proteínas de transporte ou enzimas e tornando a bicamada lipídica mais permeável a íons. Uma vez iniciada, a peroxidação lipídica só termina quando muitas moléculas de ácido graxo foram lesadas (CHIU *et al.*, 1989; HATHERILL *et al.*, 1991; CHEESEMAN; SLATER, 1996; KEHRER, 2000).

As proteínas podem ser oxidadas pelos radicais livres, formando produtos reativos, entre os quais estão os hidroperóxidos protéicos, que geram outros radicais quando interagem com metais de transição (DEAN *et al.*, 1997). A lesão das proteínas só é significativa para a viabilidade celular quando se acumula, o que na maioria das células não é provável devido aos mecanismos de remoção dessas proteínas inativas; ou se a lesão se concentra em sítios específicos de proteínas como, por exemplo, as que se ligam a metais de transição, como a hemoglobina (CHEESEMAN; SLATER, 1996; GRUNE *et al.*, 1997).

### 2.3 O ERITRÓCITO HUMANO E O ESTRESSE OXIDATIVO

O eritrócito é excepcionalmente vulnerável ao perigo de um ambiente aeróbio, pois é carregado com Fe e lipídios insaturados, elementos que contribuem para a formação de espécies reativas do O<sub>2</sub> e, conseqüentemente, para o estresse oxidativo (HEBBEL, 1986).

As lesões do eritrócito, causadas por uma sobrecarga oxidativa, são geralmente o resultado final de dois processos: a oxidação e desnaturação da hemoglobina e o ataque de radicais livres aos lipídios e às proteínas da membrana. Quando há sobrecarga das defesas antioxidantes do eritrócito, pode ocorrer hemólise

devido à inabilidade do eritrócito em regenerar os componentes lesados (HATHERILL *et al.*, 1991).

### 2.3.1 Oxidação da Hemoglobina

Em situações fisiológicas a hemoglobina sofre auto-oxidação, tornando-se metahemoglobina. Para ligar-se ao O<sub>2</sub> reversivelmente, o Fe do heme precisa estar em sua forma reduzida, apesar da exposição a inúmeros agentes oxidantes endógenos e exógenos. O eritrócito possui mecanismos que previnem a ação desses agentes oxidantes e que reduzem o Fe da hemoglobina quando oxidado (ATAMNA; GINSBURG, 1995). Em certas situações porém, estes mecanismos falham e a hemoglobina pode tornar-se não funcional. Estas anormalidades ocorrem, por exemplo, se: o eritrócito é exposto a drogas oxidantes e toxinas, os mecanismos protetores da célula estão deficientes ou há anormalidades genéticas que afetam a molécula da hemoglobina diminuindo a sua estabilidade (LEE *et al.*, 1999).

A oxidação da hemoglobina envolve o compartilhamento de elétrons do Fe<sup>+2</sup> do grupamento heme com o O<sub>2</sub>, levando a oxihemoglobina para a forma de superoxiferrihemoglobina. A reação é reversível e quando o O<sub>2</sub> é liberado, a oxihemoglobina dissocia-se parcialmente em sua forma desoxigenada e O<sub>2</sub> molecular. O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> também pode ser dissociado, causando a oxidação do Fe<sup>+2</sup> para a forma Fe<sup>+3</sup>, com produção de metahemoglobina. Esta também é formada pela exposição da hemoglobina ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formado pela dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (PEISACH *et al.*, 1975; ATAMNA; GINSBURG, 1995). Em eritrócitos normais, a produção diária de metahemoglobina é menor que 1% da hemoglobina total, devido ao equilíbrio entre a produção e redução da mesma. Quando a metahemoglobina está presente, *in vivo*, em concentrações de 1,5 a 2 g/dl, em geral equivalente a mais de 10% da hemoglobina total, o indivíduo apresenta-se cianótico, já que a mesma não consegue ligar-se ao O<sub>2</sub> (MANSOURI; LURIE, 1993; LEE *et al.*, 1999).

A metahemoglobina pode ser reduzida à desoxihemoglobina através da ação de enzimas e por outros mecanismos. Entretanto, em situações patológicas em que há

aumento da sobrecarga oxidativa ou enfraquecimento das defesas antioxidantes, a produção de hemoglobina oxidada aumenta e há geração de espécies reativas do O<sub>2</sub>. Durante a desnaturação oxidativa, a metahemoglobina é convertida para os chamados hemicromos reversíveis, os quais podem ainda ser reduzidos para a hemoglobina funcional, *in vitro*. Porém, se o estresse oxidativo continuar, ocorre a produção de hemicromos irreversíveis (PEISACH *et al.*, 1975; HANDIN *et al.*, 1995).

Os hemicromos são os primeiros produtos da desnaturação progressiva e são gerados quando o heme é dissociado do seu local ocupando outro local na globina, devido a qualquer modificação na estrutura ou desnaturação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da hemoglobina. Os hemicromos são então derivados das formas de hemoglobina férrica de baixo *spin*, que possui a 6<sup>a</sup> coordenação ocupada por um ligante proveniente da globina: um grupo hidroxil- ou histidil- protonado (hemicromos reversíveis) ou um histidil- não protonado (hemicromos irreversíveis). Os hemicromos irreversíveis não podem ser reconstituídos para a hemoglobina funcional e precipitam junto com a globina e a hemina, formando os chamados corpos de Heinz (RACHMILEWITZ *et al.*, 1971; PEISACH *et al.*, 1975; HANDIN *et al.*, 1995).

Estes corpúsculos foram descritos pela primeira vez por HEINZ (1890) e são considerados os produtos finais da desnaturação oxidativa da hemoglobina. Os corpos de Heinz podem ser visualizados em microscopia de luz somente através de colorações supravitais, com cristal violeta ou azul de cresil brilhante. Eles aparecem como inclusões globulares próximas à membrana ou livres no citoplasma, com tamanho de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ , na coloração azul violeta. Em eritrócitos humanos, a formação espontânea de corpos de Heinz é um processo comum no envelhecimento do eritrócito. Entretanto, pode haver produção exacerbada de corpos de Heinz quando ocorre envenenamento químico, intoxicação medicamentosa, presença de hemoglobinas instáveis, deficiência de G6-PD ou outras situações que comprometam o mecanismo redutor do eritrócito (REINHART *et al.*, 1986).

Evidências indicam que os corpos de Heinz se aderem à face citosólica da membrana, por interações hidrofóbicas ou através de pontes dissulfeto, ligando-se à porção protéica da membrana, especificamente à banda 3, anquirina e glicoforina,

onde promove o agrupamento das mesmas (LOW; WAUGH, 1985). A liberação de hemina dos corpos de Heinz pode enfraquecer a interação entre actina e proteína 4.1, desestabilizando a membrana (WAUGH; LOW, 1985; REINHART *et al.*, 1986; WAUGH *et al.*, 1986; JAROLIM *et al.*, 1990).

Eritrócitos contendo corpos de Heinz perdem a deformabilidade e a flexibilidade necessárias para atravessar os capilares do baço. O controle de qualidade da reologia do eritrócito é realizado quando esta célula tenta atravessar as pequenas fenestrações da membrana que separa os cordões e os sinusóides do baço. Para o eritrócito conseguir atravessar esses filtros, necessita de extrema deformação e flexibilidade. Isto não ocorre em eritrócitos que possuem densos e indeformáveis agregados de corpos de Heinz, ocorrendo o seqüestro dos mesmos e, conseqüentemente, hemólise. A extensa lise dessas células pode acarretar crises hemolíticas (LOW; WAUGH, 1985; REINHART *et al.*, 1986). Entretanto, em alguns casos, o eritrócito consegue passar pelas fenestrações, mas perde um pedaço da membrana devido à excisão dos corpos de Heinz pelos macrófagos esplênicos. Isto leva os eritrócitos à forma de ceratócitos com produção de um fragmento que, eventualmente, será eliminado da circulação (JANDL, 1996).

### 2.3.2 Peroxidação Lipídica e Oxidação das Proteínas da Membrana

Os lipídios da membrana eritrocitária são susceptíveis à peroxidação lipídica causada por radicais livres, os quais desencadeiam os eventos para a formação de hidroperóxidos, que podem ser decompostos na presença de metais de transição, e de complexos de Fe de baixo peso molecular, metahemoglobina e heme. Estes eventos formam mais radicais livres como,  $\text{OH}^\cdot$ , radicais ferril provenientes da hemoglobina e radicais alcoxi e peroxil, os quais amplificam o processo de peroxidação lipídica (RICE-EVANS, 1991).

A peroxidação lipídica pode causar a polimerização dos componentes da membrana e o aumento da rigidez dos fosfolipídios da bicamada, levando à diminuição da deformabilidade do eritrócito. A permeabilidade da membrana também

fica comprometida pela formação de poros, por onde componentes intracelulares, como a hemoglobina, podem escapar (LUBIN; CHIU, 1982). Isto pode ser explicado pela perda de íon potássio ( $K^+$ ) ocorrida por injúria oxidativa associada à falha da bomba  $Na^+K^+$ , que ocasionam permeabilidade aumentada à água e, conseqüentemente, hemólise (CHIU *et al.*, 1989).

A inativação de grupos tióis das proteínas e a peroxidação lipídica podem contribuir para a hemólise oxidativa do eritrócito. A injúria causada pela peroxidação lipídica pode ser transmitida a substâncias vizinhas, como as proteínas de membrana. Como exemplos, enquanto a degradação de fosfatidiletanolamina pode alterar a estrutura da espectrina, o MDA, produto da peroxidação lipídica, é capaz de ligar-se às proteínas da membrana, causando rigidez e diminuição da deformabilidade do eritrócito (CHIU *et al.*, 1989).

As proteínas da membrana eritrocitária possuem grupos sulfidril que são extremamente susceptíveis à ação direta de radicais livres, como o  $OH^{\cdot}$  gerado pelo acúmulo de  $H_2O_2$  em presença de complexos de Fe de baixo peso molecular. As conseqüências desses eventos são agregação, fragmentação e degradação dessas proteínas, o que leva à instabilidade da membrana e, conseqüentemente, à hemólise (HATHERILL *et al.*, 1991).

## 2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE DO ERITRÓCITO

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

A contenção direta de radicais livres pode ser realizada por uma série de antioxidantes endógenos e exógenos. Quando funcionam como coletores desses radicais, essas moléculas doam elétrons e tornam-se radicais livres, que podem iniciar reações em cadeia ou ser regenerados à sua forma original (CHAN *et al.*, 1999).

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

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

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

A metahemoglobina redutase NADH dependente é também chamada de citocromo  $b_5$  metahemoglobina redutase. Esta enzima é uma flavoproteína constituída de uma cadeia peptídica e um grupo prostético, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). A enzima converte aproximadamente 67% da metahemoglobina a deoxihemoglobina, através do uso de dois carreadores de elétrons, o citocromo  $b_5$  e o NADH. A deficiência genética dessa enzima ou de citocromo  $b_5$  pode causar metahemoglobinemia congênita em humanos (MANSOURI; LURIE, 1993).

A metahemoglobina redutase NADPH dependente reduz o FAD em presença de NADPH. O FAD reduzido (FADH), então, converte a metahemoglobina em desoxihemoglobina. A deficiência dessa enzima não está associada a casos de metahemoglobinemia porque a mesma reduz apenas 5% da metahemoglobina formada (MANSOURI; LURIE, 1993).

A GSH é o mais abundante tiol celular, formada a partir do ácido glutâmico e da cisteína em presença de ATP e de duas enzimas, a glutamil-cisteína sintetase e a glutathione sintetase (STRYER, 1995). A manutenção dos níveis de GSH é essencial para sustentar o estado reduzido dos tióis de enzimas celulares e de proteínas do citoesqueleto. Esse tripeptídeo é importante na proteção da célula contra o estresse oxidativo, na destoxificação de uma variedade de xenobióticos eletrofilicos, na remoção de espécies reativas do O<sub>2</sub>, peróxidos e hidroperóxidos orgânicos e na regeneração de vitaminas antioxidantes (CHEN *et al.*, 2000).

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

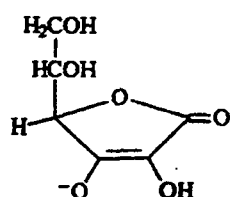
O NADPH e o NADH são os principais carreadores de elétrons dentro da célula. As suas concentrações são mantidas pela ingestão adequada de niacina ou, em condições extremas, pelo triptofano como substituto da niacina na formação de nicotinamida. As formas reduzidas desses compostos são mantidas por elétrons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

As vitaminas C e E são os principais coletores de radicais livres, encontrados no citoplasma e na membrana, respectivamente (NIKI, 2000).

### 2.4.1 Vitamina C

A vitamina C ou ácido L-ascórbico, representada na Figura 2, é uma cetolactona sintetizada em muitos mamíferos no fígado. Entretanto, os humanos perderam a habilidade de sintetizá-la, mas possuem eficientes mecanismos para a sua absorção, transporte e manutenção nos tecidos. Quando absorvida, a vitamina C é distribuída aos tecidos pelo plasma, onde é um dos principais antioxidantes a proteger lipoproteínas da oxidação (MAY, 1998).

FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA C.



FONTE: MAY (1999).

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

A capacidade antioxidativa da vitamina C é devida ao alto potencial redutor de sua dupla ligação carbono-carbono, a qual doa prontamente hidrogênio e elétrons para uma variedade de oxidantes, incluindo radicais livres do  $O_2$  e de peróxidos. A oxidação da vitamina C ocorre em duas etapas, ambas reversíveis. A primeira etapa fornece um radical relativamente estável e aparentemente sem causar dano biológico, o radical livre ascorbil. Na segunda etapa, o radical formado doa um segundo elétron fornecendo ácido desidroascórbico, o qual pode ser hidrolisado irreversivelmente.

Existem muitos sistemas dentro do eritrócito que agem espontaneamente para restabelecer a vitamina C. Um desses sistemas é dependente de GSH, enquanto outros são mediados por enzimas como a tioredoxina redutase e a glutaredoxina. Além disso, há uma redutase NADH dependente que reduz o radical ascorbil dentro da célula (MAY, 1999; VANDUIJN *et al.*, 2000).

O eritrócito tem uma alta capacidade de regenerar o ácido desidroascórbico proveniente do plasma, o qual entra na célula pelo transportador protéico de glicose, o GLUT-1. A entrada do ácido desidroascórbico é extremamente lenta porque o eritrócito não possui o transportador para a vitamina C, armazenando assim, quantidades de vitamina C iguais às do plasma. A GSH reduz o ácido desidroascórbico tornando-se GSSG, que será reduzida em presença de NADPH. As enzimas que reciclam a vitamina C também usam a GSH como substrato para reduzir o ácido desidroascórbico (MENDIRATTA *et al.*, 1998; MAY, 1998a; MAY *et al.*, 1998; MAY, 1999; VANDUIJN *et al.*, 2000). Existem evidências de sistemas alternativos na membrana plasmática, onde a vitamina C intracelular age como um doador de elétrons para uma oxidoredutase transmembrana, que tem a função de proteger a membrana celular da oxidação (MAY *et al.*, 2000; VANDUIJN *et al.*, 2000).

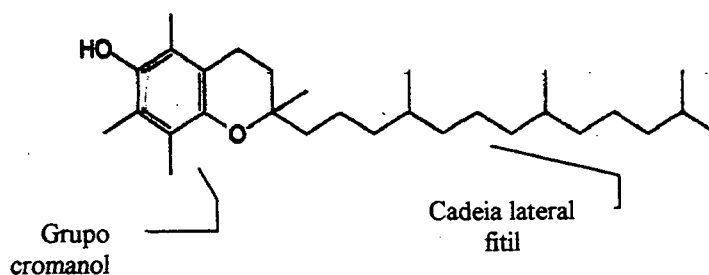
Em contradição à ação antioxidante, observou-se que a vitamina C pode funcionar como um poderoso pró-oxidante na presença de metais de transição, como o íon  $Fe^{+3}$  (CARR; FREI, 1999; CHAN *et al.*, 1999). A redução destes metais pela vitamina C pode ter efeitos deletérios devido à produção de  $OH^{\bullet}$  ou radicais peroxil provenientes da reação de redução de íons metálicos com  $H_2O_2$  ou hidroperóxidos lipídicos. A reação de Fenton ocorre prontamente *in vitro* mas, há controvérsias sobre sua relevância *in vivo*, uma vez que os metais de transição ‘livres’ são logo sequestrados por proteínas como ferritina, transferrina e ceruloplasmina. Comprovou-se, no entanto, que durante a injúria tecidual esses metais de transição podem ser liberados e, conseqüentemente, interagir com o ascorbato (HALLIWELL, 1996; CARR; FREI, 1999).

## 2.4.2 Vitamina E

O termo vitamina E abrange um grupo de antioxidantes lipossolúveis. A análise estrutural dessas moléculas demonstrou que existem dois grupos: os tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) e tocotrienóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). O  $\alpha$ -tocoferol é a forma mais abundante na natureza e a que tem maior atividade biológica (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999).

As principais fontes de vitamina E são sementes e óleos vegetais e o transporte no plasma ocorre através de lipoproteínas, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL). Estruturalmente, o  $\alpha$ -tocoferol é composto por um anel cromanol heterocíclico com uma cadeia alifática lateral fitil contendo dezesseis carbonos (Figura 3). O grupo cromanol é responsável pela habilidade de recolher radicais livres e a cadeia lateral fitil facilita a incorporação do grupo cromanol na bicamada lipídica, o lugar adequado para recolher os radicais peroxil (BURTON; INGOLD, 1989; KOGA *et al.*, 1998).

FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DO  $\alpha$ -TOCOFEROL



FONTE: BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER (1999)

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

A vitamina E é o mais importante antioxidante da membrana celular. Em experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstrou-se que a vitamina E coleta radicais livres e  $H_2O_2$ , protegendo a membrana eritrocitária da peroxidação lipídica e da hemólise. A vitamina E age como um 'antioxidante quebrador de cadeia' através da doação de um átomo de hidrogênio principalmente ao radical peroxil, prevenindo assim a propagação de radicais livres. A concentração de vitamina E presente na membrana é inversamente proporcional à extensão da hemólise oxidativa (MAY *et al.*, 1998; LII *et al.*, 1998; AZZI; STOCKER, 2000).

A deficiência de vitamina E pode causar anemia em bebês prematuros, como resultado do dano por radicais livres. A diminuição da sobrevivência do eritrócito e o aumento da susceptibilidade a peróxidos ocorre devido à deficiência severa de vitamina E (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999).

A vitamina E pode agir como um antioxidante ou pró-oxidante dependendo da presença de seus co-antioxidantes no meio reacional. Isto já foi demonstrado em LDL, onde a lipoperoxidação induz um aumento dos radicais peroxil, os quais são consumidos pela vitamina E. Os radicais tocoferoxil precisam ser reciclados pela vitamina C, pois podem propagar a peroxidação dentro da LDL. Na presença de co-antioxidantes como vitamina C e ubiquinol a vitamina E não apresenta tal comportamento (KONTUSH *et al.*, 1996; AZZI; STOCKER, 2000).

Relata-se que, a vitamina E exerce funções não antioxidantes como: ativação de expressão de genes como  $\alpha$ -tropomiosina e fator de crescimento para tecido conjuntivo e efeitos inibitórios sobre a proteína quinase C e no crescimento de certas células (AZZI; STOCKER, 2000).

#### 2.4.3 Interação Entre Vitaminas C e E

Para a combinação entre dois antioxidantes ser sinérgica, a taxa de inibição da oxidação pelos dois antioxidantes precisa ser a mesma ou menor que a taxa de inibição de cada antioxidante sozinho. A combinação entre vitamina C e vitamina E pode ser efetiva na inibição da oxidação. Estes dois antioxidantes estão localizados em

diferentes domínios mas, mesmo assim, interagem no domínio entre a membrana e a fase aquosa (NIKI *et al.*, 1995).

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

A proximidade do grupo cromanol na superfície da membrana é consistente com o comportamento sinérgico das duas vitaminas, observado em peroxidação de fosfolipídios de membranas artificiais. A vitamina C é um bom antioxidante quando radicais peroxil são gerados na fase aquosa mas, é muito menos efetiva quando esses radicais são inicialmente gerados dentro da membrana. A vitamina C não penetra a membrana suficientemente para interagir com o radical peroxil mas ela doa prontamente um elétron para a redução do radical  $\alpha$ -tocoferoxil, formado na reação entre a vitamina E e os radicais livres. Sugere-se que estes eventos ocorram na interface água/lipídios da bicamada lipídica da membrana eritrocitária (DOBA *et al.*, 1985; BURTON; INGOLD, 1989; MAY, 1998; AZZI; STOCKER, 2000). Estudos *in vitro* mostraram que, a vitamina C pode reciclar a vitamina E em membranas eritrocitárias e eritrócitos intactos, assim como em outros sistemas biológicos (CHAN, 1993; WATERS II *et al.*, 1997; MAY *et al.*, 1996; MAY, 1998).

Em estudos *in vivo*, demonstrou-se que a peroxidação lipídica em ratos submetidos a estresse oxidativo por peróxidos não foi influenciada pela vitamina C quando a dieta com vitamina E era adequada. Mas, quando os índices de vitamina E estavam diminuídos, a peroxidação lipídica foi acentuada em presença de vitamina C e Fe (BURTON *et al.*, 1990).

## 2.5 DOENÇAS HEMOLÍTICAS CORRELACIONADAS COM O ESTRESSE OXIDATIVO

### 2.5.1. Eritrócitos com Sensibilidade Aumentada ao Estresse Oxidativo

Em algumas doenças hemolíticas, a lesão e destruição dos eritrócitos têm sido atribuídas ao aumento do estresse oxidativo. A anemia falciforme, a  $\alpha$ -talassemia e a deficiência em G6-PD são os principais exemplos de doenças genéticas que possuem estresse oxidativo aumentado (CHAN *et al.*, 1999).

A anemia falciforme é uma doença hemolítica crônica resultante da troca de ácido glutâmico por valina no 6º aminoácido da cadeia  $\beta$  da hemoglobina. Os indivíduos afetados produzem uma hemoglobina anormal, chamada de hemoglobina S, que se torna polimerizada quando está na forma desoxigenada. Os eritrócitos tomam a forma de meia-lua ou foice e são chamados de falciformes. Esta doença caracteriza-se por obstrução vascular, infecção, anemia e hemólise (TATUM; CHOW, 1996). Os eritrócitos falcêmicos podem gerar espontaneamente duas vezes mais  $O_2^{\cdot-}$ , peróxidos e radicais OH que eritrócitos normais, promovendo assim, uma auto-oxidação aumentada do Fe da hemoglobina. A excessiva geração de radicais livres pode ser explicada, em parte, pelo Fe descompartimentalizado e pela hemina liberada da Hb S desnaturada (HEBBEL *et al.*, 1982). Os radicais livres formados induzem à peroxidação lipídica e à produção de MDA, ocorrendo aumento da rigidez, diminuição da deformabilidade e alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária (CHAN *et al.*, 1999).

As concentrações e as atividades de enzimas e coletores de radicais livres envolvidos com a defesa antioxidante do eritrócito parecem estar diminuídas nos eritrócitos falcêmicos. Estes possuem propensão a formar corpos de Heinz devido, em parte, à diminuição do conteúdo de GSH. A vitamina E também pode estar diminuída no plasma e em eritrócitos de indivíduos com anemia falciforme (LACHANT; TANAKA, 1986; RICE-EVANS *et al.*, 1986; CHAN *et al.*, 1999).

As talassemias se constituem em um grupo de doenças genéticas que apresentam um desequilíbrio na produção das cadeias de globina. Na  $\beta$ -talassemia há supressão parcial ou total da produção de cadeias  $\beta$ , enquanto, na  $\alpha$ -talassemia o mesmo ocorre em relação às cadeias  $\alpha$ . A ocorrência de anemia, bem como o seu grau, depende do tipo de talassemia e do nível de produção das cadeias envolvidas. Os eritrócitos de indivíduos talassêmicos são mais susceptíveis à auto-oxidação devido ao aumento da formação de MDA após uma sobrecarga oxidativa. Os mecanismos que contribuem para o estresse oxidativo são numerosos e incluem excesso de Fe intracelular e plasmático e auto-oxidação de globinas de instáveis com geração de radicais livres, os quais promovem a peroxidação lipídica (SHINAR; RACHMILEWITZ, 1990). O Fe intracelular tem origem nos produtos da oxidação da hemoglobina e acumula-se dentro da célula na forma de hemicromos ligados à membrana, o que contribui para a desestabilização da mesma. O excesso do Fe plasmático deve-se às repetidas transfusões que muitos dos indivíduos talassêmicos sofrem. Alguns estudos mostram que pode ocorrer diminuição da concentração de vitamina E no plasma e eritrócitos de indivíduos talassêmicos, sugerindo que, problemas com os mecanismos antioxidantes podem ser responsáveis, em parte, pela susceptibilidade ao estresse oxidativo (RICE-EVANS; BAYSAL, 1987; CHAN *et al.*, 1999).

A deficiência de G6-PD é uma eritroenzimopatia causada por uma mutação no gene que codifica a G6-PD, levando à diminuição da atividade desta enzima, chave do ciclo das pentoses. O eritrócito possui limitado poder redutor e, devido à ausência de organelas, depende do ciclo das pentoses para produzir NADPH. Quando há ausência ou diminuição de G6-PD, ocorre produção insuficiente de NADPH e diminuição da concentração de GSH, levando ao aumento do estresse oxidativo dentro do eritrócito, que ocorre especialmente quando  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  são formados por fatores exógenos como, drogas, infecções e em consequência das reações de oxidação entre a hemoglobina e o  $O_2$ . Quando estes oxidantes se acumulam dentro do eritrócito, pode ocorrer oxidação de proteínas de membrana e da hemoglobina com formação de

metahemoglobina e corpos de Heinz, e conseqüentemente hemólise (CHAN *et al.*, 1999).

### 2.5.2 Eritrócitos Sob Ação de Drogas Oxidantes

As anemias hemolíticas adquiridas incluem mecanismos provocados por agentes físicos, químicos ou biológicos. Entre elas se destaca a ação de produtos oxidativos, como hidrazinas, primaquina, sulfanilamida, acetanilida, nitrofurantoína, naftaleno e outros (LEE *et al.*, 1999).

Algumas drogas oxidantes são capazes de desencadear hemólise em indivíduos com doenças hemolíticas com sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo. Entretanto, em alguns casos, a hemólise ocorre em indivíduos com eritrócitos aparentemente normais (STERN, 1989).

Existem drogas que precisam ser metabolizadas para que a sua atividade oxidante se torne aparente, enquanto outras reagem diretamente com a hemoglobina, causando desnaturação oxidativa, com formação de metahemoglobina, corpos de Heinz e peroxidação lipídica. Porém, em outros casos, a droga reage primeiro com o O<sub>2</sub>, formando radicais livres e peróxido que, se produzidos em grandes quantidades, sobrecarregam a capacidade redutora do eritrócito, ocorrendo desnaturação da hemoglobina e lesão da membrana (STERN, 1989).

Alguns medicamentos de uso corrente podem levar o eritrócito a um estresse oxidativo, com danos irreversíveis ao mesmo, como é o caso de alguns analgésicos, drogas antimaláricas e drogas usadas no tratamento do câncer. Um exemplo desta afirmação é o acetaminofeno, um analgésico, antipirético com ação oxidante (TÜKEL, 1995). A literatura mostra que o tratamento de eritrócitos humanos com hidroxiuréia, uma droga usada contra o câncer, resultou em mudança na fragilidade osmótica e no aumento da formação de metahemoglobina (MALEC *et al.*, 1994).

A fenil-hidrazina é um exemplo clássico de droga que induz dano oxidativo ao eritrócito de indivíduos saudáveis. Historicamente, esta droga foi usada no tratamento de policitemia vera e mostrou produzir, *in vivo*, hemólise intravascular associada à

metahemoglobinemia e formação de corpos de Heinz. Em eritrócitos normais, a fenil-hidrazina causa, *in vitro*, a desnaturação oxidativa da hemoglobina e efeitos deletérios sobre as proteínas e lipídios da membrana (STERN, 1989).

A oxihemoglobina pode reagir com a fenil-hidrazina, formando não somente  $H_2O_2$  e metahemoglobina, mas também o radical fenilhidrozil que pode gerar  $O_2^{\cdot-}$  e radicais intermediários, como fenildiazeno e íon benzenodiazônico (GOLDBERG; STERN, 1976; MISRA; FRIDOVICH, 1976; CHAKRABARTI *et al.*, 1995).

A fenil-hidrazina pode causar degradação do citoesqueleto da membrana, principalmente da espectrina, sem afetar as glicoproteínas. Esta degradação pode ser gerada pelos radicais intermediários formados da reação entre fenil-hidrazina e hemoglobina. A proteína banda 3 e a espectrina também podem sofrer agregação causando o aumento da rigidez e alterações da forma do eritrócito. Estas alterações podem causar o seqüestro e a destruição, pelo baço, dos eritrócitos lesados (CHAKRABARTI *et al.*, 1995; HASHMI; SALEEMUDDIN, 1996).

## 2.6 USO DAS VITAMINAS C e E NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE DOENÇAS HUMANAS

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

Dietas ricas em vegetais, frutas e grãos têm sido indicadas na proteção contra doenças como câncer e doenças cardiovasculares (NOGUCHI *et al.*, 2000).

O aumento no consumo de vitamina E parece diminuir o número de casos de infarto do miocárdio. Em estudos epidemiológicos, demonstrou-se que a associação entre vitamina E e  $\beta$ -caroteno reduz a mortalidade causada por câncer de colon e de pulmão (ANDERSON; PHILLIPS, 1999).

Dietas e suplementos vitamínicos ricos em vitamina E têm importante papel em doenças relacionadas com estresse oxidativo, como: câncer doenças cardiovasculares, artrite, algumas doenças hemolíticas, entre outras (LII *et al.*, 1998).

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

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

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

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

### **3 OBJETIVO**

### **3 OBJETIVO**

Estudar a ação oxidante de cloridrato de fenil-hidrazina sobre o eritrócito humano, associado aos efeitos protetores antioxidantes de vitamina C e de vitamina E, *in vitro*.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA

Coletou-se, em EDTAK<sub>3</sub> (1 mg/ml), 20 ml de sangue venoso humano de 20 indivíduos adultos considerados saudáveis, com idades entre 19 e 52 anos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR, obtendo-se o consentimento informado por parte dos doadores, de acordo com o modelo da declaração apresentada no Anexo.

### 4.2 ISOLAMENTO DOS ERITRÓCITOS

Centrifugou-se o sangue por 25 minutos a 800 x g para retirada do plasma e da camada leucocitária. Em seguida, lavou-se os eritrócitos três vezes em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 123 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 27 mM e NaCl 123 mM), por centrifugações a 1200 x g durante 5 minutos (DACIE; LEWIS, 1995).

Ressuspendeu-se os eritrócitos em tampão fosfato salino, acertando-se o volume globular a cerca de 35 %, através do método do microhematócrito (DACIE; LEWIS, 1995). Colocou-se alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos em tubos de hemólise e centrifugou-se por 5 minutos a 1200 x g, retirando-se um volume de sobrenadante correspondente ao volume de solução reagente a ser adicionado, não se alterando assim, o volume globular final da suspensão de eritrócitos, como será descrito nos itens 4.3 e 4.4.

### 4.3 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

#### 4.3.1 Amostras com Vitamina C (Ácido L-Ascórbico)

A alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos, adicionou-se vitamina C (Sigma Chemical Co. A-0278) 500 mM em tampão fosfato 67 mM, pH 7,6, com

glicose 200 mg/dl, para as concentrações finais de 0,1 a 90 mM, de acordo com o item 4.2. Homogeneizou-se as amostras por rotação em aparelho PHOENIX HS 22 durante 60 minutos.

#### 4.3.2 Amostras com Vitamina E (Acetato de $\alpha$ -Tocoferol)

Solubilizou-se vitamina E (Sigma Chemical Co. T-3001) em tensoativo Tween 80 (Synf reagentes), na proporção 1:2, em banho-maria a 37 °C. Após a incorporação da vitamina E no tensoativo, adicionou-se uma solução de etanol 1% (v/v) levando-se novamente a mistura a 37 °C até a completa solubilização. Desta forma, preparou-se soluções estoque de vitamina E nas concentrações de 26,4 e 211,5 mM. As soluções foram acondicionadas em frascos âmbar e ao abrigo da luz, sendo conservadas por até 3 dias à temperatura ambiente. A alíquotas de 1 ml da suspensão de eritrócitos, adicionou-se solução de vitamina E, para as concentrações finais de 0,1 a 80 mM, de acordo com o item 4.2. Homogeneizou-se as amostras por rotação em aparelho PHOENIX HS 22 durante 60 minutos.

Em alíquotas de suspensão de eritrócitos, adicionou-se uma solução de Tween 80 e etanol 1% em volumes iguais aos usados para obtenção das concentrações finais de vitamina E. Após 60 minutos de homogeneização, adicionou-se fenil-hidrazina 1 mM e homogeneizou-se, através de aeração com pipeta micrométrica. Realizou-se este procedimento a fim de verificar possíveis interações entre o meio solubilizante da vitamina E e os eritrócitos.

#### 4.3.3 Amostras Tratadas com Vitamina C e Vitamina E

Adicionou-se vitamina C e vitamina E a suspensões de eritrócitos, de acordo com os itens 4.3.1 e 4.3.2, para as concentrações finais de 2 e 20 mM, homogeneizando-se as amostras por rotação em aparelho PHOENIX HS 22 durante 60 minutos.

#### 4.4 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS COM SUBSTÂNCIA OXIDANTE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA

Adicionou-se o cloridrato de fenil-hidrazina (Sigma Chemical Co. P-6926) 6,9 mM em tampão fosfato 67 mM, pH 7,6, com glicose 200 mg/dl, a alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos para concentrações finais de 0,1 a 5 mM. Homogeneizou-se as amostras através de aeração, com o auxílio de pipeta micrométrica. Incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 20 minutos.

##### 4.4.1 Amostras Tratadas com Vitamina C ou Vitamina E

Adicionou-se a alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos tratados com antioxidantes vitamina C ou vitamina E, conforme os itens 4.3.1 e 4.3.2, solução de cloridrato de fenil-hidrazina 6,9 mM para a concentração final de 1 mM. Homogeneizou-se as amostras através de aeração, com o auxílio de pipeta micrométrica. Incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 20 minutos.

##### 4.4.2 Amostras Tratadas com Vitamina C e Vitamina E

Adicionou-se a alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos tratados com antioxidantes vitamina C e vitamina E, conforme o item 4.3.3, solução de cloridrato de fenil-hidrazina 6,9 mM, para a concentração final de 1 mM. Homogeneizou-se as amostras através de aeração, com o auxílio de pipeta micrométrica. Incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 20 minutos.

##### 4.4.3 Amostras Controle Tratadas com Cloridrato de Fenil-hidrazina

Adicionou-se a alíquotas de 1 ml de suspensão de eritrócitos, cloridrato de fenil-hidrazina 6,9 mM, para a concentração final de 1 mM. Homogeneizou-se as

amostras através de aeração, com o auxílio de pipeta micrométrica. Incubou-se as amostras à temperatura ambiente durante 20 minutos.

#### 4.5 CONTAGEM DE CORPOS DE HEINZ

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

Analisou-se a reprodutibilidade do método utilizando-se uma amostra de sangue tratada como no item 4.4.3. Após dez determinações, obteve-se valores médios de  $19,4 \pm 1,1\%$ , com coeficiente de variação de 5,6%.

Adicionou-se 25  $\mu$ l das amostras tratadas, como descrito no item 4.4 a 0,5 ml de tampão fosfato 67 mM, pH 7,4, com glicose 200 mg/dl, composto por 1,3 partes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  67 mM e 8,7 partes de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  67 mM. Homogeneizou-se por aeração, com o auxílio de pipeta micrométrica. Sobre uma lâmina de microscopia, adicionou-se 20  $\mu$ l da mistura a 50  $\mu$ l de corante metil violeta (2 g de cristal violeta Carlo Erba em 100 ml de solução de NaCl 0,73 g/dl). Após 5 minutos, observou-se a formação os corpos de Heinz ao microscópio de luz, considerando-se como positivos, eritrócitos que apresentassem mais de uma inclusão próximas à membrana ou livres no citoplasma. Segundo DACIE e LEWIS (1995), os corpos de Heinz são arredondados e, se corados por cristal violeta apresentam coloração azul violeta, medindo cerca de 1 a 3  $\mu$ m. Após a contagem de 1000 células, estabeleceu-se a porcentagem de eritrócitos contendo corpos de Heinz.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA

A determinação da formação de metahemoglobina foi realizada segundo o método de EVELYN e MALLOY (1938), modificado por BEUTLER *et al.* (1995).

Analisou-se a reprodutibilidade do método utilizando-se uma amostra de sangue tratada como no item 4.4.3. Após dez determinações, obteve-se valores médios de  $11,2 \pm 1,3\%$ , com coeficiente de variação de 11,5%.

Em tubo de ensaio, colocou-se 10 ml de tampão fosfato 16 mM e 100 µl de suspensão de eritrócitos, tratados ou não com antioxidante(s) e/ou oxidante. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 minutos, fez-se a leitura da metahemoglobina (A) em 630 nm (espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601), usando-se água destilada como branco.

Em seguida, adicionou-se 50 µl de cianeto neutralizado (NaCN 10 g/dl e ácido acético 12 g/dl na proporção 1:1) às misturas reativas. Após cinco minutos, fez-se a leitura (B) em 630nm, usando-se água destilada como branco. Nesta etapa, a metahemoglobina desaparece.

Em outro tubo, colocou-se 8 ml de tampão fosfato 66 mM pH 6,6, ( $K_2HPO_4$  e  $KH_2PO_4$ ) e 2 ml das soluções anteriores, adicionando-se 50 µl de NaCN 10 g/dl e 50 µl de  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 g/dl. Após homogeneização, fez-se a leitura (D) em 540 nm. Usou-se como branco uma mistura de 10 ml de tampão fosfato 66 mM e 50 µl de NaCN 10 g/dl e 50 µl de  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 g/dl.

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

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

Onde,

MetaHb = metahemoglobina em %;

FB = fator B

Valores de referência < 1%.

O fator FB foi calculado utilizando-se sangue de 5 indivíduos considerados saudáveis. Adicionou-se 100 µl de sangue total a um tubo de ensaio contendo 10 ml de tampão fosfato 16 mM, juntou-se 50 µl de  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 g/dl. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 minutos, fez-se a leitura (A) em 630 nm (espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601), utilizando-se água destilada como branco.

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

Em outro tubo, contendo 8 ml de tampão fosfato 66 mM, adicionou-se 2 ml da mistura reativa anterior, 50 µl de  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 g/dl e 50 µl de NaCN 10 g/dl. Homogeneizou-se as amostras e, após 5 minutos, fez-se a leitura em (D) 540 nm, usando-se como branco uma mistura de 10 ml de tampão fosfato 66 mM e 50 µl de NaCN 10 g/dl e 50 µl de  $K_3[Fe(CN)_6]$  20 g/dl.

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

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

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

#### 4.7 DETERMINAÇÃO ESPETROFOTOMÉTRICA DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A determinação da GSH foi realizada segundo a técnica de BEUTLER *et al.* (1963).

Analisou-se a reprodutibilidade do método utilizando-se uma amostra de suspensão de eritrócitos. Após dez determinações, obteve-se valores médios de  $4,54 \pm 0,4\%$ , com coeficiente de variação de 8,5%.

##### 4.7.1 Preparo do Hemolisado

Em um tubo de ensaio, colocou-se 200 µl de suspensão de eritrócitos tratados ou não com antioxidante(s) e/ou oxidante a 2 ml de água destilada.

#### 4.7.2 Dosagem da Concentração de Hemoglobina

Adicionou-se 200 µl do hemolisado a 10 ml de reativo de Drabkin (DACIE; LEWIS,1995) para a estimacão da hemoglobina da amostra, utilizando-se como padrão um sangue com a concentrao de hemoglobina conhecida, na diluico usual de 1:251. Procedeu-se a leitura a 540 nm, em espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601.

#### 4.7.3 Dosagem da Concentraco de GSH

Adicionou-se 3 ml de soluço precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de EDTANa<sub>2</sub> e 30 g de NaCl em 100 ml) a 2 ml do hemolisado. Após 5 minutos, filtrou-se em papel filtro qualitativo.

Adicionou-se 1 ml do filtrado a 4 ml de soluço de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 300 mM. Preparou-se o branco adicionando-se 2 ml de soluço precipitante, diluída 2:5 em água destilada, a 8 ml de soluço Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 300 mM. Após a homogeneizao, procedeu-se a leitura (A<sub>1</sub>) a 412 nm em espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601.

Adicionou-se 1 ml de uma soluço de 20 mg de 5,5'-ditiobis (cido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (Sigma Co. D-8130) em 100 ml de soluço de ácido cítrico 1 g/dl ao tubo com a amostra e ao branco. Após homogeneizao, procedeu-se a leitura (A<sub>2</sub>) em 412 nm.

#### 4.7.4 Cculos e Valores de Referência

A concentrao (C) de GSH  expressa em µmoles/g de hemoglobina (Hb), segundo a fórmula:

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

Para simplificar a fórmula acima, obteve-se o valor numérico 101 através de cálculos entre os valores de diluições da amostra e o coeficiente de extinção molar ( $13,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ):

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

Onde,

Hb = concentração de hemoglobina da amostra

$E_1$  = fator de correção para o coeficiente de extinção molar ( $13,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) do ânion amarelo produzido quando a GSH interage com o DTNB.

O fator de correção é usado quando o espectrofotômetro possui uma amplitude de onda maior que 6 nm, o que acarreta uma diminuição no coeficiente de extinção molar. O espectrofotômetro pode ser calibrado por comparação do valor de extinção no sistema teste ( $D_2$ ) com aquele obtido no espectrofotômetro com amplitude de onda menor que 6 nm a 412 nm ( $D_1$ ). O fator de correção derivado,  $E_1$ , é dado por  $D_1 / D_2$  e é constante para o espectrofotômetro utilizado.

No caso do espectrofotômetro SHIMADZU UV 1601 não houve a necessidade de calcular o fator de correção pois o aparelho não possui amplitude de onda maior que 6 nm. O valor usado para  $E_1$ , então, foi igual a 1.

Valores de referência em adultos:  $6,57 \pm 1,04 \text{ } \mu\text{moles/g}$  de Hb.

#### 4.8 DETERMINAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE HEMÓLISE

Analisou-se a reprodutibilidade do método utilizando-se uma amostra de suspensão de eritrócitos tratadas como no item 4.4.3. Após dez determinações, obteve-se valores médios de  $0,7 \pm 0,05\%$ , com coeficiente de variação de 6,8%.

Determinou-se a concentração de hemoglobina extracelular no sobrenadante das suspensões de eritrócitos tratados com vitamina C, com vitamina C e cloridrato de fenil-hidrazina e somente com cloridrato de fenil-hidrazina, de acordo com os itens 4.3.1, 4.4 e 4.4.1, pelo método da cianometahemoglobina adaptado para pequenas

concentrações (PELISSARI *et al.*, 1993). As diluições do sobrenadante em reagente de Drabkin variaram de acordo com o grau de hemólise observado visualmente, em relação à faixa de sensibilidade do método. Assim, na ausência de coloração rósea visível, a diluição foi de 1:3; para coloração rósea tênue, foi de 1:15; para coloração levemente avermelhada, de 1:50; para coloração avermelhada, de 1:95 e vermelho intenso, de 1:110. Utilizou-se a fórmula abaixo para o cálculo da hemoglobina extracelular:

$$\text{Hbe} = \frac{\text{A} \times \text{diluição}}{5,68}$$

Onde,

Hbe = concentração de hemoglobina extracelular em g/dl;

A = absorvância em 540 nm;

5,68 = constante de proporcionalidade.

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

$$\% \text{ de hemólise} = \frac{100 - \text{HT} \times \text{HBe}}{\text{Hb}}$$

Onde,

HT = hematócrito em %;

Hbe = concentração de hemoglobina extracelular em g/dl.

Hb = concentração de hemoglobina na suspensão de eritrócitos

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância seguida do teste de Tukey para a comparação de pares de médias. Os resultados foram considerados

estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ . Os dados experimentais foram apresentados na forma de gráficos de dispersão e de colunas, com os valores médios e respectivos desvios padrão para cada determinação.

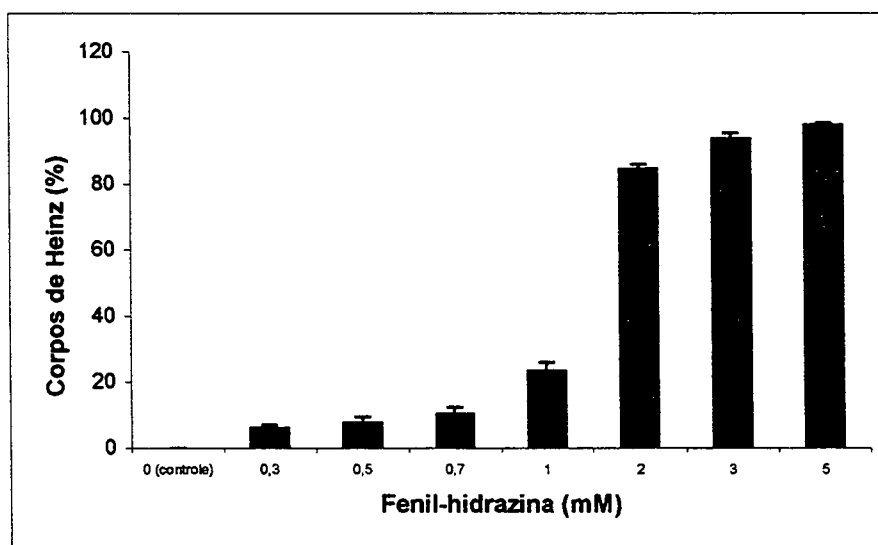
## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

A Figura 4 apresenta as porcentagens médias obtidas para a formação de corpos de Heinz em eritrócitos humanos submetidos à ação de cloridrato de fenil-hidrazina, 0,3 a 5 mM. A formação de corpos de Heinz cresceu em função da concentração de oxidante.

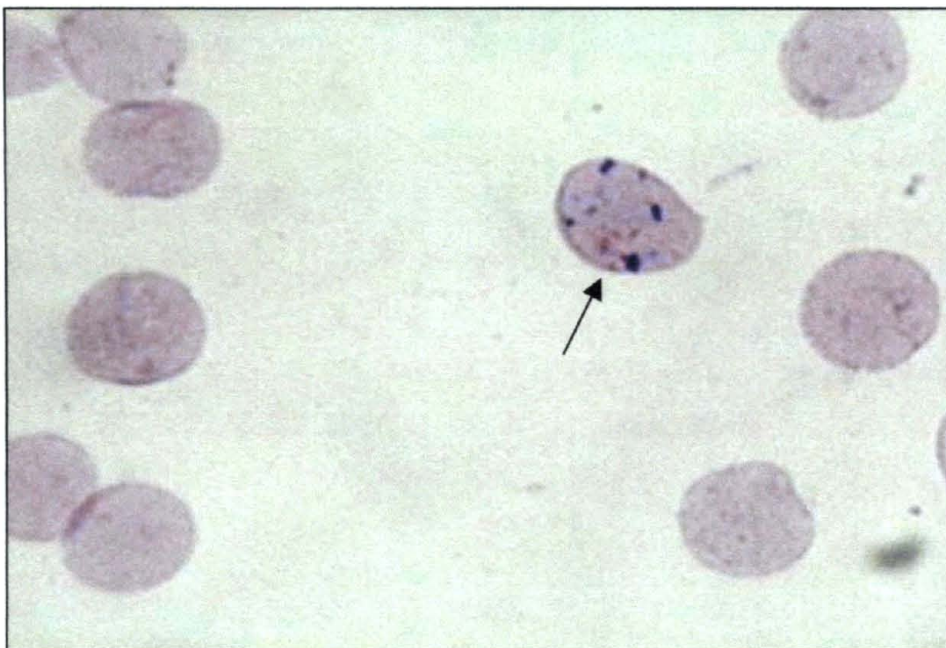
As Figuras 5 e 6 são fotomicrografias, ao microscópio de luz, de eritrócitos humanos contendo corpos de Heinz formados por fenil-hidrazina, nas concentrações de 1 e 5 mM. Os corpos de Heinz foram visualizados no aumento de 1000 x, através de coloração supravital com cristal violeta. Os eritrócitos considerados positivos são aqueles que apresentam mais de uma inclusão azul violeta no citoplasma e/ou próximas à membrana.

FIGURA 4 - FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 0,3 A 5 mM.



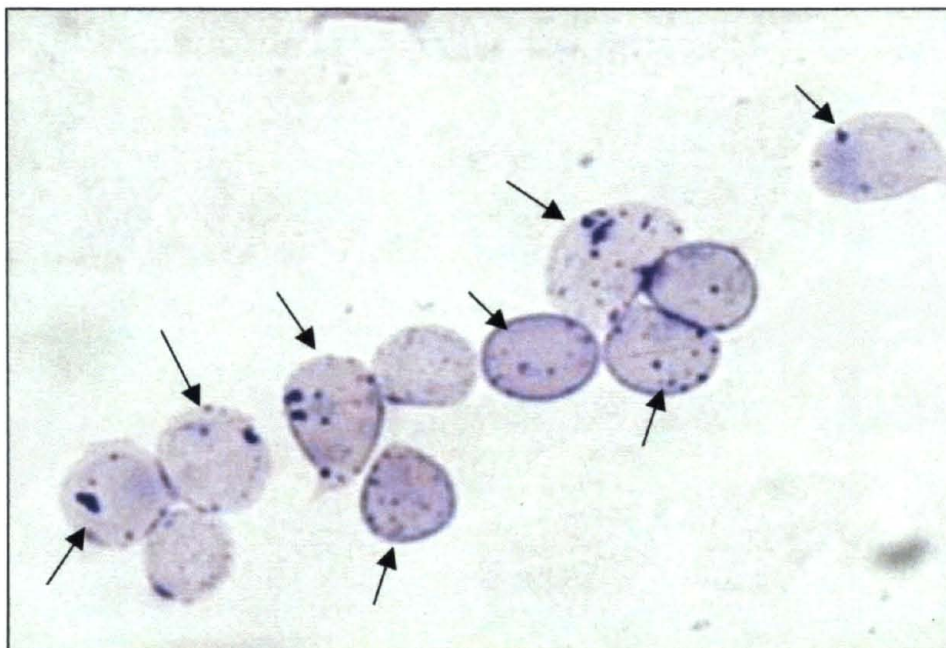
NOTAS: 0 = eritrócitos não tratados com cloridrato de fenil-hidrazina (controle)  
n = 10, sendo 5 amostras com 2 repetições independentes

FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA DE ERITRÓCITOS CONTENDO CORPOS DE HEINZ FORMADOS PELA AÇÃO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTA: Coloração supravital com cristal violeta. 1000 x.

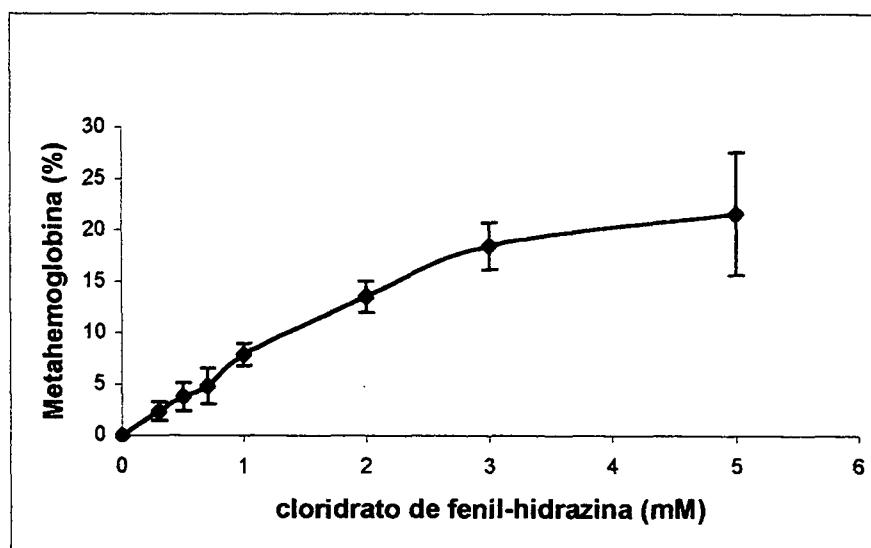
FIGURA 6 – FOTOMICROGRAFIA DE ERITRÓCITOS CONTENDO CORPOS DE HEINZ FORMADOS PELA AÇÃO DE FENIL-HIDRAZINA 5 mM.



NOTA: Coloração supravital com cristal violeta. 1000 x

A Figura 7 apresenta as porcentagens médias de formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos submetidos à ação de cloridrato de fenil-hidrazina 0,3 a 5 mM. Na Tabela 1, estão os resultados da comparação de médias, pelo teste de Tukey, para a formação de metahemoglobina em eritrócitos sob a ação de cloridrato de fenil-hidrazina 0,3 a 5 mM em relação ao controle, com eritrócitos não tratados com cloridrato de fenil-hidrazina. Os resultados indicam que o efeito da fenil-hidrazina foi estatisticamente significativo a partir da concentração de 1 mM.

FIGURA 7 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 0,3 A 5 mM.



NOTA: Controle = eritrócitos não submetidos à ação de fenil-hidrazina (ponto zero)

Cada ponto experimental é a média de 15 experimentos independentes

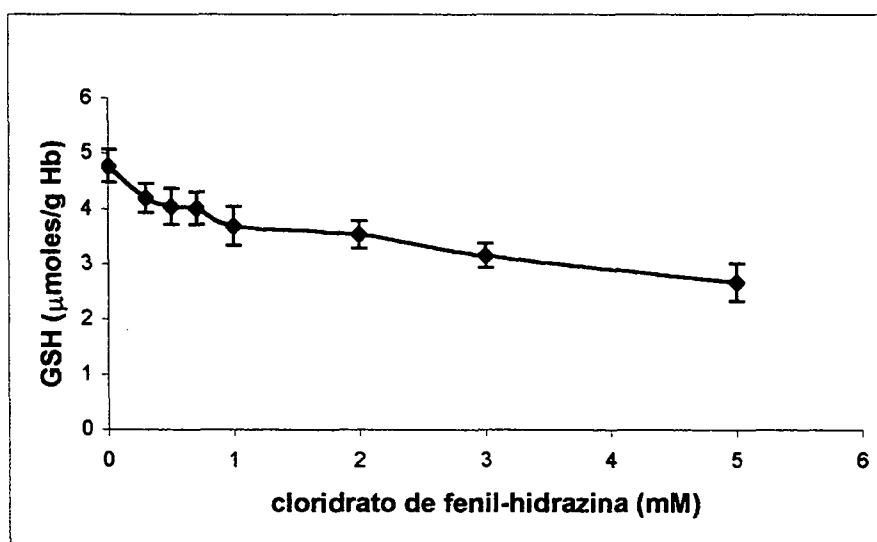
TABELA 1 – TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS, SOB A AÇÃO DO CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA EM RELAÇÃO AO CONTROLE COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM OXIDANTE

| CLORIDRATO DE<br>FENIL-HIDRAZINA<br>(mM) | P      |
|--|--------|
| 0,3                                      | 0,8372 |
| 0,5                                      | 0,3201 |
| 0,7                                      | 0,0837 |
| 1  | 0,0003 |
| 2  | 0,0001 |
| 3  | 0,0001 |
| 5  | 0,0001 |

NOTA: Diferença estatística significativa para  $p \leq 0,05$ .

As concentrações médias de GSH em eritrócitos humanos sob a ação de cloridrato de fenil-hidrazina 0,3 a 5 mM, estão apresentadas na Figura 8. A Tabela 2 mostra os resultados da comparação de médias, pelo teste de Tukey, para a determinação de GSH em eritrócitos sob a ação de cloridrato de fenil-hidrazina 0,3 a 5 mM em relação ao controle, com eritrócitos não tratados com cloridrato de fenil-hidrazina. A partir de 0,3 mM de fenil-hidrazina ocorreu diminuição significativa da concentração de GSH.

FIGURA 8 – CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 0,3 A 5 mM.



NOTAS: Controle = eritrócitos não submetidos à ação de fenil-hidrazina (ponto zero)  
Cada ponto experimental é a média de 15 experimentos independentes

TABELA 2 – TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY PARA A AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM ERITRÓCITOS SOB A AÇÃO DO CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA EM RELAÇÃO AO CONTROLE COM ERITRÓCITOS NÃO TRATADOS COM CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA

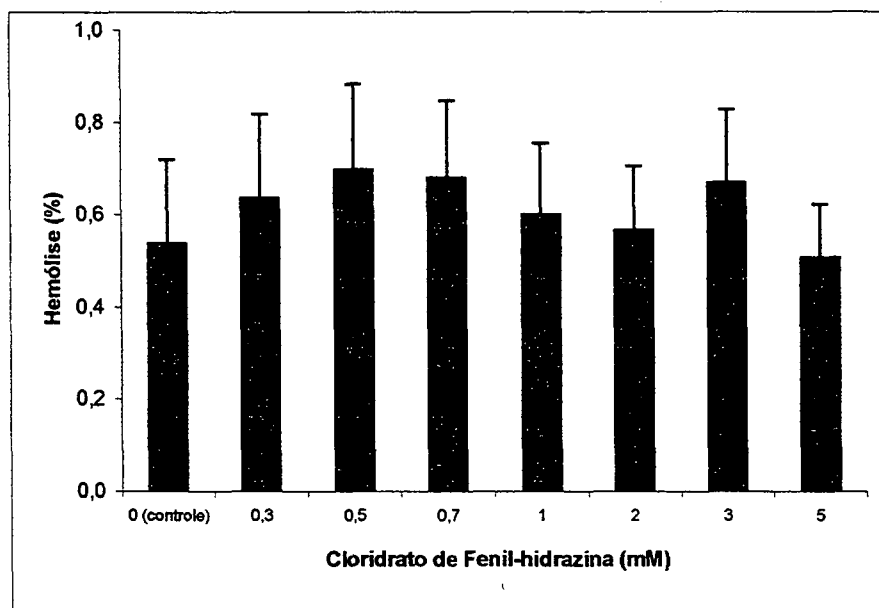
| CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA (mM) | P      |
|------------------------------------|--------|
| 0,3                                | 0,0005 |
| 0,5                                | 0,0001 |
| 0,7                                | 0,0001 |
| 1                                  | 0,0001 |
| 2                                  | 0,0001 |
| 3                                  | 0,0001 |
| 5                                  | 0,0001 |

NOTA: Diferença estatística significativa para  $p \leq 0,05$ .

Na Figura 9 estão apresentadas as porcentagens de hemólise em suspensões de eritrócitos tratados com cloridrato de fenil-hidrazina 0,3 a 5 mM. Não houve diferença estatística entre os eritrócitos tratados com fenil-hidrazina e o controle, com eritrócitos não tratados com oxidante. Isto demonstra que, nas concentrações de 0,3 a 5 mM a fenil-hidrazina não causou aumento na hemólise.

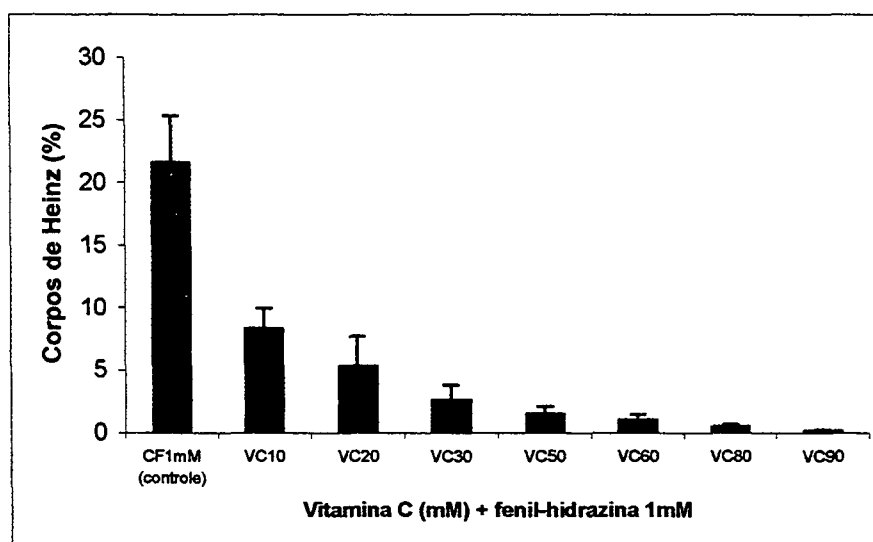
A Figura 10 apresenta as porcentagens médias da formação de corpos de Heinz em eritrócitos de indivíduos saudáveis sob a ação de vitamina C 10 a 90 mM, com a adição de cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM, *in vitro*. Todas as amostras foram estatisticamente diferentes do controle, que corresponde a eritrócitos tratados somente com fenil-hidrazina 1 mM. Observou-se, portanto, uma eficiente proteção da vitamina C (10-90 mM) contra a indução da formação de corpos de Heinz pela fenil-hidrazina, diretamente proporcional à sua concentração.

FIGURA 9 – PORCENTAGENS MÉDIAS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 0,3 A 5 mM.



NOTAS: Controle = eritrócitos não submetidos à ação de fenil-hidrazina  
n = 15, sendo 5 amostras com 3 repetições independentes

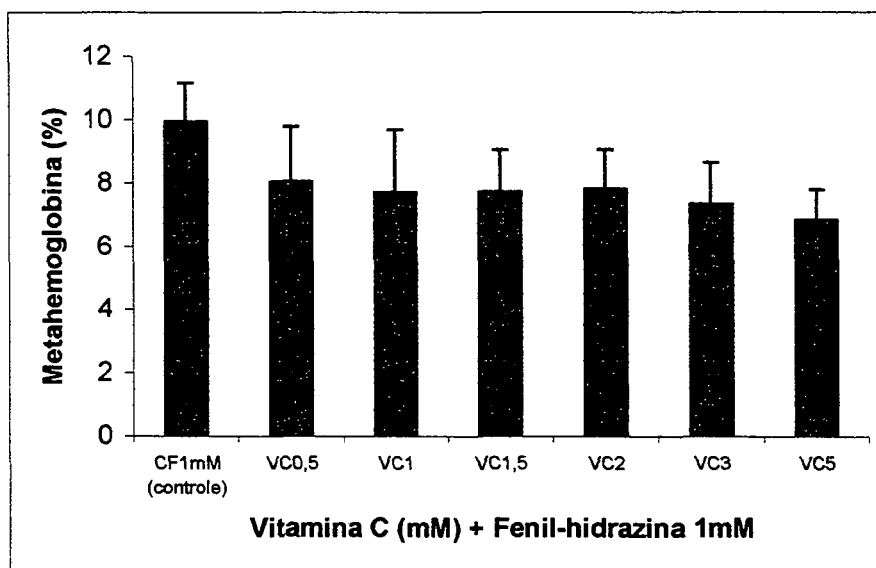
FIGURA 10 - FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO VITAMINA C 10 a 90 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
VC = vitamina C (10-90 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
n = 10, sendo 5 amostras com 2 repetições independentes

Na Figura 11 estão apresentadas as porcentagens médias da formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos normais sob a ação de vitamina C 0,5 a 5 mM e de cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM. Todas as amostras foram estatisticamente diferentes do controle, o qual corresponde a eritrócitos tratados somente com fenil-hidrazina 1 mM.

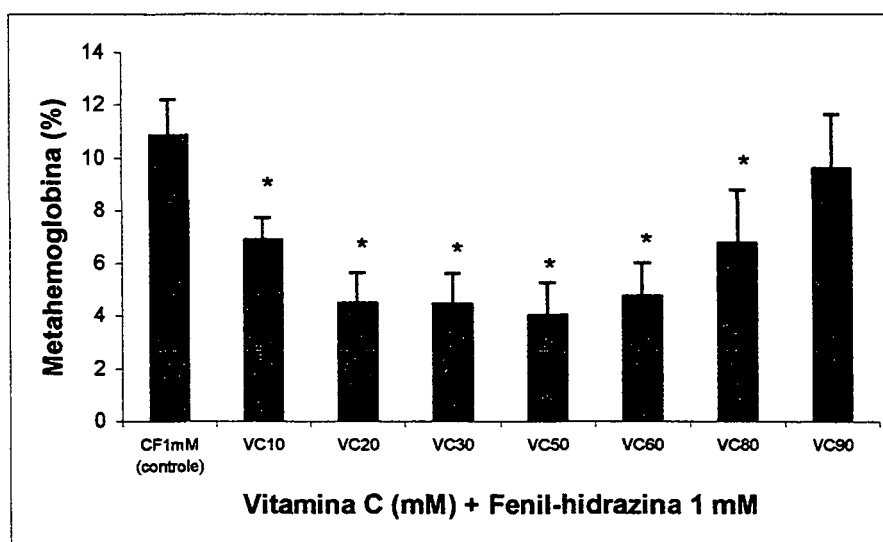
FIGURA 11 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO VITAMINA C 0,5 A 5 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
VC = vitamina C (0,5-5 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
n = 15, sendo 5 amostras com 3 repetições independentes

O efeito de vitamina C (10 a 90 mM), sobre a formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina, foi contraditório (Figura 12). O efeito na redução da formação de metahemoglobina cresceu até 20 mM, se estabilizou entre 20 e 60 mM e, gradualmente, perdeu a eficácia até 90 mM. A formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina não foi reduzida pela adição de vitamina C 90 mM.

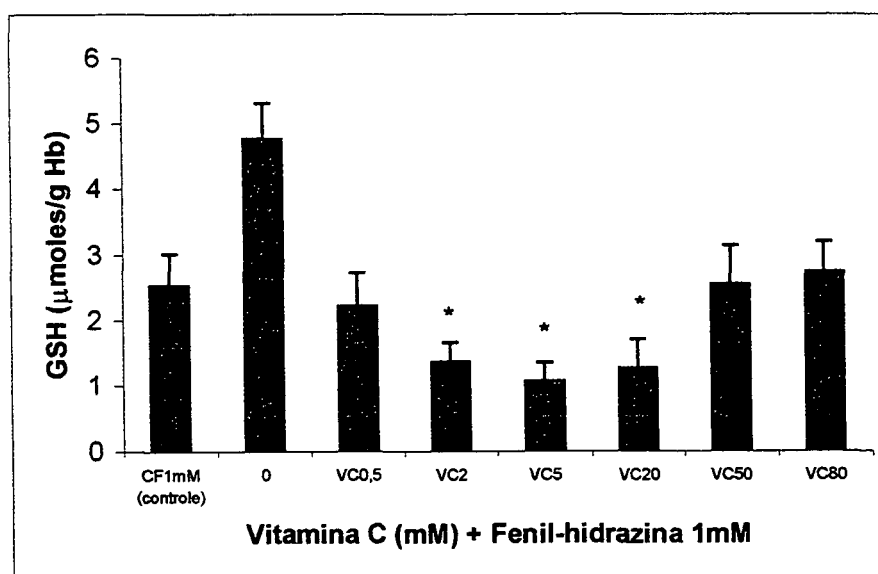
FIGURA 12 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO VITAMINA C 10 A 90 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
 VC = vitamina C (10-90 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 n = 15, sendo 5 amostras com 3 repetições independentes  
 \* diferença estatística com o controle

As concentrações médias de GSH em eritrócitos humanos sob a ação de vitamina C 0,5 a 80 mM e cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM estão apresentadas na Figura 13. O controle constituiu-se de eritrócitos tratados apenas com fenil-hidrazina 1 mM. Somente as amostras tratadas com vitamina C 2, 5 e 20 mM foram estatisticamente diferentes do controle. Tanto o controle, como as amostras tratadas com vitamina C e oxidante foram estatisticamente diferentes das amostras que não receberam tratamento.

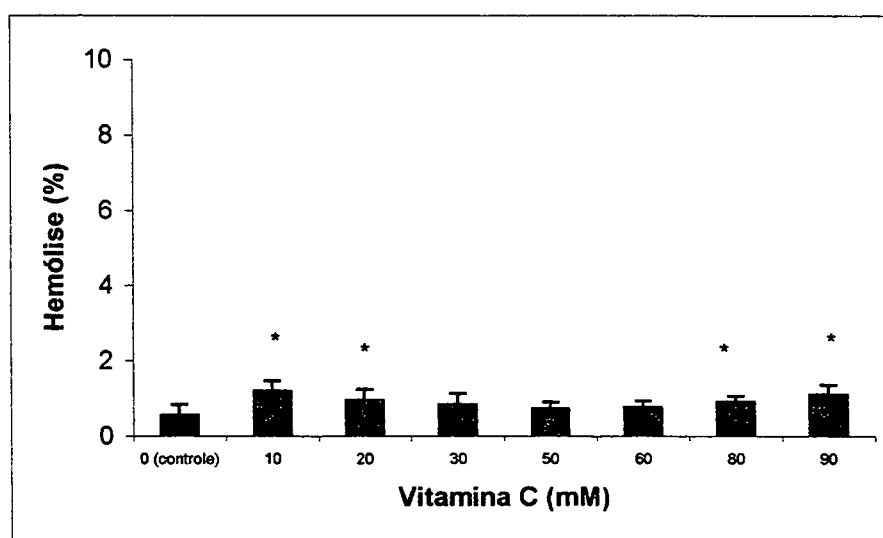
FIGURA 13 - CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C 0,5 A 80 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
 0 = eritrócitos não tratados com oxidante ou antioxidante  
 VC = vitamina C (0,5-80 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 n = 15, sendo 5 amostras com 3 repetições independentes  
 \* diferença estatística com o controle

As porcentagens médias de hemólise para eritrócitos tratados somente com vitamina C 10 a 90 mM estão apresentadas na Figura 14. Os resultados indicam que a vitamina C, sem a presença de oxidante, causou hemólise estatisticamente significativa nas concentrações de 10, 20, 80 e 90 mM. O controle correspondeu a eritrócitos não tratados com vitamina C.

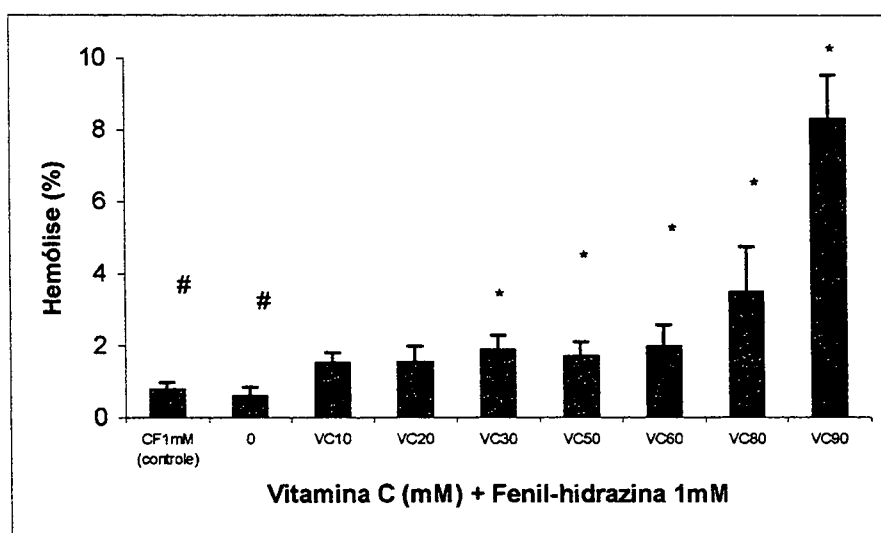
FIGURA 14 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C 10 A 90 mM.



NOTAS: 0 = eritrócitos não submetidos à ação de vitamina C (controle)  
n = 12, sendo 4 amostras com 3 repetições independentes  
\* diferença estatística com o controle

A Figura 15 apresenta as porcentagens médias de hemólise para eritrócitos sob a ação de vitamina C 10 a 90 mM e cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM. Não houve diferença entre o controle e os eritrócitos que não receberam nenhum tratamento. Pode-se observar que, a vitamina C, em presença de fenil-hidrazina, causou hemólise significativa nas concentrações de 30 a 90 mM.

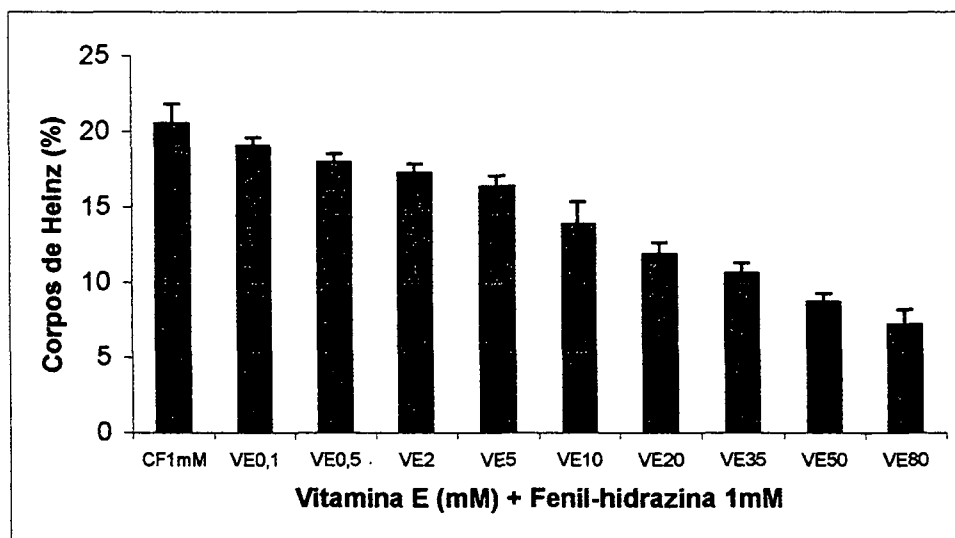
FIGURA 15 – PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C, 10 A 90 mM, COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
 0 = eritrócitos não tratados com oxidante ou antioxidante  
 VC = vitamina C (10-90 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 n = 15, sendo 5 amostras com 3 repetições independentes  
 \* diferença estatística com o controle  
 # não há diferença entre o controle e os eritrócitos não tratados

Na Figura 16 estão apresentadas as porcentagens médias para a formação de corpos de Heinz em eritrócitos humanos normais sob ação de vitamina E 0,1 a 80 mM e de cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM. Todas as amostras foram estatisticamente diferentes do controle, que corresponde a eritrócitos tratados somente com cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM. Isto demonstra que, a vitamina E (0,1-80 mM) é eficaz contra a formação de corpos de Heinz. Em amostras tratadas com Tween 80 em solução de etanol 1% (meio solubilizante da vitamina E) e fenil-hidrazina 1 mM, a formação de corpos de corpos de Heinz não foi significativamente diferente das amostras tratadas apenas com oxidante (controle).

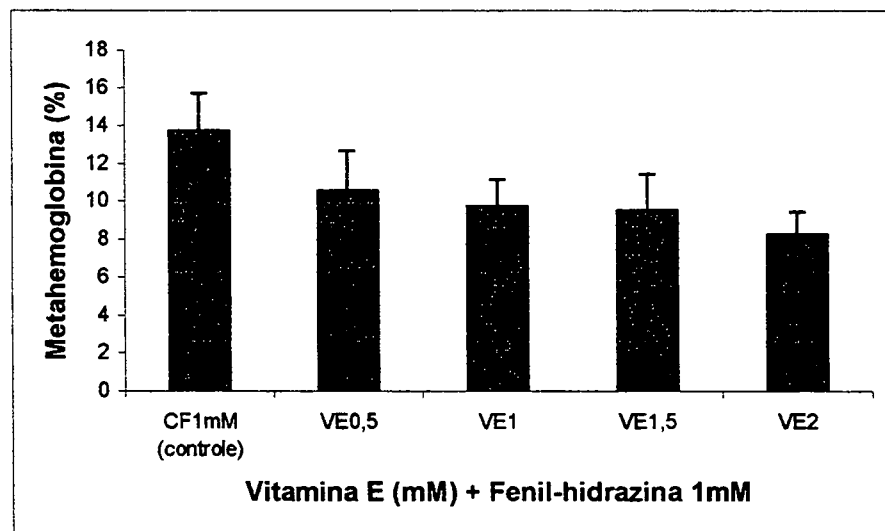
FIGURA 16 - FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA E 0,1 A 80 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
 VE = vitamina E (0,1-80 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 n = 8, sendo 4 amostras com 2 repetições independentes

A Figura 17 apresenta as porcentagens médias da formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos normais, sob a ação de vitamina E 0,5 a 2 mM, com a adição de cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM. Observa-se que, em concentrações baixas de vitamina E (0,5-2 mM) houve diminuição estatisticamente significativa da formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina. Em amostras tratadas apenas com Tween 80 em solução de etanol 1% (meio solubilizante de vitamina E) e fenil-hidrazina, a formação de metahemoglobina não foi significativamente diferente das amostras tratadas apenas com oxidante (controle).

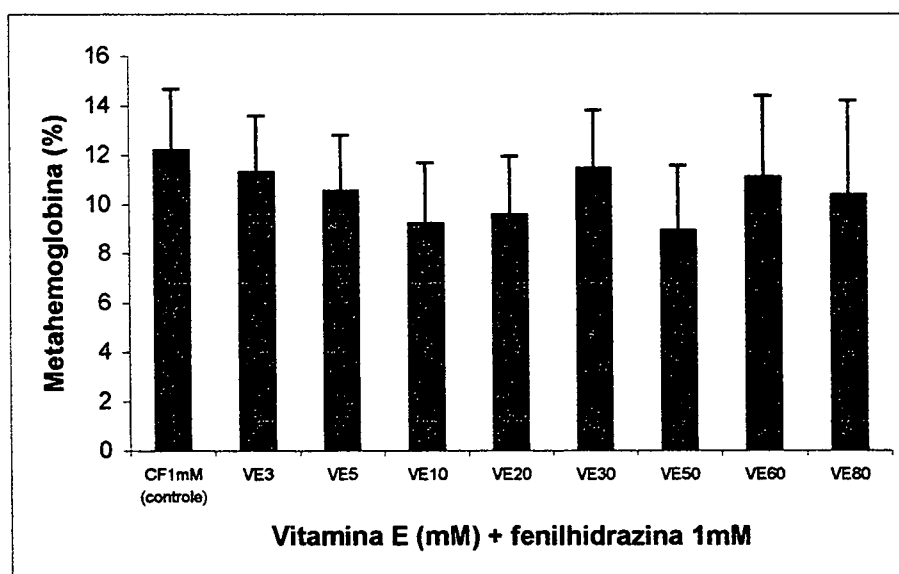
FIGURA 17 - FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA E 0,5 A 2 mM, COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
 VE = vitamina E (0,5-2 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 n = 12, sendo 4 amostras com 3 repetições independentes

Na Figura 18 estão apresentadas as porcentagens médias da formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos normais, sob a ação de vitamina E 3 a 80 mM, com a adição de cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM. Observa-se que, em concentrações mais altas de vitamina E (3-80 mM), não ocorreu efeito estatisticamente significativo na diminuição da formação de metahemoglobina.

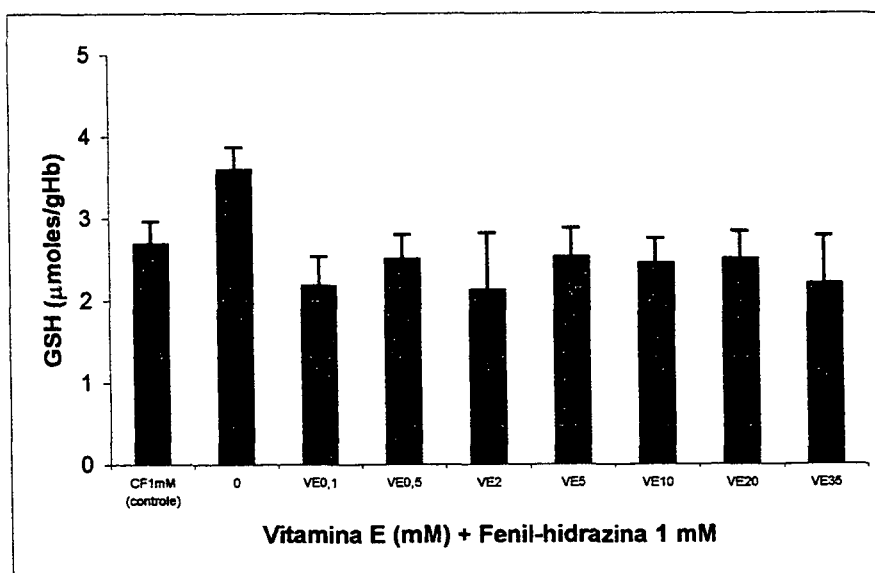
FIGURA 18 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA E 3 A 80 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (Controle)  
VE = vitamina E (3-80 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
n = 12, sendo 4 amostras com 3 repetições independentes

A Figura 19 apresenta as concentrações médias de GSH em eritrócitos humanos sob a ação de vitamina E, 0,1 a 35 mM, e cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM. O controle corresponde a eritrócitos tratados apenas com oxidante. As amostras não foram estatisticamente diferentes do controle, mas foram estatisticamente diferentes das amostras que não receberam tratamento com antioxidante ou oxidante. Nas amostras tratadas apenas com Tween 80 em solução de etanol 1% (meio solubilizante de vitamina E) e fenil-hidrazina, a concentração de GSH permaneceu igual às amostras tratadas apenas com oxidante (controle).

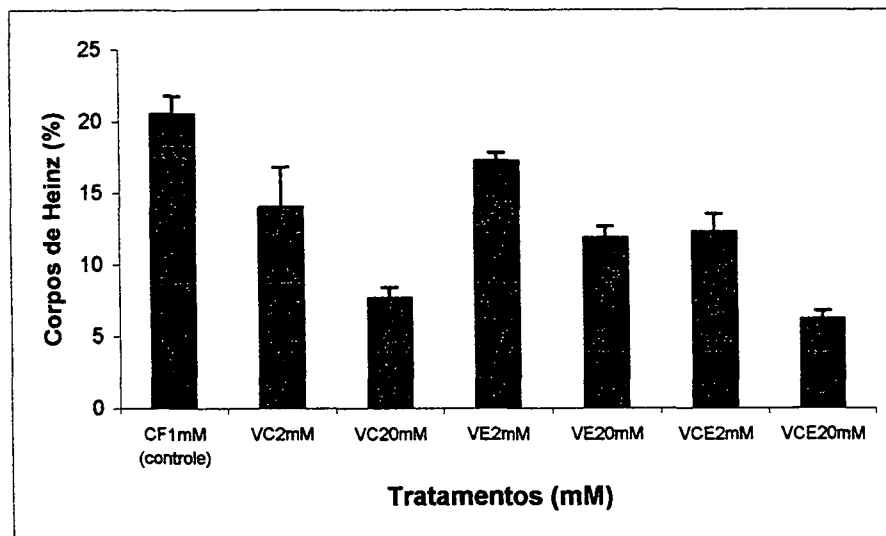
FIGURA 19 - CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA E 0,1 A 35 mM COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
 0 = eritrócitos não tratados com oxidante ou antioxidante  
 VE = vitamina E (0,1-35 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 n =9, sendo 3 amostras com 3 repetições independentes

Na Figura 20 estão apresentadas as porcentagens médias para a formação de corpos de Heinz em eritrócitos humanos submetidos à ação de vitamina C ou vitamina E nas concentrações de 2 e 20 mM e sob a ação conjunta das vitaminas C e E, nas mesmas concentrações. Todas as amostras foram estatisticamente diferentes do controle, que corresponde a eritrócitos tratados somente com cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM. Os resultados sugerem que a ação de conjunta das vitaminas é levemente mais eficiente ( $p < 0,05$ , teste de Tukey) que suas ações isoladas, contra a formação de corpos de Heinz induzida por fenil-hidrazina.

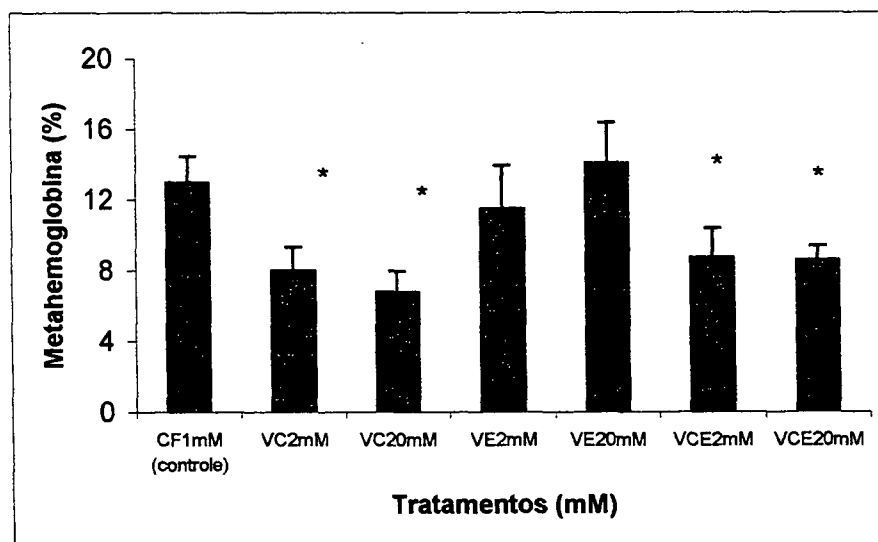
FIGURA 20 - FORMAÇÃO DE CORPOS DE HEINZ EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C E VITAMINA E COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)  
 VC = vitamina C (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 VE = vitamina E (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 VCE = vitamina C e E (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 n = 8, sendo 4 amostras com 2 repetições independentes

A Figura 21 apresenta as porcentagens médias para a formação de metahemoglobina em eritrócitos humanos submetidos à ação de vitamina C ou vitamina E nas concentrações de 2 e 20 mM e sob a ação conjunta das vitaminas C e E, nas mesmas concentrações. Os resultados sugerem a eficácia da vitamina C porém não da vitamina E, quando usadas isoladas, na proteção contra a formação de metahemoglobina, induzida por fenil-hidrazina 1 mM. Na presença de ambas as vitaminas, nas mesmas concentrações, a ação é eficaz porém, inferior ao obtido com a vitamina C isolada.

FIGURA 21 – FORMAÇÃO DE METAHEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C E VITAMINA E COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF 1 mM = eritrócitos submetidos à ação de fenil-hidrazina (controle)

VC = vitamina C (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM

VE = vitamina E (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM

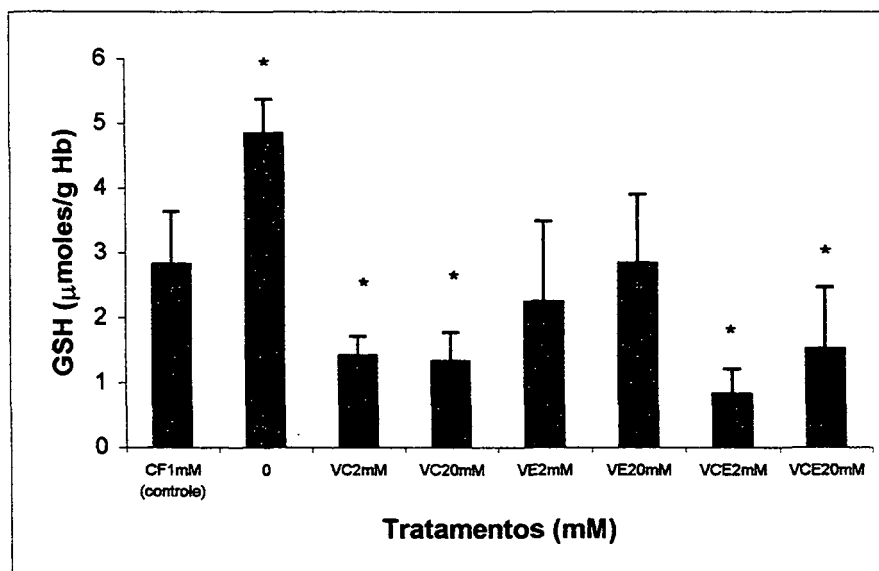
VCE = vitamina C e E (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM

n = 18, sendo 6 amostras com 3 repetições independentes

\* diferença estatística com o controle

A Figura 22 apresenta as concentrações médias de GSH em eritrócitos humanos submetidos à ação de vitamina C e vitamina E nas concentrações de 2 e 20 mM e em eritrócitos sob a ação das vitaminas C e E, nas mesmas concentrações. Os resultados demonstram que, nas concentrações de 2 e 20 mM, as vitaminas isoladas ou em conjunto são ineficazes na restauração da concentração de GSH, diminuída pela ação de fenil-hidrazina 1 mM. Por outro lado, a vitamina E não agrava o quadro de indução pela fenil-hidrazina. Já a vitamina C, isolada ou na presença de vitamina E, apresenta níveis de depleção de GSH mais acentuados, quando comparados aos do controle.

FIGURA 22 – CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) EM ERITRÓCITOS HUMANOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE VITAMINA C E VITAMINA E COM ADIÇÃO DE CLORIDRATO DE FENIL-HIDRAZINA 1 mM.



NOTAS: CF = eritrócitos tratados somente com fenil-hidrazina 1 mM (controle)  
 0 = eritrócitos não tratados com oxidante ou antioxidantes  
 VC = vitamina C (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 VE = vitamina E (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 VCE = vitamina C e E (2 e 20 mM) + fenil-hidrazina 1 mM  
 n = 18, sendo 6 amostras com 3 repetições independentes  
 \* diferença estatística com o controle

## **6 DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

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

As porcentagens médias para a formação de corpos de Heinz em eritrócitos humanos incubados com cloridrato de fenil-hidrazina 0,3 a 5 mM, apresentadas na Figura 4, demonstram um aumento relevante na formação de corpos de Heinz, em função da concentração de cloridrato de fenil-hidrazina, que chega a quase 100%. Os corpos de Heinz formados apareceram corados em azul violeta, grandes e numerosos, livres no citoplasma ou, em sua maioria, próximos à membrana (Figuras 5 e 6).

Um grande número de produtos químicos e drogas pode causar precipitação intracelular de produtos da oxidação da hemoglobina, na forma de corpos de Heinz, entre elas, a fenil-hidrazina. Muitos dos efeitos induzidos pela fenil-hidrazina sobre os eritrócitos podem ser explicados com base na sua habilidade de reagir com a hemoglobina, sofrer oxidação e formar radicais altamente reativos como  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$  (HASHMI; SALEEMUDDIN, 1996). Estes radicais podem contribuir para a formação de metahemoglobina, corpos de Heinz e hemólise (FERRALI *et al.*, 1992).

REINHART *et al.* (1986) demonstraram que a formação de corpos de Heinz sob a ação de cloridrato de fenil-hidrazina é rápida. Em dois minutos de incubação já é possível observar pequenos corpúsculos ligados à membrana ou livres no citoplasma, mas que, com o tempo, podem migrar para junto da membrana do eritrócito. O tamanho e o número de corpos de Heinz formados dependem das reações cíclicas do  $O_2$  e da droga catalítica empregada, bem como da concentração de intermediários redutores na célula e da capacidade do eritrócito em regenerar o NADPH. Quando a

atividade redutora da célula é diminuída, como em deficiência de G6-PD, e a concentração da droga for excessiva, os corpos de Heinz são numerosos e pequenos e o eritrócito, despigmentado. Se a entrada da droga catalítica exceder à destoxificação redutora normal, eles serão grandes e escassos em número (JANDL, 1996).

Observou-se uma crescente formação de metahemoglobina em relação ao aumento da concentração de cloridrato de fenil-hidrazina, entre 0,3 e 5 mM, atingindo níveis próximos a 20% (Figura 7 e Tabela 1), confirmando o importante efeito oxidante da fenil-hidrazina sobre os eritrócitos. É importante considerar que estes achados não representam apenas a formação de metahemoglobina, mas também de radical fenilhidrozil que pode gerar  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e radicais intermediários da fenil-hidrazina altamente reativos (MISRA; FRIDOVICH, 1976; FERRALI *et al.*, 2000).

A concentração de GSH diminuiu de acordo com o aumento da concentração de cloridrato de fenil-hidrazina entre 0,3 e 5 mM (Figura 8 e Tabela 2), reafirmando o efeito oxidante do cloridrato de fenil-hidrazina sobre eritrócitos humanos normais. Observou-se que a diminuição de GSH foi de 23% com 1 mM e 45% com 5 mM de fenil-hidrazina, para tempo de incubação de 20 minutos.

Esses resultados são similares aos de outros autores, que observaram, em eritrócitos de rato tratados com fenil-hidrazina 1 mM, uma diminuição da concentração de GSH de 20 e 25%, para incubações de 30 e 60 minutos, respectivamente (FERRALI *et al.*, 1992).

DESFORGES *et al.* (1960) demonstraram que um produto da oxidação da acetilfenil-hidrazina pode inibir, de modo não competitivo, a atividade de G6-PD em leveduras e em hemolisados de eritrócitos normais. Baseando-se nisso, STUART (1969) sugeriu que a acetilfenil-hidrazina tem a característica de um inibidor que interfere estequiometricamente com a manutenção da GSH em eritrócitos.

Em eritrócitos submetidos a cloridrato de fenil-hidrazina entre 0,3 e 5 mM, as porcentagens de hemólise não foram estatisticamente diferentes em relação ao controle, no qual os eritrócitos não foram submetidos à ação de cloridrato de fenil-hidrazina (Figura 9). É importante registrar que não se observou hemólise nas amostras de sangue antes da lavagem dos eritrócitos com tampão fosfato-salino. Os

resultados do controle mostram que a própria lavagem, sem qualquer incubação, provocou um pequeno grau de hemólise.

As drogas indutoras de desnaturação oxidativa do eritrócito podem apresentar características em comum, mas o comportamento da droga *in vivo* e as diferenças biológicas entre os indivíduos, podem ser fatores determinantes para os seus respectivos graus de toxicidade. Muitas drogas podem, por exemplo, causar desnaturação oxidativa em eritrócitos normais, mas não produzir hemólise significativa em eritrócitos de determinados pacientes com anemias hemolíticas (STERN, 1989).

Os oxidantes fenil-hidrazina, isouramil e divicina induzem a liberação de Fe contido em complexos de Fe eritrocitário. Quando as concentrações de GSH estão severamente reduzidas, esta liberação de Fe é seguida por formação de metahemoglobina, lipoperoxidação e hemólise. Por outro lado, quando há uma concentração suficiente de GSH disponível na célula, a peroxidação lipídica e a hemólise são prevenidas, mesmo com significativa liberação de Fe e formação de metahemoglobina (FERRALI *et al.*, 1992; FERRALI *et al.*, 2000).

Os dados acima podem explicar porque a fenil-hidrazina, mesmo na concentração de 5 mM, não causou hemólise significativa. Como foi ressaltado anteriormente, na concentração de 5 mM de fenil-hidrazina, houve um decréscimo de 45% na concentração de GSH, restando ainda quantidade suficiente para prevenir a peroxidação lipídica causada pela fenil-hidrazina e conseqüentemente, a hemólise.

A diminuição da formação de corpos de Heinz induzida por cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM teve relação direta com o aumento da concentração de vitamina C, entre 10 e 90 mM (Figura 10). Em amostras controle, nas quais se incubou eritrócitos com cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM, obteve-se porcentagens médias de  $21,6 \pm 3,8\%$  de corpos de Heinz. Com vitamina C (10-90 mM), a porcentagem média variou de 8,4 a 0,2%.

Estes resultados não são totalmente concordantes com os obtidos por WINTERBOURN (1979), que observou que a vitamina C, em concentrações de 0,5 a 1 mM, inibe a formação de corpos de Heinz induzida por cloridrato de fenil-hidrazina

mas que, se em concentrações superiores a 5mM, pode contribuir para a oxidação da hemoglobina. No mesmo trabalho, o autor sugeriu que o ascorbato inibe mais a formação de corpos de Heinz que a primeira etapa da reação que leva à sua formação, a oxidação da oxihemoglobina.

Quando eritrócitos de bebês prematuros foram incubados com ascorbato de sódio 0,6 a 6 mM, houve formação de corpos de Heinz. Em eritrócitos de adultos tratados com as mesmas concentrações, no entanto, não houve significativa formação de corpos de Heinz (BALLIN *et al.*, 1988).

Existem outras evidências de que a vitamina C pode causar dano, *in vivo*, aos eritrócitos que são deficientes em reparar o estresse oxidativo. Relata-se que, um indivíduo com deficiência de G6-PD, após ingestão de altas doses de vitamina C, apresentou uma anemia hemolítica fatal, com alta concentração de corpos de Heinz (CAMPBELL *et al.*, 1975).

Os eritrócitos empregados neste experimento mantiveram 77% da concentração de GSH e, portanto, teoricamente aptos a garantir a defesa antioxidante. Nesse aspecto, os resultados obtidos poderiam explicar porque a vitamina C não teve efeito pró-oxidante na formação de corpos de Heinz.

A formação de metahemoglobina em eritrócitos tratados com vitamina C 0,5 a 60 mM, com adição de cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM, diminuiu à medida que se aumentou a concentração de vitamina C, como observado nas Figuras 11 e 12. A partir de 80 mM, a vitamina C começou a perder a eficácia. Na concentração de 90 mM, de vitamina C não se observou redução da formação de metahemoglobina.

É discutida na literatura a duplicidade de efeitos antioxidante e pró-oxidante da vitamina C. DEN BOER *et al.* (1992) demonstraram que, baixas concentrações de vitamina C reduziram a formação de metahemoglobina em ratos. Por outro lado, CALABRESE *et al.* (1982) mostraram que a vitamina C pode não ter efeito ou mesmo aumentar a formação de metahemoglobina (metahemoglobinemia) em humanos. DÖTSCH *et al.* (1998) ao estudar eritrócitos humanos incubados com óxido nítrico e pré-incubados com ascorbato nas concentrações de 0,1 a 10 mM, observaram efeitos benéficos sobre a redução de metahemoglobina somente na concentração de 10 mM.

Dentro do eritrócito, o ascorbato pode doar elétrons à metahemoglobina redutase-NADH dependente que, por sua vez, reduz a metahemoglobina (SULLIVAN; STERN, 1982; MANSOURI; LURIE, 1993). Entretanto, o ascorbato pode reduzir a metahemoglobina independentemente desta enzima. Para isso, requer redutores equivalentes do ciclo das pentoses. O ascorbato presente no plasma é transportado para dentro da célula, principalmente na sua forma oxidada, desidroascorbato, o qual é reduzido, por um mecanismo dependente de glutathione (SULLIVAN; STERN, 1982).

A vitamina C já foi cogitada como um potencial tratamento de casos de metahemoglobinemia (MANSOURI; LURIE, 1993). Entretanto, as concentrações de vitamina C efetivas no tratamento de metahemoglobinemia experimental foram maiores que aquelas alcançadas por doses orais habitualmente recomendadas de até 1 grama, as quais resultam em concentrações plasmáticas de vitamina C de 0,05 e 0,1 mM (DÖTSCH *et al.*, 1998).

A vitamina C, nas concentrações de 0,5 a 80 mM, não se mostrou eficaz em proteger a GSH da ação da fenil-hidrazina. Nas concentrações de 2, 5 e 20 mM, diminuiu significativamente a concentração de GSH (Figura 13). Além disso, todas as amostras sob a ação de vitamina C e cloridrato de fenil-hidrazina tiveram a concentração de GSH diminuída em relação às amostras que não receberam tratamento.

Eritrócitos humanos, expostos a 320 ppm de óxido nítrico, não apresentaram diminuição da concentração de GSH (DÖTSCH *et al.*, 1998). Entretanto, a concentração GSH diminuiu significativamente quando os eritrócitos foram submetidos ao seguinte tratamento: 320 ppm de óxido nítrico até que a metahemoglobina chegasse à concentração de 13%, seguido da adição de ascorbato 10 mM e posterior incubação com 80 ppm de óxido nítrico por 3 horas. Para a concentração de 1 mM de ascorbato, houve uma pequena diminuição da GSH não sendo porém, estatisticamente significativa.

MAWATARI e MEURAKAMI (2001) demonstraram que, em eritrócitos incubados com *tert*-butil hidroperóxido 1 mM, houve exaustão da GSH em apenas 1 minuto. Porém após 15 minutos de incubação, a GSH recuperou-se lentamente,

mantendo-se em baixas concentrações durante 60 minutos de exposição. Em eritrócitos pré-incubados com ascorbato 0,1 mM e incubados com *tert*-butil hidroperóxido 1 mM por 30 minutos, não houve diferença na concentração de GSH em relação a eritrócitos tratados somente com *tert* butil hidroperóxido.

Em experimentos realizados com eritrócitos de bebês prematuros, os quais são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, a concentração de GSH caiu significativamente durante a incubação com 0,6 mM de ascorbato de sódio. Em eritrócitos de adultos saudáveis não houve queda na concentração de GSH para as concentrações de 0,6 e 2,9 mM (JAIN; SUBRAHMANYAM, 1978; BALLIN *et al.*, 1988).

Como exposto anteriormente, ao interagir com espécies reativas do O<sub>2</sub> geradas por oxidantes, a vitamina C se oxida a ácido desidroascórbico, voltando a ser reduzida pela GSH. Assim, a concentração de GSH diminui, com a formação de GSSG. Uma possível explicação para os resultados obtidos é que a vitamina C, em baixas concentrações, não seria suficiente para interagir com grande quantidade de radicais livres e O<sub>2</sub><sup>-</sup> gerados pela fenil-hidrazina, não havendo excesso de ácido desidroascórbico para ser reduzido pela GSH. Por outro lado, em altas concentrações de vitamina C (50 a 80 mM), o excesso poderia ter preservado a GSH de interagir com os radicais gerados pela fenil-hidrazina, mas, nesse caso, a GSH teria a tarefa de reduzir o ácido desidroascórbico formado.

A vitamina C, quando usada de forma isolada, provocou hemólise significativa nas concentrações de 10, 20, 80 e 90 mM (Figura 14). Quando a vitamina C foi usada na presença de fenil-hidrazina, a hemólise foi significativa a partir de 30 mM, chegando a altos índices nas concentrações 80 e 90 mM (Figura 15).

É importante ressaltar que, a hemólise ocasionada pela vitamina C 90 mM em presença de fenil-hidrazina foi 86% maior que a hemólise causada somente por vitamina C na mesma concentração. Estes dados sugerem que, a vitamina C e a fenil-hidrazina juntas sobrecarregam a defesa antioxidante do eritrócito, sendo deletérias ao mesmo.

A vitamina C é geralmente reconhecida como um agente redutor. Porém, dependendo das condições, ela pode funcionar como um agente oxidante. É relatado que a mesma, em altas concentrações, poderia, além de impedir determinadas reações de oxi-redução no interior da célula, promover um acúmulo de metahemoglobina e radicais livres, levando à hemólise (JAIN; SUBRAHMANYAM, 1978; WINTERBOURN, 1979).

Em experimentos com ratos deficientes de vitamina E e, portanto, com baixa defesa contra processos oxidativos, e suplementados com altas concentrações de vitamina C, observou-se significativa hemólise *in vitro* (COLLIS *et al.*, 1997).

A inibição da formação de corpos de Heinz induzida por cloridrato de fenil-hidrazina 1 mM teve relação direta com o aumento da concentração de vitamina E, entre 0,1 e 80 mM. Em amostras controle, nas quais se incubou eritrócitos com cloridrato de fenil-hidrazina 1mM, obteve-se porcentagens médias de  $20,3 \pm 1,3\%$  de corpos de Heinz. Com vitamina E (0,1-80 mM) a porcentagem média variou de 19 a 7,2% (Figura 16).

MENZEL *et al.* (1975) demonstraram que a suplementação diária com 100 ou 200 mg de vitamina E, na forma de acetato de  $\alpha$ -tocoferil, preveniu a formação de corpos de Heinz induzida por 2 mM de metil oleato ozonide, *in vitro*, em eritrócitos humanos.

A ação da vitamina E diminuiu a formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina, apenas nas concentrações de 0,5 a 2 mM (Figura 17). Em concentrações de 3 a 80 mM a vitamina E não teve efeito estatisticamente significativo sobre a diminuição da formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina (Figura 18).

A formação de metahemoglobina em hemolisados de ratos normais e acatalasêmicos expostos a óxido nítrico foi significativamente inibida pela adição de  $\alpha$ -tocoferol em concentrações finais de 1,2 a 5,8 mM (ZHEN *et al.*, 1993). Entretanto, observou-se aumento do efeito tóxico de fenil-hidrazina e  $H_2O_2$  quando eritrócitos de ratos foram incubados com concentrações de 6, 60 e 600  $\mu\text{g/ml}$  de acetato de dl- $\alpha$ -tocoferil (DÍEZ-MARQUES *et al.*, 1986).

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

Por outro lado, YAMAMOTO e NIKI (1988) observaram que, em membranas de eritrócitos de coelho, onde foram adicionadas hemina ou metahemoglobina na suspensão de eritrócitos, não houve consumo de vitamina E, mesmo quando adicionado um excesso de íon férrico. A metahemoglobina não reage com a vitamina E incorporada a lipossomas, nem com o mesmo presente em membranas eritrocitárias. Estes achados sugerem que, a vitamina E presente nas membranas eritrocitárias não interage com o íon férrico em fase aquosa. Isto se deve, provavelmente, à quantidade de proteínas e glicoproteínas presentes na membrana do eritrócito, as quais dificultam o acesso do ferro à vitamina E incorporada nas membranas.

A vitamina E, nas concentrações de 0,1 a 35 mM, não se mostrou eficaz em proteger a GSH da ação da fenil-hidrazina (Figura 19). Todas as amostras, sob a ação de vitamina E e fenil-hidrazina tiveram a concentração de GSH diminuída em relação às amostras que não receberam tratamento.

Os resultados obtidos parecem ser concordantes com os de outros autores. Em hepatócitos de ratos o pré-tratamento, *in vitro*, com 100  $\mu$ M de succinato de tocoferol não impediu a diminuição da concentração de GSH provocada pela adição de *tert* butil hidroperóxido 2 mM (CHEN *et al.*, 2000).

Altas doses de vitamina E aumentam a concentração de GSH do eritrócito. Isto, possivelmente, deve-se ao aumento da síntese de GSH causado pelo estímulo de glutathion sintetase ou por uma redução do uso de GSH para a destoxificação de radicais livres produzidos pela peroxidação lipídica da membrana celular. Desta forma, é possível deduzir que a membrana pode estar sendo protegida pela presença de vitamina E (COSTAGLIOLA *et al.*, 1985).

Testou-se o efeito de vitamina C e E em eritrócitos humanos, com a finalidade de avaliar um possível efeito sinérgico entre ambas na inibição do processo oxidativo. É relatado na literatura que, a vitamina C pode reduzir radicais  $\alpha$ -tocoferil formados na reação entre a vitamina E e radicais livres, principalmente o peroxil. Sugere-se que a reciclagem da vitamina E ocorra na interface água/lipídios da bicamada da membrana eritrocitária (MAY, 1998; AZZI; STOCKER, 2000).

As vitaminas C e E usadas de forma isolada ou em conjunto, nas concentrações de 2 e 20 mM, foram capazes de diminuir a formação de corpos de Heinz induzida por fenil-hidrazina (Figura 20). Como já constatado nos experimentos anteriores, embora, tanto a vitamina C quanto a vitamina E apresentem efeito inibitório sobre a formação de corpos de Heinz induzida pela fenil-hidrazina, a vitamina C tem um efeito mais acentuado. Nas concentrações de 2 e 20 mM, a vitamina C conseguiu inibir, respectivamente, 32 e 62% da formação de corpos de Heinz enquanto que, nas mesmas concentrações, a vitamina E inibiu 17 e 41%.

Porém, a ação conjunta das vitaminas não foi significativamente diferente da ação da vitamina C de forma isolada ( $p < 0,05$ , teste de Tukey). Com isto, pode-se sugerir que a presença de vitamina E não foi capaz, em quaisquer das concentrações empregadas, de aumentar o efeito inibitório da vitamina C sobre a formação de corpos de Heinz.

Quando os eritrócitos foram incubados com vitamina C ou E, nas concentrações de 2 e 20 mM, observou-se que, a vitamina E foi ineficaz em diminuir a formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina. No entanto, a vitamina C, nas mesmas concentrações, inibiu parcialmente a formação de metahemoglobina. Na presença de ambas, nas concentrações de 2 e 20 mM, houve diminuição da formação de metahemoglobina, porém inferior a obtida pela vitamina C isolada nas mesmas concentrações ( $p < 0,05$ , teste de Tukey) (Figura 21). Estes resultados sugerem que a presença de vitamina E contribuiu para uma ação menos eficiente da vitamina C.

Em eritrócitos tratados com vitamina C ou E, nas concentrações de 2 e 20 mM, com adição de fenil-hidrazina 1 mM observou-se que, as vitaminas isoladas ou em conjunto são ineficazes na restauração da concentração de GSH, reduzida pela

ação de fenil-hidrazina. A presença de vitamina C pareceu ter acelerado o processo de depleção de GSH após oxidação pela fenil-hidrazina, o que pareceu ser independente da presença concomitante da vitamina E. Por outro lado, a vitamina E isolada não agravou o quadro de depleção da GSH ocasionado pela fenil-hidrazina ( Figura 22).

Embora, seja relatado na literatura que ocorra sinergismo entre as vitamina C e E em diversos sistemas biológicos, *in vitro*, como lipossomas, membranas e eritrócitos intactos (WATERS II *et al.*, 1997; MAY *et al.*, 1996; MAY *et al.*, 1998) estes achados não foram confirmados no sistema estudado.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a fenil-hidrazina é um oxidante capaz de lesar os mecanismos de defesa contra a oxidação da hemoglobina e que as vitaminas C e E podem inibir este processo parcialmente. Situações nas quais as vitaminas C e E não conseguiram inibir etapas do processo oxidativo, podem estar relacionadas com o efeito pró-oxidante da vitamina C e/ou com a dificuldade da vitamina E em ter acesso ao processo oxidativo da hemoglobina, devido à sua maior afinidade com o meio lipídico da membrana. É possível ainda, que estas limitações sejam responsáveis pela falta de interação entre ambas, no sistema estudado.

Para fins de aprofundamento do tema abordado, seria interessante o estudo de outros parâmetros como: peroxidação lipídica, através da técnica de MDA, atividades das enzimas responsáveis pelo metabolismo energético e redutor e verificação das proteínas da membrana eritrocitária através da técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). O emprego de outros antioxidantes como,  $\beta$ -caroteno e flavonóides poderia contribuir para o estudo dos processos oxidativos bem como, a prevenção desses eventos no eritrócito humano.

## **7 CONCLUSÕES**

## 7 CONCLUSÕES

No estudo da ação antioxidante de vitamina C e E em eritrócitos humanos sob estresse oxidativo com fenil-hidrazina, pode-se concluir que:

### a) Efeitos do cloridrato de fenil-hidrazina (0,3 a 5 mM)

Não houve hemólise significativa, mas ocorreu a formação de corpos de Heinz e de metahemoglobina proporcionalmente ao aumento da concentração de fenil-hidrazina, enquanto a concentração de GSH diminuiu com o aumento do oxidante.

### b) Efeitos da vitamina C (0,5 a 90 mM) em presença de fenil-hidrazina 1 mM

- A formação de corpos de Heinz diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de vitamina C (10 a 90 mM);
- A vitamina C (0,5 a 80 mM) levou à diminuição gradativa da formação de metahemoglobina e, de forma contrária, provocou o seu aumento na concentração de 90 mM;
- Não houve recuperação da concentração de GSH por vitamina C nas concentrações de 0,5 a 80 mM;
- A vitamina C (10 a 90 mM) usada de forma isola provocou hemólise significativa mas, em presença de fenil-hidrazina 1 mM, produziu hemólise significativa a partir de 30 mM, chegando a altos índices de hemólise nas concentrações de 80 e 90 mM.

### c) Efeitos da vitamina E (0,1 a 80 mM) em presença de fenil-hidrazina 1 mM

- A formação de corpos de Heinz diminuiu de forma direta com o aumento das concentrações de vitamina E, entre 0,1 e 80 mM;
- Nas concentrações 0,1 a 2 mM, a vitamina E reduziu a formação de metahemoglobina mas não foi capaz de inibi-la nas concentrações de 3 a 80 mM;
- Nas concentrações de 0,1 a 35 mM, a vitamina E não recuperou a concentração de GSH.

d) Efeitos das vitamina C e E em presença de fenil-hidrazina 1 mM

- As vitaminas C e E, nas concentrações de 2 e 20 mM, reduzem a formação de corpos de Heinz e de metahemoglobina porém, não foram eficazes na restauração de GSH e não se observou efeito sinérgico entre ambas.

As vitaminas C e E foram eficazes contra a sobrecarga oxidativa produzida por cloridrato de fenil-hidrazina, porém, quando usadas em conjunto, não demonstraram ação sinérgica.

## **8 REFERÊNCIAS**

## 8 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos de biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 1999. p. 80-82.

ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 37, p. 1015-1025, 1999.

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

AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 39, p. 231-255, 2000.

BALLIN, A.; BROWN, E.; KOREN, G.; ZIPURSKY, A. Vitamin C-induced erythrocyte damage in premature infants. **The Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 113, n. 1, p. 114-120, 1988.

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

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

BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, B. S.; KIPPS, T. J. K. **Hematology**. 5 ed. New York: Mc Graw-Hill, 1995, p. L-51

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

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

BURTON, G. W.; INGOLD, K. Vitamin E as an *in vitro* and *in vivo* antioxidant. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 570, p. 7-22, 1989.

BURTON, G. W.; WRONSKA, U.; SRONE, L.; FOSTER, D. O.; INGOLD, K. U. Biokinetics of dietary levels *RRR*- $\alpha$ -tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not spare vitamin E *in vitro*. **Lipids**, Champaign, v. 24, n. 4, p. 199-210, 1990.

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

CAMPBELL, G. D.; STEINBERG, M. H.; BOWER, J. D. Ascorbic acid-induced hemolysis in G-6-PD deficiency. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 82, p. 810-815, 1975.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 13, p. 1007-1022, 1999.

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

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

CHAN, A. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 71, p. 725-731, 1993.

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

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

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

CHEN, H.-W.; CHIANG, M.-T.; WANG, C.-K. Inhibition of *tert*-butyl hydroperoxide-induced cell membrane bleb formation by  $\alpha$ -tocopherol and glutathione. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 38, p. 1089-1096, 2000.

CHIU, D.; KUYPERS, F.; LUBIN, B. Lipid peroxidation in human red cells. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 26, n. 4, p. 257-276, 1989.

CLARO, L. M.; ALBERTON, K.; LEONART, M. S. S. Formação de corpos de Heinz em eritrócitos de pacientes portadores de anemias hemolíticas. **Revista do XXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**. Porto Alegre, v. 30, n. 2, p. 93, 1998.

COLLIS, C.; YANG, M.; DIPLOCK, A.; HALLINAN, T.; RICE-EVANS, C. Effects of co-supplementation of iron with ascorbic acid on antioxidant - pro-oxidant balance in the guinea pig. **Free Radical Research**, London, v. 27, p. 113-121, 1997.

COSTAGLIOLA, C.; LINBONDI, M.; MENZIONE, M.; RINALDI, E.; AURICCHIO, G. Vitamin E and red blood cell glutathione. **Metabolism**, Philadelphia, v. 34, n. 8, p. 712-713, 1985.

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

DAVIDSON, W. D.; TANAKA, K. R. Factors affecting pentose phosphate pathway activity in human red cells. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 23, p. 371-380, 1972.

DEAN, R. T.; FU, S.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochemical Journal**, London, v. 324, p. 1-18, 1997.

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

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

DÍEZ-MARQUES, M. L.; CAZAÑA LUCIO, F. J.; RODRIGUEZ PUYOL, M. *In vitro* response of erythrocytes to  $\alpha$ -tocopherol exposure. **International Journal for Vitamin and Nutritional Research**, Berne, v. 56, p. 311-315, 1986.

DOBA, T.; BURTON, G.; INGOLD, K. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 835, p. 298-303, 1985.

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

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

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

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.

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

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

FINKEL, T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 65, p. 337-340, 1999.

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

GOLDBERG, B.; STERN, A. The mechanism of superoxide anion generation by the interaction of phenylhydrazine with hemoglobin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 251, n. 10, p. 3045-3051, 1976.

GRUNE, T.; REINHECKEL, T.; DAVIES, K. J. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 11, p. 526-534, 1997.

HAEST, C. W. M. Interaction between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 694, p. 331-352, 1982.

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

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

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

HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. **Blood: principles and practice of hematology**. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1974, 1995. p. 76

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

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

HATHERILL, J. R.; TILL, G. O.; WARD, P. A. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. **Agent and Actions**, Basel, v. 32, n. 3, p. 351-358, 1991.

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

HEBBEL, R. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 107, n. 5, p. 401-404, 1986.

HEINZ, R. Morphologische veränderungen der rother blutkörperchen durch gifte. **Virchows Archiv**, Secaucus, v. 122, p. 112-115, 1890.

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

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

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

JANDL, J. H. **Blood**: textbook of hematology. 2. ed. Boston: Little, Brown and Company., 1996. p. 505-506.

JAROLIM, P.; LAHAV, M.; LIU, S. C.; PALEK, J. Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemim. **Blood**, New York, v. 76, p. 2125-2129, 1990.

KEHRER, J. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, Limerick, v. 149, p. 43-50, 2000.

KLAUNIG, J. E.; XU, Y.; ISENBERG, J. S.; BACHOWSKI, S.; KOLAJA, K. L.; JIANG, J.; STEVENSON, D. E.; WALBORG, E. F. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, Triangle Park, v. 106, p. 289-295, 1998.

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

KONTUSH, A.; FINCKH, B.; KARTEN, B.; KOHLSCHÜTTER, A.; BEISIEGEL, U. Antioxidant and prooxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. **Journal of Lipid Research**, New York, v. 37, p. 1436-1448, 1996.

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

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

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

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

LIOCHEV, S. I. The mechanisms of 'Fenton-like' reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. **Metal Ions in Biological Systems**, New York, v. 36, p. 1-39, 1999.

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

LUBIN, C.; CHIU, D. Properties of vitamin E-deficient erythrocytes following peroxidant injury. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 16, p. 928-932, 1982.

MALEC, J.; WOLBERG, W.; ROMSAAS, E. Hydroxyurea has the capacity to induce damage to human erythrocytes which can be modified by radical scavengers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 120, p. 566 - 573, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

MENDIRATTA, S.; QU, Z.; MAY, J. M. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 24, p. 789-797, 1998.

MENZEL, D.; SLAUGHTER, R. J.; BRYANT, A. A.; JAUREGUI, H. O. Prevention of ozonide-induced Heinz bodies in human erythrocytes by vitamin E. **Archives of Environmental and Health**, Washington, v. 30, p. 234-236, 1975.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The oxidation of phenylhydrazine: superoxide and mechanism. **Biochemistry**, Washington, v. 15, p. 681-687, 1976.

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

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

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

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

PEISACH, J.; BLUMBERG, W. E.; RACHMILEWITZ, E. A. Demonstration of ferrihemochrome intermediates in Heinz body formation following the reduction of

oxyhemoglobin a by acetylphenylhydrazine. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 393, p. 404-418, 1975.

PELISSARI, C. B.; STINGHEN, S. T.; NASCIMENTO, A. J.; LEONART, M. S. S. Padronização para a dosagem de hemoglobina extracelular pelo método da cianometemoglobina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 14-16, 1993.

RACHMILEWITZ, E. A.; PEISACH, J.; BLUMBERG, W. E. Studies on the stability of oxyhaemoglobin A and its constituent chains and their derivatives. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 246, p. 3356-3366, 1971.

REINHART, W.; SUNG, L.; CHIEN, S. Quantitative relationship between Heinz body formation and red blood cell deformability. **Blood**, New York, v. 68, n. 6, p. 1376-1383, 1986.

RICE-EVANS, C.; OMORPHOS, S. C.; BAYSAL, E. Sickle cell membranes and oxidative damage, **Biochemical Journal**, London, v. 237, p. 265-269, 1986.

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

RICE-EVANS, C. Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. In: HARRIS, J. R. **Blood cell biochemistry**. London: Plenum Press, 1991. p. 429-453.

SALTMAN, P. Oxidative stress: a radical view. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 26, n. 4, p. 249-256, 1989.

SCHUSTER, R.; HOLZHUTTER, H. G.; JACOBASH, G. Interrelations between glycolysis and the hexose monophosphate shunt in erythrocytes as studied on the basis of a mathematical model. **Biosystems**, Amsterdam, v. 22, p. 19, 1988.

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

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

STERN, A. Drug-induced oxidative denaturation in red blood cells. **Seminars in Hematology**, Orlando, v. 26, n. 4, p. 301-306, 1989.

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

STUART, G. Observations on the mechanism of action of acetylphenylhydrazine in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficient erythrocytes. **British Journal of Haematology**, London, v. 16, p. 435-441, 1969.

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

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

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

TÜKEL, S. S. Effects of acetaminophen on methemoglobin, superoxide dismutase and  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase activities of human erythrocytes. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Marrickville, v. 35, p. 719-724, 1995.

VANDUIJN, M.; TIJSSEN, K.; VANSTEVENINCK, J.; VAN DEN BROEK, P.; VAN DER ZEE, J. Erythrocytes reduce extracellular ascorbate free radicals using intracellular ascorbate as an electron donor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 36, p. 27720-27725, 2000.

WATERS II, R. E.; WHITE, L.; MAY, J. M. Liposomes containing  $\alpha$ -tocopherol and ascorbate are protected from an external oxidant stress. **Free Radical Research**, London, v. 26, p. 373-379, 1997.

WAUGH, S.; LOW, P. Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. **Biochemistry**, Washington, v. 24, p. 34-39, 1985.

WAUGH, S.; WILLARDSON, B.; KANNAN, R.; LABOTKA, R.; LOW, P. Heinz bodies induce clustering of band 3, glycophorin, and ankyrin in sickle cell erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 78, p. 1155-1160, 1986.

WESTERMAN, M.; ZHANG, Y.; McCONNELL, J.; CHEZIK, P.; NEELAM, R.; FREELS, S.; FELDMAN, L.; ALLEN, S.; FUNG, L. W. Ascorbate levels in red blood cells and urine in patients with sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, New York, v. 65, p. 174-175, 2000.

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

YAMAMOTO, K.; NIKI, E. Interaction of  $\alpha$ -tocopherol with iron: antioxidant and prooxidant effects of  $\alpha$ -tocopherol in the oxidation of lipids in aqueous dispersions in the presence of iron. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 958, p. 19-23, 1988.

ZHEN, L. X.; ISHII, K.; TAKETA, K.; OGATA, M. Inhibitory effect of  $\alpha$ -tocopherol on methemoglobin formation by nitric oxide in normal and acatalasemic mouse hemolysates. **Physiological Chemistry and Physics and Medical Nmr**, Melville, v. 25, n. 4, p. 253-260, 1993.



## 9 ANEXO

|   |    |
|---|----|
| CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS EM SERES HUMANOS..... | 92 |
| TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO.....                       | 93 |

Curitiba, 09 de abril de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a)( s)  
Dra. Lígia Maria Claro

Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de **“ESTUDO DA AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS OXIDANTES E ANTIOXIDANTES SOBRE ERITRÓCITOS HUMANOS”**, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

**Protocolo CEP-HC nº 025.EXT.007/2001-03**

O referido projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 27 de março de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente



**Prof. Dr. Renato Tambara Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em  
Serres Humanos do Hospital de Clinicas – UFPR

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) O objetivo desta pesquisa é:

Estudar a ação oxidante de cloridrato de fenilhidrazina sobre o eritrócito humano, associado ao efeito antioxidante das vitaminas C e E, *in vitro*.

b) Caso você participe da pesquisa, será necessário fazer exames, onde serão coletadas amostras de sangue para realizar os objetivos citados acima.

c) Como em qualquer diagnóstico clínico-laboratorial você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados a coleta de sangue, por punção venosa.

d) Contudo os benefícios esperados são: melhor compreensão dos mecanismos de hemólise e estresse oxidativo que levam a doenças hemolíticas e ação controladora do processo oxidativo por parte dos antioxidantes a serem empregados.

e) Está garantido todas as informações que você queira, antes durante e depois do estudo.

f) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.

g) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos profissionais que executam a pesquisa e pelas autoridades legais, no entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

h) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, etc) não são da responsabilidade do paciente.

i) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Data  
/ /

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data  
/ /