

NEWTON KEY HOKAMA

***OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA COMO
MODELO DE ESTUDO DO SISTEMA DE
ÓXIDO-REDUÇÃO ERITROCITÁRIO:
INTERAÇÃO ENTRE NITRITO DE SÓDIO,
AZUL DE METILENO E CISTAMINA.***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação de “Fisiopatologia em Clínica Médica”, da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor.

**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - UNESP
2001**

NEWTON KEY HOKAMA

***OXIDAÇÃO DA HEMOGLOBINA COMO
MODELO DE ESTUDO DO SISTEMA DE
ÓXIDO-REDUÇÃO ERITROCITÁRIO:
INTERAÇÃO ENTRE NITRITO DE SÓDIO,
AZUL DE METILENO E CISTAMINA.***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação de “Fisiopatologia em Clínica Médica”, da Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor.

**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - UNESP
2001**

Orientador:

Prof. Doutor LUIZ SHIGUERO MATSUBARA

Ao tio Kenji Suenaga, meu “Carl Sagan” particular.

Paula,
João Pedro,
Chokei e Neide, Maria José,
E a minha grande família (grande):
agradeço a vocês por tudo e sempre,
com vocês construo meu trabalho e minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Luiz Shiguero Matsubara**, Professor Assistente-Doutor do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, que como orientador foi e é companheiro sobretudo, meu guia desde o internato, minha gratidão pelas lições e pelo incentivo.

Ao **Professor Doutor Paulo Eduardo de Abreu Machado**, Professor Titular do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, por proporcionar as condições para a realização deste trabalho. E mais, por ensinar-me o significado da palavra educador.

Aos **Doadores de Sangue** da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas - UNESP – Botucatu que, além do exercício de cidadania e de compromisso para com o próximo, concordaram em participar deste trabalho.

À **Professora Doutora Maria Terezinha Trovarelli Tornero**, Professor Livre-Docente do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu – UNESP, pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados.

Ao **Sr. Valdir Benedito Cruz**, técnico do laboratório de Bioquímica Eritrocitária da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas - UNESP – Botucatu, pelo auxílio na parte experimental deste trabalho.

À **Chris e Reça Decker**, pelo apoio e incentivo, e no auxílio na tradução do resumo.

Ao **Corpo Docente** da Disciplina de Hematologia do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pelo incentivo e colaboração em todos os momentos deste trabalho.

À chefia e **funcionários** da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas - UNESP – Botucatu, pelo incentivo e colaboração em todos os momentos deste trabalho.

Aos **funcionários** da Pós-Graduação do Departamento de Clínica Médica e da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Estudo realizado no Laboratório de Bioquímica Eritrocitária da
Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de
Medicina de Botucatu - UNESP, SP.

verbal e por escrito. Todos os indivíduos eram do sexo masculino, não anêmicos e sem deficiência de G6PD.

Foram utilizados, para os testes, glóbulos lavados, ressuspensos em PBS, pH 7.45, com hemoglobina ajustada entre 11 e 13 g/dl, na presença de glicose e incubados a 37° C com as drogas testadas, nos momentos 10, 90 e 180 minutos de incubação.

As doses utilizadas foram baseadas em métodos padronizados em nosso laboratório para a avaliação da atividade da enzima G6PD, (Nitrito de Sódio e Azul de Metileno) e do Sistema da Glutathione-Redutase/Glutathione-Peroxidase (Nitrito de Sódio e Cistamina).

O estudo foi realizado em duas fases, sendo estudados 8 indivíduos na fase I e 8 indivíduos na Fase II.

A primeira fase foi subdividida em 2 partes, IA e IB.

Na fase IA dosamos a quantidade de Metahemoglobina formada na presença de Azul de Metileno e/ou Cistamina, para avaliarmos o potencial oxidativo direto sobre o ferro-heme destas drogas.

Na fase IB, dosamos a quantidade reduzida, pela presença de Azul de Metileno e/ou Cistamina, de Metahemoglobina induzida pela presença de Nitrito de Sódio

Na fase II, utilizamos a Cromatografia Líquida de Alta Performance para avaliarmos a formação e reversão do complexo Hemoglobina-Etilamina, na presença de Azul de Metileno e/ou Nitrito de Sódio.

Os resultados obtidos na Fase IA permitem afirmar que o Azul de Metileno induziu a formação de Metahemoglobina. Aos 90 minutos de incubação este efeito foi potencializado pela presença da Cistamina, provavelmente como consequência da competição pelo NADPH. A oxidação da cisteína β 93 pela incubação isolada de Cistamina não induziu a formação da Metahemoglobina.

Na Fase IB observamos que a redução da Metahemoglobina pela Cistamina foi observada somente aos 180 minutos de incubação, em níveis inferiores à redução pelo Azul de Metileno, que foi praticamente total aos 90 minutos. A presença concomitante de Cistamina diminuiu a redução da Metahemoglobina pelo Azul de Metileno aos 90 e 180 minutos, provavelmente como consequência da competição pelo NADPH.

Na fase II observamos, aos 10 minutos, a menor reversão do complexo Hemoglobina-Etilamina na presença do Nitrito de Sódio, seja isoladamente ou em conjunto com o Azul de Metileno. Isoladamente, o AM não modificou a reconversão. Aos 90 minutos, a presença de Nitrito de Sódio e/ou Azul de Metileno diminuiu a reversão da Hemoglobina A. Aos 180 minutos, apenas o

Azul de Metileno isoladamente diminuiu significativamente a reversão do Complexo Hemoglobina-Etilamina.

No conjunto, os resultados sugerem que o efeito das 3 drogas utilizadas ocorrem através da ação primariamente oxidante sobre o sistema de óxido-redução eritrocitário.

O Azul de Metileno atua de forma mais eficiente sobre a redução da Metahemoglobina induzida pelo Nitrito de Sódio pelo fato atuar como receptor de elétrons e agir diretamente sobre o átomo de Ferro oxidado da Metahemoglobina.

A redução de Metahemoglobina pela Cistamina ocorre através de mecanismo não totalmente elucidado, provavelmente por reação não-catalítica indireta, através da Cisteamina, como sugerido pela menor eficiência e maior intervalo de tempo requerido.

A interação entre o Azul de Metileno, Nitrito de Sódio e a Cistamina é competitiva, provavelmente através do consumo de NADPH.

Além disso, o novo método proposto, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Performance para avaliar a formação e reversão do complexo Hemoglobina-Etilamina, permitiu observar, sob uma outra perspectiva, a interação entre as drogas no sistema de óxido-redução eritrocitário.

8. SUMMARY

Hemoglobin, the essential component of erythrocyte cytoplasm, is physiologically prone to oxidation by external agents, through the formation of Methemoglobin or the oxidation of $\beta 93$ cysteine by thiol agents.

Unable to protein synthesis, the erythrocyte depends essentially on glycolysis, which, besides producing ATP, maintains the highly efficient reduction potential through the integration of NADH production and the Hexose Monophosphate Shunt.

The present investigation's purpose was to evaluate the erythrocyte antioxidant system by studying hemoglobin oxidation by the following substances: a) Sodium Nitrite (SN), a well known Methemoglobin-forming agent; b) Methylene Blue (MB), a Methemoglobin reductant reagent, available for therapeutic and laboratory tests; c) the thiol reagent Cystamine (CI), that reacts with hemoglobin through the $\beta 93$ cysteine oxidation, forming the Hemoglobin-Ethylamine complex.

After informed consent was obtained, blood sample was collected from blood donors of the Botucatu's Hemocentro Division. All subjects were male, non-anemic and non-G6PD deficiency individuals.

Washed, pH 7.45 PBS resuspended red blood cells (hemoglobin between 11 and 13 g/dl) were incubated (37° C) with glucose and the test reagents, at 10, 90 and 180 minutes.

The concentration and doses of reagents were based on current standard methods utilized in our laboratory for evaluation of G6PD (SN and MB) and Glutathione-reductase activity (SN and CI).

The studies were performed in two distinct stages. For each stage, 8 subjects were studied.

Stage I were subsequently divided in 2 stages, IA and IB.

In stage IA the concentration of Methemoglobin was measured after the exposition of MB and/or CI, for assessment of ferro-heme specific oxidative effect of the reagents.

In stage IB we measured the concentration of Methemoglobin after the exposition of SN, MB and/or CI, as a result of the degree of reduction by MB and/or CI of the SN-induced Methemoglobin.

In stage II, through the HPLC apparatus, we evaluated the formation and reversal of Hemoglobin-Ethylamine complex, in the presence of MB and/or SN.

We observed in stage IA that MB induced the formation of Methemoglobin. At 90 minutes of incubation, this effect was increased in the

presence of CI, probably as a consequence of competition for NADPH. The β 93 Cysteine oxidation by incubation with Cystamine did not induce the Methemoglobin formation.

In stage IB we observed Methemoglobin reduction by CI only at 180 minutes of incubation, in lower levels of reduction than MB, which were practically total at 90 minutes. The concomitant presence of CI and MB diminished the MB Methemoglobin reduction at 90 and 180 minutes, probably as a consequence of competition for NADPH.

In stage II we observed, at 10 minutes, a lesser reversal of Hemoglobin-Ethylamine complex in the presence of SN, alone or with MB. Methylene Blue, alone, did not modify the reversal. At 90 minutes the presence of SN and/or MB reduced the reversal of the complex. At 180 minutes, only MB, without SN, reduced significantly the reversal of Hemoglobin-Ethylamine complex.

Overall, the results suggest that the effect of the three reagents we utilized occurred as a result of a primarily oxidizing reaction on the erythrocyte oxide-reduction system.

Methylene Blue, as an electron acceptor, is more efficient in Methemoglobin reduction, by its direct effect over the heme iron Fe^{+3}

Mechanisms of Methemoglobin reduction by Cystamine are not totally elucidated. They probably occur by indirect non-catalytic reaction, through the Cysteamine formation, as suggested by the lesser efficiency and longer time interval required.

The interaction between MB, SN and CI is competitive, probably through competition for NADPH.

Finally, the proposed method, utilizing HPLC to measure the formation and reversal of Hemoglobin-Ethylamine complex, provided a new perspective to evaluate the effect and interaction of the chemical agents in the erythrocyte oxide-reduction system.

ÍNDICE

| | página |
|------|---|
| 1 | INTRODUÇÃO |
| 1.1. | Uma breve apresentação |
| 1.2. | A vida, os elétrons e o eritrócito |
| 1.3. | O metabolismo do eritrócito: interação com o transporte de oxigênio |
| 1.4. | O eritrócito e a engenharia da produção de elétrons |
| 1.5. | As Drogas e o Eritrócito |
| 2 | OBJETIVO |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS |
| 4 | RESULTADOS |
| 5 | DISCUSSÃO |
| 6 | CONCLUSÕES |
| 7 | RESUMO |
| 8 | SUMMARY..... |
| 9 | APÊNDICE |
| 10 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uma breve apresentação

O eritrócito, célula altamente especializada do organismo, vive sob contínua ameaça oxidante, seja em decorrência da presença de ferro e oxigênio, seja pela capacidade limitada de síntese protéica. Podemos verificar, em contrapartida, a grande eficiência do seu sistema redutor, através da regeneração de NADPH e de GSH pela via glicolítica.

A oxidação da molécula de hemoglobina, seja espontaneamente ou através de substâncias químicas, constitui modelo experimental de grande valia no estudo deste sistema. Existem dois sítios principais desta oxidação: o ferro-heme e a cisteína 93 da cadeia de globina β .

Neste trabalho utilizamos: o Nitrito de Sódio (NS), agente formador da metahemoglobina; o Azul de Metileno (AM), o antídoto principal na Metahemoglobinemia; e a Cistamina (CI), agente tiol, oxidante da cisteína β 93. A incubação destas drogas em glóbulos vermelhos lavados e ressuspensos em Solução Salina Tamponada, (Phosphate Buffer Saline ou PBS) pH 7.45, permitiu, através da dosagem de Metahemoglobina e de método em Cromatografia Líquida de Alta Performance (High Performance

Liquid Chromatography ou HPLC) desenvolvido especificamente para este trabalho, observar a interação destas drogas no sistema.

Para uma melhor compreensão, esta introdução será dividida em duas partes principais. Apresentaremos as características do sistema de óxido eritrocitário e sua relação com o funcionamento do organismo nas próximas três seções deste capítulo. Na última seção, descreveremos a ação sobre o eritrócito das substâncias químicas utilizadas neste trabalho.

1.2. A vida, os elétrons e o eritrócito

Os fenômenos biológicos são a fragmentação observacional do que se chama vida. A vida é uma longa história que vem sendo contada há 3,8 bilhões de anos (COOPER, 1997). Somos testemunhas, vivas, e divulgadores desta história e, até onde (pouco) sabemos, este é o único planeta entre bilhões de constelações do universo onde a vida floresce.

A vida também pode ser vista como processo químico, envolvendo milhares de diferentes reações ocorrendo de forma organizada, as reações metabólicas. O conjunto destas reações, a maior parte dependente da atividade das enzimas, denomina-se metabolismo.

Os seres vivos utilizam a energia química, obtidos através de reações oxidativas acopladas, para propulsionar os processos da manutenção da vida (MURRAY et al., 1990).

A vida neste planeta depende da luz do sol, a fonte primária da energia vital que mantém a integridade dos átomos, moléculas, membranas, células, tecidos, enfim, os seres vivos e seus constituintes, em equilíbrio dinâmico. O fluxo desta energia materializa-se inicialmente na capacidade autotrófica (acoplamento do metabolismo à processos exergônicos simples existentes no meio circundante) de certos organismos, através da fotossíntese (formação de glicose pelas plantas verdes), e se propaga através da cadeia alimentar.

A unidade funcional dos organismos é a célula. O sistema gerador de energia nas células dos animais superiores utiliza predominantemente a glicose como substrato. Através de uma seqüência de reações que ocorrem no citoplasma (glicólise) e na mitocôndria (fosforilação oxidativa) na presença de oxigênio molecular, 1 mol de glicose fornece a energia para a formação de 36 moles de adenosina-trifosfato (ATP), o principal intermediário de alta energia das células.

Quimicamente, a oxidação é definida como a perda de elétrons e a redução como o ganho de elétrons. Um átomo é composto de um núcleo

central circundado por um ou mais elétrons. Os elétrons orbitam em diferentes níveis. Quanto maior a carga energética do elétron, mais distante estará do núcleo. A luz pode excitar um elétron para um nível de energia maior. Esta energia adicionada é transformada em energia química potencial, que o átomo pode posteriormente liberar, e o elétron retornará para o seu nível orbitário original.

A energia estocada nas ligações químicas pode ser transferida para outras ligações químicas, através da mudança dos níveis energéticos dos elétrons. Em algumas destas reações químicas, os elétrons realmente passam de um átomo ou molécula para outra. Este tipo de reação química é denominada reação de óxido-redução. O fluxo de energia através dos sistemas vivos ocorre através das reações de óxido-redução, visto que os elétrons que migram carregam com eles seu potencial energético de posição, pois mantêm sua distância do núcleo.

A migração dos elétrons para outros átomos ou moléculas nos sistemas biológicos ocorre, em geral, juntamente com um próton, o átomo de hidrogênio. Assim, a oxidação de uma reação química envolve a remoção de átomos de hidrogênio para outra molécula, e a redução envolve o ganho de um átomo de hidrogênio por outra molécula.

Na fotossíntese, os átomos de hidrogênio são transferidos da água (H₂O) para o dióxido de carbono (CO₂), reduzindo-o em glicose (C₆H₁₂O₆) (Fig. 1).

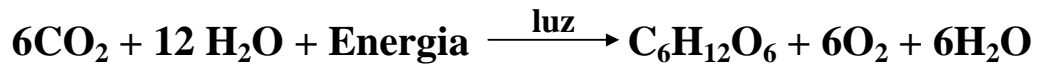


Figura 1 – Esquema simplificado da fotossíntese.

O oxigênio (O₂) é uma molécula altamente reativa, com grande capacidade de atração de elétrons. Nos sistemas biológicos, é o mais comum receptor de elétrons. Durante a fosforilação oxidativa, os elétrons do NADH e FADH₂ combinam com o O₂, formando H₂O e a energia liberada deste processo dirige a síntese de ATP à partir do ADP. Portanto, o oxigênio atua como o receptor final dos elétrons retirados das moléculas de glicose (fig. 2).

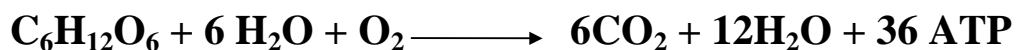


Figura 2 - Esquema simplificado da utilização da glicose para produção de energia.

A massa de um organismo vivo é proporcional ao cubo do seu diâmetro, enquanto a área de superfície, ao quadrado do diâmetro. Evolutivamente, na medida em que os seres multinucleares foram se

tornando cada vez maiores e em decorrência da baixa taxa de difusão e solubilidade do oxigênio em soluções aquosas, sistemas circulatórios se desenvolveram para possibilitar a troca de gases e substratos com o meio ambiente, já que a difusão simples não permitiria a atividade do metabolismo basal. Além disso, o desenvolvimento de órgãos respiratórios capacitou o aumento da superfície disponível para difusão dos gases, mantendo contato direto entre os fluídos internos e o meio ambiente.

A hemoglobina é uma proteína transportadora de oxigênio e, evolutivamente antiga (RAVEN & JOHNSON, 1992), está presente no sistema circulatório dos vertebrados, anelídeos, moluscos e em alguns protozoários. É um tetrâmero de aproximadamente 5,0 x 5,5 x 6,4 nm, com um peso molecular de 64.400 dalton. Consiste de 2 pares de cadeias de polipeptídeos denominadas globinas α e β . As cadeias de globina são constituídas por uma sequência de aminoácidos arranjados em uma ordenação, número e padrão espacial (estrutura terciária) definidos. Em cada cadeia um complexo heme está ligado covalentemente a um sítio específico. O heme é constituído por protoporfirina, que consiste em 4 anéis pirrólicos unidos em anel planar por quatro pontes α -metilênicas, e um átomo de ferro no centro do anel. O oxigênio se liga a este átomo de ferro.

A mioglobina é uma proteína heme, encontrada nas células musculares, de apresentação monomérica, similar em constituição e estrutura à globina β (PERUTZ, 1987). Tem a função de armazenar o oxigênio, utilizado na oxidação dos substratos pela mitocôndria, que fornece energia para a contração muscular.

Isoladamente, o ferro do complexo heme (na forma Ferrosa ou Fe^{++}) reage com o oxigênio de forma irreversível, produzindo o heme férrico (Fe^{+++}). A inserção do heme na estrutura da globina garante a reversibilidade da ligação com o oxigênio da mioglobina e da hemoglobina na medida em que, isolando os grupamentos heme, previne a formação de pontes entre o oxigênio e átomos de ferro de dois grupamentos heme (PERUTZ, 1987; CHIN, 1980). Da mesma forma, o complexo heme fica localizado em uma reentrância da molécula de globina (o “pocket” do heme) revestida por aminoácidos hidrofóbicos, diminuindo a possibilidade de contato com a água. Contribui para este isolamento a ligação do átomo de ferro com um átomo de nitrogênio da histidina, que doa uma carga negativa, o que possibilita ao ferro formar uma ligação fraca com o oxigênio.

Quando comparamos a mioglobina e a hemoglobina quanto à saturação de oxigênio em relação à pressão parcial de oxigênio ou pO_2 (vide

fig. 3), observamos que a curva da mioglobina é hiperbólica, o que demonstra sua grande capacidade de captação em níveis baixos de oxigênio.

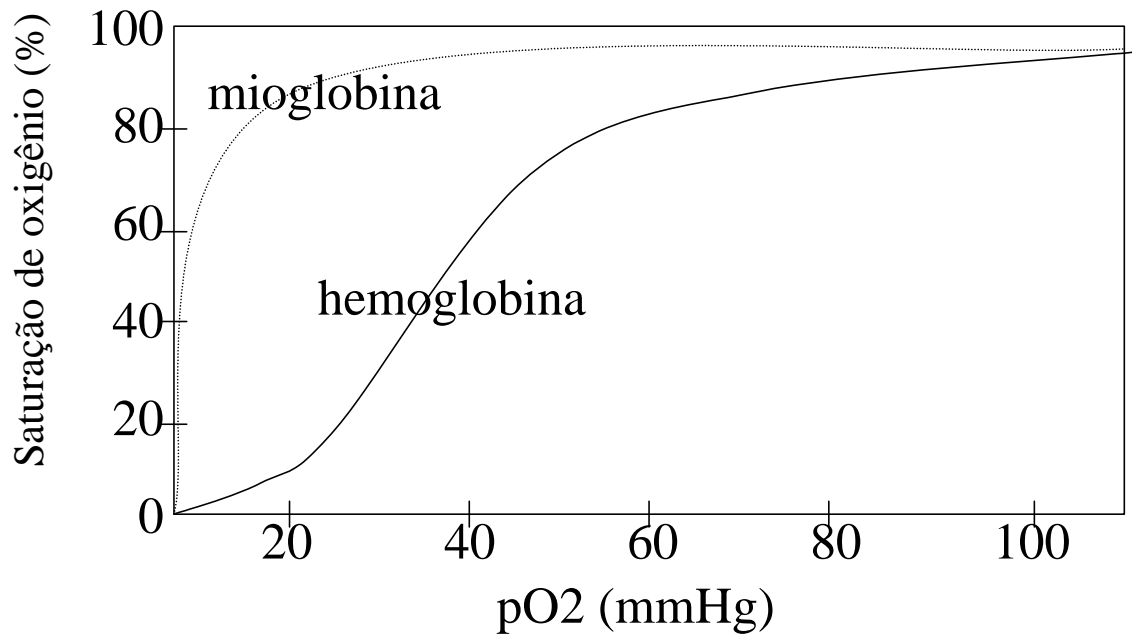


Figura 3. Curvas da dissociação do oxigênio das moléculas de mioglobina (linha pontilhada) e hemoglobina (linha contínua). O aspecto da curva da mioglobina é hiperbólica, evidenciando grande saturação do oxigênio em tensões baixas de oxigênio em relação à hemoglobina (adaptado de Perutz, MF. Molecular Anatomy, Physiology, and Pathology of Hemoglobin. In “The Molecular Basis of Blood Diseases”, Stamatoyannopoulos G. WB Saunders Company, Philadelphia, 1987).

Cada molécula de hemoglobina pode se combinar com até 4 átomos de O_2 e, diferentemente da mioglobina, apresenta curva sigmoide. Este aspecto é resultado da cooperatividade entre os monômeros. À medida que o

monômeros se ligam ao O_2 , a afinidade dos outros monômeros da hemoglobina aumenta. Assim, cada ligação de O_2 facilita a ligação de novas moléculas de O_2 no mesmo tetrâmero.

Esta cooperatividade entre as quatro sub-unidades permite que a hemoglobina se comporte de forma distinta para a captação (no órgão respiratório, em altas tensões de O_2) e liberação (nos tecidos, em baixa tensão) do oxigênio.

Nos vertebrados, a hemoglobina circula no interior dos eritrócitos. Esta localização permite, às custas de uma alta concentração de hemoglobina, evitar o aumento de viscosidade sanguínea, o que dificultaria o bombeamento do sangue pelo coração e da própria circulação. Por outro lado, a hemoglobina livre no plasma, após sua dissociação em monômeros e dímeros (HUISMAN, 1995), é rapidamente filtrada pelo rim e eliminada na urina.

Contudo, é a total integração do metabolismo eritrocitário com o transporte de oxigênio que justifica a presença da hemoglobina intra-celular (BREWER & EATON, 1971).

1.3. O metabolismo do eritrócito: interação com o transporte de oxigênio

O eritrócito é uma célula altamente especializada, de metabolismo simplificado (BERLIN, 1983), cuja função é transportar a hemoglobina através da circulação, por 120 ± 6 dias. Neste período, percorre a distância de 280 km (ARESE, 1990) durante 170.000 ciclos cardíacos (ALLISON, 1960).

Morfológicamente um disco bicôncavo com diâmetro de 7 a 8 μm , apresenta grande elasticidade e deformabilidade, condições absolutamente necessárias para se movimentar através da microcirculação (até 4 μm de diâmetro) (SKALAK, 1969).

O eritrócito é a célula terminal do processo denominado eritropoese, que ocorre na medula óssea. As células precursoras dos eritrócitos são derivadas da população de células-tronco hematopoéticas, comprometidas com a diferenciação eritróide, de acordo com uma sequência de eventos controlada geneticamente (BULL, 2001).

A eritropoese é responsável pela constante renovação dos eritrócitos destruídos, sendo dependente da integridade do ambiente medular e do estímulo da glicoproteína Eritropoetina, produzida pelas células peritubulares do rim (LACOMBE et al., 1989).

Os eritroblastos, células precursoras eritróides reconhecíveis por suas características citológicas específicas, são responsáveis pela produção de 85% do conteúdo da hemoglobina. Após a expulsão do núcleo, a produção de hemoglobina se completa na fase denominada reticulócito, que ainda contém mitocôndrias e ribossomos (BULL, 2001).

O eritrócito maduro não possui mitocôndria ou organelas (MILLER, 1995). O metabolismo energético do eritrócito, devido a ausência das reações oxidativas da mitocôndria, depende integralmente da Via Glicolítica Anaeróbica ou via de Embden-Meyerhof (VEM) para a produção de componentes de alta energia.

A Via Glicolítica Anaeróbica compreende uma sequência de 11 reações catalisadas por enzimas específicas. Para cada mol de glicose metabolizada, 2 moles de ácido láctico são produzidos e 2 moles de Adenosina Tri Fosfato (ATP) são gerados.

A glicose entra na célula por meio de difusão facilitada, mediada por uma proteína transmembrana (MUECKLER, 1985). Sem a necessidade de insulina, este influxo de glicose compensa o menor rendimento da Via Glicolítica Anaeróbica.

Entre muitas funções no eritrócito, o ATP é utilizado no transporte ativo de cátions, no sistema de degradação de proteínas dependente de ATP,

na manutenção da forma bicôncava, na preservação da deformabilidade quelando e controlando a saída de Cálcio intra-celular, e no transporte de lipídios (MILLER, 1995).

Aproximadamente 1/10 do fluxo da glicólise é desviado para a formação de 2,3 Difosfoglicerato (2,3 DPG), através do Desvio de Rapoport-Luebering. A principal função do 2,3 DPG é reduzir a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, ao se combinar e estabilizar a conformação deoxi da hemoglobina, impedindo que o oxigênio liberado para os tecidos seja novamente captado pelo eritrócito. O aumento da produção de 2,3 DPG permite, em poucas horas, a adaptação em altitudes acima de 2.000 m do nível do mar, onde o ar é mais rarefeito. Nas anemias, o aumento de 2,3 DPG é mecanismo adaptativo dos mais importantes (MILLER, 1995).

Dessa forma, a Via Glicolítica Anaeróbica representa a usina de energia que viabiliza as atividades dependentes de ATP, notadamente aquelas relacionadas com a membrana eritrocitária, e o Desvio de Rapoport-Luebering modula a afinidade da Hemoglobina pelo oxigênio, controlando a liberação para os tecidos (a principal função do eritrócito) (MILLER, 1995).

1.4. O eritrócito e a engenharia da produção de elétrons

O estresse oxidativo é um conjunto de condições intra e extra-celulares que conduzem à formação química e metabólica de radicais livres derivados do oxigênio (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O termo radical livre refere-se a espécies químicas que contém um único elétron não pareado em sua última camada eletrônica. Isto confere alta instabilidade, possibilitando reagir com os elementos celulares através desse potencial oxidativo (ganho de elétrons), lesando a célula (SALTMAN, 1989).

O eritrócito maduro, sendo incapaz de sintetizar componentes lesados devido ao metabolismo simplificado, é constantemente ameaçado pela oxidação, em decorrência da alta tensão intracelular de oxigênio (SALTMAN, 1989).

Dessa forma, assegurar a integridade funcional da Hemoglobina e dos componentes de membrana e enzimas é primordial para a manutenção do metabolismo eritrocitário, através da contínua produção de elétrons (SIEMS et al., 2000). Este potencial redutor é decorrente da formação de NADH pela própria Via Glicolítica Anaeróbica, e de NADPH, através do Desvio da Hexose Monofosfato.

Na forma deoxihemoglobina, o ferro do heme está no estado ferroso (Fe^{++}). Quando o oxigênio se liga, um dos elétrons do ferro é parcialmente

transferido para o oxigênio ligado, transformando-se no estado férrico (Fe^{+++}) (WITTENBERG, 1970). A oxihemoglobina é, portanto, um superoxo-ferriheme ($\text{Fe}^{+++}\text{O}_2^-$). Quando o oxigênio é liberado, o estado ferroso é restabelecido. Contudo, uma pequena porção do oxigênio deixa a hemoglobina como radical livre superóxido (O_2^-), mantendo o ferro no estado férrico. A Hemoglobina, nesta condição, é denominada Metahemoglobina. Esta reação é referida como auto-oxidação da hemoglobina e ocorre numa taxa de 0,5 a 3% ao dia (TELEN & KAUFMAN, 1993).

A Metahemoglobina é incapaz de se ligar ao oxigênio (FINCH, 1948). A taxa de oxidação é aumentada por condições como o aumento de temperatura, diminuição do pH, presença de fosfato orgânico, íons metálicos.

Certas drogas com ação oxidante, além de aumentar a formação de Metahemoglobina, podem lesar outros componentes do eritrócito (WRIGHT et al., 1999). Se a desnaturação oxidativa da hemoglobina prossegue, a metahemoglobina é convertida em hemicromos. Estes são formados através de mudanças na estrutura terciária da proteína. Embora os hemicromos possam ser revertidos, posteriores distorções da estrutura

terciária, irreversíveis, dissociarão a estrutura quaternária, com consequente precipitação e formação dos corpos de Heinz.

A maior parte da metahemoglobina (MetaHb) é reduzida através da ação de uma enzima, a citocromo b_5 metahemoglobina redutase (JAFFÉ, 1989), que atua na presença de dois carreadores de elétrons, citocromo b_5 e NADH. A citocromo b_5 metahemoglobina redutase catalisa a transferência de elétrons do NADH para o citocromo b_5 e, posteriormente, para a Metahemoglobina, conforme esquema abaixo (fig. 4).

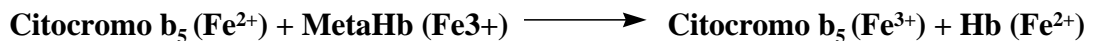
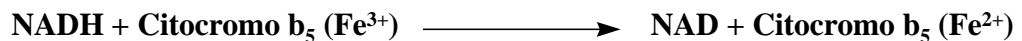


Figura 4. Esquema das reações envolvendo a transferência de elétrons do NADH para a redução da Metahemoglobina em Hemoglobina, através da redução e oxidação do citocromo b_5 .

Além do sistema de redução dependente de NADH, duas outras substâncias, o ácido ascórbico e o tripeptídeo Glutathiona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), podem reverter a Metahemoglobina em Hemoglobina através de mecanismo não-enzimático (MANSOURI & LURIE, 1993).

O NADPH pode, através de sistema enzimático que envolve a metahemoglobina-redutase-NADPH-dependente (HULTIQUIST et al., 1993), reduzir a metahemoglobina. Sua importância fisiológica pequena (menos de 5% da atividade redutora de metahemoglobina) é decorrente, possivelmente, da ausência de um carreador intermediário de elétrons análogo ao citocromo b_5 .

O NADPH é formado à partir da redução do NADP na Via da Hexose Monofosfato, com a participação das enzimas Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G-6-PD) e 6-Fosfogluconato Desidrogenase (6-PGD). A G-6-PD “desvia” a Glicose-6-Fosfato (G-6-P) do seu caminho na Via Glicolítica Anaeróbica, convertendo-a em 6-Fosfogluconato (6-PG). A 6-PGD converte a 6-PG em Ribulose-5-Fosfato, uma pentose fosfato. Esta é a única reação em que o eritrócito maduro necessita de oxigênio e forma CO_2 (metabolismo aeróbico). A Ribulose-5-Fosfato, através de uma série de reações pode ser convertida em Frutose-6-Fosfato (F-6-P) e Gliceraldeído-3-Fosfato (G-3-P), que reentram na Via Glicolítica Anaeróbica, produzindo lactato e ATP. De forma alternativa, a F-6-P pode ser convertida em G-6-P pela enzima Glicose Fosfato Isomerase e ser reintroduzida na Via da Hexose Monofosfato (reciclagem) (MILLER, 1995).

A utilização de glicose marcada com ^{14}C em diversas posições desta molécula possibilita avaliar o fluxo metabólico da Via da Hexose Monofosfato através da detecção do $^{14}\text{CO}_2$. A atividade total desta Via é fornecida pelo ^{14}C -1 e, a reciclagem, pelo ^{14}C -2 (MILLER, 1995).

Em condições fisiológicas, menos de 10% do fluxo de glicose passa pela Via da Hexose Monofosfato. Sob estresse oxidativo, observa-se aumento de até 25 vezes sobre a atividade basal da formação de CO_2 eritrocitário.

A formação do NADPH no eritrócito está associada com a defesa frente à agressão oxidante, através da regeneração da Glutathione, conferindo proteção principalmente aos grupos sulfidrilas.

Os grupos sulfidrilas (-SH) são potencialmente de risco à ação oxidante (FISCHER et al., 1978). Um grande número de funções bioquímicas do eritrócito depende criticamente de um pequeno número de tióis essenciais, susceptíveis à oxidação, como: a) enzimas da Via Glicolítica Anaeróbica Hexoquinase, Gliceraldeído-Fosfato-Deidrogenase, Piruvatoquinase; b) proteínas da membrana e; c) Hemoglobina (principalmente os grupos sulfidrilas da cisteína 93 da globina β). Estes grupos tióis são oxidados em dissulfetos (-S-S-) e sulfóxidos, prejudicando a função e favorecendo a desnaturação destas proteínas (GILBERT & McLEAN, 1990).

O tripeptídeo Glutationa (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) é o tiol intracelular e o peptídeo de baixo peso molecular mais abundante das células do organismo (MEISTER & ANDERSON, 1983). O resíduo L-cisteinil fornece o grupamento -SH, chave da atividade química desta molécula.

A glutatona (CHIU et al., 1989), na sua forma reduzida (GSH), protege as células contra uma variedade de oxidantes tóxicos e geradores de radicais livres, além de manter um grande número de moléculas em sua forma funcional ativa.

Após exposição do GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (glutationa oxidada). O GSH é regenerado através da ação da enzima Glutationa Redutase (GSH-Rd), uma flavoproteína, e depende da presença de NADPH que, por sua vez, é formado na Via da Hexose Monofosfato(CHIU et al., 1989).

O ânion superóxido (O_2^-) é formado à partir da seguinte reação (fig. 5):

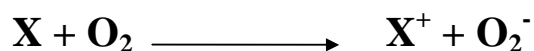


Figura 5. Esquema simplificado da reação envolvendo a formação de superóxido a partir de uma molécula-doadora X, oxidada pelo O_2 .

No eritrócito, o doador X é a própria oxihemoglobina. Drogas e toxinas com ação oxidante também podem gerar superóxido. Uma vez formado em solução aquosa, produtos tóxicos adicionais do oxigênio podem se formar espontaneamente à partir do superóxido. Portanto, o superóxido deve sofrer dismutação pela enzima Superóxido Dismutase (SOD), produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio (Fig. 6) (SALTMAN, 1989):

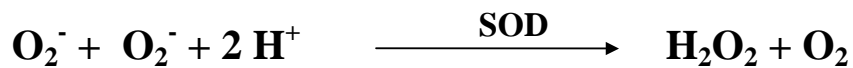


Figura 6. Esquema da reação da redução do Superóxido (O₂⁻) em Peróxido (H₂O₂), pela ação da enzima Superóxido Dismutase (SOD).

Na presença de quantidades catalíticas de metais de transição como o ferro, o superóxido e o peróxido podem reagir e formar o radical hidroxil (OH[·]), altamente reativo (Fig. 7):

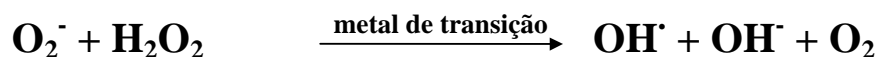


Figura 7. Esquema da reação de formação do radical hidroxila (OH[·]) na presença de metais de transição e superóxido e peróxido.

Qualquer um destes derivados do oxigênio, denominados espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), pode exercer efeitos tóxicos nos componentes celulares, incluindo-se a lise celular através da ação

oxidante nas membranas, principalmente através da peroxidação dos lipídios (CHIU et al., 1989). Ocorrendo a lipoperoxidação, isto desencadeará alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Além disso, a lipoperoxidação pode também ser resultante da ação dos corpos de Heinz, produtos também da ação dos ERMOS.

Dessa forma, uma vez formado, o peróxido de hidrogênio deve ser decomposto. O GSH tem ação fundamental no eritrócito nesta detoxicação catalisada pela enzima GSH peroxidase (GSH-Px) (COHEN & HOCHSTEIN, 1963), conforme a seguinte reação (Fig. 8):



Figura 8. Esquema da reação de redução do Peróxido de Hidrogênio em Água através da ação da Glutathiona Peroxidase (GSH-Px).

A catalase, uma enzima heme dependente de NADPH, decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (JACOB et al., 1965). Parece ter ação menos importante no eritrócito, conforme observado na ausência de doença hemolítica ou metahemoglobinemia nos indivíduos com acatalasemia hereditária.

Contrariando todas as previsões catastróficas, os eritrócitos, com sua alta concentração de oxigênio (favorecendo a formação dos ERMO), com a grande presença de lipídios poli-insaturados em sua membrana (o que favorece a lipoperoxidação) e de ferro (induzindo a produção de radicais hidroxila), em condições fisiológicas sobrevivem 120 dias. Se a natureza impôs tamanho desafio oxidativo no interior desta célula, também forneceu um grande potencial redutor.

Assim, no caminho da glicose até o lactato, gerando ATP e 2,3-DPG, a formação adicional de NADH e de NADPH completam, na simplicidade desta integração bioquímica, o vigoroso metabolismo desta célula.

1.5. As Drogas oxidantes e o Eritrócito

O eritrócito é susceptível aos efeitos oxidantes de certas substâncias e drogas e seus metabólitos. A lesão por drogas pode ocorrer em 3 circunstâncias (GORDON-SMITH, 1980):

- a) se a droga induzir estresse oxidante superior à capacidade redutora, como no caso do uso de altas doses de dapsona;
- b) se existem anormalidades estruturais do eritrócito como nas hemoglobinopatias instáveis, o que acarreta maior susceptibilidade

ao estresse oxidante, mesmo quando a capacidade redutora está preservada;

c) se há deficiência no capacidade redutora, como no caso da deficiência de G6PD.

Na Grécia Antiga, Pitágoras, o filósofo e matemático, já alertava seus alunos sobre o perigo da ingestão do feijão fava. O favismo, quadro clínico descrito formalmente por médicos da região do sul da Itália e da Sardenha no início deste século, é hoje compreendida como a manifestação hemolítica intra-vascular aguda em decorrência da ingestão do feijão fava em pacientes com deficiência de G6PD, variante Mediterrânea (LUZZATO & MEHTA, 1989).

A deficiência de G6PD é a mais comum das enzimopatias conhecidas. Transmitida através de herança ligada ao cromossoma X, é geneticamente heterogênea. Mais de 300 variantes diferentes já foram descritas, e sua caracterização bioquímica indica que são resultado de muitas mutações alélicas. Estima-se que afete 400 milhões de indivíduos em termos mundiais. Na maior parte das vezes, é condição assintomática. O quadro clínico predominante é o evento hemolítico desencadeado por drogas com potencial oxidante(LUZZATO & MEHTA, 1989).

Durante a ocupação da África pelo Exército Americano na Segunda Guerra Mundial, observou-se que soldados, principalmente os da raça negra, desenvolviam quadro hemolítico após uso profilático de Primaquina (KELLERMEYER et al., 1962). Para elucidar a denominada susceptibilidade à hemólise da primaquina em negros, estudos foram realizados em 1944 pela University of Chicago-Army Medical Research Unit na Penitenciária Estadual de Illinois, em voluntários. Os resultados (DERN et al., 1954) revelaram que ocorreu hemólise em 10% dos homens negros que receberam Primaquina e que a gravidade da hemólise dependeu da dosagem utilizada. Posteriormente, demonstrou-se que esta susceptibilidade era decorrente da deficiência de G6PD (KELLERMEYER et al., 1962).

O mesmo grupo de pesquisadores, ligados diretamente ao U.S. Army, desenvolveu método para identificar os indivíduos deficientes em G-6-PD (BREWER et al., 1962). O princípio deste teste, simples o suficiente para ser realizado em campos de batalha, envolve a oxidação da hemoglobina em metahemoglobina pelo nitrito de sódio (coloração marrom) e a subsequente redução enzimática para hemoglobina na presença do azul de metileno nos indivíduos com atividade normal de G6PD (coloração avermelhada).

O Azul de Metileno (AM) é um corante básico redox, componente das colorações tipo Romanovsky, que impregna componentes ácidos das células com tonalidade azul-violeta, largamente empregado na rotina dos laboratórios de hematologia.

Com ação anti-séptica, pode ser utilizado em infecções do trato urinário. É utilizado em nível experimental como agente virucida (WAGNER et al., 1993) e tripanosomocida em bolsas de sangue para transfusões. A ação virucida ocorre na presença de oxigênio e luz visível, através da ação lesiva do Azul de Metileno sobre os resíduos guanina nos ácidos nucleicos virais (FLOYD et al., 1989).

Terapeuticamente, o Azul de Metileno é utilizado nos pacientes com Metahemoglobinemia Adquirida (MARRS et al., 1989), através de injeção venosa, na dose de 1mg/kg em solução de 1 g/dl, em tempo de infusão de 5 minutos. Doses acumuladas superiores a 7 mg/kg podem desencadear sintomas como dispnéia, dor precordial, cianose persistente e anemia hemolítica (SILLS & ZINKHAM, 1994).

A Metahemoglobina é reduzida pelo Azul de Metileno pelo fato desta substância ser um doador de elétrons efetivo para a Metahemoglobina Redutase dependente de NADPH. Na presença desta enzima e de NADPH, o Azul de Metileno é rapidamente reduzido a Branco de Metileno que, por sua

vez, reduz a metahemoglobina não-enzimaticamente, conforme figura abaixo (fig. 9):



Figura 9. Esquema da redução da Metahemoglobina em Hemoglobina pelo Branco de Metileno, através da enzima Metahemoglobina redutase dependente de NADPH.

A redução do Azul de Metileno para Branco de Metileno requer a Via da Hexose Monofosfato intacta para a regeneração do NADPH. Nesse sentido, os eritrócitos deficientes em G6PD não reverterem a Metahemoglobina induzida pelo Nitrito de Sódio, conforme se observa pelo método de Brewer. Dessa forma, o Azul de Metileno é agente potencialmente oxidante, podendo desencadear episódios hemolíticos em indivíduos deficientes de G6PD.

Outras drogas potencialmente oxidantes podem reduzir a Metahemoglobina em Hemoglobina.

A divicina (2,6-diamino-4,5-dihidroxipirimidina), na forma reduzida, uma aglicona implicada na patogênese do Favismo, reduz a metahemoglobina eficientemente (BENATTI, 1985), tanto em eritrócitos intactos como em hemolisados. Embora o NADPH, NADH e o GSH não tenham qualquer efeito direto na atividade redutora da Metahemoglobina, eles convertem a divicina oxidada em espécies hidroxiquinona reduzidas, que transferirão elétrons para a Metahemoglobina. De forma semelhante ao Azul de Metileno, esta redução é dependente da atividade da Via da Hexose Monofosfato.

A Cistamina, uma diamina formada por duas moléculas de cisteamina ligadas por uma ponte dissulfeto, é um agente tiol que também atua na redução da Metahemoglobina formada pelo Nitrito de Sódio. Ela penetra no eritrócito intacto e forma complexo estável com a molécula de Hemoglobina A, ligando-se à cisteína β -93 (MACHADO, 1979), formando o complexo Hemoglobina-Etilamina (HbEA). A redução deste complexo em Hemoglobina ocorre na presença de GSH (BEUZARD et al., 1978), oxidado em GSSG que, novamente, é revertido em GSH através da ação da enzima Glutationa Redutase. Como a Glutationa Redutase depende da disponibilidade de NADPH, a reversão do complexo HbEA está diminuída nos eritrócitos deficientes em G6PD.

O complexo HbEA migra como uma banda eletroforética distinta da Hemoglobina (MACHADO, 1979). Esta propriedade fornece uma maneira simples de quantificar a reatividade da Cistamina e a reversão do complexo HbEA em hemoglobina.

Comparando a ação do Azul de Metileno e Cistamina (Barraviera et al.,1988), verificou-se que a redução da Metahemoglobina em Hemoglobina ocorreu de forma mais tardia e o grau de redução foi três vezes inferior em relação ao Azul de Metileno. Correlacionando a redução da Metahemoglobina com os níveis de Riboflavina, vitamina precursora de FAD, coenzima da Glutathione Redutase, propôs um novo método utilizando a capacidade de redução da metahemoglobina pela Cistamina para a avaliação indireta da atividade das enzimas Glutathione redutase e Glutathione peroxidase.

Assim, observamos que o efeito isolado do AM ou da CI sobre a redução da Metahemoglobina induzida pelo NS ocorre através de ação oxidativa primária destas substâncias. No caso do AM, através do consumo de NADPH e ativação da G6PD.

Com relação à CI, o mecanismo inicial é a formação do complexo HbEA, com a oxidação do grupo SH da cisteína β 93. A redução da

Metahemoglobina é fenômeno secundário nesta reação, mas as vias efetivas são desconhecidas.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a interação do efeito das substâncias Azul de Metileno, Cistamina e Nitrito de Sódio no sistema de óxido-redução eritrocitário, através da incubação a 37° C destas em suspensão de glóbulos vermelhos lavados de indivíduos normais, na presença de glicose.

Na primeira fase do trabalho, utilizamos a dosagem de Metahemoglobina como forma de avaliação da oxidação após períodos de 10, 90 e 180 minutos de incubação com estas substâncias.

Propomos, na segunda fase do trabalho, método utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC ou High Performance Liquid Chromatography). Neste método, o acompanhamento da formação e redução do complexo Hemoglobina-Etilamina é sugerido como forma de avaliação da ação oxidante das drogas sobre o Sistema de Óxido-redução Eritrocitário.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Planejamento

Foram realizadas 2 séries de experimentos. No experimento I, utilizamos a dosagem de metahemoglobina (MetaHb) através de leitura espectrométrica. Esta fase foi dividida em 2 partes, IA e IB.

No experimento IA, avaliou-se a formação de MetaHb na presença de Azul de Metileno e/ou Cistamina, aos 10, 90 e 180 minutos de incubação a 37°C.

No experimento IB, avaliou-se a reversão da MetaHb, induzida pelo nitrito de sódio (NS), em Hemoglobina (Hb), na presença de Azul de Metileno (AM) e/ou Cistamina (C), aos 10, 90 e 180 minutos de incubação a 37°C.

No experimento II avaliou-se a interferência do AM e/ou NS na formação e reversão do complexo Hemoglobina-S-Etilamina (induzida pela presença de Cistamina), aos 10, 90 e 180 minutos de incubação a 37°C.

3.2. Casuística

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, recebendo parecer favorável, aprovado em reunião deste Comitê aos 14 de setembro de 1998, sob número 221/98 CEP.

Foram estudadas amostras de sangue de 16 voluntários sadios, do sexo masculino, com faixa etária entre 18 e 45 anos, sem uso recente de medicação, sem anemia laboratorialmente, sem reticulocitose, sem antecedentes de doença hematológica.

O sangue utilizado foi proveniente de doadores de sangue da Divisão Hemocentro e de voluntários.

Todos os indivíduos foram informados sobre os experimentos, e somente após autorização verbal e por escrito, o sangue foi coletado.

Foram testados 8 indivíduos para o experimento I e 8 indivíduos para o experimento II.

3.3. Processamento do sangue para os experimentos I e II:

De cada indivíduo foram colhidos 8 ml de sangue em seringa de plástico através de punção de veia de antebraço garroteado, depositados em

tubos de vidro contendo 8 gotas de heparina, vedados com tampa de borracha, misturados suavemente por inversão e processadas imediatamente.

Para obtenção de glóbulos vermelhos (GV) lavados, o sangue foi centrifugado a 2.500 rotações por minuto (r.p.m.) por 10 minutos. O plasma, glóbulos brancos e plaquetas foram aspirados com pipeta de Pasteur. Os GV foram lavados com tampão salina-fosfato (PBS) à 4⁰C, centrifugados a 2.500 r.p.m. por 10 minutos, por três vezes. Após a última lavagem, os GV foram ressuspensos em PBS, com a concentração final de hemoglobina ajustada entre 11 e 13 g/dl, quantificada conforme método da cianometahemoglobina (International Committee for Standardization in Hæmatology, 1967), utilizando o reagente de Drabkin.

3.4. Protocolo do Experimento I

No experimento IA, os reagentes foram distribuídos como no Quadro 1:

Quadro 1: Distribuição de reagentes do experimento IA.

| Reativos | Tubos | | | |
|--------------------------------------|------------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| | controle (μ l) | AM (μ l) | C (μ l) | AM+C (μ l) |
| GV lavados, com Hb ajustada | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Solução de glicose a 5% | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Solução de azul de metileno a 0,015% | ----- | 50 | ----- | 50 |
| Solução de cistamina 0,1M | ----- | ----- | 100 | 100 |
| PBS | 150 | 100 | 50 | ----- |
| Volume final (μ l) | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 |

No experimento IB, os reagentes foram distribuídos como no Quadro 2:

Quadro 2: Distribuição de reagentes do experimento IB.

| Reativos | Tubos | | | |
|--------------------------------------|------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| | NS (μ l) | NS+AM (μ l) | NS+C (μ l) | NS+AM+C (μ l) |
| GV lavados, com Hb ajustada | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Solução de nitrito de sódio a 0,7% | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Solução de glicose a 5% | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Solução de azul de metileno a 0,015% | ----- | 50 | ----- | 50 |
| Cistamina (0,1M) | ----- | ----- | 100 | 100 |
| PBS | 150 | 100 | 50 | ----- |
| Volume final (μ l) | 1250 | 1250 | 1250 | 1250 |

Os tubos foram vedados com tampa de borracha e incubados em banho-maria, a 37⁰C. Foram retiradas alíquotas de 200 μ l de cada um dos 8

tubos (experimentos IA e IB) aos 10, 90 e 180 minutos de incubação, sempre precedidas de agitação suave, para a dosagem de Metahemoglobina.

3.5. Dosagem de Metahemoglobina

Foi utilizado o método de dosagem de Metahemoglobinemia por espectrofotometria (Evelyn & Malloy, 1938), conforme descrição abaixo, como ilustrado na Figura 10.

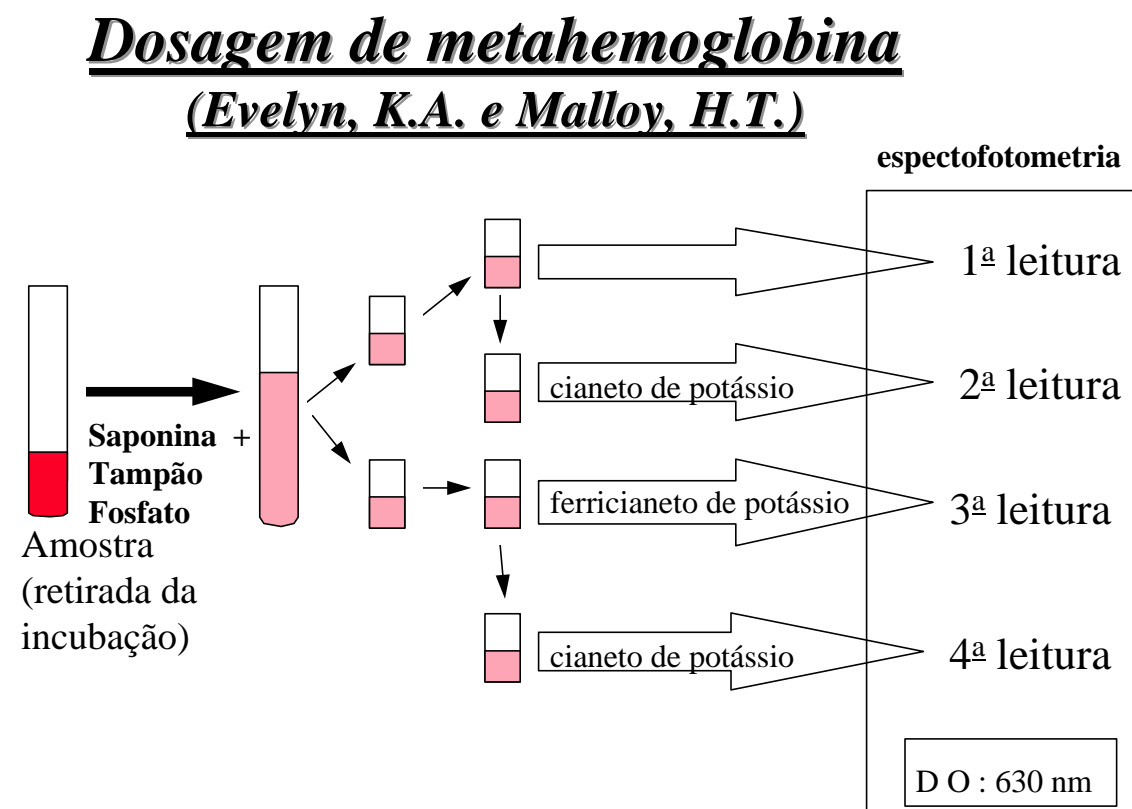


FIGURA 10 Representação esquemática do método de dosagem de Metahemoglobina, conforme Evelyn, K.A. e Malloy, H.T.

As alíquotas de 200 µl retiradas de cada tubo foram colocadas em tubos sorológicos previamente identificados.

Foram acrescentados 100 µl de saponina (2%) e os tubos, agitados. A seguir, acrescentaram-se 10 ml de tampão fosfato pH 6,8 (diluição 1:50 com água destilada) em cada tubo. Os tubos foram vedados com Parafilm e agitados por inversão.

De cada tubo, alíquotas de 3 ml foram retiradas e depositadas em 2 cubetas de vidro.

As leituras da densidade óptica foram realizadas em espectrofotômetro de duplo feixe (Shimadzu), em 630 nm. O blank utilizado foi o tampão fosfato pH 6,8 (diluição 1:50 com água destilada).

Na primeira cubeta foram realizadas 2 leituras espectrofotométricas, a primeira leitura, diretamente. A segunda leitura foi realizada após o acréscimo

de cristais de cianeto de potássio (aproximadamente 20 mg) e homogeneização por inversão (tampada com Parafilm) da primeira cubeta.

A terceira leitura foi realizada na segunda cubeta, acrescentando cristais de ferrocianeto de potássio (aproximadamente 20 mg), homogeneizado por inversão da cubeta (tampada com Parafilm). Após, foram acrescentados cristais de cianeto de potássio (aproximadamente 20

mg), homogenizado por inversão da cubeta (tampada com Parafilm) e, a quarta leitura, efetuada.

A primeira leitura corresponde à quantidade presente de MetaHb. A segunda leitura ocorre após o acréscimo de Cianeto de Potássio, transformando a Hb e a MetaHb em cianometahemoglobina e cianohemoglobina .

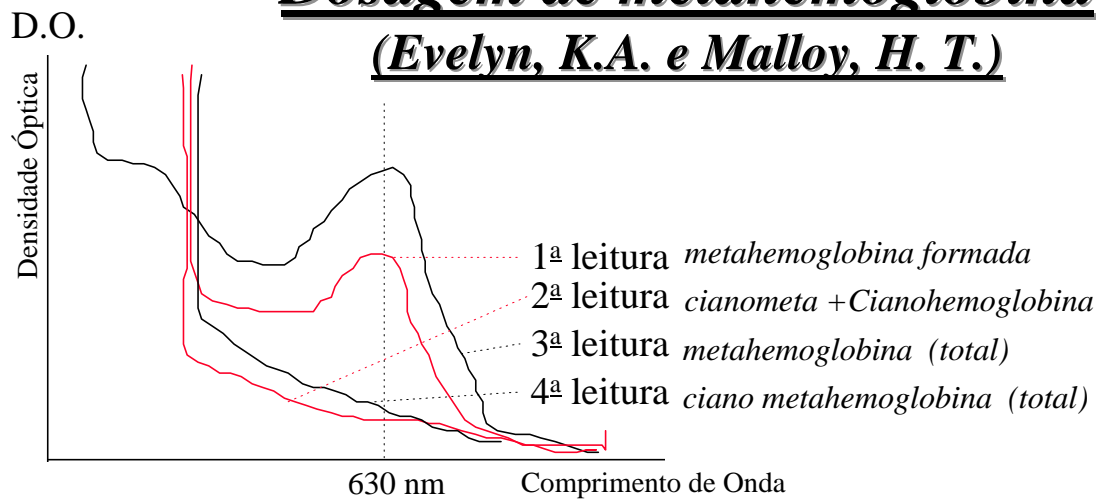
A terceira leitura corresponde à conversão total da Hb em MetaHb, após acréscimo de ferricianeto de potássio, na segunda cubeta. A quarta leitura corresponde à conversão total da MetaHb em cianometahemoglobina, conseqüente ao acréscimo de cianeto de potássio.

Na Figura 11 ilustramos o princípio espectrofotométricas do método utilizado para a dosagem de Metahemoglobina.

A porcentagem de MetaHb foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de MetaHb} = \frac{\text{D.O. 1}^{\text{a}} \text{ leitura} - \text{D.O. 2}^{\text{a}} \text{ leitura}}{\text{D.O. 3}^{\text{a}} \text{ leitura} - \text{D.O. 4}^{\text{a}} \text{ leitura}} \times 100$$

Dosagem de metahemoglobina (Evelyn, K.A. e Malloy, H. T.)



| | |
|--|---|
| Porcentagem de metahemoglobina formada = 100 x | $\frac{\text{D.O. 1ª leitura} - \text{D.O. 2ª leitura}}{\text{D.O. 3ª leitura} - \text{D.O. 4ª leitura}}$ |
|--|---|

Figura 11: Representação gráfica dos espectros dos hemolisados: 1ª Leitura: espectro da metahemoglobina formada; 2ª Leitura: espectro da cianometahemoglobina formada após adição de cristais de cianeto de potássio ao material da 1ª leitura; 3ª Leitura: espectro do total de MetaHb formada pela adição de cristais de ferricianeto de potássio; 4ª Leitura: espectro da cianometahemoglobina pela adição de cristais de cianeto de potássio ao tubo da 3ª leitura. Princípio da leitura espectrofotométrica do método de dosagem de MetaHb, conforme Evelyn, K.A. e Malloy, H.T.

No final do experimento, obtivemos a dosagem de MetaHb aos 10, 90 e 180 minutos de incubação de cada tubo.

3.6. Princípio do experimento II

A Cistamina, quando adicionada aos glóbulos vermelhos, liga-se à Hemoglobina através da Cisteína, localizada na posição 93 da globina beta, formando o complexo Hemoglobina-S-Etilamina (HSE), como ilustrado na figura 12.

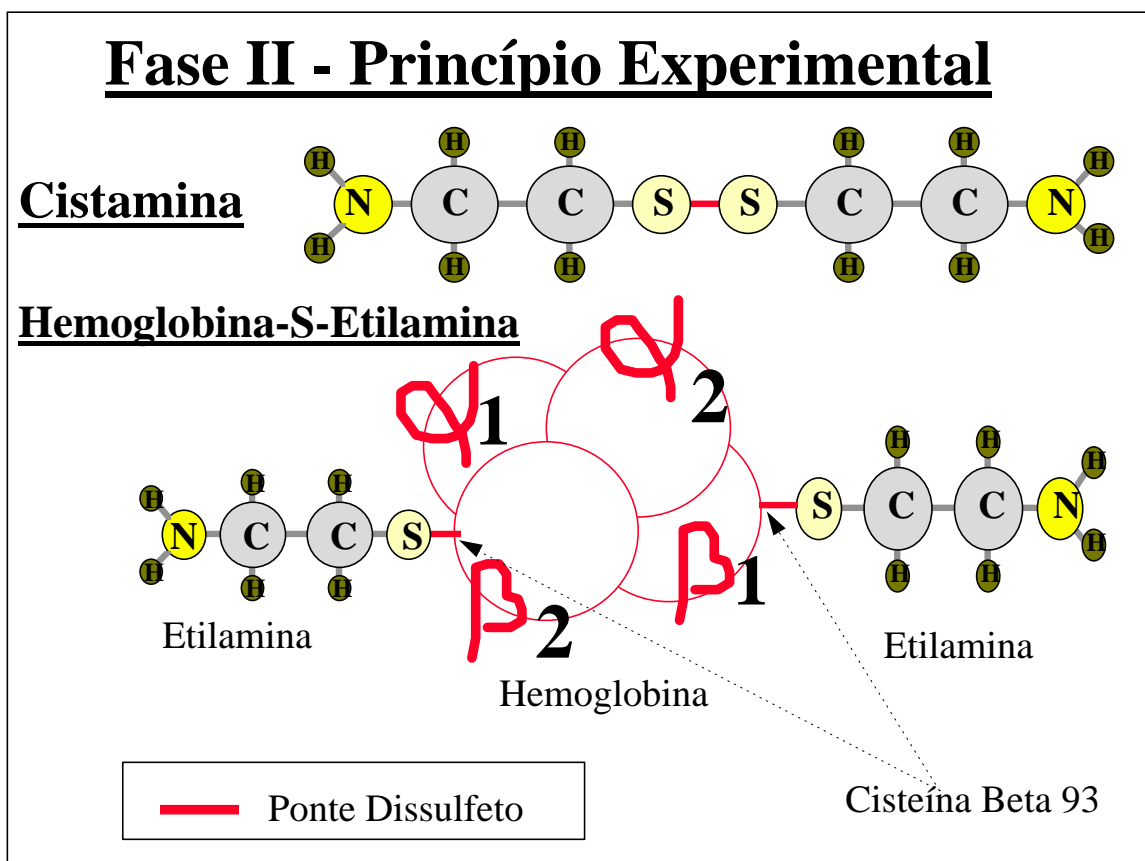


Figura 12: Representação esquemática da molécula de Cistamina e da formação da molécula de Hemoglobina-S-Etilamina.

A formação do complexo Hemoglobina-Etilamina, assim como sua redução em Hemoglobina novamente, podem ser observadas através de eletroforese de hemoglobina, como ilustrado na figura 13.

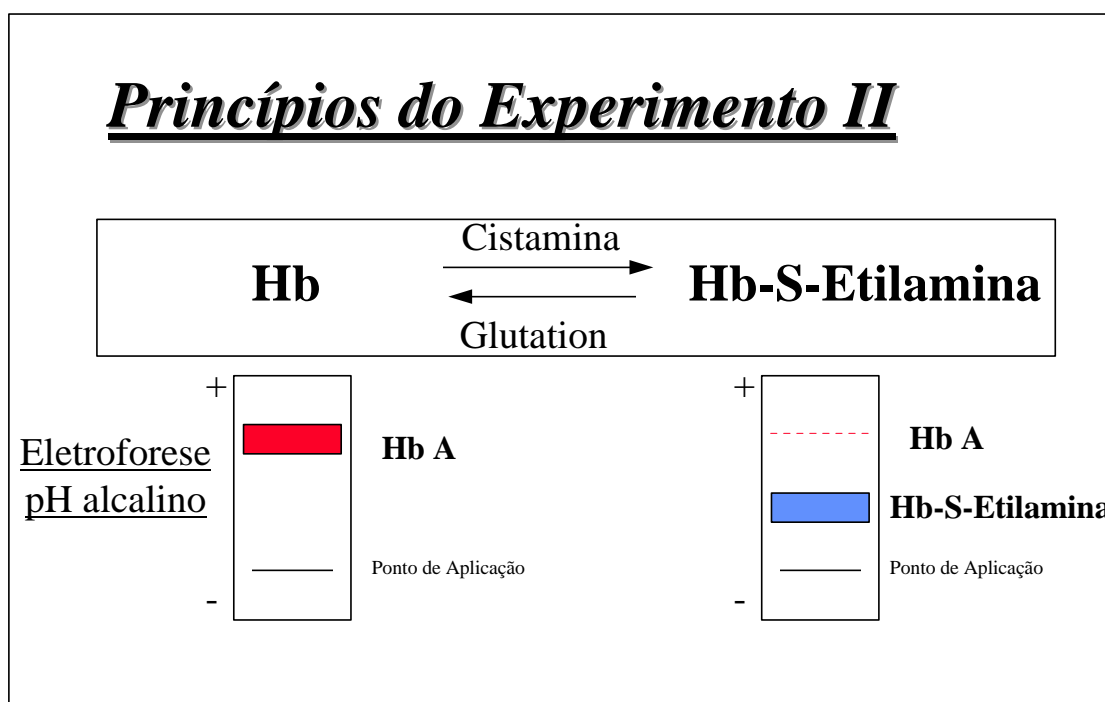


Figura 13: Representação esquemática da modificação da Migração Eletroforética da Hemoglobina-S-Etilamina resultante do tratamento dos glóbulos vermelhos com cistamina..

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAP) é método de separação amplamente utilizado para o estudo das proteínas, incluindo-se as hemoglobinas (KUTLAR et al., 1983).

Duas bombas impulsionam 2 tampões que diferem quanto ao pH, osmolaridade, e/ou composição química. Seguindo uma programação determinada previamente, a composição da fase móvel se modifica, conforme o fluxo e a proporção final dos tampões. A fase estacionária é composta de uma coluna de resina, cuja natureza depende da finalidade da separação. A amostra é injetada e se ligará à coluna e a corrida é iniciada. A mudança na composição da fase móvel levará à mudança de afinidade da amostra à coluna, eluindo as moléculas seletivamente. Um sistema detector (por exemplo, um espectrofotômetro) é acoplado à saída do fluxo da coluna e registra, no tempo, a quantidade de material eluído. A análise final é realizada por softwares em conexão com o sistema detector e o resultado final é expresso por um cromatograma, como ilustrado na figura 14.

Cromatografia Líquida de Alta Performance

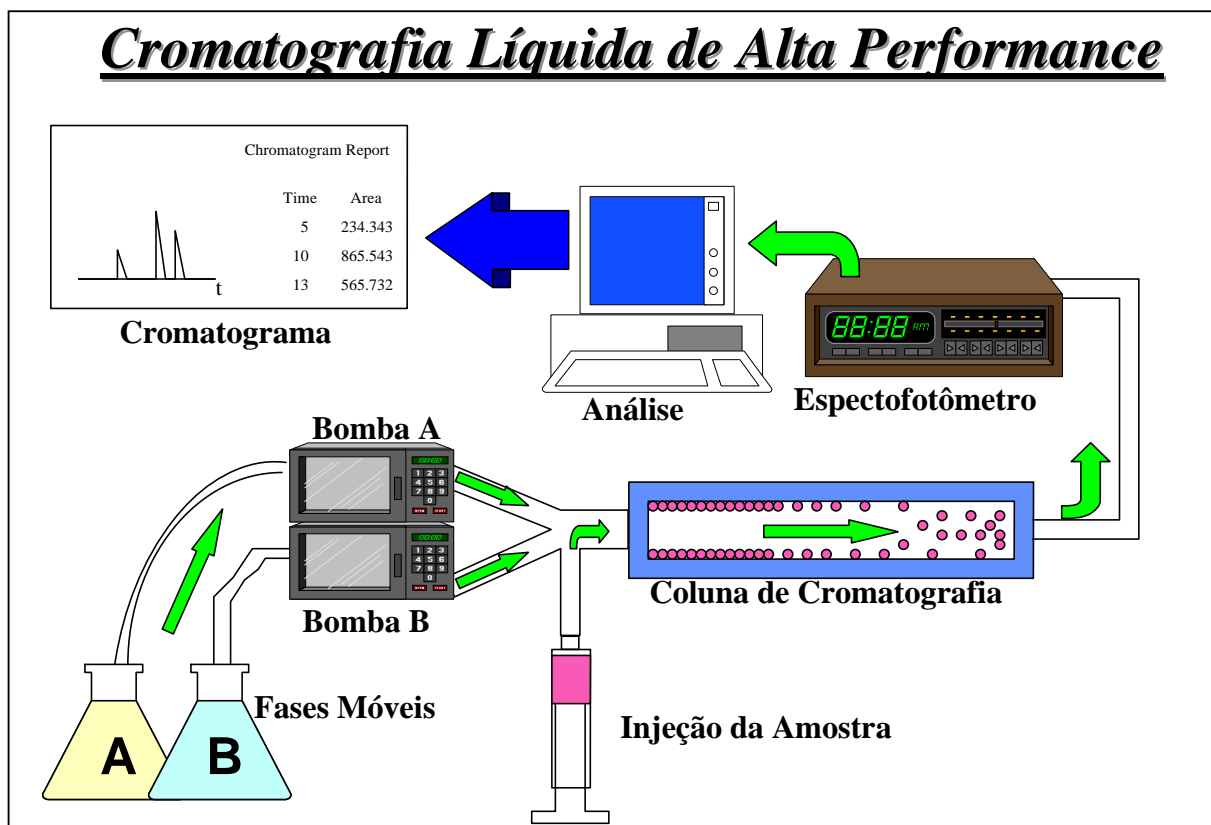


Figura 14: Representação esquemática da cromatografia líquida de alta performance.

No presente trabalho, baseado em metodologia aplicada no estudo de hemoglobinas (WILSON et al., 1983), a fase estacionária da CLAP por troca catiônica utiliza uma coluna SHIM-PAK WCX-1 (Weak Cation Exchange), composta de gel de sílica modificada contendo grupos carboxil, que proporciona afinidade para moléculas de cargas positivas. Utilizando-se de uma fase móvel com alta concentração de sódio (Na^+), pode-se obter a eluição diferencial de moléculas com cargas elétricas diferentes, na medida em que se aumenta o gradiente de sódio e se modifica o pH da fase móvel.

Portanto, moléculas com baixa afinidade à coluna (menos catiônicas) serão eluídas em concentrações menores de Na⁺, enquanto que as moléculas com maior cationicidade (ou maior afinidade à coluna) serão eluídas em concentrações mais elevadas.

No experimento II utilizamos a CLAP por troca catiônica para:

- avaliar a formação e a reversão do complexo Hb-S-Etilamina aos 10, 90 e 180 minutos;
- verificar a influência do azul de metileno e/ou nitrito de sódio na formação e reversão do complexo Hb-S-Etilamina aos 10, 90 e 180 minutos.

3.7. Protocolo do experimento II

Os reagentes foram distribuídos como no Quadro 3:

Quadro 3: Distribuição de Reagentes do experimento II.

| Reativos | Tubos | | | |
|--------------------------------------|------------------------|------------------|------------------|----------------------|
| | Controle (μ l) | AM (μ l) | NS (μ l) | AM+N S (μ l) |
| GV lavados, com Hb ajustada | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Solução de glicose a 5% | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Solução de cistamina 0,1M | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Solução de azul de metileno a 0,015% | ----- | 10 | ----- | 10 |
| Solução de nitrito de sódio a 0,7% | ----- | ----- | 10 | 10 |
| PBS | 20 | 10 | 10 | ----- |
| Volume total (μ l) | 250 | 250 | 250 | 250 |

Os tubos foram vedados com tampa de borracha e incubados em banho-maria, a 37⁰C. Aos 10, 90 e 180 minutos de incubação foram retiradas alíquotas de 50 ul de cada tubo e depositadas em tubos de Eppendorf, previamente identificados.

Estas alíquotas foram lavadas com 950 ul de PBS a 4⁰C e centrifugação a 10.000 r.p.m. por 15 segundos, no total de 3 lavagens sucessivas.

Após a última lavagem, foram retirados 20 ul do concentrado de hemácias, hemolisadas em tubo de hemólise com 1.000 ul de Solução Triton EDTA, com agitação vigorosa.

O hemolisado foi filtrado com unidade filtrante HV millex em polietileno com membrana durapore 0, 45 um de poro (Sistema Millipore).

A seguir, as amostras foram injetadas no sistema de CLAP em coluna de troca catiônica para análise.

Utilizou-se Sistema Shimadzu de CLAP com os seguintes componentes:

- 2 bombas LC-10AD
- Sistema Detector UV-VIS SPD-10AV
- Analisador Integrador Chromatopac CR7A
- Degaseificador DGU-2A

Utilizamos o comprimento de onda de 415 nm para detectar as hemoglobinas eluídas.

As Fases Móveis foram preparadas conforme Quadro 4:

Quadro 4: Composição das Fases Móveis A e B.

| Reativos | Fase Móvel A | Fase Móvel B |
|----------------------------------|--------------|--------------|
| Bis – Tris | 3.6610 g | 3.6610 g |
| Acetato de Sódio | ----- | 10.207 g |
| Cianeto de Potássio | 0.0480 g | 0.0480 g |
| Acetato de Amônia | 0.1156 g | 0.6490 g |
| Água (q.s.p.) | 500 ml | 500 ml |
| pH equilibrado com Ácido Acético | 6.47 | 7.00 |

Após o preparo, todas as soluções foram filtradas e degaseificadas com Hélio.

A concentração inicial da Fase Móvel foi: Fase B = 10% e Fase A = 90%, em equilíbrio pré-separação por 10 minutos.

O Fluxo das Fases Líquidas foi mantido constante, na velocidade de 1 ml por minuto.

A composição da Fase Móvel foi programada como no Quadro 5:

Quadro 5: Programa da Fase Móvel.

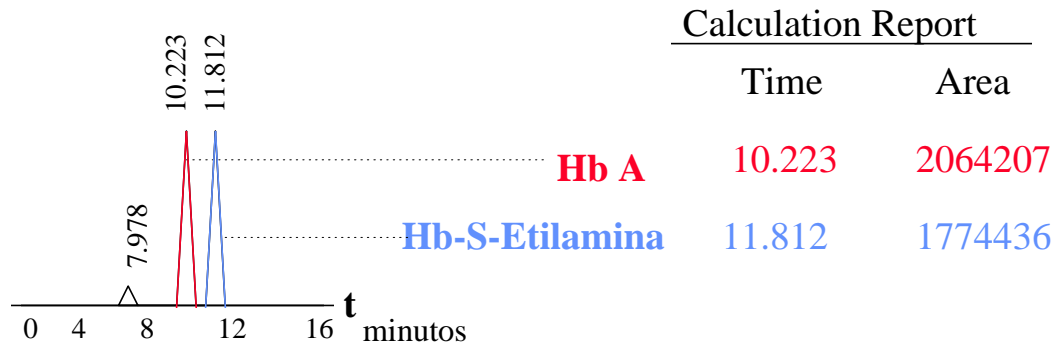
| Tempo (em minutos) | evento |
|--------------------|-------------------------------|
| 0,00 | injeção da amostra |
| 0,50 | início do registro da corrida |
| 2,00 | Concentração de B = 20% |
| 3,00 | Concentração de B = 20 % |
| 5,00 | Concentração de B = 55% |
| 10,00 | Concentração de B = 100 % |
| 20,00 | Fim da Corrida |

Os resultados foram obtidos através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hemoglobina A} = \frac{\text{Área da Hemoglobina A}}{\text{Área da Hemoglobina A} + \text{Área Complexo HSE}} \times 100$$

As áreas foram fornecidas pelo Cromatograma, como esquematizado na figura 15.

Experimento II - Cromatograma



$$\text{Porcentagem de Hemoglobina A} = 100 \times \frac{\text{Área de Hemoglobina A}}{\text{Áreas de Hemoglobina A} + \text{Hemoglobina-S-Etilamina}}$$

Figura 15: Representação esquemática do Cromatograma fornecido pela Cromatografia Líquida de Alta Performance de Troca Catiônica, evidenciando as curvas de eluição das Hemoglobinas Normal e Hemoglobina-S-Etilamina.

No final dos experimentos da Fase II, obtivemos a porcentagem de Hb A em relação ao total da Hemoglobina nos 4 tubos, aos 10, 90 e 180 minutos de incubação.

3.8. Análise Estatística.

Os valores negativos de Metahemoglobina encontrados na fase IA foram transformados em zero. Os valores de metahemoglobina superiores a 1,0 encontrados na fase IB foram transformados em 1,0. Considerando os valores de Metahemoglobina (Fase IA e IB) e de Hemoglobina A (Fase II) obtidos nos tratamentos, foi realizado o teste de Cochran (ao nível de 5%). Como o teste não demonstrou a homocedasticidade, os dados originais (x) foram transformados em $y = \log_{10} (x + 0,001)$. A transformação logarítmica foi realizada pelo fato dos dados originais serem quocientes de variáveis aleatórias. A adição de 0,001 justifica-se pela ocorrência de valores iguais a zero, sendo impossível o cálculo logarítmico.

Aplicado novamente após a transformação, o teste de Cochran (a nível de 5%) comprovou a homocedasticidade.

As comparações entre as médias transformadas de Metahemoglobina [$y = \log_{10} (x + 0,001)$] para os diversos tratamentos nos tempos 10, 90 e 180 minutos das fases IA e IB foram realizadas pela aplicação do Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

As comparações entre as médias transformadas de Hemoglobina A [$y = \log_{10} (x + 0,001)$] para os diversos tratamentos nos tempos 10, 90 e 180

minutos da fase II foram realizadas pela aplicação do Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho estão apresentados sob a forma de tabelas (tabelas 1 a 8) e gráficos (figuras 16 a 18).

Na Tabela 1 são apresentados as médias e desvios-padrão dos resultados da fase IA , em percentagem de Metahemoglobina, resultantes da incubação de hemácias lavadas com glicose, na presença e ausência de azul de metileno e/ou cistamina, em 8 doadores de sangue.

Tabela 1 - Fase IA – Médias (X) e desvios-padrão (DP) da percentagem de Metahemoglobina dos hemolisados de hemácias incubadas a 37° C com Glicose, na presença ou ausência de Azul de Metileno (AM) e/ou Cistamina (CI), aos 10, 90 e 180 minutos .

| Tratamentos | 10 minutos | 90 minutos | 180 minutos |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Glicose | 0,31 ± 0,36 | 0,36 ± 0,52 | 0,18 ± 0,28 |
| Glicose + AM | 1,33 ± 0,53 | 1,70 ± 0,59 | 3,74 ± 3,38 |
| Glicose + CI | 0,52 ± 0,80 | 0,33 ± 0,47 | 0,84 ± 1,35 |
| Glicose + AM + CI | 5,19 ± 1,78 | 6,60 ± 2,63 | 7,87 ± 3,05 |

Na Tabela 2 são apresentados as médias e desvios-padrão dos resultados da fase IB , em percentagem de Metahemoglobina, resultantes da incubação de hemácias lavadas com glicose e nitrito de sódio, na presença e ausência de azul de metileno e/ou cistamina, em 8 doadores de sangue.

Tabela 2 - Fase IB – Médias (X) e desvios-padrão (DP) da percentagem de Metahemoglobina dos hemolisados de hemácias incubadas a 37° C com Glicose e Nitrito de Sódio (NS), na presença ou ausência de Azul de Metileno (AM) e/ou Cistamina (CI), aos 10, 90 e 180 minutos.

| Tratamentos | 10 minutos | 90 minutos | 180 minutos |
|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Glicose + NS | 58,71 ± 7,36 | 81,58 ± 9,05 | 87,81 ± 12,38 |
| Glicose + NS + AM | 54,47 ± 10,67 | 1,21 ± 0,60 | 2,48 ± 1,34 |
| Glicose + NS + CI | 65,19 ± 7,24 | 73,65 ± 17,15 | 30,07 ± 14,07 |
| Glicose + NS + AM + CI | 61,80 ± 7,29 | 35,74 ± 19,69 | 6,08 ± 3,03 |

Na Tabela 3 são apresentados as médias e desvios-padrão dos resultados da fase II , em percentagem de Hemoglobina A, resultantes da incubação de hemácias lavadas com glicose, na presença e ausência de azul de metileno e/ou cistamina, de 8 doadores de sangue.

Tabela 3 - Fase II - Médias (X) e desvios-padrão (DP) da percentagem de Hemoglobina A dos hemolisados de hemácias incubadas a 37° C com Glicose e Cistamina (CI), na presença ou ausência de Azul de Metileno (AM) e/ou Nitrito de Sódio (NS), aos 10, 90 e 180 minutos.

| Tratamentos | 10 minutos | 90 minutos | 180 minutos |
|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Glicose + CI | 57,71 ± 3,17 | 79,35 ± 14,51 | 92,63 ± 8,16 |
| Glicose + CI + AM | 52,83 ± 2,92 | 58,16 ± 14,61 | 68,34 ± 18,64 |
| Glicose + CI + NS | 45,14 ± 3,72 | 60,08 ± 18,04 | 80,05 ± 20,92 |
| Glicose + CI + AM + NS | 42,22 ± 4,76 | 53,38 ± 17,02 | 75,23 ± 15,91 |

Na Tabela 4 são apresentados os resultados do teste de Cochran em C_o da fase IA, IB e II, para verificação da homocedasticidade entre os tratamentos. Para 5% de significância, com $k = 3$ e $g = 7$ graus de liberdade, o $C_{crítico}$ é de 0,653. Apenas os valores inferiores a C_o são aceitos.

Tabela 4 - Resultados (C_o) do teste de Cochran das fases IA, IB e II nos tempos 10, 90 e 180 minutos.

| Tratamentos | 10 minutos | 90 minutos | 180 minutos |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Fase IA | 0.7493* | 0.8918* | 0.5049 |
| Fase IB | 0.4162 | 0.5073 | 0.5293 |
| Fase II | 0.4110 | 0.3132 | 0.3960 |

* resultados maiores que o $C_{crítico}$ para $k = 3$ e $g = 7$ graus de liberdade.

Devido a rejeição da homocedasticidade entre os grupos, particularmente na fase IA, os dados obtidos em todos os experimentos foram transformados de acordo com a seguinte fórmula matemática:

$$y = \log_{10} (x + 0,001)$$

Para as fases IA e IB, o valor de x correspondeu aos valores absolutos de metahemoglobina encontrados. Para a fase II, o valor de x correspondeu aos valores absolutos de hemoglobina A.

A transformação logarítmica, foi realizada em decorrência dos dados obtidos (metahemoglobina e hemoglobina A) se trataram de quocientes de

variáveis aleatórias. A adição de 0,001 para os valores de x justifica-se pela ocorrência de valores iguais a zero, sendo impossível o cálculo logarítmico.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados do teste de Cochran, em C_o , da fase IA, IB e II, após transformação $y = \log_{10}(x + 0,001)$, para verificação da homocedasticidade entre os tratamentos. Com o $C_{crítico}$ de 0,653, todos os valores foram aceitos, permitindo a análise estatística.

Tabela 5 - Resultados do teste de Cochran das fases IA, IB e II aos 10, 90 e 180 minutos de incubação, após conversão dos valores originais em $y = \log_{10}(x + 0,001)$

| Tratamentos | 10 minutos | 90 minutos | 180 minutos |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Fase IA | 0.5763 | 0.4591 | 0.6208 |
| Fase IB | 0.5181 | 0.6365 | 0.4061 |
| Fase II | 0.5119 | 0.3739 | 0.4498 |

$C_{crítico} = 0,653$ para $k = 3$ e $g = 7$ graus de liberdade.

Em seguida foi realizado o teste de Tukey para comparações entre as médias transformadas [$y = \log_{10}(x + 0,001)$] para os diversos tratamentos, nos tempos 10, 90 e 180 minutos.

Os resultados do Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, em valores reconvertidos ($x = -0,001 + 10^y$) da Fase IA para os diversos tratamentos nos tempos 10, 90 e 180 minutos, são apresentados na tabela 6 e na figura 16.

Tabela 6 - Fase IA – Resultado do teste de Tukey, apresentando valores reconvertidos ($x = -0,001 + 10^y$) em valores absolutos de metahemoglobina, de acordo com os diversos tratamentos e tempo de incubação. As letras diferenciam os grupos distintos estatisticamente ($p < 0.05$) na comparação entre as médias.

| | 10 minutos | 90 minutos | 180 minutos |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| H + G | 0,001 C | 0,001 C | 0,001 B |
| H + G + AM | 0,012 B | 0,016 B | 0,029 A |
| H + G + CI | 0,002 C | 0,001 C | 0,002 B |
| H + G + AM + CI | 0,049 A | 0,061 A | 0,073 A |

Observação: H = hemácias; G = glicose; AM = Azul de Metileno; CI = Cistamina.

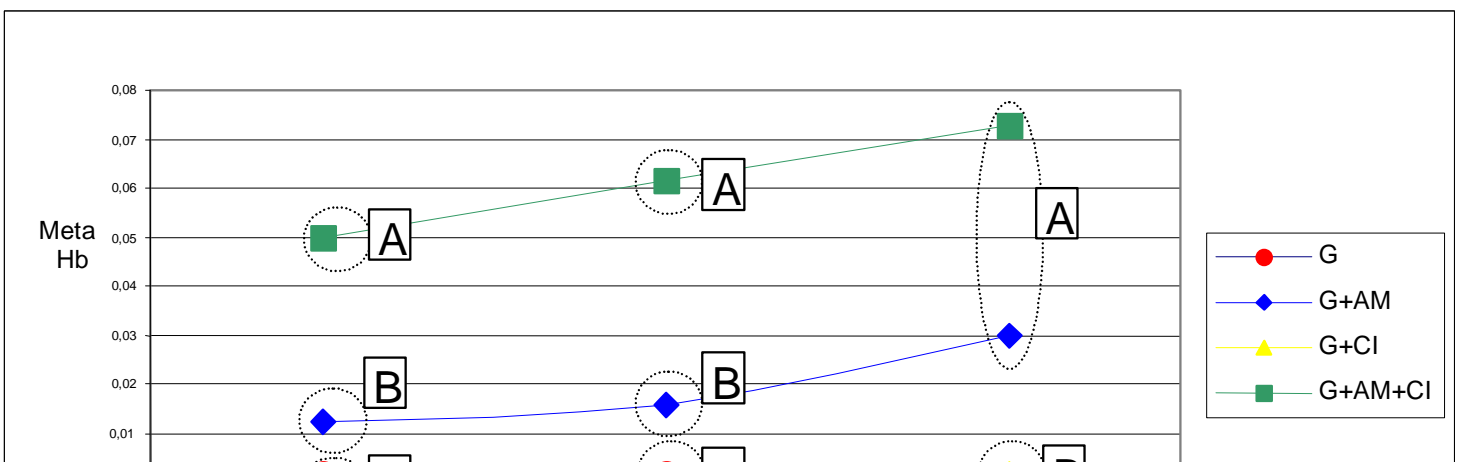


Figura 16 - Fase IA – Gráfico representando o resultado do teste de Tukey, apresentando valores absolutos de metahemoglobina reconvertidos ($x = -0,001 + 10^y$) dos diversos tratamentos e tempo de incubação. As letras e o círculos diferenciam os grupos distintos estatisticamente ($p < 0.05$) na comparação entre as médias (H = hemácias; G = glicose; NS = Nitrito de Sódio; AM = Azul de Metileno; CI = Cistamina).

Os resultados do Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, em valores reconvertidos ($x = -0,001 + 10^y$), comparando as médias transformadas de Metahemoglobina da Fase IB para os diversos tratamentos nos tempos 10, 90 e 180 minutos, são apresentados na tabela 7 e na figura 17.

Tabela 7 - Fase IB – Resultado do teste de Tukey, apresentando valores reconvertidos ($x = -0,001 + 10^y$) em valores absolutos de metahemoglobina, de acordo com os diversos tratamentos e o tempo de incubação. As letras diferenciam os grupos distintos estatisticamente ($p < 0.05$) na comparação entre as médias.

| Tratamentos | 10 minutos | 90 minutos | 180 minutos |
|---------------------|-----------------|----------------|----------------|
| H + G + NS | 0,582 AB | 0,810 A | 0,868 A |
| H + G + NS + AM | 0,533 B | 0,010 C | 0,022 D |
| H + G + NS + CI | 0,648 A | 0,715 A | 0,272 B |
| H+ G + NS + AM + CI | 0,613 AB | 0,278 B | 0,053 C |

Observação: H = hemácias; G = glicose; NS = Nitrito de Sódio; AM = Azul de Metileno; CI = Cistamina.

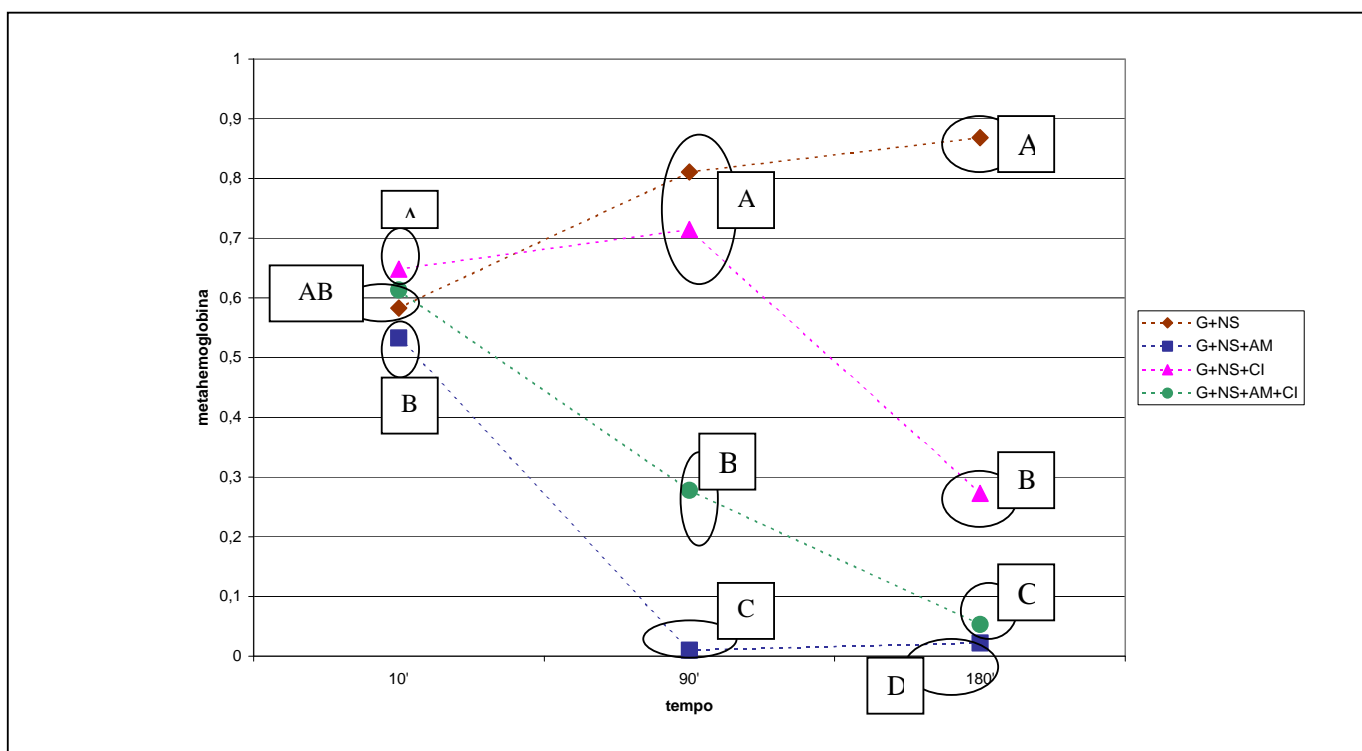


Figura 17 - Fase IB – Gráfico representando o resultado do teste de Tukey, apresentando valores absolutos de metahemoglobina reconvertidos ($x = -0,001 + 10^y$), de acordo com os diversos tratamentos e o tempo de incubação. As letras e os círculos diferenciam os grupos distintos estatisticamente ($p < 0.05$) na comparação entre as médias (H = hemácias; G = glicose; NS = Nitrito de Sódio; AM = Azul de Metileno; CI = Cistamina).

Os resultados do Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, em valores reconvertidos ($x = -0,001 + 10^y$), comparando as médias

transformadas de Hemoglobina A da Fase II para os diversos tratamentos nos tempos 10, 90 e 180 minutos, são apresentados na tabela 8 e na figura 18.

Tabela 8 - Fase II – Resultado do teste de Tukey, apresentando valores absolutos de hemoglobina A, após reconversão ($x = -0,001 + 10^y$), dos diversos tratamentos e tempos de incubação. As letras em azul designam os grupos distintos em relação à comparação entre as médias.

| | 10 minutos | 90 minutos | 180 minutos |
|------------------|----------------|----------------|-----------------|
| G + CI | 0,576 A | 0,778 A | 0,922 A |
| G + CI + AM | 0,527 A | 0,560 B | 0,645 B |
| G + CI + NS | 0,450 B | 0,573 B | 0,763 AB |
| G + CI + AM + NS | 0,419 B | 0,502 B | 0,734 AB |

Observação: G = glicose; CI = Cistamina; AM = Azul de Metileno; NS = Nitrito de Sódio.

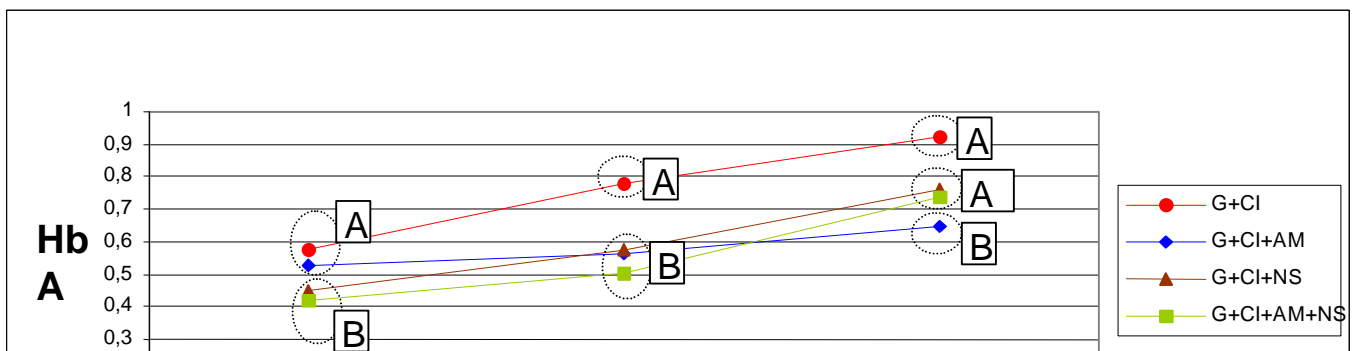


Figura 18 - Fase II – Gráfico representando o resultado do teste de Tukey, apresentando valores absolutos de Hemoglobina A reconvertidos ($x = -0,001 + 10^y$), de os diversos tratamentos e tempo de incubação. As letras em azul e os círculos designam os grupos distintos em relação à comparação entre as médias (H = hemácias; G = glicose; NS = Nitrito de Sódio; AM = Azul de Metileno; CI = Cistamina).

5. DISCUSSÃO

Estamos em um pronto-socorro: uma menina com 30 dias de vida foi trazida pelos pais devido ao arroxamento de lábios e extremidade das mãos e pés, percebido desde ontem. A criança está bem, corada, mamando com força, ganha peso adequadamente. A avaliação clínica não revela alterações significativas (não há icterícia), a ausculta cardíaca e pulmonar é normal, e o ecocardiograma não apresenta qualquer alteração. Os pais negam o uso de qualquer medicamento. É solicitada a dosagem de Metahemoglobina, cujo resultado, 15% (para um valor normal de até 1%), confirma o diagnóstico de Metahemoglobinemia. Há pouca suspeita de ser secundária à deficiência de G6PD, pois a paciente, além de ser do sexo feminino (a anomalia, transmitida pelo cromossoma X, raramente é sintomática nas mulheres heterozigóticas), não apresenta ancestrais de origem africana ou mediterrânea. Também não se observa diarréia ou sinais de infecção.

Optou-se pelo uso de Azul de Metileno endovenoso. Para alívio da equipe de plantão, em poucas horas, o azul vai sendo substituído pelo rosado. Um histórico mais detalhado, realizado no dia seguinte, sugere a provável causa da Metahemoglobinemia: água de poço, devidamente filtrada e fervida, estava sendo usada para ressuspender o leite em pó. Mais

alguns dias e a confirmação: a atividade da G6PD eritrocitária da criança é normal, e a água do poço está contaminada com alto nível de nitratos.

A história descrita acima expõe a reconhecida vulnerabilidade para o aparecimento da Metahemoglobina nos lactentes, em decorrência da menor capacidade de redução (ROSS, 1963). Esta susceptibilidade é consequência da menor disponibilidade da forma citoplasmática da enzima NADH-citocromo-b5-redutase (BARTOS & DESFORGES, 1966; CHOURY, 1981) nestes eritrócitos. Este caso clínico nos lembra que a ação tóxica, às vezes de difícil reconhecimento clínico, de diversas substâncias presentes no ambiente (FERNICOLA & AZEVEDO, 1981), de uso farmacológico (CHRISTENSEN et al., 1996; KHAN & KRUSE, 1999) e até mesmo em alimentos (ARAÚJO & MÍDIO, 1989; TOLEDO & REYES, 1990), deve ser reconhecida. Ainda, esta história direciona-nos a uma outra interface com relação à abordagem seguida até aqui: se o nosso trabalho focaliza dados obtidos *in vitro*, a visão que procuramos estende-se ao horizonte clínico.

Além disso, esta história tem o objetivo de, como ponto de referência do início da discussão, guiá-la através dos seguintes aspectos do presente trabalho: a) a oxidação da hemoglobina e a formação de metahemoglobina (fase IA); b) a formação de Metahemoglobina pelos nitritos e nitratos e os mecanismos de redução da Metahemoglobina (fase IB); c) as relações entre

o modelo experimental proposto e a visão que proporciona do sistema de óxido-redução, principalmente os aspectos metodológicos envolvidos com a avaliação do complexo Hemoglobina-S-Etilamina (fase II); d) o modelo experimental proposto e o horizonte clínico.

5.1 A Formação de Metahemoglobina (Fase IA)

Certamente a hemoglobina é uma das proteínas mais bem estudadas. O conhecimento de sua função, desvendada por várias gerações de cientistas, está aliada ao estudo profundo de sua estrutura.

O funcionamento da hemoglobina depende da integridade do eritrócito, seja pela rápida degradação que ela sofre no plasma, ou pelas vias metabólicas que restauram a ação oxidativa que sofre com o tempo. Além disso, há a influência de outros fatores ligados à sua função: a interação com o 2,3-DPG, mudanças do comportamento químico com variações na temperatura e no pH eritrocitário. Este comportamento alostérico permite que a hemoglobina apresente duas propriedades aparentemente antagônicas em relação ao oxigênio: a grande afinidade, que assegura a capacidade de transporte eficiente, e a capacidade de controlar a liberação deste, de acordo com a necessidade tecidual.

A forma sigmoideal da curva de dissociação do oxigênio pela hemoglobina é resultado da interação entre suas subunidades ou monômeros, denominada interação heme-heme (PERUTZ, 1987). Em outras palavras, cada monômero se comporta de forma isolada quanto a oxigenação e deoxigenação, mas o comportamento da molécula como um todo depende do conjunto. Assim, a ligação ou liberação do oxigênio a um dos monômeros pode modular a afinidade das outras subunidades, modificando o comportamento de toda a molécula. Esta modulação funcional está diretamente ligada à mudanças na sua estrutura quaternária; conforme ocorre a ligação com o oxigênio, a molécula modifica-se de acordo com movimentações entre as subunidades. E o mais surpreendente: toda esta mudança depende dos elétrons dos 4 átomos de ferro presentes em cada molécula.

Na forma desoxigenada, o átomo de ferro do heme se encontra no estado Fe^{2+} , com 6 elétrons no orbital d. Nesta situação, o ferro está coordenado aos 5 ligantes (4 átomos de nitrogênio do anel pirrólico e ao nitrogênio imidazol da histidina proximal), com um elétron não pareado, tornando-se fortemente paramagnético (PERUTZ, 1987). Este elétron é forçado a parar com um dos cinco elétrons, resultando na configuração eletrônica de alto spin. Em consequência, o átomo de ferro é empurrado

para fora do plano da protoporfirina, em direção à histidina proximal, levando todo o anel a se abaular nessa direção. Esta movimentação aciona outras mudanças na estrutura quaternária (forma tensa ou T), detectadas através de comportamento espectrométrico específico. A deoxihemoglobina apresenta absorção de uma banda específica na região verde, conferindo, como resultado, sua conhecida cor púrpura.

A ligação do heme com o oxigênio, isto é, a oxihemoglobina, induz ao pareamento dos elétrons, modificando o estado do spin, que passa a ser nulo. Isto acomoda o átomo de ferro no plano do heme, também modificando a estrutura quaternária (forma relaxada ou R) e o resultante espectro (o que torna a solução de oxihemoglobina vermelho escarlate). Como observou Max Perutz, a natureza nos demonstra sua sabedoria (através da hemoglobina) ao aproveitar a atividade dos elétrons, que acaba influenciando decisivamente sobre a função das moléculas e dos seres vivos.

A interação do oxigênio com o ferroheme da hemoglobina gera o superóxido-ferriheme ($\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$), isto é, há uma transferência parcial de um elétron do ferro ao oxigênio. A liberação do oxigênio restaura o estado ferroso do heme (MANSOURI & LURIE, 1993). Fisiologicamente, uma pequena parte do oxigênio é liberada como radical superóxido, resultando na formação de metahemoglobina, processo este denominado auto-oxidação da

hemoglobina. O fato desta reação ser favorecida por fosfatos orgânicos, como a 2,3 DPG (MANSOURI & WINTERHALTER, 1974), sugerem que a estrutura tensa da molécula está associada à uma maior dissociação em superóxido.

A conversão do tetrâmero da hemoglobina em tetrâmero de metahemoglobina é uma oxidação de 4 etapas (JAFFÉ & HULTQUIST, 1989). Assim, existem vários híbridos intermediários, de acordo com o número de monômeros oxidados. Como a hemoglobina compreende 2 monômeros α e 2 monômeros β , oito combinações diferentes de híbridos podem ocorrer. Os híbridos de metahemoglobina demonstram, semelhantemente à oxigenação, certo grau de cooperatividade, mostrando uma maior afinidade ao oxigênio que a hemoglobina, o que poderia contribuir para uma maior dificuldade de oxigenação tecidual associada ao menor transporte de oxigênio.

A incubação de uma solução de oxihemoglobina por um período de tempo prolongado gradualmente transfoma-a em metahemoglobina (BUNN & FORGET, 1986). Fatores do solvente podem favorecer esta oxidação, tais como: aumento da temperatura, pH ácido, fosfatos orgânicos e oxigenação parcial da hemoglobina. Além disso, a conformação tensa da estrutura quaternária favorece a dissociação em superóxido.

A molécula de hemoglobina é, portanto, particularmente propensa a sofrer oxidação, seja espontaneamente ou através de agentes extrínsecos. Os dois principais sítios primários envolvidos são: a) o átomo de ferro no interior do heme, formando a Metahemoglobina; b) os grupos SH da globina, que se convertem em pontes dissulfetos (-S-S-). A formação de Metahemoglobina ocorre espontaneamente, mas os níveis intra-eritrocitários são mantidos em níveis baixos em decorrência dos eficientes mecanismos de redução, principalmente pela ação da Metahemoglobina Redutase NADH dependente (HULTQUIST et al., 1984). Esta capacidade de redução é centena de vezes superior à formação espontânea de metahemoglobina. Assim, os valores aumentados de Metahemoglobina refletem, principalmente, o aumento de sua formação, relacionados com a exposição a agentes externos.

Quimicamente representada pela remoção de 1 elétron do átomo de Fe^{2+} da hemoglobina, esta simplificação não reflete a complexidade envolvida na reação de formação da metahemoglobina. Em primeiro lugar, na ausência de substâncias exógenas, a metahemoglobina é resultante da sua interação com o O_2 ou com formas parcialmente reduzidas de oxigênio, como o O_2^- , H_2O_2 e HO^\cdot . A formação de metahemoglobina por agentes químicos pode ocorrer de três formas: a) diretamente, por componentes que

possuem um potencial redox grande, como ferrocianeto, cobre, peróxido de hidrogênio, hidroxilamina, cloratos, quinonas; b) oxidação por produtos intermediários do metabolismo de drogas, e c) oxidação indireta, quando a substância, na presença de oxigênio, induz à formação de O_2^- e H_2O_2 , que, em seguida, oxidarão a hemoglobina.

A geração de O_2^- e H_2O_2 levará à formação de HO^\cdot que, pode reagir em cadeia com outras moléculas de hemoglobina, formando mais metahemoglobina (SALTMAN, 1989; SILLS & ZINKHAM, 1994). É importante ressaltar que a formação de Metahemoglobina, além de indicar a presença de um estresse oxidante superior a capacidade de sua redução, representa apenas a ponta de um iceberg onde outras vias metabólicas do eritrócito estão ativadas, com o aumento da atividade da SOD, Catalase e Glutathione Peroxidase. Nesta visão amplificada, certamente ocorre o aumento da atividade da via glicolítica (formação de NADH) e da da G6PD, para a formação de NADPH, necessário para a regeneração do GSH pela Glutathione Redutase.

Vários produtos químicos (domésticos, industriais, terapêuticos) são capazes de aumentar a taxa de oxidação da hemoglobina, a ponto de superar a capacidade redutora fisiológica, levando à acumulação de

metahemoglobina (BUNN & FORGET, 1986). Os mecanismos envolvidos e a velocidade da reação diferem entre as diversas drogas.

Diversos agentes oxidantes reagem diretamente com o ferro ferroso da hemoglobina. O ferricianeto é um exemplo deste grupo (BUNN & FORGET, 1986). Embora a reação em hemolisados ocorra rapidamente, o ferricianeto não está associado com metahemoglobinemia, pois não penetra através da membrana eritrocitária. Interessantemente, a oxidação ocorre mais rapidamente no interior das subunidades β , sendo que os híbridos de valência $(\alpha\beta^+)_2$ predominam nesta reação (AKINTONWA, 2000). O íon cúprico, diferentemente, oxida exclusivamente as subunidades β e, o oxigênio favorece a oxidação das subunidades α .

Na fase IA, testamos a formação de Metahemoglobina na ausência e presença de Azul de Metileno e/ou Cistamina em suspensão de hemácias lavadas e incubadas a 37°C, na presença de glicose, nos momentos 10, 90 e 180 minutos.

Os seguintes resultados da Fase IA são relevados para a discussão a seguir:

- No tubo controle os valores da Metahemoglobina são inferiores a 0,15% no intervalo de tempo observado.

- A incubação com AM induz a maior formação de MetaHemoglobina em todos os momentos estudados.

- A incubação apenas com CI não difere do tubo controle quanto à formação de Metahemoglobina.

- A CI, embora não forme MetaHb isoladamente, em conjunto com o AM aumenta consideravelmente esta ação, sendo estatisticamente superior nos momentos 10 e 90 minutos de incubação.

- Aos 180 minutos a formação de MetaHb pelo AM não difere estatisticamente do AM + C.

Utilizado como agente redutor nas Metahemoglobinemias adquiridas, o AM consome o NADPH intra-eritrocitário, transforma-se em Branco de Metileno, que, por sua vez, reestabelece a função carreadora de oxigênio da Hemoglobina (MANSOURI & WINTERHALTER, 1973). Assim, a sua ação redutora depende da disponibilidade de NADPH, que depende da integridade da Via das Pentoses (JAFFÉ & NEUMANN, 1964).

Em altas doses, contudo, o AM pode provocar numerosas reações adversas, entre elas a metahemoglobinemia e hemólise (METZ et al., 1976). Podemos considerar que os efeitos farmacológico e tóxico são contínuos e decorrentes da ação primariamente oxidante do AM, sendo que, no primeiro caso, ocorre a ativação do sistema redutor NADPH, enquanto que a

toxicidade decorre da incapacidade relativa de redução. Dessa forma, a terapêutica com Azul de Metileno está contra-indicada no tratamento da Metahemoglobinemia em pacientes com deficiência de G6PD, tanto pela ineficácia como pela possibilidade de desencadeamento de hemólise.

Como agente oxidante, a CI difere do AM por preferencialmente se ligar aos grupamentos $-SH$, sem desencadear a formação de Metahemoglobina. Sua metabolização no eritrócito depende da integridade do Sistema Glutathione Peroxidase-Glutathione Redutase, visto que o GSH é consumido para a reconversão do Complexo Hemoglobina-S-Etilamina em Hemoglobina (BARRAVIERA et al., 1988).

Nas condições deste ensaio, ressaltando as diferentes doses utilizadas para o AM e CI, o efeito oxidante do AM é evidenciado pela formação de Metahemoglobina, o que não ocorre com a incubação isolada da CI.

Esta ação do AM é potencializada na presença de CI. Como o consumo de GSH pela CI levará a uma maior formação de GS-SG, parece-nos que deve ocorrer menor disponibilidade de NADPH, necessário para a reversão do GSSG em GSH, o que aumentaria a ação oxidante do AM sobre a hemoglobina.

Outro mecanismo possível para justificar a potencialização da formação de Metahemoglobina pela CI seria pela competição pelo GSH. A

formação secundária do Peróxido de Hidrogênio pelo AM (formação da metahemoglobina) levaria a uma ativação da Glutathione peroxidase, com maior formação de GS-SG. Em sequência, levaria a maior utilização pela Glutathione Redutase do NADPH, com conseqüente menor disponibilidade e maior efeito oxidante.

Nas condições do ensaio, portanto, deve ocorrer o consumo de NADPH pela adição isolada de CI, mas provavelmente em níveis inferiores ao do AM. A ativação da via Glutathione redutase-oxidase pela CI ocorre rapidamente, como observado aos 10 minutos, e permanece durante todo o período observado do ensaio.

Quantitativamente, a Hemoglobina compõe 95% do peso seco do eritrócito e é, certamente, o local preponderante da ação oxidante da CI.

Uma das conseqüências mais importantes da oxidação dos grupamentos -SH é a formação dos corpos de Heinz, cuja pesquisa é utilizada como parâmetro laboratorial no diagnóstico das hemólises por agentes oxidantes e hemoglobinas instáveis (HARVEY & KEITT, 1983). A formação dos corpos de Heinz inicia-se com a oxidação do ferro do heme, seguida da oxidação dos grupamentos -SH da cisteína β 93; até este ponto a oxidação seria reversível. Com a continuidade da oxidação, seguiria-se a desestabilização do arranjo terciário e quaternário, tornando a molécula

insolúvel; as moléculas desarranjadas polimerizam e precipitam, formando os corpos de Heinz.

Assim, possivelmente a ausência de formação da metahemoglobina pela incubação com CI deve indicar a pequena possibilidade de formação dos corpos de Heinz no presente trabalho.

A conformação tensa da deoxihemoglobina é cerca de 10 vezes mais susceptível a oxidação que a oxihemoglobina (BUNN & FORGET, 1986). O aumento da afinidade de Oxigênio que ocorre com o complexo Hb-S-EA (BARRAVIERA & MACHADO, 1987) poderia justificar uma menor formação de Metahemoglobina pela presença isolada da Cistamina. A ausência da interferência no pH e nos níveis de 2,3-DPG intra-eritrocitários pela CI também afasta uma modificação secundária da afinidade do oxigênio justificando menor formação de Metahemoglobina.

5.2 A Redução de Metahemoglobina (fase IB)

No presente trabalho optamos pela avaliação da redução pelo AM e CI da metahemoglobina induzida pelo NS. O motivo principal da escolha deste modelo deve-se ao fato de que as condições do ensaio, assim como as doses de azul de metileno e da cistamina já foram testadas em trabalhos realizados em nosso laboratório (BARRAVIERA et al., 1988). Estes trabalhos

padronizaram métodos de avaliação quantitativa da atividade da G6PD eritrocitária (AM) e da atividade da enzima Glutathione Redutase (CI), através da redução da Metahemoglobina induzida pelo NS. Foram nas condições destes ensaios (tempo de incubação, dosagem) que baseamos nosso ensaio.

Os nitratos são componentes naturais de todas as frutas e vegetais, além de estarem presentes na água e serem utilizados como preservativos em produtos derivados de carne e peixe. Os nitratos são convertidos em nitritos na cavidade oral, através das bactérias da flora normal. A presença de nitrito é um importante mecanismo de resistência contra doenças infecciosas nos mamíferos. A ingestão de altas doses, seja por contaminação de água de poço (BUCKLIN, 1981), alimentos (GRANT, 1981), através do uso de conservantes, ou de medicamentos, podem desencadear a metahemoglobinemia.

A reação de oxidação da hemoglobina em metahemoglobina pelos nitritos apresenta um comportamento cinético peculiar, onde a taxa de oxidação aumenta após transcorrido um determinado intervalo de tempo (SINGLEY, 1962). Ocorre indiretamente, através de um processo autocatalítico (DOYLE et al., 1981), onde o Oxigênio é reduzido, produzindo superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nesta situação, a

formação de metahemoglobina é apenas um dos efeitos sequenciais da formação das ERMO. É interessante observar que, apesar do estresse oxidante induzido pelo nitrito, a formação de Metahemoglobina é o evento mais evidente.

No presente trabalho, utilizamos o Nitrito de Sódio a 0,7%, seguindo a padronização de trabalhos anteriores (BARRAVIERA et al., 1988), que evidenciou que, nesta concentração, a formação de Metahemoglobina era reversível e proporcionava a maior capacidade de redução, fixadas a proporção de Azul de Metileno (AM) e glicose.

Clinicamente, a Metahemoglobinemia induzida por Nitritos é tratada, nos casos com sintomatologia importante, com agentes redutores, principalmente o AM (WRIGHT et al., 1999).

Diferentemente do processo fisiológico, onde 95% da redução ocorre através do sistema enzimático Metahemoglobina-Redutase dependente de NADH, o Azul de Metileno utiliza o NADPH como doador de elétrons para a redução da Metahemoglobina, através da enzima Metahemoglobina-redutase dependente de NADPH (HULTQUIST et al., 1984). A pequena importância fisiológica desta enzima decorre da ausência de um aceptor, cujo papel é realizado, farmacologicamente, pelo AM, o que permite a plena função deste sistema redutor dormente.

A CI, da mesma forma que o AM, atua como agente redutor de Metahemoglobina induzida pelo NS (BARRAVIERA et al., 1988). A redução da Metahemoglobina pela CI ocorre através da ativação do Sistema Glutationa Peroxidase – Glutationa Redutase, e não pela ativação direta da G6PD, como ocorre com o AM.

Os seguintes resultados da Fase IB são relevados para a discussão a seguir:

- A formação de metahemoglobina pelo NS já é observada aos 10 minutos, mas sua proporção aumenta progressivamente, não ultrapassando 90% aos 180 minutos.
- Aos 10 minutos observamos que a proporção de Metahemoglobina entre os diferentes tratamentos não difere. Apenas a comparação entre a presença isolada de AM e a presença isolada de CI mostra diferença estatística.
- A redução praticamente total da Metahemoglobina com o tratamento com o AM é evidenciada aos 90 minutos e mantém-se aos 180 minutos.
- A redução da Metahemoglobina com o tratamento com a CI somente é observada aos 180 minutos de tratamento. Aos 90 minutos a redução não difere do tratamento com nitrito de sódio.

- A redução final de Metahemoglobina pelo AM é superior à da CI. O tempo de incubação necessário para que ocorra a redução é de 90 minutos para o AM e 180 minutos para a CI.
- A redução da Metahemoglobina com o tratamento conjunto com AM e CI é menor que quando da presença isolada de AM e superior à Cistamina aos 90 e 180 minutos de incubação

5.2.1 Ação do Nitrito de Sódio

A formação de Metahemoglobina pelo NS aumenta com o tempo de incubação, sendo máxima aos 180 minutos de incubação. Nesta reação, um íon nitrito é oxidado para nitrato para cada hemoproteína transformada. O conhecido comportamento cinético peculiar desta reação, isto é, o aumento na velocidade da reação após um período de intervalo, pode justificar a observação acima (LISSI, 1998). Neste trabalho, em vista dos objetivos, as avaliações nos tempos 10, 90 e 180 não permitiram observar a curva sigmoideal, o que provavelmente não compromete a análise, visto que será a comparação entre os diversos tratamentos o enfoque principal, isto é, a redução da metahemoglobina.

A formação de MetaHb pelo NS não supera a proporção de 90% em nenhum dos tempos de incubação. Isto evidencia que não há excesso de

nitrito, possibilitando a reversibilidade da oxidação pelo AM e pela CI, o que é fundamental para a análise da redução.

Aos 10 minutos, não se observa aumento ou diminuição da proporção de Metahemoglobina entre os tratamentos, sendo possivelmente a ação oxidante do NS que predomina.

A ação oxidante induzida pelo NS nos eritrócitos não ocorre apenas na Hemoglobina, sendo evidenciada pelo aumento da atividade da glutatona redutase e da G6PD, diminuição da atividade da Superóxido Dismutase e Catalase, e alterações da membrana, como hiperpolarização e aumento da rigidez (ZAVODNIK et al., 1999). O aumento da atividade da glutatona redutase e G6PD com a administração de NS deve estar relacionada com a formação secundária de Superóxido e peróxido de Hidrogênio.

5.2.2 Ação do Azul de Metileno e Cistamina

Aos 90 minutos observamos a redução total da metahemoglobina pelo AM. A adição da CI ao AM diminuiu a proporção de metahemoglobina reduzida. Acreditamos que a interferência da CI sobre a ação do AM ocorreria em decorrência da competição pelo NADPH, refletindo menor formação de Branco de Metileno para a redução da MetaHb.

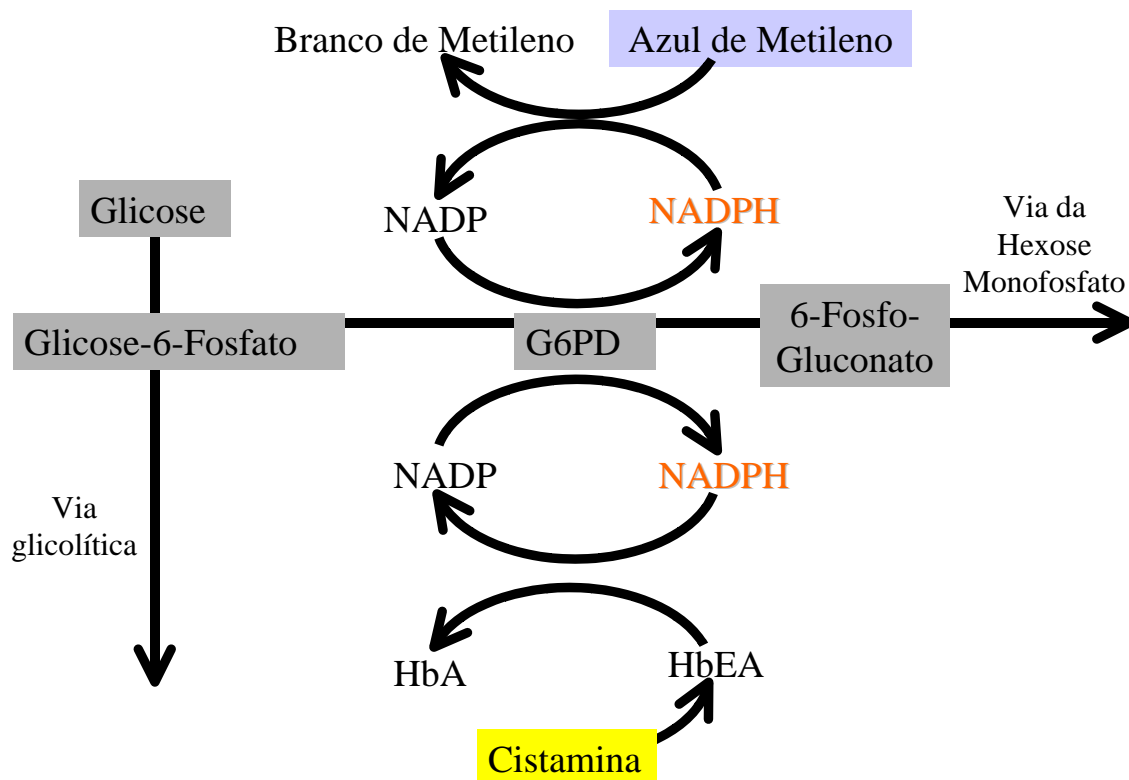


Figura 19: Esquema demonstrando o consumo de NADPH diretamente pelo Azul de Metileno, em paralelo com o consumo indireto de NADPH pela Cistamina, para a reversão do complexo HbEA em HbA.

A redução da metahemoglobina pela CI isoladamente ocorre tardiamente em relação ao AM. Esta redução poderia ocorrer através da ação da Glutathione redutase. A reação envolvendo a Glutathione redutase reverteria a Metahemoglobina-S-etilamina em Metahemoglobina e Cisteamina, na presença de NADPH. A Cisteamina, que, por sua vez, reverteria a MetaHb em Hb deM forma não-enzimática. Isto justificaria um intervalo maior (180 minutos de incubação) (vide figuras 19 e 20).

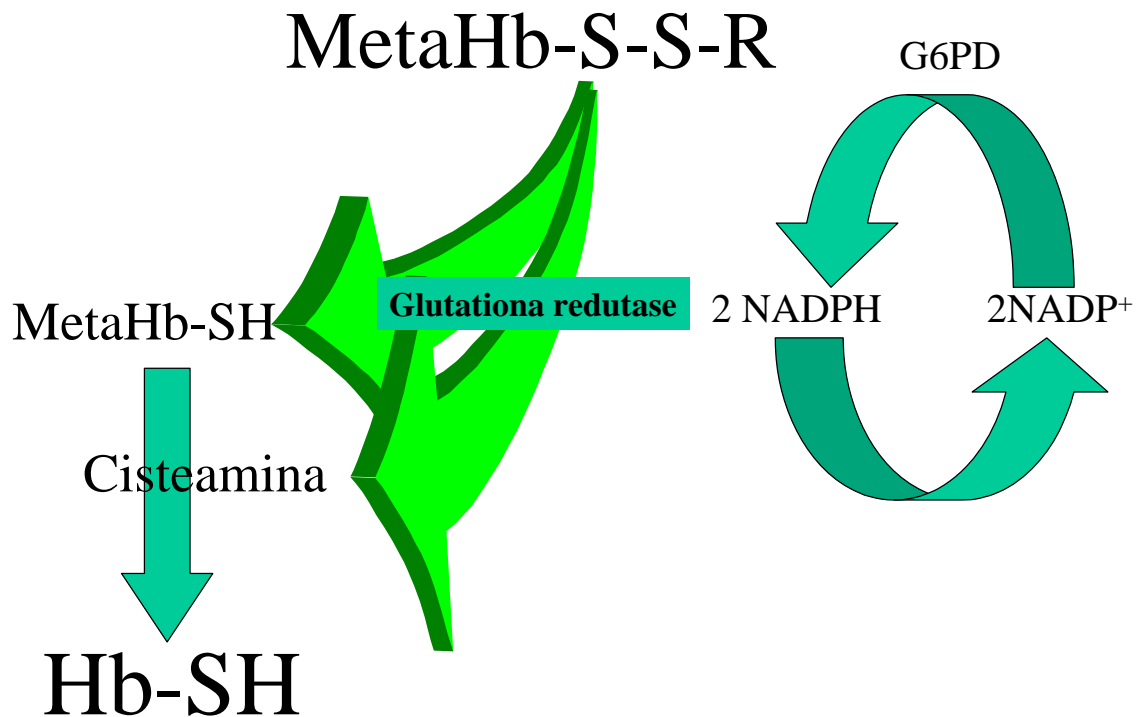


Figura 20. Esquema representando a redução do complexo Metahemoglobina – Etilamina (MetaHbS-S-R) através do consumo de NADPH e participação da Glutathione reductase. A Cisteamina, resultante da Redução da MetaHbS-S-R em Metahemoglobina, atuaria na redução final em Hemoglobina.

O principal questionamento com relação a esta sequência de reações reside no fato do complexo HbEA e a Cisteamina não serem substratos da Glutathione reductase (BEUZARD et al., 1978). Outra sequência de reações com relação a redução do complexo Hb-S-EA poderia ser resumida na sequência de reações ilustrada na figura 21.

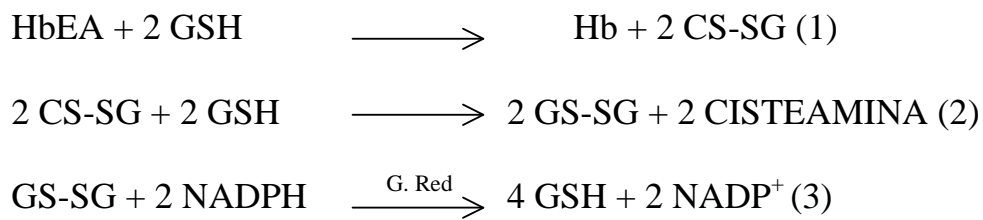


Figura 21. Sequência de reações envolvendo a redução do Complexo Hemoglobina-Etilamina (HbEA), através da formação de CISTEAMINA e consumo e regeneração do Glutation (GSH) na presença de Glutationa Redutase (G. Red.).

Nesta sequência, a ação redutora do complexo Hb-S-EA seria decorrente de uma reação não enzimática com o GSH. A Cisteamina formada, por sua vez, reduziria a Metahemoglobina em Hemoglobina, através de outra reação não-enzimática. A única enzima neste processo seria a Glutationa Redutase, necessária para a reação 3.

O principal aspecto a ser introduzido nesta parte da discussão está no possível papel da recém purificada Tioltransferase eritrocitária (MIEYAL et al., 1991; TERADA et al., 1992). Esta enzima, com peso molecular de 28.000 a 36.000, tem especificidade para substratos variando de dissulfetos de baixo peso molecular (incluindo a cistamina) a proteínas disulfetos (tripsina e insulina). A quantidade estimada foi calculada em 4,6 unidades por grama de hemoglobina, com nível de atividade semelhante a outras

enzimas do sistema de óxido-redução eritrocitário como a Glutathione redutase e a G6PD.

Enzimas como a fosfofrutoquinase e piruvatoquinase, inativadas por dissulfetos foram reativadas eficientemente pela adição de tioltransferase com GSH (MIEYAL et al., 1991). A ação da Tioltransferase também pôde ser observada na restauração de grupamentos SH de proteínas de membrana eritrocitária tratadas com diamida, na presença de GSH.

Em modelo utilizando tioltransferase purificada de fígado de coelho, observou-se que a atividade da G6PD eritrocitária humana, previamente inativada pela incubação com Cistamina, foi reestabelecida com o tratamento da tioltransferase com Cisteamina, na ausência do GSH (TERADA, 1994). Estes dados não podem ser extrapolados diretamente para o sistema de óxido-redução eritrocitário, visto que a enzima purificada do eritrócito tem características distintas em sua composição de aminoácidos com relação às enzimas obtidas de outros tecidos e animais.

Certamente o estudo da ação da tioltransferase eritrocitária nas condições do presente trabalho poderia adicionar outra perspectiva com relação à ação redutora do complexo HbEA, isto é, a ação direta sobre a reversão em Hb e Cisteamina, através de uma reação catalítica. Neste sentido

a redução da Metahemoglobina poderia ocorrer através da Cisteamina, como ilustrado na figura 22.

Em conclusão, embora os mecanismos associados com a reversão do complexo Hb-S-Etilamina não estejam completamente elucidados, a interferência da ação do AM pela CI estão relacionados com a competição pelo NADPH. Além disso, a redução da MetaHb pela CI deve ocorrer através de mecanismo não-catalítico, via Cisteamina.

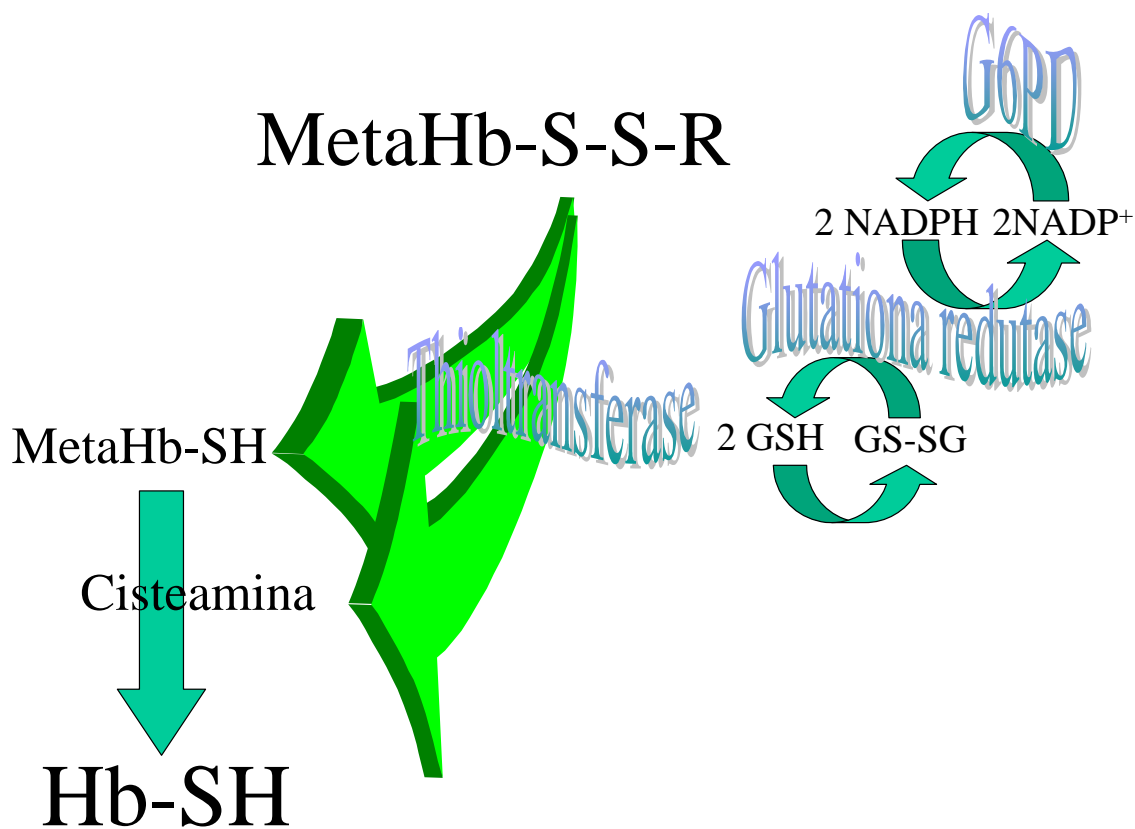


Figura 22. Esquema da Via de redução do complexo Metahemoglobina-Etilamina pela Tioltransferase, com redução não catalítica pela Cisteamina.

5.3 Reversão do complexo HbEA (Fase II)

Entre as propriedades do complexo HbEA, este apresenta estabilidade por vários dias em células incubadas em tampões salinos, ou em lisados estocados a 4° C. A reversão depende da presença de glicose, temperatura de 37°C e da integridade da G6PD (MACHADO, 1979).

Nesta fase do experimento visamos observar a reversão do complexo HbEA pelo metabolismo eritrocitário e a influência do NS e/ou do AM neste sistema. Diferentemente das fases anteriores, focalizamos o sistema Glutationa redutase-Glutationa Peroxidase.

Utilizamos a Cromatografia Líquida de Alta Performance, com coluna de troca catiônica, para a análise do complexo HbEA e sua reversão em Hb A, por se tratar de tecnologia de maior precisão que os métodos eletroforéticos. A conveniência de se analisar diretamente o cromatograma acrescenta facilidades técnicas.

As dificuldades técnicas inerentes foram o tempo dispendioso para cada corrida, em torno de 30 minutos, incluindo os 10 minutos de equilíbrio nos intervalos. Foi certamente esta dificuldade que não permitiu maior número de avaliações nos 180 minutos de incubação.

Em todos os doadores foi realizada corrida com o hemolisado pós-lavagem dos glóbulos, o que permitiu verificar que nenhum apresentava hemoglobina anormal. O tempo de eluição da Hemoglobina A foi de 10,120 a 11,020 minutos. Acreditamos que esta variação ocorreu pelo fato da aplicação ter sido manual, o que poderia ter influenciado o intervalo entre a aplicação da amostra e o início do registro. Além disso, todos os picos interpretados como hemoglobina A mostraram porcentagem acima de 83%

em relação ao total de hemoglobina eluída, o que afastaria a heterozigose para hemoglobinas anormais.

A presença do complexo HbEA foi detectada através da identificação de hemoglobina eluída posteriormente à hemoglobina A, isto é, apresentando maior afinidade catiônica, com intervalos sempre superiores a 1 minuto e distintas na cromatografia.

Os seguintes resultados da Fase II são relevados para a discussão a seguir:

- Aos 10 minutos há uma menor proporção de HbA na presença de NS, seja isoladamente ou em conjunto com AM. A presença do AM não modifica a reconversão de HbA.
- Aos 90 minutos, a presença de NS e/ou AM diminui a reconversão de HbA semelhantemente.
- Aos 180 minutos, não há diferença estatística entre os grupos quanto a reconversão de HbEA em HbA. Apenas o AM isoladamente diminui a reconversão da HbA em comparação com o tubo controle.

Nas condições do ensaio, a redução de HbEA em HbA ocorre progressivamente com o tempo de incubação, alcançando a proporção superior a 90% aos 180 minutos, apenas na presença de glicose.

Aos 10 minutos observamos que a presença do NS, na presença ou ausência do AM, é fator limitante da redução. Esta influência do NS é observada também na Fase IB, quando verificamos que a ação redutora da CI e do AM não é observada neste momento da avaliação. A interferência do NS deve estar associada com a formação secundária de superóxido e, sequencialmente, do peróxido de hidrogênio. Este será metabolizado pela Glutationa Peroxidase, cujo substrato, o GSH, é fundamental para a reversão do complexo Hb-EA em Hb.

Aos 90 minutos, a interferência do NS se mantém. Isto reforça a possibilidade que a competição pelo GSH diminui a redução do complexo Hb-EA. Além disso, a relação entre este dado com a ausência da redução da Metahemoglobina pela CI na fase IB neste momento do ensaio evidencia que o sistema redutor eritrocitário sofre influência maior do NS que da CI, nas condições do ensaio.

Aos 180 minutos a proporção de hemoglobina A na presença do NS não difere do tubo com CI. Novamente, a relação com a redução da MetaHb pela CI na fase IB corrobora estes dados.

A interpretação conclusiva seria que a competição pelo GSH entre o NS e a CI ocorre principalmente entre o início da incubação e os 90 primeiros minutos, sendo esta principalmente relacionada com o estresse oxidante do NS (formação de superóxido e peróxido de hidrogênio). A partir deste momento, há disponibilidade de GSH para a redução do complexo HbEA e formação da Cisteamina, que, por sua vez, seria o agente redutor (não catalítico) da Metahemoglobina formada pelo NS.

A influência negativa do AM isoladamente sobre a redução do complexo Hb-EA é observada aos 90 e 180 minutos. De maneira semelhante ao observado na fases IA, a competição pelo NADPH é o fator que justifica a menor redução. Neste sentido, o AM isoladamente tem comportamento oxidante, que aumenta com o tempo de incubação, e se acentua com a presença da CI. É pouco provável que tenha ocorrido limitação da resposta pelo consumo de glicose, pois na Fase IB, a redução de Metahemoglobina pelo AM e CI ocorreu adequadamente aos 180 minutos de incubação.

5.4 O modelo experimental proposto e o horizonte clínico

O principal mecanismo de defesa dos seres vivos contra a agressão oxidativa está no isolamento dos compartimentos celulares, isto é, na restrição de determinadas vias metabólicas nas organelas, como a

mitocôndria. Além disso, a mitocôndria tem papel detoxicador importante de xenobióticos.

O eritrócito, como um ermitão que destrói as paredes de sua casa, é melhor descrito como um elemento figurado do sangue que contém hemoglobina em alta concentração. Apesar da exposição continuada ao oxigênio e ao ferro, o isolamento protetor se restringe à estrutura da molécula de hemoglobina (isolamento do heme em relação a água e solubilidade externa) e à simplificação metabólica.

Não menos importante, a capacidade redutora através da Metahemoglobina redutase NADH dependente, da grande atividade da SOD e da Catalase, a presença de anti-oxidantes de baixo peso molecular como a Vitamina E, ácido ascórbico e da Via da Hexose Monofosfato, garantem a manutenção da integridade da hemoglobina e da membrana, resultando em uma surpreendente longa sobrevivência.

O fato de circular por todo organismo, em contato extremamente íntimo com o endotélio tecidual, pode ampliar o papel detoxicador: em primeiro lugar, como transportador destes agentes redutores; em segundo lugar, metabolizando produtos tóxicos de reações iniciadas por radicais livres, liberados para o plasma, como os produtos de lipoperoxidação (especialmente o malondialdeído). A grande capacidade que o peróxido de

hidrogênio possui de atravessar membranas celulares poderia representar outro mecanismo pelo qual o eritrócito depuraria produtos da ação oxidante tóxica produzidos pelos tecidos.

Neste trabalho, isolamos o eritrócito. Retiramos o plasma e os leucócitos, ressuspendemos em Tampão adequado para manter a funcionabilidade, incubamos a 37°C com seu combustível principal e observamos o comportamento da Hemoglobina com a adição isolada e conjunta do NS, AM e CI. O motivo? O NS, pelo modelo consagrado de agente indutor da oxidação do ferro heme; o AM, como agente redutor da MetaHb, de uso experimental, diagnóstico (deficiência de G6PD) e terapêutico. A CI, um agente oxidante tiol, com potencial farmacológico para várias situações clínicas, que permitiu, através do uso da CLAP, outra visão do sistema de óxido-redução, a abordagem do sistema que utiliza o GSH. Como um citômetro de fluxo, incidimos nosso raio laser (as drogas) no eritrócito e vimos seus reflexos através de vários ângulos (a formação e redução da metahemoglobina e do complexo Hb-EA).

Em suma, transformamos o eritrócito em nosso laboratório. Os resultados foram discutidos em vários tópicos, serão resumidos nas conclusões que finalizarão este texto. Mas fica a pergunta: como ampliar esta visão laboratorial para o horizonte clínico?

A grande dificuldade que temos em compreender os mecanismos de óxido-redução através de uma ótica biológica e clínica, e não puramente química ou bioquímica, está no fato das reações ocorrerem de forma extremamente rápida, com os agentes intermediários de difícil detecção, além da dificuldade de avaliar, na complexidade celular, o que é causa e o que é efeito. Afinal, estamos observando o movimento de elétrons.

Outra limitação está no fato que o que é observado laboratorialmente não pode ser transposto clinicamente, principalmente pelas condições extremamente estáticas que impomos experimentalmente. Um exemplo claro desta dificuldade é a ineficácia do agente N-Acetilcisteína por via endovenosa em reduzir Metahemoglobina induzida por NS em voluntários humanos (TANEN et al., 2000). Este agente, que é utilizado terapêuticamente na intoxicação pelo paracetamol, havia se mostrado extremamente eficaz na redução da Metahemoglobina *in vitro* (WRIGHT et al., 1996) e por isso, médicos resolveram testar a eficácia em voluntários. Entre as várias diferenças do tratamento *in vivo versus in vitro*, as concentrações plasmáticas eram 0,7 a 10% menores que as utilizadas nos tubos de ensaio.

O objetivo deste trabalho visou compreender, através da interação de modelos experimentais descritos previamente, a fisiologia do eritrócito,

especificamente o sistema de óxido-redução eritrocitária. Tendo como resultado um novo modelo (a oxidação conjunta do ferroheme e dos grupamentos SH da hemoglobina), esperamos que, com os próximos experimentos, possamos contribuir para uma maior compreensão do funcionamento desta célula, o glóbulo vermelho.

6. CONCLUSÕES

Em nosso modelo experimental, as seguintes considerações são relevadas:

FASE IA

1. O Azul de Metileno, isoladamente, atua como agente oxidante, como observado pela formação de Metahemoglobina.
2. A ação oxidante do Azul de Metileno ocorre provavelmente através do consumo de NADPH.
3. A Oxidação da Hemoglobina pela Cistamina não forma Metahemoglobina.
4. O aumento da formação de metahemoglobina quando da incubação concomitante da Cistamina reforça a hipótese de que o consumo de NADPH deve ser o fator principal da ação oxidante do Azul de Metileno.

Fase IB

1. A formação de Metahemoglobina pelo Nitrito de Sódio é reversível nas condições do presente ensaio.
2. A redução da Metahemoglobina pelo Azul de Metileno é um fenômeno secundário à redução do Azul de Metileno em Branco de Metileno, reação esta dependente da integridade da enzima Glicose-6-Fosfato Dehidrogenase.
3. A redução da Metahemoglobina pela Cistamina ocorre paralelamente à redução do complexo Hemoglobina-S-Etilamina, seja através da ação redutora da Cisteamina, seja através da ação da enzima Tioltransferase eritrocitária.
4. A diminuição da redução da Metahemoglobina pelo Azul de Metileno na incubação concomitante da Cistamina aos 90 minutos de incubação ocorre pelo consumo de NADPH.

Fase II

1. A formação e reversão do complexo Hemoglobina–S-Etilamina é possível de ser monitorada pela técnica de HPLC.
2. A reversão do complexo Hemoglobina–S-Etilamina ocorre através do consumo de GSH, que, por sua vez, depende da presença de NADPH.
3. A presença do Nitrito de Sódio e do Azul de Metileno diminuem a reversão do complexo Hemoglobina-S-Etilamina, possivelmente através do consumo de NADPH.

Conclusão final

Na avaliação do sistema de óxido-redução eritrocitário, a denominação de agente oxidante ou redutor refere-se a condições específicas relacionadas com dosagem, tempo de incubação, integridade das estruturas celulares e vias metabólicas e interação entre as drogas utilizadas.

Os resultados deste trabalho, nas condições expostas, sugerem que a ação primária das 3 drogas utilizadas é oxidante sobre o sistema de óxido-redução eritrocitário. O Azul de Metileno atua de forma mais eficiente sobre a redução da Metahemoglobina induzida pelo Nitrito de Sódio pelo fato atuar como receptor de elétrons e reduzir diretamente o átomo de Ferro oxidado da Metahemoglobina.

A redução de Metahemoglobina pela Cistamina, menos eficiente e mais tardia, ocorreu através de mecanismo não totalmente elucidado, provavelmente por reação não-catalítica indireta, através da Cisteamina. A influência da enzima Tioltransferase eritrocitária deve ser estudada em trabalhos posteriores para melhor compreensão desta redução.

A interação entre o Azul de Metileno, Nitrito de Sódio e a Cistamina é competitiva, provavelmente através do consumo direto e indireto de NADPH.

Em vista das dificuldades metodológicas no estudo do Sistema de Óxido-redução eritrocitário, o novo método proposto, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Performance para avaliar a formação e reversão do complexo Hemoglobina-Etilamina, permitiu observar, sob uma outra perspectiva, a interação entre as drogas no sistema de óxido-redução eritrocitário.

O estudo da interação de novas drogas no modelo apresentado neste trabalho poderá contribuir para fornecer informações para o conhecimento do sistema de óxido-redução eritrocitário, além de permitir o estudo de potenciais efeitos terapêuticos e tóxicos destas substâncias.

7. RESUMO

A hemoglobina, o componente principal do citoplasma eritrocitário, está sujeita à oxidação, fisiologicamente ou por agentes externos, seja através da formação de Metahemoglobina, ou pela oxidação da cisteína $\beta 93$ por agentes tios.

Impossibilitado de sintetizar proteína, o eritrócito depende primordialmente da via glicolítica, que, além de fornecer ATP, através da integração da formação de NADH e da Via da Hexose Monofosfato, mantém o potencial redutor extremamente eficiente.

A presente investigação teve como finalidade avaliar o sistema de óxido-redução eritrocitário, à partir da oxidação da hemoglobina pelas seguintes drogas: a) Nitrito de Sódio, indutora da formação de Metahemoglobina; b) Azul de Metileno, utilizado terapeuticamente e em testes laboratoriais na redução de Metahemoglobina; c) Cistamina, agente tiol, que induz à formação do complexo Hemoglobina-Etilamina, através da oxidação da cisteína $\beta 93$.

Doadores de sangue da Divisão Hemocentro foram convidados a participar do trabalho e tiveram seu sangue coletado após consentimento

verbal e por escrito. Todos os indivíduos eram do sexo masculino, não anêmicos e sem deficiência de G6PD.

Foram utilizados, para os testes, glóbulos lavados, ressuspensos em PBS, pH 7.45, com hemoglobina ajustada entre 11 e 13 g/dl, na presença de glicose e incubados a 37° C com as drogas testadas, nos momentos 10, 90 e 180 minutos de incubação.

As doses utilizadas foram baseadas em métodos padronizados em nosso laboratório para a avaliação da atividade da enzima G6PD, (Nitrito de Sódio e Azul de Metileno) e do Sistema da Glutathione-Redutase/Glutathione-Peroxidase (Nitrito de Sódio e Cistamina).

O estudo foi realizado em duas fases, sendo estudados 8 indivíduos na fase I e 8 indivíduos na Fase II.

A primeira fase foi subdividida em 2 partes, IA e IB.

Na fase IA dosamos a quantidade de Metahemoglobina formada na presença de Azul de Metileno e/ou Cistamina, para avaliarmos o potencial oxidativo direto sobre o ferro-heme destas drogas.

Na fase IB, dosamos a quantidade reduzida, pela presença de Azul de Metileno e/ou Cistamina, de Metahemoglobina induzida pela presença de Nitrito de Sódio

Na fase II, utilizamos a Cromatografia Líquida de Alta Performance para avaliarmos a formação e reversão do complexo Hemoglobina-Etilamina, na presença de Azul de Metileno e/ou Nitrito de Sódio.

Os resultados obtidos na Fase IA permitem afirmar que o Azul de Metileno induziu a formação de Metahemoglobina. Aos 90 minutos de incubação este efeito foi potencializado pela presença da Cistamina, provavelmente como consequência da competição pelo NADPH. A oxidação da cisteína $\beta 93$ pela incubação isolada de Cistamina não induziu a formação da Metahemoglobina.

Na Fase IB observamos que a redução da Metahemoglobina pela Cistamina foi observada somente aos 180 minutos de incubação, em níveis inferiores à redução pelo Azul de Metileno, que foi praticamente total aos 90 minutos. A presença concomitante de Cistamina diminuiu a redução da Metahemoglobina pelo Azul de Metileno aos 90 e 180 minutos, provavelmente como consequência da competição pelo NADPH.

Na fase II observamos, aos 10 minutos, a menor reversão do complexo Hemoglobina-Etilamina na presença do Nitrito de Sódio, seja isoladamente ou em conjunto com o Azul de Metileno. Isoladamente, o AM não modificou a reconversão. Aos 90 minutos, a presença de Nitrito de Sódio e/ou Azul de Metileno diminuiu a reversão da Hemoglobina A. Aos

180 minutos, apenas o Azul de Metileno isoladamente diminuiu significativamente a reversão do Complexo Hemoglobina-Etilamina.

No conjunto, os resultados sugerem que o efeito das 3 drogas utilizadas ocorrem através da ação primariamente oxidante sobre o sistema de óxido-redução eritrocitário.

O Azul de Metileno atua de forma mais eficiente sobre a redução da Metahemoglobina induzida pelo Nitrito de Sódio pelo fato atuar como receptor de elétrons e agir diretamente sobre o átomo de Ferro oxidado da Metahemoglobina.

A redução de Metahemoglobina pela Cistamina ocorre através de mecanismo não totalmente elucidado, provavelmente por reação não-catalítica indireta, através da Cisteamina, como sugerido pela menor eficiência e maior intervalo de tempo requerido.

A interação entre o Azul de Metileno, Nitrito de Sódio e a Cistamina é competitiva, provavelmente através do consumo de NADPH.

Além disso, o novo método proposto, utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Performance para avaliar a formação e reversão do complexo Hemoglobina-Etilamina, permitiu observar, sob uma outra perspectiva, a interação entre as drogas no sistema de óxido-redução eritrocitário.

8. SUMMARY

Hemoglobin, the essential component of erythrocyte cytoplasm, is physiologically prone to oxidation by external agents, through the formation of Methemoglobin or the oxidation of β 93 cysteine by thiol agents.

Unable to protein synthesis, the erythrocyte depends essentially on glycolysis, which, besides producing ATP, maintains the highly efficient reduction potential through the integration of NADH production and the Hexose Monophosphate Shunt.

The present investigation's purpose was to evaluate the erythrocyte antioxidant system by studying hemoglobin oxidation by the following substances: a) Sodium Nitrite (SN), a well known Methemoglobin-forming agent; b) Methylene Blue (MB), a Methemoglobin reductant reagent, available for therapeutic and laboratory tests; c) the thiol reagent Cystamine (CI), that reacts with hemoglobin through the β 93 cysteine oxidation, forming the Hemoglobin-Ethylamine complex.

After informed consent was obtained, blood sample was collected from blood donors of the Botucatu's Hemocentro Division. All subjects were male, non-anemic and non-G6PD deficiency individuals.

Washed, pH 7,45 PBS resuspended red blood cells (hemoglobin between 11 and 13 g/dl) were incubated (37° C) with glucose and the test reagents, at 10, 90 and 180 minutes.

The concentration and doses of reagents were based on current standard methods utilized in our laboratory for evaluation of G6PD (SN and MB) and Glutathione-reductase activity (SN and CI).

The studies were performed in two distinct stages. For each stage, 8 subjects were studied.

Stage I were subsequently divided in 2 stages, IA and IB.

In stage IA the concentration of Methemoglobin was measured after the exposition of MB and/or CI, for assessment of ferro-heme specific oxidative effect of the reagents.

In stage IB we measured the concentration of Methemoglobin after the exposition of SN, MB and/or CI, as a result of the degree of reduction by MB and/or CI of the SN-induced Methemoglobin.

In stage II, through the HPLC apparatus, we evaluated the formation and reversal of Hemoglobin-Ethylamine complex, in the presence of MB and/or SN.

We observed in stage IA that MB induced the formation of Methemoglobin. At 90 minutes of incubation, this effect was increased in

the presence of CI, probably as a consequence of competition for NADPH. The β 93 Cysteine oxidation by incubation with Cystamine did not induce the Methemoglobin formation.

In stage IB we observed Methemoglobin reduction by CI only at 180 minutes of incubation, in lower levels of reduction than MB, which were practically total at 90 minutes. The concomitant presence of CI and MB diminished the MB Methemoglobin reduction at 90 and 180 minutes, probably as a consequence of competition for NADPH.

In stage II we observed, at 10 minutes, a lesser reversal of Hemoglobin-Ethylamine complex in the presence of SN, alone or with MB. Methylene Blue, alone, did not modify the reversal. At 90 minutes the presence of SN and/or MB reduced the reversal of the complex. At 180 minutes, only MB, without SN, reduced significantly the reversal of Hemoglobin-Ethylamine complex.

Overall, the results suggest that the effect of the three reagents we utilized occurred as a result of a primarily oxidizing reaction on the erythrocyte oxide-reduction system.

Methylene Blue, as an electron acceptor, is more efficient in Methemoglobin reduction, by its direct effect over the heme iron Fe^{+3}

Mechanisms of Methemoglobin reduction by Cystamine are not totally elucidated. They probably occur by indirect non-catalytic reaction, through the Cysteamine formation, as suggested by the lesser efficiency and longer time interval required.

The interaction between MB, SN and CI is competitive, probably through competition for NADPH.

Finally, the proposed method, utilizing HPLC to measure the formation and reversal of Hemoglobin-Ethylamine complex, provided a new perspective to evaluate the effect and interaction of the chemical agents in the erythrocyte oxide-reduction system.

9. APÊNDICE

Materiais:

Equipamentos:

- Balança Analítica
- Banho Maria
- Centrífuga
- Coulter T890
- Espectofotômetro
- Pipetadores Automáticos
- Ponteiras de Propileno
- Potenciômetro

Reativos:

- Ácido Clorídrico
- Cianeto de Potássio
- Cistamina
- Cloreto de Azul de metileno tri-hidratado
- Ferricianeto de potássio
- Fosfato de Potássio
- Saponina
- Metanol
- Heparina
- Na_2HPO_4
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Saponina branca
- Tris
- Bis- Tris

Soluções e tampões

Soluções e tampões foram preparados com água obtida pelo sistema de ultra-purificação MiliQ®.

1. Solução de azul de metileno (AM) a 0,015%

Cloreto de azul de metileno trihidratado ----- 0,15 g
Água MiliQ----- 1000,0 ml
Conservação a 4^oC positivos.

2. Solução de cistamina 0,1 Molar (M)

Cistamina ----- 22,52 mg
Tampão TRIS, pH 7,45 ----- 1,0 ml
Conservação a 4^oC positivos.

3. Solução de cloreto de sódio a 0,9%

Cloreto de sódio ----- 9,0 g
Água q.s.p. ----- 1000,0 ml
Conservação a 4^oC positivos.

4. Solução de Drabkin

Ferricianeto de potássio ----- 200,0 mg
Cianeto de potássio ----- 50,0 mg
Bicarbonato de sódio ----- 1,0 g
Água q.s.p. ----- 1000,0 ml
Conservação a 4^oC positivos.

5. Solução de glicose a 5%

Glicose ----- 5 g
Água q.s.p. ----- 100 ml
Conservação a 4^oC positivos.

6. Solução de nitrito de sódio a 0,7%.

Nitrito de sódio ----- 0,7 g
Água q.s.p. ----- 100,0 ml
Conservação a 4^oC positivos.

7. Solução salina tamponada, pH 7,45 (PBS)

A. Solução estoque ácida, pH 5,0:

NaH₂PO₄.H₂O ----- 22,16 g

Água q.s.p. ----- 1000,0 ml

Conservação a 4^oC positivos.

B. Solução estoque alcalina, pH 9,0:

Na₂HPO₄ ----- 17,2 g

Água q.s.p. ----- 1000,0 ml

Conservação a 4^oC positivos.

C. Tampão Fosfato, pH 7,45:

Solução A ----- 16,0 ml

Solução B ----- 84,0 ml

Ajustar o pH para 7,45, adicionando pequenas quantidades de solução A ou B.

D. Solução de trabalho (PBS)

Tampão fosfato, pH 7,45 ----- 1 volume

Solução de cloreto de sódio a 0,9% ----- 9 volumes

Conservação a 4^oC positivos.

8. Solução de saponina a 2%.

Saponina branca ----- 2 g

Água q.s.p. ----- 100 ml

Conservação em vidro escuro a 4^oC positivos.

9. Tampão fosfato pH 6,8 (solução estoque).

Fosfato de potássio, monobásico ----- 34,6 g

Fosfato de sódio, dibásico ----- 36,1 g

Água q.s.p. ----- 250 ml

Ajustar o pH da solução para 6,8 com HCl 1N.

10. Tampão fosfato, pH 6,8 (solução de trabalho).

Solução tampão fosfato (estoque) ----- 10,0 ml

Água q.s.p. ----- 500,0 ml

Preparada imediatamente antes do uso.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINTONWA, D.A.A. Theoretical mechanistic basis of oxidants of methaemoglobin formation. **Med. Hypothesis**, v.54, p.312-320, 2000.

ALLISON, A.C. Turnovers of erythrocytes and plasma proteins in mammals. **Nature**, v.188, p.37-40, 1960.

ARAÚJO, A.C.P., MIDIO, A.F. Nitratos, nitritos e compostos N-nitrosos em alimentos: onde está o problema? **Rev. Soc. Brasil. Progr. Ciência**, v.47, p.947-56, 1989.

ARESE, P. Pathophysiology of Hemolysis in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. **Seminars in Hematology**, v. 27, p.1-40, 1990.

BARRAVIERA, B, MACHADO, P.E.A., MEIRA, D.A., CURI, P.R., MARTINS, J.N.P., SOUZA, M.J. Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase and Glutathione Reductase Activity in methemoglobin Reduction by Methylene Blue and Cystamine. Study on Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase-Deficient Individuals, on Normal subjects and on Riboflavin-Treated Subjects. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.30, p.370-378, 1988.

BARRAVIERA, B., MACHADO, P.E.A. Glutathione reductase e grupos SH reativos intracitocitários – Revisão. **Arq. Bras. Med.**, v.61, p.399-403, 1987.

BARTOS, H.R., DESFORGES, J.F.N. Erythrocyte DPNH-dependent diaphorase levels in infants. **Pediatrics**, v. 37, p.991, 1966.

BENNATTI, U. Hexose Monophosphate Shunt-Stimulated Reduction of Methemoglobin by Divicine. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 242, p.549-556, 1985.

BERLIN, N.I.: Erythrokinetics. In: WILLIAMS W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J. (eds): **Hematology**. New York, McGraw-Hill, 1983, pp395-405.

BEUZARD, Y., ROSA, J., MACHADO, P., HASSAN, W., MAX-AUDIT, I., GAREL, M.C. Antisickling effect of Cystamine and Its Action on The Biosynthesis of Hemoglobin. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 21,p109-26, 1978.

BREWER, G.J., EATON, J.W. Erythrocyte Metabolism: Interaction with Oxygen Transport: **Science**, v 171, p.1205-11, 1971.

BREWER, G.J., TARLOV, A.R., ALVING, A.S. The Methemoglobin Reduction Test for Primaquine-Type Sensitivity of Erythrocytes. A simplified procedure for Detecting a Specific Hypersusceptibility to Drug Hemolysis, **J. Am. Med. Assoc.**, v.180, p.126-128, 1962

BUCKLIN, R. Fatal methemoglobinemia due to well water nitrates. **Ann. Intern. Med.**, v, 52, p. 703, 1981.

BULL B.S. Morphology of the erythron. In: BEUTLER, E, COLLER, B.S., LICHTMAN, M.A., KIPPS, T.J., SELIGSOHN, U. (Eds). **Williams HEMATOLOGY**. New York: McGraw-Hill, 2001. P. 271-288.

BUNN, H.F., FORGET, B.G. Hemoglobin Oxidation: Methemoglobin, Methemoglobinemia and Sulfhemoglobinemia. In: **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia: Saunders, 1986. P 457-72.

CHIN, D. H. On the mechanism of autoxidation of Fe II porphyrins. Detection of a peroxo-bridged Fe (III) porphyrin dimer and the mechanism of its thermal decomposition to the oxo-bridged Fe (III) porphyrin. **J. Am. Chem. Soc.** v.102, p.4344-7, 1980.

CHIU, D., KUYPERS, F., LUBIN, B. Lipid Peroxidation in Human Red Cells. **Semin. Hematol.**, v. 26, p. 257-76, 1989.

CHOURY, D. Membrane-bound cytochrome b5 reductase (Methemoglobin reductase) in human erythrocytes. **J Clin Invest**, v. 67, p.149, 1981.

CHRISTENSEN, C.M., FARRAR, H.C., KEARNS, G.L. Protracted Methemoglobinemia after Phenazopyridine Overdose in an Infant. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 36, p.112-116, 1996.

COHEN, G., HOCHSTEIN, P. Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. **Biochemistry**, v.2, p. 1420-8, 1963.

COOPER, G. M. **The Cell: A molecular approach**, Washington D.C., ASM Press, 1997.

DERN, R.J., WEINSTEIN, I.M., LEROY, G.V., TALMAGE, D.W., ALVING, A.S. The Hemolytic Effect of Primaquine. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 43, p.303-9, 1954.

DOYLE, M.P., PICKERING, R.A., DEWEERT, .T.M, HOEKSTRA J.W., PATER, D. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. **J. Biol Chem.**, v.256, p.393, 1981.

EVELYN, K.A., MALLOY, H.T. Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and Sulfhemoglobin in a single sample of blood. **J. Biol. Chem.**, v. 126, p. 655-62, 1938.

FERNÍCOLA, N.G.G., AZEVEDO, F.A. Metemoglobinemia e Nitrato nas Águas. **Rev. Saúde Publ. São Paulo**, v.15, p.242-248, 1981.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Brasil.**, v. 43, p.61-8, 1997.

FINCH, C.A. Methemoglobinemia and Sulfhemoglobinemia. **New Engl. J. Med.**, v.239, p.470-8, 1948.

FISCHER, T.M., HAEST, C.W.M., STOHR, M. Selective alteration of erythrocyte deformability by -SH reagents. Evidence for a involvement of spectrin in membrane shear elasticity. **Biochim Biophys Acta**, v. 510; p.270-282, 1978.

FLOYD, R.A., WEST, M.S., ENEFF, K.L., SCHNEIDER, J.E. Methylene blue plus light mediates 8-hydroxyguanine formation in DNA. **Arch. Biochem. Biophys.** v.273, p. 106-11, 1989.

GILBERT H.F., McLEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v.63, p.69-172, 1990.

GORDON-SMITH, E.C. Drug induced oxidative haemolysis. **Clin. Haematol.**, v. 9, p. 557-586, 1980.

GRANT, R.S. Well water nitrate poisoning review: A survey in Nebraska 1973 to 1978. **Nebr. Med. J.**, v. 66, p.197, 1981.

HARVEY, J.W., KEITT, A.S. Studies of the efficacy and potential hazards of methylene blue therapy in aniline-induced methaemoglobinemia. **British Journal of Haematology**, v .54, p.29-41, 1983.

HASSAN, W., BEUZARD, Y., ROSA, J. Inhibition of erythrocyte sickling by cystamine, a thiol reagent. **Proceed. Nat. Acad. Sciences (USA)**, v.73, p.3288-92, 1976.

HUISMAN, T.H.J. Human Hemoglobin. In: MILLER, D. R., BAEHNER, R.L. (Eds). **Blood Diseases of Infancy and Childhood**. 7nd ed. Saint Louis: Mosby, 1995. p.385-414.

HULTQUIST, D.E., SANNES, L.J., JUCKETT, D.A. Catalysis of Methemoglobin Reduction. **Current Topics in Cellular Regulation**, vol 24, p. 287-299, 1984.

HULTQUIST, D.E., XU, F., QUANDT, K.S., SHLAFER, M., MACK, C.P., TILL, G.º, SEEKAMP, A., BETZ, A.L., ENNIS, S.R. Evidence that NADPH-Dependent Methemoglobin Reductase and Administered Riboflavin Protect Tissues from oxidative Injury. **Am J. Hematol.**, v.42, p.13-18, 1993.

JACOB, H.S., INGBAR, S.H, JANDL, J. H. Oxidative Hemolysis and Erythrocyte Metabolism in Hereditary Acatlasia. **J. Clin. Invest.**, v. 44, p. 1187-1199, 1965.

JAFFÉ, E.R., HULTQUIST, D.E. Cytochrome b5 Redutase Deficiency and Enzymopenic Hereditary Methemoglobinemia. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.B., SLY, W.S., VALLE, D. (Eds). **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 1989. P.2267-80.

JAFFÉ, E.R., NEUMANN, G. A comparison of the Effect of Menadione, Methylene Blue and Ascorbic Acid on the Reduction of Methaemoglobin *in vivo*. **Nature**, v.202, p.607-8, 1964.

KELLERMEYER, R.W., TARLOV, A.R., BREWER, G.J. Hemolytic Effect of Therapeutic Drugs. Clinical Considerations of the Primaquine-Type Hemolysis. **J. Am. Med. Assoc.**, v.180, p.128-134, 1962..

KHAN, N.A., KRUSE, J.Á. Methemoglobinemia Induced by Topical Anesthesia: A Case Report and Review. **Am. J. Med. Sci.**, v.318, p.415-421, 1999.

KUTLAR, F, KUTLAR, A., NUGUID, E. A., Prchal, J., HUISMAN, T.H.J. Usefulness of HPLC Methodology for the characterization of Combinations of the Common β Chain Variants HBS S, C, and O-Arab, and the α Chain Variant HB G-Philadelphia. **Hemoglobin**, v. 17, p. 55-66, 1983.

LACOMBE, C., DA SILVA, J.L., BRUNEVAL, P., SALZMANN, J.L, CASADEVALL, N., CAMILLERI, J.P., BARIETY, J., VARET, B, TAMBOURIN, P. Cellular Localization of Erythropoietin Gene Transcription. In: ASCENSAO, J.L., ZANJANI, E.D., TAVASSOLI, M., LEVINE, A.S., MACKINTOSH, F.R. (Eds). **Molecular Biology of Erythropoiesis**. New York: Plenum, 1989: 69-74.

LISSI, E. .Autocatalytic oxidation of hemoglobin by nitrite: A possible mechanism. **Free Radic.Biol. Med.**, v. 24, p.1535-6, 1998.

LUZZATTO, L., MEHTA, A. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. In: SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. (Eds): **The Metabolic Basis of Inherited Disease**. New York: McGraw-Hill, 1989, p 2237-2265.

MACHADO, P.E.A. **Cistamina, agente tiol com efeito anti-falcizante in vitro. Estudo da redução do complexo hemoglobina-cistamina pelo eritrócito in vitro. Estudo da ação da Cistamina e Glutation oxidado sobre a tradução proteica in vitro**. Botucatu, 1979. 137p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista.

MANSOURI, A., LURIE, A.A. Concise Review: Methemoglobinemia. **Am. J. Hematol.**, v.42, p.7-12, 1993.

MANSOURI, A., WINTERHALTER, K.H. Nonequivalence of Chains in Hemoglobin Oxidation and Oxygen Binding. Effect of Organic Phosphates. **Biochemistry**, v 13, p 3311-14., 1974.

- MANSOURI, A., WINTERHALTER, K.H. Nonequivalence of chains in hemoglobin oxidation. **Biochemistry**, v. 12, p.4946-9, 1973.
- MARRS, TC, BRIGHT, J.E., INNS R.H. Methaemoglobin production and reduction by methylene blue and the interaction of methylene blue with sodium nitrite in vivo. **Hum. Toxicol.**, v.8, p.359-64, 1989.
- MARTIN, H., HUISMAN, T.H.J. Formation of ferrihemoglobin of isolated human hemoglobin types by sodium nitrite. **Nature**, v.200, p.898, 1963
- MEISTER, A., ANDERSON, M.E. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.**, v.52, p.711-760, 1983.
- METZ, E. N., BALCERZAK, S.P., SAGONE, A.L., Jr. Mechanisms of Methylene Blue Stimulation of the Hexose Monophosphate Shunt in Erythrocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 58, p. 797-802, 1976.
- MIEYAL, J.J., STARKE, D.W., GRAVINA, S.A., DOTHEY, C., CHUNG, J.S. Thioltransferase in Human Red Blood Cells: Purification and Properties. **Biochemistry**, v. 30, p.6088-97, 1991.
- MILLER, D.R. Hemolytic Anemia: metabolic defects. In: MILLER, D. R., BAEHNER, R.L. (Eds). **Blood Diseases of Infancy and Childhood**. Saint Louis: Mosby, 1995: p.316-384.
- MUECKLER, M. Sequence and structure of a human glucose transporter. **Science** , v.229, p.941-5, 1985.
- MURRAY, R., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. **Harper: Bioquímica**, Sexta ed, São Paulo, Atheneu, 1990.
- PERUTZ MF. Molecular Anatomy, Physiology, and Pathology of Hemoglobin. In: STAMATOYANNOPOULOS, G., NIENHUIS, A.W., LEDER, P., MAJERUS, PW, (Eds). **The Molecular Basis of Blood Diseases**. Philadelphia: Saunders, 1987. P.127-178.
- RAVEN, P.H., JOHNSON, G.B. **Biology**, 2nd ed. Mosby. 1992.
- ROSS, J.D. Deficient activity of DPNH-dependent methemoglobinemia diaphorase in cord blood erythrocytes. **Blood** , v. 21, p. 51-3, 1963.
- SALTMAN, P. Oxidative Stress: A Radical View. **Semin. Hematol.**, v. 26, p.249-256, 1989.

SIEMS, W.G., SOMMERBURG, O., GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clin. Nephrol.**, v.53, (suppl. 1), p. S9-17, 2000.

SILLS, M.R., ZINKHAM, W.H. Methylene blue-induced Heinz body hemolytic anemia. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v.148, p. 306-10, 1994.

SINGLEY, T.L. III. Secondary methemoglobinemia due to the adulteration of fish with sodium nitrite. **Ann Int. Med.**;v. 57, p.800, 1962.

SKALAK, R. Deformation of red blood cells in capillaries. **Science**, v.164, p.717, 1969.

TANEN, D.A., VECCHIO, L., FRANK, D.O., CURRY, S.C. Failure of Intravenous N-Acetylcysteine to Reduce Methemoglobin Produced by Sodium Nitrite in Human Volunteers: A Randomized Controlled Trial. **Annals Emerg. Med.**, v.35, p.369-73, 2000.

TELEN, M.J., KAUFMAN, R.E. The Mature Erythrocyte. In: LEE, G.R., FOERSTER, J., LUKENS, J., FRIXOS, P., GREER, J.P., RODGERS, G.M. (Eds). **Wintrobe's Clinical Hematology**, Baltimore: Lea & Febiger, 1993, p.193-227.

TERADA, T. Thioltransferase Can Utilize Cysteamine as Same as Glutathione as a Reductant During the restoration of Cystamine-Treated Glucose-6—Phosphate Dehydrogenase Activity. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.34, p.723-7, 1994.

TERADA, T., OSHIDA, T., NISHIMURA, M., MAEDA, H., HARA, T., HOSOMI, S., MIZOGUCHI, T., NISHIHARA, T. Study on Human Erythrocyte Thioltransferase: Comparative Characterization with Bovine Enzyme and Its Physiological Role under Oxidative Stress. **J. Biochem.**, v.111, p.688-92, 1992.

TOLEDO, M.C.F., REYES, F.G.R. Nitratos e Nitritos: Presença em alimentos e riscos de sua ingestão. **Rev. Nutr., PUCCAMP**, v.3, p.9-20, 1990.

WAGNER, S.J., STORRY, J.R., MALLORY, D.A., STROMBERG, R.R., BENADE, L.E., FRIEDMAN, L.I. Red cell alteration associated with virucidal methylene blue phototreatment. **Transfusion**, v.33: 30-6, 1993.

WILSON, J.B., HEADLEE, M.E., HUISMAN, T.H.J. A new high-performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantitation of various hemoglobin variants in adults and newborn babies. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 102, p. 174-86, 1983.

WITTENBERG, J.B., WITTENBERG, B.A., PEISACH, J., BLUMBERG, W.E. On the state of the iron and the nature of the ligand in oxyhemoglobin. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, v.67, p.1846,1970.

WRIGHT, R.O., LEWANDER, W.J., WOOLF, A.D. Methemoglobinemia: Etiology, Pharmacology, and Clinical Management. **Ann. Emerg. Med.**, v.34, p.646-56, 1999.

WRIGHT, R.O., MAGNANI, B., SHANNON, M.W., WOOLF, A.D. N-Acetylcysteine Reduces Methemoglobin in Vitro. **Annals Emerg. Med.**, v. 28, 499-503, 1996.

ZAVODNIK, I.B., LAPSHINA E.A., REKAWIECKA K., ZAVODNIK L.B., BARTOSZ, G., BRYCZEWSKA, M. Membrane effects of nitrite oxidation of human red blood cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1421, p306-16, 1999.