Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física
Programa de Pós-Graduação em Física

Sebastião Antônio Mendanha Neto

Estresse Oxidativo em Membranas de Eritrócito Avaliado por Ressonância Paramagnética Eletrônica

Goiânia
2010

Sebastião Antônio Mendanha Neto

Estresse Oxidativo em Membranas de Eritrócito Avaliado por Ressonância Paramagnética Eletrônica

Dissertação apresentada ao Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: *Prof. Dr. Antonio Alonso*

Goiânia
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG

Mendanha Neto, Sebastião Antônio.
M537e Estresse oxidativo em membranas de eritrócito avaliado por ressonância paramagnética eletrônica [manuscrito] / Sebastião Antônio Mendanha Neto. - 2010.
x, 67 f. : il., figs.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física, 2010.
Bibliografia.
Inclui lista de abreviaturas e figuras.

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Radicais livres. 3. Ressonância paramagnética eletrônica. I. Título.

CDU: 538.9:543.429.22

A meus pais, Raul Antônio Mendanha e Ana Cândida da Silva Moreira Mendanha (in memoriam).

Agradecimentos

- A meus pais, por sempre terem acreditado em meus ideais e proporcionado a realização deste trabalho;
- Ao professor Dr. Antonio Alonso, pelo tempo dedicado à orientação, por todos os ensinamentos científicos e morais além da confiança despendida quando necessário;
- Aos amigos Jorge Luiz Vieira dos Anjos e Adolfo Henrique de Moraes Silva, pela ajuda e ideias fundamentais para a realização deste trabalho;
- Aos demais amigos do Grupo de Biofísica: Agnaldo Rosa de Almeida, Heverton Silva de Camargos e Kelly de Souza Fernandes, pela ajuda durante a realização deste trabalho;
- Ao amigo Guilherme Colherinhas de Oliveira, pela ajuda inestimável com a preparação de algumas figuras contidas neste trabalho;
- A meus familiares, que mesmo com dificuldades em compreender o verdadeiro significado deste trabalho, sempre me incentivaram a seguir em frente;
- Aos professores do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG), pela dedicação e atenção durante o curso de pós-graduação;
- Aos meus colegas do IF-UFG, pela amizade e apoio;
- Ao Prof. Dr. Fernando Pelegrini, por ceder gentilmente o laboratório de Ressonância Eletrônica;
- Ao Instituto Goiano de Oncologia e Hematologia (INGOH) e ao Hemolabor, por cederem as amostras de sangue sem as quais este trabalho seria inviabilizado;
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Universidade Federal de Goiás (UFG), pelo suporte financeiro.

"Em ciência não existe um erro tão grosseiro que, amanhã ou depois, sob alguma perspectiva, não pareça profético."

Jean Rostand

Conteúdo

Lista de Abreviaturas **iii**

Lista de Figuras **v**

Resumo **ix**

Abstract **x**

1 Introdução **1**

2 O Eritrócito Humano **3**

2.1 Estresse Oxidativo em Eritrócitos Humanos 6

2.2 Mecanismos de Defesa Contra o Estresse Oxidativo 8

3 Espectroscopia de RPE Aplicada a Sistemas Biológicos **10**

3.1 Interação Hiperfina e a Forma do Espectro de RPE 13

3.2 O Método dos Marcadores de Spin 17

4 Objetivos **20**

5 Materiais e Métodos **21**

5.1 Preparação dos Eritrócitos e Indução do Estresse Oxidativo 21

5.2 Avaliação da Hemólise 22

5.3 Avaliação da Peroxidação Lipídica 22

5.4 Marcação dos Lipídios da Membrana de Eritrócito 23

5.5 Quantificação das Proteínas da Membrana de Eritrócito Oxidada 23

5.6 Marcação das Proteínas da Membrana de Eritrócito 24

5.7 Condições de Operação do Espectrômetro de RPE 25

6 Resultados **26**

6.1 Hemólise Oxidativa 26

6.2 Oxidação Lipídica 27

6.3 Caracterização dos Sítios Sulfidrila 31

6.4 Oxidação Protéica 33

6.5 Efeito Protetor da Catalase 37

7 Discussão **38**

8 Conclusões **43**

9 Perspectivas **45**

Bibliografia **45**

Lista de Abreviaturas

5-DSA 5-DOXIL estearato

AAPH 2,2'-Azobis(2-metilpropanamida) dicloridrato

AGPI Ácidos Graxos Poliinsaturados

BCA Ácido Bicinconínico

BSA Albumina de Soro Bovino

CAT Catalase

CO_2 Dióxido de Carbono

EROs Espécies Reativas de Oxigênio

GPx Glutationa Peroxidase

GSH Glutationa

H_2O_2 Peróxido de Hidrogênio

Hgb Hemoglobina

$HO^{\bullet}$ Radical Hidroxil

MAL-5 3-maleimida proxil

MDA Malondialdeído

MetaHgb Metahemoglobina

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

NaCl Cloreto de Sódio

NaN_3 Azida de Sódio

NaOH Hidróxido de Sódio

NEM N-etilmaleimida

NO Óxido Nítrico

O_2 Oxigênio Molecular

$O_2^{\bullet -}$ Ânion Radical Superóxido

PBS Tampão Fosfato Salino

$RO^{\bullet}$ Radical Alcoxil

$RO_2^{\bullet}$ Radical Peroxil

RPE Ressonância Paramagnética Eletrônica

SH Grupo Sulfidrila

SOD Superóxido Dismutase

TBA Ácido Tiobarbitúrico

TCA Ácido Tricloroacético

Lista de Figuras

2.1 Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos humanos normais mostrando sua forma de disco bicôncavo (Créditos da imagem: Annie Cavanagh, Wellcome Images [18]). 3

2.2 Modelo esquemático da bicamada lipídica e das proteínas integrais, ancoradas e do citoesqueleto que constituem a membrana do eritrócito. Proteínas integrais; B3: banda 3, Gf-A: glicoforina A e Gf-C: glicoforina-C. Proteínas ancoradas; Anq: anquirina e P4.2: proteína 4.2. Proteínas do citoesqueleto; α-Spc: α-espectrina, β-Spc: β-espectrina, Adc: aductina, Tms: tropomiosina e Tmd: tropomodulina (Figura adaptada de *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model* [17]). 5

2.3 Esquema da cadeia de reações que levam a peroxidação lipídica (Figura adaptada de *Lipid Oxidation Pathways* [13]). 7

3.1 Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) na presença de um campo magnético aplicado. O painel A mostra os níveis energéticos sem a interação com o spin nuclear do átomo de nitrogênio; o painel B mostra os níveis energéticos desdobrados pela interação nuclear hiperfina. 16

3.2 Espectro de absorção; g define a posição da linha central e a é a constante de desdobramento hiperfino. 17

3.3 Estrutura molecular geral do radical nitróxido. R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin. 18

3.4 Parâmetro $2A_{\|}$ obtido diretamente do espectro de RPE. 19

5.1 Moléculas inibidoras do estresse oxidativo: α-tocoferol (painel A) e ácido ascórbico (painel B). 21

5.2 Marcador de spin 5-DOXIL estearato (5-DSA) que contém um grupo nitróxido ligado no 5° carbono da cadeia acil. 23

5.3 Marcador de spin 3-maleimida proxil (MAL-5) (painel A) e a molécula bloqueadora de sítios sulfidrila n-etilmaleimida (NEM) (painel B). 24

6.1 Hemólise induzida por estresse oxidativo para uma concentração de hematócrito 2% incubada em soluções contendo diferentes concentrações da ERO H_2O_2 (Painel A) e em função do tempo de exposição dos eritrócitos à concentrações de H_2O_2 selecionadas (Painel B). Efeitos protetores contra a hemólise induzida por 0,8 mM de H_2O_2 para várias concentrações das moléculas de ácido ascórbico e α-tocoferol (Painel C). Efeitos de proteção contra a hemólise oxidativa das moléculas de ácido ascórbico e α-tocoferol na presença de aumentos graduais na concentração de H_2O_2 (Painel D). 27

6.2 Espectros de RPE do marcador 5-DSA incorporado nas membranas de eritrócito na presença de aumentos graduais de H_2O_2. As linhas pontilhadas verticais indicam como o parâmetro $2A_{\|}$ é obtido diretamente do espectro. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. A figura mostra também a curva obtida para o parâmetro $2A_{\|}$ como função da concentração de H_2O_2. 28

6.3 O Painel A mostra o parâmetro de RPE $2A_{\|}$ do marcador de spin 5-DSA incorporado nas membranas de eritrócito como função da concentração de H_2O_2 além da curva hemolítica obtida em função da concentração de H_2O_2 para uma concentração de hematócrito 2% (quadrados vermelhos). O Painel B apresenta o parâmetro de RPE ($2A_{\|}$) como função da concentração das moléculas de ácido ascórbico e α-tocoferol para uma oxidação produzida com 0,8 mM de H_2O_2. Os símbolos vazios indicam os resultados para as membranas não tratadas com H_2O_2. 28

6.4 Parâmetro de RPE $2A_{\|}$ do marcador de spin 5-DSA incorporado nas membranas de eritrócito como função da concentração de ácido ascórbico para diferentes tempos de exposição das amostras a 100 μM de H_2O_2. 29

6.5 Diminuição na formação do produto resultante da oxidação lipídica (MDA-TBA) para várias concentrações das moléculas de α-tocoferol e ácido ascórbico. A linha tracejada indica a quantidade do produto MDA-TBA formado pela oxidação induzida por 0,8 mM de H_2O_2. 30

6.6 Espectros de RPE do marcador 5-DSA para amostras expostas a oxidação causada por AAPH e H_2O_2. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. 30

6.7 Espectros de RPE do marcador de spin MAL-5 que se liga covalentemente aos sítios sulfidrila das proteínas da membrana do eritrócito. O Painel A mostra os espectros característicos de dois sítios SH distintos. O Painel B apresenta a superposição do espectro controle (marcação integral dos sítios SH por 12 horas) e o espectro obtido através da composição dos espectros referentes aos sítios 1 e 2 na proporção 75 e 25 % respectivamente. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. 31
6.8 O Painel A apresenta os espectros do marcador de spin MAL-5 ligado ao sítio SH de maior reatividade (sítio 1) para diferentes tempos de reação entre o marcador e os sítios sulfidrila das proteínas da membrana do eritrócito. O Painel B mostra os espectros do marcador MAL-5 ligado aos sítios menos reativos (sítio 2) para diferentes tempos de incubação prévia das amostras com a molécula ligante de sítios SH N-etilmaleimida. Todos os espectros apresentados no Painel B foram marcados durante 12 horas. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. 32
6.9 Espectros de RPE do marcador de spin MAL-5 com destaque para as componentes espectrais S e W. A componente S diz respeito a fração de marcadores de movimento mais restrito e a componente W (predominante nos sítios 2) a fração de marcadores de movimento menos restrito. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. 33
6.10 Esquema para as possíveis ligações do marcador de spin MAL-5 nos sítios sulfidrila 1 e 2. 34
6.11 Razão entre as componentes espectrais W e S para várias concentrações de AAPH (Painel A) e de H_2O_2 (Painel B). 34
6.12 Intensidade do sinal do marcador MAL-5 ligado as proteínas da membrana do eritrócito como função da concentração de H_2O_2. O decréscimo no valor da intensidade para as três últimas concentrações indica a degradação dos grupos SH onde o marcador se liga covalentemente (Painel A). Comparação entre a rigidez relativa da membrana avaliada pelo marcador lipídico e a concentração total de proteínas presentes na membrana de eritrócito oxidada como função da concentração de H_2O_2 (Painel B). 35

6.13 Espectros de RPE do marcador MAL-5 ligado aos grupos sulfidrila das proteínas da membrana do eritrócito na presença de aumentos graduais de H_2O_2. As linhas pontilhadas verticais indicam como o parâmetro $2A_{\|}$ é obtido diretamente do espectro. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. A figura mostra também a curva obtida para o parâmetro $2A_{\|}$ como função da concentração de H_2O_2. 36
6.14 (a) Espectro de RPE do marcador de spin MAL-5 ligado as proteínas da membrana do eritrócito. (b) Amostra oxidada com 60 μM de H_2O_2. (c) Amostra previamente tratada com 160 μM de ácido ascórbico e oxidada com 60 μM de H_2O_2. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. 36
6.15 Efeito protetor da catalase contra a hemólise oxidativa induzida com várias concentrações de H_2O_2. A figura também apresenta a curva obtida para o parâmetro espectral $2A_{\|}$ do marcador de spin 5-DSA em função da concentração de peróxido de hidrogênio. 37

Resumo

Os efeitos do estresse oxidativo promovido pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e pelo 2,2'-Azobis(2-metilpropanamida) dicloridrato (AAPH) nas proteínas e lipídios da membrana de eritrócito foram investigados através do teste da hemólise oxidativa, da formação do malondialdeído (MDA) além da espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) do marcador de spin lipídico 5-DOXIL estearato (5-DSA) e do marcador de spin 3-maleimida proxil (MAL-5) que se liga covalentemente às proteínas da membrana de eritrócito. O parâmetro espectral $2A_{\|}$ obtido diretamente dos espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA estruturado na bicamada lipídica da membrana de eritrócito foi sensível às alterações na dinâmica dos lipídios resultantes da oxidação das proteínas da membrana. A oxidação das proteínas observada para concentrações baixas de H_2O_2 (a partir de 100 μM) foram confirmadas com o marcador MAL-5. A peroxidação lipídica indicada pela hemólise oxidativa e formação de MDA ocorreu em concentrações de H_2O_2 cerca de 8 vezes maiores (a partir de 800 μM). O ácido ascórbico e alfa-tocoferol protegem a membrana pelos testes de hemólise e MDA, mas não evitaram o enrijecimento da membrana do eritrócito. Os espectros do marcador MAL-5 revelaram a existência de dois grupos tióis distintos nas proteínas da membrana de eritrócito que diferem quanto a suas configurações estruturais e sensibilidade aos ataques oxidativos. O sítio SH de maior exposição ao solvente e menor reatividade ao marcador MAL-5 foi o mais vulnerável à oxidação. É bem conhecido que neste processo oxidativo a hemoglobina se liga à membrana e os resultados deste trabalho sugerem que este efeito pode ser acompanhado por um aumento adicional no parâmetro $2A_{\|}$ do marcador 5-DSA. A catalase presente nos eritrócitos se revelou como um eficiente protetor da oxidação lipídica e protéica da membrana induzidas por H_2O_2.

Abstract

The oxidative stress effects promoted by hydrogen peroxide (H_2O_2) and 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) in proteins and lipids of the erythrocyte membrane were investigated by testing the oxidative hemolysis, the formation of malondialdehyde (MDA) in addition to spectroscopic electron paramagnetic resonance (EPR) of lipid spin label 5-DOXIL stearic acid (5-DSA) and 3-maleimide proxyl (5-MSL) that binds covalently to erythrocyte's membrane proteins. The spectral parameter $2A_{\|}$ obtained directly from the EPR spectra of spin label 5-DSA structured in the lipid bilayer of the erythrocyte membrane was sensitive to changes in the dynamics of lipids resulting on the oxidation of membrane proteins. The oxidation of proteins observed for very low concentrations of H_2O_2 (starting at 100 μM) were confirmed with spin label 5-MSL. Lipid peroxidation indicated the oxidative hemolysis and formation of MDA occurred at concentrations of H_2O_2 about 8 times larger (starting at 800 μM). Ascorbic acid and α-tocopherol protect the membrane by hemolysis and MDA tests, but did not prevent the stiffening of the erythrocyte membrane. The spectra of the spin label 5-MSL revealed the existence of two distinct thiol groups in erythrocyte membrane proteins that differ in their structural configurations and sensitivity to oxidative attack. The SH site that has higher exposure to solvent and less reactivity to spin label 5-MSL was the most vulnerable to oxidation. It is well known that upon oxidation hemoglobin binds to the membrane and the results of this study suggest that this effect may be accompanied by a further increase in the parameter $2A_{\|}$ of the spin label 5-DSA. Catalase present in erythrocytes proved to be an effective protector of lipid peroxidation and oxidation of membrane proteins induced by hydrogen peroxide.

Capítulo 1

Introdução

A atuação das espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas resultantes da oxidação ou redução do oxigênio molecular (O_2), são relacionadas a uma série de patologias tais como a aterosclerose, a hipertensão, o mal de Parkinson, a nefropatia, a diabetes, a artrite inflamatória, o mal de Alzheimer e a síndrome de Down [1–6].

Altas concentrações de EROs formadas sob condições patológicas podem levar a danos em níveis macromoleculares através de alterações no DNA, mudanças na permeabilidade iônica da membrana do eritrócito, oxidação de grupos sulfidrila de proteínas e aumento da peroxidação lipídica [6–12].

Hidroperóxidos lipídicos são os produtos da oxidação de ácidos graxos polinsaturados (AGPI). Uma vez formados, os hidroperóxidos se decompõem em radicais peroxila e alcoxila, inicializando reações em cadeia e levando a produtos secundários da oxidação tais como cetonas, aldeídos, alcoóis, ácidos e lactonas. Estes produtos secundários são responsáveis por uma série de reações não específicas que causam danos a células e tecidos no corpo humano [13].

Na maioria das células, as mitocôndrias são as maiores fontes de EROs [6,14]. Apesar da falta de mitocôndrias nas células vermelhas, as EROs são continuamente produzidas no sangue devido à alta concentração de O_2 na corrente sanguínea e a grande abundância de ferro nas hemoglobinas [6]. Por serem as células carreadoras de oxigênio do organismo humano, torna-se muito importante determinar os efeitos oxidativos das EROs nas membranas do eritrócito.

Devido ao fato das EROs terem a capacidade de reagir não especificamente com um

vasto número de compostos, os organismos vivos usam uma série de moléculas (conhecidas como antioxidantes) que impedem a ação das EROs com propósito de proteger a funcionalidade e a integridade estrutural de macromoléculas biologicamente fundamentais (ácidos nucleicos, proteínas e fosfolipídios) [15].

Como regra geral, é bastante aceito que, embora as técnicas atuais para a determinação da oxidação funcionem bem em sistemas simples *in vitro*, elas nem sempre são confiáveis em sistemas biológicos complexos como, por exemplo, as membranas do eritrócito [16].

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica que se aplica a sistemas que possuem elétrons desemparelhados e cuja sensibilidade pode ser usada para determinar mudanças sutis na conformação de macromoléculas e na dinâmica de agregados moleculares tais como membranas. Essa técnica permite o uso de marcadores de spin contendo um grupo nitróxido ligado em sua estrutura para reportar o comportamento do micro ambiente no qual se encontram inseridos, tais como: parâmetro de ordem, dinâmica molecular ou fluidez e polaridade através dos espectros de RPE.

Neste estudo, esta metodologia foi usada para se obter informações adicionais sobre o efeito das EROs e de moléculas antioxidantes nas propriedades biofísicas das membranas de eritrócitos com o intuito de propor explicações mais precisas acerca dos mecanismos de ação destas moléculas nos domínios lipídicos e nas proteínas da membrana do eritrócito.

Capítulo 2

O Eritrócito Humano

Os eritrócitos (Figura 2.1) são as células mais abundantes e especializadas do corpo humano. São compostos por água (721 mg/mL do eritrócito), proteínas (321 mg/mL do eritrócito), lipídios (5,1 mg/mL do eritrócito) e carboidratos (80 mg/mL do eritrócito) [17]. Sua principal função é transportar oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2). Por não possuírem núcleo, ribossomos e mitocôndrias os eritrócitos não possuem capacidade de divisão celular, síntese de proteínas e reações oxidativas mitocondriais necessitando assim, serem constantemente renovados pelo organismo [6].

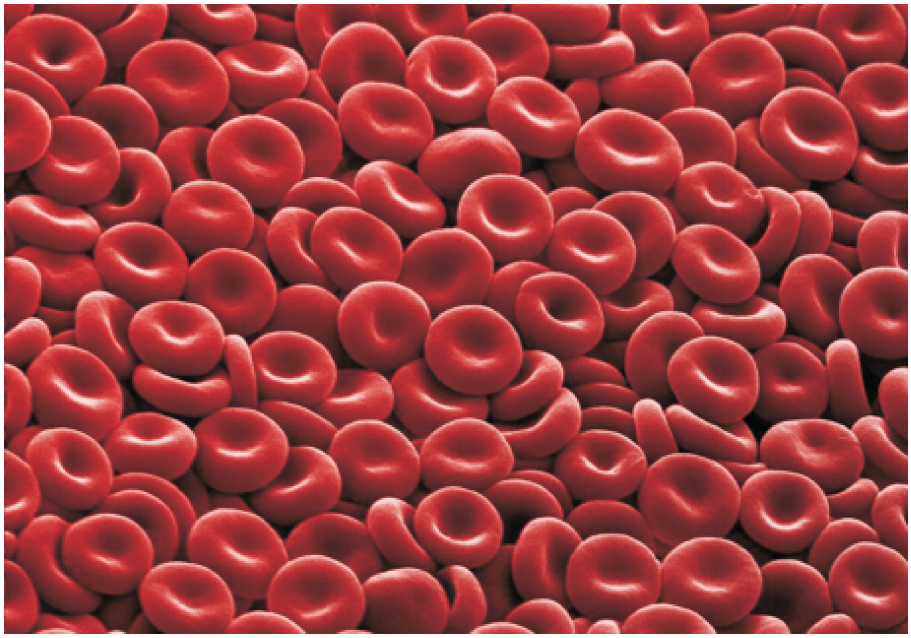

Figura 2.1: Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos humanos normais mostrando sua forma de disco bicôncavo (Créditos da imagem: Annie Cavanagh, Wellcome Images [18]).

A hemoglobina (Hgb), uma das proteínas mais especializadas existentes na natureza, corresponde a cerca de 95% do conteúdo citoplasmático do eritrócito. A Hgb mantém o ferro no seu estado reduzido Fe^{+2} permitindo assim a ligação reversível do O_2 no grupo heme, além de facilitar a troca do CO_2 produzido pelos tecidos com os pulmões [6, 19].

A organização estrutural da membrana celular dos eritrócitos permite que eles sofram grandes deformações mantendo sua integridade estrutural durante sua permanência de quatro meses no sistema circulatório. Essa membrana consiste em uma bicamada lipídica composta por 19.5% (peso/peso) de água, 39.6% de proteínas, 35.1% de lipídios e 5.8% de carboidratos [17].

As proteínas da membrana do eritrócito podem ser classificadas em três categorias de acordo com suas propriedades funcionais na ultra-estrutura da membrana. O primeiro grupo é formado pelas proteínas que compõem o citoesqueleto, entre as quais estão as espectrinas (cadeias α e β), as proteínas banda 4.1 e a actina. Estas proteínas se associam especificamente entre si para formar um citoesqueleto localizado diretamente abaixo da bicamada lipídica. O segundo grupo é composto por proteínas integrais inseridas na membrana lipídica através dos domínios hidrofóbicos de suas sequências de amino-ácidos. Exemplos típicos deste grupo são a proteína banda 3 e as glicoforinas. O último grupo, o das proteínas ancoradas, é formado por proteínas que se conectam com as proteínas integrais e com as proteínas do citoesqueleto. Os exemplos mais representativos deste grupo são a anquirina e a banda 4.2 (Figura 2.2). Cada um destes três conjuntos de proteína tem um importante papel no controle da forma da célula, na ligação com outras células e substratos e na organização de domínios específicos da membrana [6, 17].

No que diz respeito aos lipídios da membrana do eritrócito, é sabido que o total de lipídios nos glóbulos vermelhos é aproximadamente 5×10^{-10} mg/célula. A bicamada lipídica é composta por aproximadamente 60% de fosfolipídios, 30% de colesterol e o restante principalmente por glicolipídios. Enquanto o colesterol é igualmente distribuído entre as duas camadas, os fosfolipídios são dispostos assimetricamente. A fosfatidilcolina e a esfingomielina estão predominantemente localizadas na monocamada exterior, enquanto a maioria da fosfatidileta-

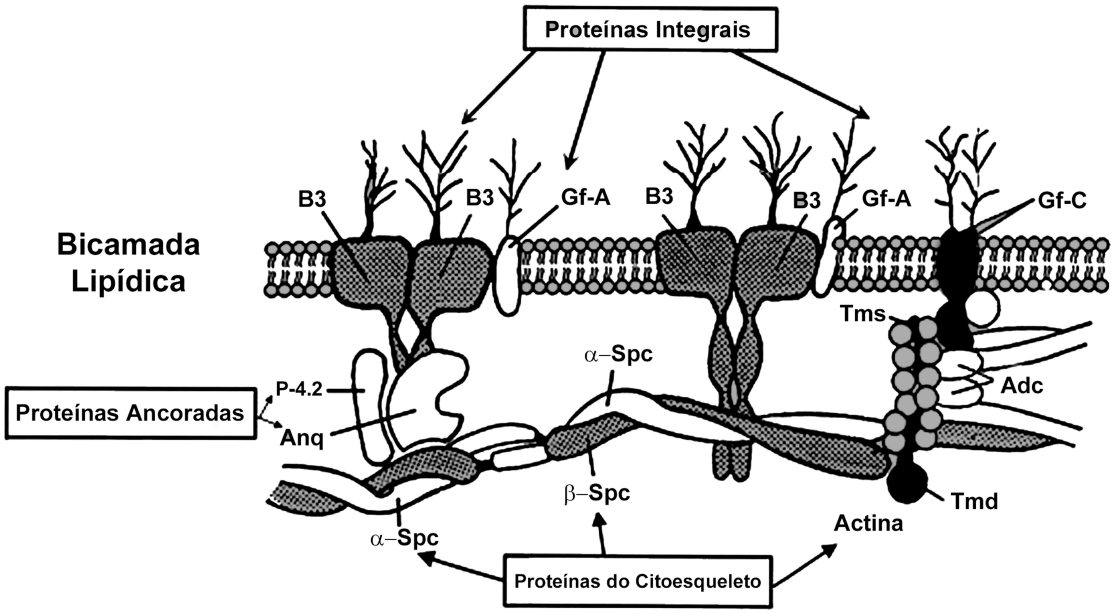

Figura 2.2: Modelo esquemático da bicamada lipídica e das proteínas integrais, ancoradas e do citoesqueleto que constituem a membrana do eritrócito. Proteínas integrais; B3: banda 3, Gf-A: glicoforina A e Gf-C: glicoforina-C. Proteínas ancoradas; Anq: anquirina e P4.2: proteína 4.2. Proteínas do citoesqueleto; α-Spc: α-espectrina, β-Spc: β-espectrina, Adc: aductina, Tms: tropomiosina e Tmd: tropomodulina (Figura adaptada de *Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model* [17]).

nolamina e da fosfatidilserina se limita a monocamada interior. A maioria dos fosfolipídios da membrana do eritrócito tem duas cadeias de ácidos graxos, as quais são ligadas a uma estrutura de glicerol. O estado de saturação (saturado ou insaturado) destes ácidos graxos e o tamanho de suas cadeias afetam significantemente o grau de fluidez da membrana. À medida que o grau de insaturação aumenta, o empacotamento das cadeias hidrofóbicas da bicamada diminui cada vez mais, aumentando assim a fluidez da membrana [17].

Os lipídios da membrana do eritrócito podem interagir com as proteínas integrais localizadas na bicamada (especialmente a banda 3) para formar canais de transporte através da bicamada lipídica. Outras proteínas, particularmente a banda 4.1 e a espectrina, as quais estão ligadas à superfície da bicamada, se ligam preferencialmente a fosfolipídios aniônicos, conferindo uma topografia extremamente específica à monocamada interior da membrana das células vermelhas [17].

2.1 Estresse Oxidativo em Eritrócitos Humanos

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são continuamente formadas em pequenas quantidades pelo processo metabólico normal a partir da redução parcial do oxigênio molecular (O_2). Entre as principais EROs estão: o peróxido de hidrogênio H_2O_2, o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o radical hidroxil ($HO^{\bullet}$), os radicais peroxil ($RO_2^{\bullet}$) e alcoxil ($RO^{\bullet}$) além do óxido nítrico (NO). O H_2O_2, por exemplo, pode reagir com $O_2^{\bullet -}$ e íons de ferro para produzir o composto altamente reativo $HO^{\bullet}$ [6].

Devido sua combinação extremamente rápida com íons de metais de transição ou outros radicais no próprio micro ambiente onde foi produzido, o radical hidroxil ($HO^{\bullet}$) é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos. Este radical pode causar a inativação ou mutação do DNA, além de inativar proteínas (enzimas ou mesmo proteínas da membrana celular) ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) e/ou as pontes dissulfeto (-SS) [20, 21].

Nos eritrócitos a principal fonte de EROs é a proteína carreadora de oxigênio hemoglobina (Hgb). Esta proteína pode sofrer auto-oxidação para produzir $O_2^{\bullet -}$. Desde que a concentração interna de Hgb oxigenada é de aproximadamente 5 mM, uma pequena taxa de auto-oxidação pode produzir níveis substanciais de EROs. Uma ocasional redução de O_2 para $O_2^{\bullet -}$ é acompanhada da oxidação da Hgb para metaHgb (o estado de oxidação do ferro é o Fe^{+3}), uma proteína que não liga ou transporta O_2. Além de causar danos às próprias células vermelhas, grandes quantidades de EROs provenientes dos eritrócitos tem a capacidade de causar danos a outros componentes do sangue [6, 14].

Como visto na equação abaixo, a dismutação do O_2 irá gerar quantidades excessivas de H_2O_2 [22].

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2. \tag{2.1}$$

O H_2O_2 pode atravessar a membrana com a mesma facilidade da água, enquanto o radical $O_2^{\bullet -}$ precisa passar pelos canais iônicos. Esta característica é extremamente importante para

formação de EROs a partir do Fe^{+2} da Hgb como descrito pela reação de Fenton:

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH^- + OH^{\bullet}. \tag{2.2}$$

A teoria de oxidação aceita pela literatura, a qual envolve um ataque das EROs na posição alílica com a formação de hidroperóxidos insaturados, sugere que a oxidação de ácidos graxos polinsaturados ocorre como uma cadeia de reações que prosseguem através de três fases (Figura 2.3): (i) iniciação, (ii) propagação, e (iii) terminação. Este esquema clássico de oxidação lipídica é usado para explicar a maior parte das observações e pesquisas, mas continua a ser incapaz de explicar alguns dos detalhes encontrados em estudos de oxidação lipídica [13].

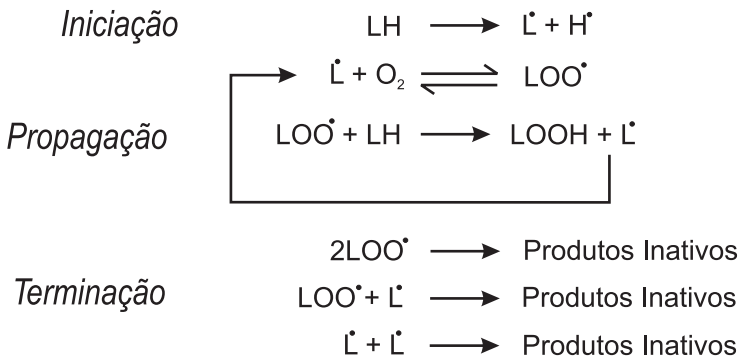

Figura 2.3: Esquema da cadeia de reações que levam a peroxidação lipídica (Figura adaptada de *Lipid Oxidation Pathways* [13]).

Quando em contato com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana do eritrócito as EROs iniciam o processo de peroxidação lipídica, mecanismo pelo qual os lipídios são atacados com energia suficiente para formar radicais orgânicos que reagem com o oxigênio e resultam no radical peroxil [16]. Os resultados da peroxidação lipídica podem ser, por exemplo, danos estruturais na membrana e a geração de produtos oxidados, alguns destes produtos são quimicamente reativos e têm a capacidade de modificar macromoléculas [23].

A maioria das metodologias utilizadas para avaliar a magnitude da peroxidação lipídica mede a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Um dos métodos mais utilizados para se avaliar a oxidação lipídica é a verificação da formação do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante

a oxidação de ácidos graxos polinsaturados, principalmente o ácido araquidônico. Sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos de alta absortividade molar no espectro visível (λ = 532 nm). Entretanto, embora este método ainda seja amplamente utilizado, a avaliação do MDA pelo teste com TBA não é específica, pois quantifica a soma das diferentes espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (como carboidratos e proteínas), denominadas TBARS [21].

Outro método bastante utilizado, o teste da hemólise oxidativa, monitora espectrofotometricamente (λ = 540 nm) a quantidade de hemoglobina liberada no solvente quando as células vermelhas se rompem devido ao comprometimento estrutural de sua membrana causado pela ação das EROs [20]. Por também ser uma medida indireta da peroxidação lipídica assim como o teste do MDA, este método pode quantificar a soma das diferentes moléculas que tem seu pico de absorção em 540 nm, comprometendo assim a especificidade da avaliação.

2.2 Mecanismos de Defesa Contra o Estresse Oxidativo

Para minimizar os danos causados a macromoléculas e tecidos, os organismos vivos fazem uso de moléculas antioxidantes que limitam o estresse oxidativo promovido pelas EROs quando o nível de oxidação ultrapassa o limite aceitável. Este mecanismo de defesa pode destoxificar o microambiente dos agentes oxidativos antes mesmo que estes possam causar uma lesão ou mesmo bloquear a produção das EROs. São estas moléculas antioxidantes que permitem ao eritrócito resistir aos ataques oxidativos, impedindo a peroxidação lipídica acelerada e outros danos celulares tais como a inativação protéica [20].

O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) a qual catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2, \tag{2.3}$$

a catalase (CAT) cujo sítio ativo contém um grupo heme que atua na decomposição de H_2O_2

a O_2 e H_2O

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{CAT} H_2O + H_2O + O_2 \tag{2.4}$$

e a glutationa peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutationa (GSH) como co-fator [6]

$$GSH + GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} H_2O + H_2O + GSSG^1. \tag{2.5}$$

O sistema antioxidante não enzimático é formado por vários compostos, com destaque para a glutationa (GSH), principal substância antioxidante intracelular; para os tocoferóis (vitamina E), moléculas que exibem qualitativamente a atividade biológica do α-tocoferol (composto mais potente e geralmente a forma predominante) que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos polinsaturados das membranas e lipoproteínas; e para o ascorbato (vitamina C), molécula que atua diretamente como antioxidante sobre EROs em ambiente biológico aquoso, impedindo a inicialização da peroxidação lipídica e resultando na formação do ânion radical ascorbila ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na fase lipofílica da membrana [6, 24].

Existem ainda outras moléculas antioxidantes tais como o ácido úrico, o ácido tânico, o β-caroteno, além de proteínas de transporte de íons de metais de transição, como a transferrina (transporte do ferro) e a ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina) [24].

[1] Glutationa oxidada.

Capítulo 3

Espectroscopia de RPE Aplicada a Sistemas Biológicos

A Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica que permite ao investigador detectar e caracterizar moléculas com elétrons desemparelhados, sem alterar ou destruir tais moléculas. Radicais livres e compostos biológicos contendo elementos de transição se tornaram os tipos de moléculas com elétrons desemparelhados mais investigados por RPE em pesquisas biológicas.

A espectroscopia de RPE, monitora as transições induzidas entre os níveis de energia Zeeman de um sistema paramagnético situado em um campo magnético estático. Para que ocorra transição, a amostra deve ser irradiada com um campo eletromagnético de frequência definida que corresponda a separação (ΔE) dos níveis de energia entre os quais a transição acontece; ou seja,

$$h\nu = \Delta E. \tag{3.1}$$

Esta relação é conhecida como *condição de ressonância*. Em experimentos comuns de RPE o campo de radiação eletromagnética é polarizado em um plano perpendicular a direção do campo magnético estático.

A energia de interação (energia Zeeman)[1] do momento de dipolo magnético da amostra

[1]Esta descrição está utilizando o sistema de medidas cgs no qual $\mu_0 = 1$. Isto permite escrever $\vec{B} = \vec{H}$ e usar Gauss (G) como unidade de medida para o campo magnético auxiliar $\vec{H}$.

irradiada com o campo externo estático $\vec{H}$ é descrita pelo operador Hamiltoniano

$$\hat{\mathcal{H}} = -\vec{\mu} \cdot \vec{H}. \tag{3.2}$$

O momento de dipolo magnético eletrônico pode ser expresso como

$$\vec{\mu} = -g\mu_B \vec{J} \tag{3.3}$$

onde g é o fator de espectroscópico de desdobramento

$$g = 1 + \frac{j(j+1) + s(s+1) - l(l+1)}{2j(j+1)}, \tag{3.4}$$

$\mu_B = \dfrac{e\hbar}{2mc}$ é o magneton de Bohr e $\vec{J}$ é o momento angular eletrônico total.

Assumindo que a direção do campo aplicado seja a direção z, a equação (3.2) é reescrita como

$$\begin{aligned} \hat{\mathcal{H}} = -\hat{\mu} \cdot \vec{H} &= -\hat{\mu}_z H \\ &= g\mu_B \hat{J}_z H. \end{aligned} \tag{3.5}$$

onde J_z é o operador correspondente a projeção do momento angular total na direção do campo aplicado. Os valores esperados de J_z são denotados por m_j e variam entre $-j$ e $+j$ por valores inteiros. Desta forma, o efeito do campo magnético estático é produzir $2j+1$ níveis, cada um com energia $E_{m_j} = g\mu_B H m_j$ e população dada pela lei de distribuição de Boltzmann

$$P_{m_j} = exp\left(\frac{-E_{m_j}}{kT}\right) \Bigg/ \sum_{m_j} exp\left(\frac{-E_{m_j}}{kT}\right). \tag{3.6}$$

As transições são induzidas somente entre os níveis de energia adjacentes caracterizados pelos números quânticos m_j e $m_{j\pm1}$, com isso, a condição de ressonância ($\Delta E = g\mu_B H_r$) pode ser reescrita como

$$h\nu = g\mu_B H_r; \tag{3.7}$$

H_r é chamado campo de ressonância.

A equação (3.7) é satisfeita para uma grande faixa de frequências e campos magnéticos. Por razões técnicas, frequências na região das microondas são usadas. Tipicamente para $\nu = 9,5$

GH_z (Banda X), H_r = 3400 G e ΔE = 0,3 cm^{-1}. A equação (3.7) nos diz ainda que existem dois possíveis meios para a detecção da absorção ressonante de uma amostra paramagnética. Podemos fixar H e então variar ν e vice versa. Por razões experimentais o segundo método é o usado. Assim um espectro de RPE é registrado como função do campo magnético e não da frequência.

Energias magnéticas da ordem de 0,3 - 1 cm^{-1} são algumas centenas de vezes menores que a energia térmica kT para temperaturas ordinárias. Sendo assim, a diferença de população entre os níveis de energia, como dados na equação (3.6) é muito pequena. Contudo, é esta diferença de população a responsável pela detecção do sinal de RPE. De fato, quando a amostra é irradiada com um campo de microondas, ela absorve energia deste campo e é excitada para níveis energéticos superiores, ao mesmo tempo que a transição inversa ocorre por emissão estimulada. Visto que as taxas de ambos processos são proporcionais a população do nível de energia do qual a transição começa, uma absorção de energia resultante permanece.

Estas circustâncias entretanto, não são suficientes para permitir a detecção contínua do sinal de RPE. Desde que o processo de absorção prevaleça, as populações dos níveis de energia irão se igualar causando o desaparecimento do sinal (saturação). Felizmente, existem mecanismos de relaxação, os quais levam o sistema de volta as populações de equilíbrio de Boltzmann depois da perturbação causada pelo campo de microondas. A situação de equilíbrio é restaurada por meio da dissipação da energia magnética em forma de energia térmica.

A taxa com a qual o equilíbrio térmico é restaurado é definida por um tempo característico denominado *tempo de relaxação spin-rede* ou *longitudinal* T_1. Assumindo que o processo possa ser representado por um decaimento exponencial:

$$\frac{d\mathcal{M}_z}{dt} = \frac{-(\mathcal{M}_z - \mathcal{M}_{eq})}{T_1} \tag{3.8}$$

onde $\mathcal{M}_z$ é a magnetização macroscópica da amostra, $\mathcal{M}_{eq}$ é dada pela *lei de Curie*

$$\mathcal{M}_{eq} = \frac{j(j+1)Ng^2\mu_B^2 H}{3kT} \tag{3.9}$$

para qual N é o número de spins e T é a temperatura absoluta.

O processo de relaxação spin-rede diminui o tempo de vida dos níveis de energia, e consequentemente um alargamento das linhas espectrais pode ocorrer devido ao princípio da incerteza de Heisenberg. Contudo, sobre condições de baixa potência do campo de microondas, o que evita os efeitos de saturação, o alargamento de linha é causado por outro mecanismo de relaxação. Estes mecanismos mantém a energia Zeeman total constante em contraste com os mecanismos de relaxação spin-rede e são caracterizados por um tempo de relaxação T_2 denominado *tempo de relaxação transversal*.

Devido a estes processos, a componente perpendicular da magnetização, que na ausência de relaxação iria seguir o campo de microondas com mesma velocidade angular $\omega = 2\pi\nu$, decai para zero com o tempo característico T_2 de acordo com a equação

$$\frac{d\mathcal{M}_x}{dt} = \frac{-\mathcal{M}_x}{T_2}. \tag{3.10}$$

As equações (3.8) e (3.10) são conhecidas como *equações de Bloch* para a magnetização macroscópica.

3.1 Interação Hiperfina e a Forma do Espectro de RPE

A aplicação de um campo magnético externo pode gerar um campo magnético interno na amostra o qual irá ser somado ou subtraído do campo externo. Por conveniência H_r na equação (3.7) é definido como campo magnético *externo* de ressonância. Qualquer campo local pode ser computado desde que seja permitido que o fator g varie; isto é,

$$g_{ef} = \frac{h\nu}{\mu_B H_r}. \tag{3.11}$$

O fator g pode ser considerado então como uma quantidade característica da molécula na qual o elétron desemparelhado está localizado.

Além do campo local induzido pelo campo externo aplicado, existem campos locais permanentes e que não dependem da presença de um campo externo. Tais campos são gerados pela presença de outros momentos magnéticos, geralmente associados aos núcleos dos átomos

da molécula. A interação do spin de um elétron desemparelhado[2] com o spin nuclear é chamada de interação nuclear hiperfina e foi observada pela primeira vez em espectros de absorção óptica de átomos [26].

A Hamiltoniana que descreve a interação entre o spin eletrônico e o spin nuclear pode ser escrita como

$$\mathcal{H} = \vec{I} \cdot \overleftrightarrow{A'} \cdot \vec{S} + a\vec{I} \cdot \vec{S} \tag{3.12}$$

onde $\overleftrightarrow{A'}$ é um tensor de segunda ordem, com elementos dados por

$$A'_{ij} = -g_e \mu_{B_e} g_N \mu_{B_N} \langle \left(r^2 \delta_{ij} - 3x_i x_j\right) r^{-5} \rangle, \tag{3.13}$$

$\vec{r}$ é o vetor distância entre o elétron e o núcleo e a *constante de desdobramento hiperfino isotrópico* a é definida por

$$a = (8\pi/3) g_e \mu_{B_e} g_N \mu_{B_N} \psi^2(0) \tag{3.14}$$

O primeiro termo da equação (3.12) descreve a interação dipolar elétron-núcleo e o segundo termo, também chamado de interação de contato de Fermi, está relacionado com o valor assumido pela função de onda $\psi(\vec{r})$ do elétron desemparelhado quando o mesmo ocupa a posição do núcleo.

A Hamiltoniana de interação hiperfina pode ser reescrita de forma mais compacta:

$$\mathcal{H} = \vec{I} \cdot \overleftrightarrow{A} \cdot \vec{S} \tag{3.15}$$

quando definimos um novo tensor de segunda ordem (*tensor de acoplamento hiperfino*) $\overleftrightarrow{A}$ com componentes:

$$A_{ij} = A'_{ij} + \delta_{ij} a \tag{3.16}$$

Note que, para distribuições eletrônicas que possuem simetria esférica (orbital tipo s)

$$\langle x^2/r^5 \rangle = \langle y^2/r^5 \rangle = \langle z^2/r^5 \rangle = \frac{1}{3} \langle 1/r^3 \rangle \tag{3.17}$$

[2] A partir de agora vamos assumir que toda contribuição para o momento angular total $\vec{J}$ e principalmente devido ao momento angular de spin $\vec{S}$. De fato, pode ser mostrado que a contribuição do momento angular orbirtal $\vec{L}$ pode ser negligenciada para maioria dos sistemas moleculares [25].

o que anula o termo de interação dipolar. Por outro lado, o termo de contato de Fermi requer uma densidade eletrônica não nula na posição nuclear, e apenas orbitais atômicos tipo s apresentam tal característica. Entretanto, se a densidade eletrônica for descrita por uma função de onda que seja a mistura de orbitais s e p, ambas interações, dipolar e contato de Fermi estão presentes simultaneamente.

Para um radical livre no qual o spin eletrônico interage via acoplamento hiperfino com N núcleos de números quânticos de spin individuais I_k, a Hamiltoniana é

$$\mathcal{H} = \mu_{B_e}\vec{H} \cdot \overleftrightarrow{g} \cdot \vec{S} + \sum_{k=1}^{N} \vec{S} \cdot \overleftrightarrow{A^{(k)}} \cdot \vec{I} \tag{3.18}$$

A rápida reorientação molecular de uma espécie paramagnética em um solvente de baixa viscosidade, promedia os termos anisotrópicos da Hamiltoniana de interação hiperfina. Com isso, a posição da linha central do espectro e a magnitude do desdobramento hiperfino são então determinadas pelos valores médios dos elementos diagonais dos tensores $\overleftrightarrow{g}$ e $\overleftrightarrow{A}$. Os níveis de energia do sistema podem ser obtidos em termos da Hamiltoniana isotrópica

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_0 &= g\mu_{B_e}\vec{H} \cdot \vec{S} + \sum_{k=1}^{N} a_k \vec{S} \cdot \vec{I}_k \\ &= g\mu_{B_e} H_0 S_z + \sum_{k=1}^{N} a_k \left(S_x I_{kx} + S_y I_{ky} + S_z I_{kz}\right) \end{aligned} \tag{3.19}$$

onde:

$$g = \frac{1}{3}\, Tr\overleftrightarrow{g} \qquad \text{e} \qquad a_k = \frac{1}{3}\, Tr\overleftrightarrow{A^{(k)}} \tag{3.20}$$

Os níveis de energia podem ser determinados tratando o termo hiperfino como uma perturbação no termo de energia Zeeman. As autofunções da Hamiltoniana Zeeman podem ser escritas como um produto das autofunções de spin eletrônico e nuclear dos operadores de spin S_z e I_{kz}. Estas funções também são autofunções da Hamiltoniana simplificada:

$$\mathcal{H}_0' = g\mu_{B_e} H_0 S_z + \sum_{k=1}^{N} a_k S_z I_{kz} \tag{3.21}$$

e as requeridas energias de primeira ordem são os correspondentes autovalores:

$$E = g\mu_{B_e} H_0 m_s + \sum_{k=1}^{N} a_k m_s M_k \tag{3.22}$$

onde $m_s = \pm\frac{1}{2}$ e $M_k = -I_k, -I_k + 1, \cdots, I_k$.

Devido ao efeito do campo estático aplicado e do acoplamento hiperfino são gerados uma série de subníveis com energia dada pela equação (3.22). Alguns destes níveis terão mesma energia, isto é, serão degenerados, se as interações hiperfinas forem as mesmas para dois ou mais átomos. Neste caso o núcleo será dito magneticamente equivalente, e está propriedade é imediatamente reconhecida à partir da geometria da molécula.

Como o operador $\hat{S}$ atua apenas no spin eletrônico, a disposição dos spins nucleares de dois estados entre os quais a transição acontece deve ser a mesma. Em conclusão, as transições permitidas devem satisfazer as regras de seleção $\Delta m_s = \pm 1$ e $\Delta M_k = 0$ para todos os núcleos.

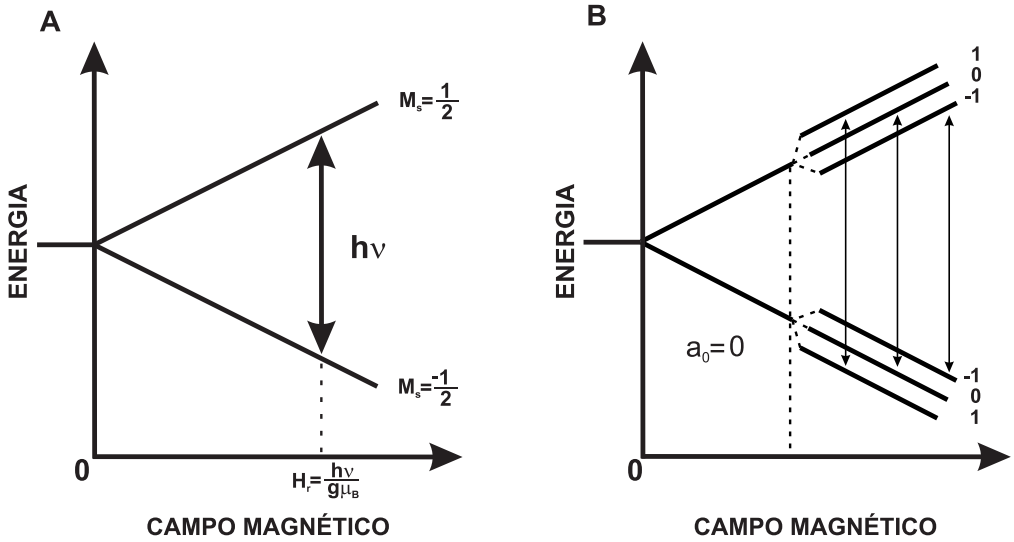

Figura 3.1: Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) na presença de um campo magnético aplicado. O painel A mostra os níveis energéticos sem a interação com o spin nuclear do átomo de nitrogênio; o painel B mostra os níveis energéticos desdobrados pela interação nuclear hiperfina.

Supondo que todos os N núcleos são equivalentes temos níveis de energia dados por

$$E(m_s, M) = g\mu_{B_e} H_0 m_s + a m_s M \tag{3.23}$$

onde M é a soma vetorial dos números quânticos M_k. A diferença de energia entre os níveis envolvidos nas transições permitidas é

$$\Delta E(M) = g\mu_{B_e} H_0 + aM. \tag{3.24}$$

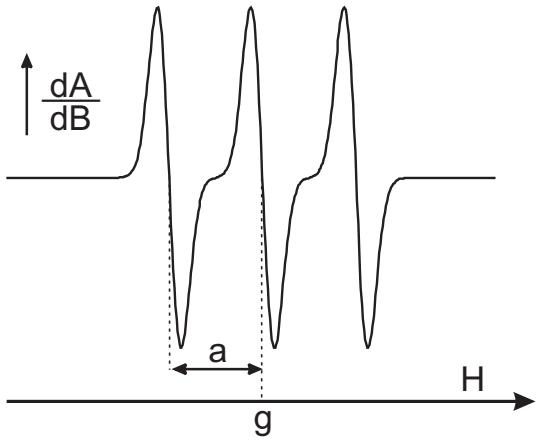

Figura 3.2: Espectro de absorção; g define a posição da linha central e a é a constante de desdobramento hiperfino.

O espectro será constituido de um número de linhas igual a $2NI_k + 1$ possíveis valores de M, com intensidade proporcional a degenerescência de cada estado de spin nuclear M. Se $I_k = 1$, então M_k poderá assumir os valores $0, \pm 1$ e as linhas espectrais adjacentes serão igualmente espaçadas pelo valor de a.

3.2 O Método dos Marcadores de Spin

Muitos sistemas biológicos contêm naturalmente centros paramagnéticos, estes sistemas, entretanto, são uma fração mínima dos quais a sensibilidade da espectroscopia de RPE pode ser útil. Seria muito desejável que qualquer sistema biológico ou molécula pudesse ser feita paramagnética de um modo específico. Para isso foram desenvolvidos "marcadores de spin"(spin labels) - radicais livres estáveis que podem ser ligados a sítios específicos de uma molécula em um sistema complexo e que a espectroscopia de RPE fornece informações sobre o ambiente do marcador.

Uma propriedade essencial de um marcador de spin é a estabilidade sobre as condições usadas no estudo de moléculas biológicas, como pH, concentração salina e temperatura. Ele deve ser sensível a seu ambiente - preferencialmente a polaridade, restrições espaciais, orientação, fluidez além de campos magnéticos e elétricos locais. Para serem ordinariamente úteis

é necessário que os compostos usados como marcadores de spin possuam um bom entendimento químico, o qual permita a síntese de marcadores específicos para determinados fins. Os marcadores de spin mais utilizados são os baseados na molécula de nitróxido (Figura 3.3).

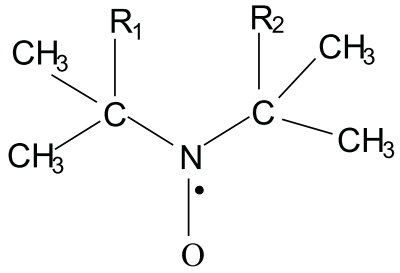

Figura 3.3: Estrutura molecular geral do radical nitróxido. R_1 e R_2 representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin.

O espectro de RPE de marcadores de spin é muito sensível à taxa com a qual o marcador consegue se reorientar. Assim um conhecimento desta dependência funcional permite avaliar o grau de mobilidade do ambiente no qual o marcador se encontra inserido. Em particular, mudanças na conformação trazidas por processos bioquímicos são facilmente detectadas.

Marcadores de spin baseados no doxil esteárico, por exemplo, quando incorporados ao ambiente da membrana possuem movimento restrito o qual resulta no alargamento e na variação de seus espectros. O grau de restrição do movimento destes marcadores é a base para uma medida muito útil, o parâmetro $2A_{\parallel}$ (Figura 3.4), o qual pode ser usado como uma medida da fluidez relativa da membrana[3].

Além disso, o fator g e a constante de desdobramento hiperfino a_0 dos marcadores de spin variam significantemente com a polaridade do solvente. Assim temos uma maneira de monitorar a natureza hidrofílica ou hidrofóbica do ambiente no qual o marcador está inserido.

Os marcadores de spin baseados no doxil esteárico se organizam na membrana pelas

[3]Este parâmetro está diretamente relacionado com o parâmetro de ordem

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})}. \tag{3.25}$$

Os valores de A_{xx}, A_{yy} e A_{zz} são os elementos principais do tensor $\overleftrightarrow{A}$ e $A_{\parallel}$ e $A_{\perp}$ são iguais a metade da separação das linhas externas e internas respectivamente, medidas diretamente do espectro de RPE [25]. Desde que a variação do parâmetro $2A_{\parallel}$ é a mais pronunciada no espectro de RPE, uma primeira aproximação para a avaliação do parâmetro de ordem S é o próprio parâmetro $2A_{\parallel}$.

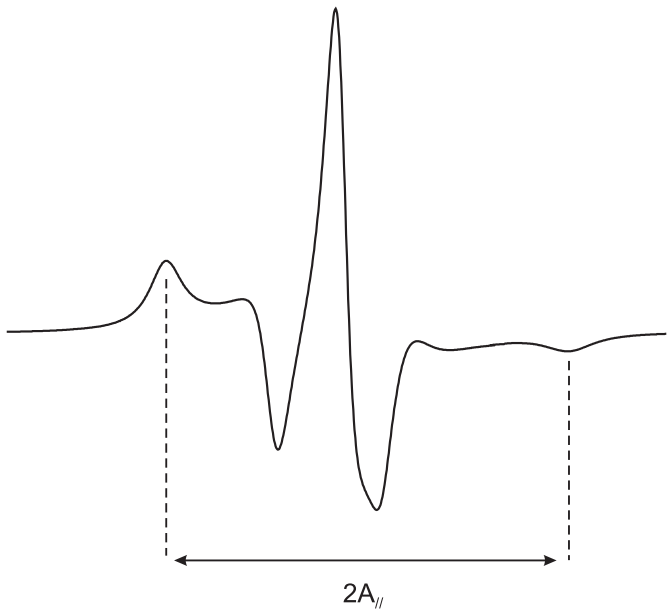

Figura 3.4: Parâmetro $2A_{\|}$ obtido diretamente do espectro de RPE.

mesmas forças não covalentes que ligam os lipídios naturais. A transferência deste tipo de marcadores para a membrana pode ser realizada biosinteticamente, cultivando-se um organismo que contenha componentes previamente marcados; ou fisicamente, fazendo uso da alta solubilidade destes marcadores de spin em um ambiente similar a sua composição.

Por outro lado, marcadores de spin derivados do maleimido reagem covalentemente com os sítios sulfidrila (SH) de proteínas para fornecer informações valiosas à respeito da conformação, dinâminca e função dos grupos tióis onde se encontram ligados. Em particular, alterações na mobilidade da cadeia polipeptídica causadas pela ligação cruzada entre proteínas e lipídios da membrana ou mesmo pela denaturação proteíca podem ser identificadas nos espectros de RPE de marcadores de spin específicos como, por exemplo, o 3-maleimida proxil (MAL-5).

Sendo assim, desde que as alterações causadas pela inserção dos marcadores de spin no sistema em estudo são praticamente desprezíveis e podem ser controladas, este método se torna uma poderosa ferramenta para a avaliação de sistemas biológicos.

Capítulo 4

Objetivos

Este trabalho tem como principais objetivos:

- usar a técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) através do Método dos Marcadores de Spin juntamente com o Teste da Hemólise Oxidativa e da verificação da formação do malondialdeído (MDA) para avaliar o estresse oxidativo nos lipídios e proteínas da membrana do eritrócito;
- obter informações complementares sobre a oxidação de grupos SHs das proteínas da membrana de eritrócito através do uso de marcadores de spin específicos;
- avaliar o potencial antioxidante das moléculas de α-tocoferol e ácido ascórbico nas proteínas e lipídios da membrana do eritrócito.

Capítulo 5

Materiais e Métodos

5.1 Preparação dos Eritrócitos e Indução do Estresse Oxidativo

Para realização do trabalho foram utilizadas amostras obtidas de diferentes bancos de sangue. O sangue diluído em tampão fosfato salino (PBS; 5 mM de fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,4) contendo 1 mM de azida de sódio (NaN_3)[1] foi centrifugado três vezes a 150×g durante 10 minutos a 4 °C tendo o plasma e células brancas cuidadosamente removidos em cada lavagem. Os eritrócitos foram então resuspendidos em PBS a uma concentração de hematócrito 2%. Para induzir o estresse oxidativo, alíquotas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou 2,2'-Azobis(2-metilpropanamida) dicloridrato (AAPH) adquiridos da empresa Sigma Chem. Co. (St Louis, MO) foram adicionadas a suspensão de eritrócitos e incubadas a 37 °C por 3 horas. As soluções reagentes foram cuidadosamente agitadas de 30 em 30 minutos durante a incubação.

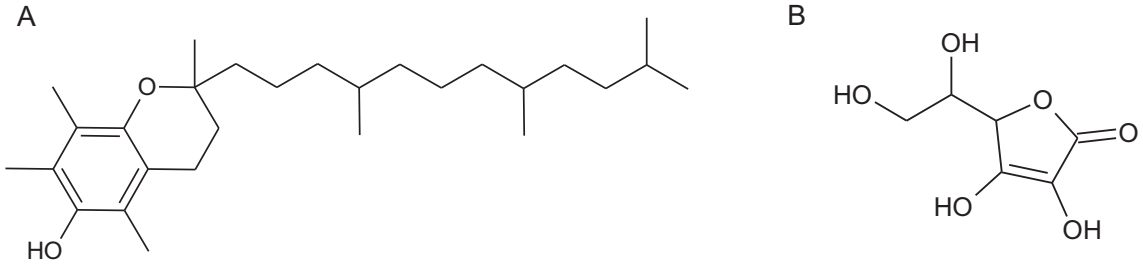

Figura 5.1: Moléculas inibidoras do estresse oxidativo: α-tocoferol (painel A) e ácido ascórbico (painel B).

[1]Nos testes onde o efeito antioxidante da catalase foi avaliado, a azida de sódio não foi adicionada ao tampão fosfato salino.

Para avaliar o efeito protetor das moléculas de α-tocoferol e ácido ascórbico (Figura 5.1), os eritrócitos previamente incubados por 30 minutos a 37°C com as alíquotas desejadas das moléculas em questão foram submetidas ao estresse oxidativo como mencionado acima.

5.2 Avaliação da Hemólise

A magnitude da hemólise foi determinada espectrofotometricamente. Após a incubação, as soluções reagentes foram centrifugadas a 300×g durante 10 minutos a 25 °C e a absorção A do sobrenadante foi medida a 540 nm. A porcentagem de hemólise foi determinada de acordo com a equação:

$$\%\text{hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \tag{5.1}$$

onde A_{c1} é a amostra controle (0 % H_2O_2), A_{c2} a amostra completamente hemolisada com H_2O destilada e A_a a amostra com a alíquota de H_2O_2 desejada.

5.3 Avaliação da Peroxidação Lipídica

A formação de malondialdeído (MDA) foi usada como medida indireta da peroxidação lipídica [27]. Depois da incubação nas soluções de H_2O_2, ácido tricloroacético (TCA) (10% da concentração final da solução) foi adicionado a 1,5 mL do sobrenadante da solução de eritrócitos. As soluções foram então centrifugadas a 300×g por 10 minutos a 25 °C. Após a centrifugação foi adicionado ao sobrenadante 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% TBA em 0,05 M de NaOH) e as soluções reagentes foram aquecidas a 95 °C por 30 minutos. Para separar as camadas do sobrenadante as soluções foram imediatamente resfriadas após o período de incubação e 1 mL de n-butanol foi adicionado a cada tubo. A camada superior do sobrenadante, a qual contém as substâncias resultantes da reação com TBA foram lidas a 453 e 532 nm. A concentração do produto final MDA-TBA é obtida através da subtração de 20% da absorbância a 453 nm da absorbância a 532 nm usando um coeficiente de exitinção molar de 1,56x105 $M^{-1}cm^{-1}$.

5.4 Marcação dos Lipídios da Membrana de Eritrócito

Após serem expostas ao período de estresse oxidativo, as membranas de eritrócito foram precipitadas por centrifugação a 300×g durante 10 minutos a 4 °C. Ao precipitado de membranas foi adicionado uma pequena alíquota do marcador 5-DOXIL estearato (5-DSA) diluído em etanol na razão de 50 mg/mL (Figura 5.2). Este marcador de spin que contém o grupo nitróxido ligado ao 5° carbono da cadeia acil, foi adquirido da empresa Sigma Chem. Co. (St Louis, MO).

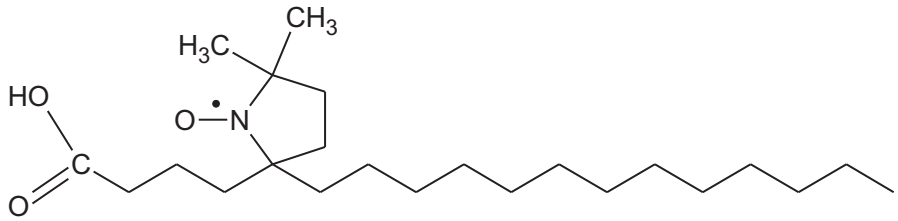

Figura 5.2: Marcador de spin 5-DOXIL estearato (5-DSA) que contém um grupo nitróxido ligado no 5° carbono da cadeia acil.

A pequena proporção de marcador na solução garante uma distribuição homogênea ao longo da membrana evitando possíveis interações magnéticas entre os grupos nitróxido, as quais provocariam distorções nas linhas de ressonância e comprometeriam a avaliação do sistema. As interações entre os marcadores são em grande parte evitadas desde que na preparação das amostras seja garantida uma proporção de cerca de 150 lipídios naturais para cada marcador [28].

5.5 Quantificação das Proteínas da Membrana de Eritrócito Oxidada

A quantificação das proteínas da membrana de eritrócito oxidada foi realizada utilizando um conjunto baseado na reação do ácido bicinconínico (BCA) [29, 30] adquirido da empresa Sigma Chem. Co. (St Louis, MO). Após serem expostas ao período de estresse oxidativo, as membranas de eritrócito foram precipitadas por centrifugação a 300×g durante 10

minutos a 4 °C. Uma pequena alíquota do precipitado de membranas foi adicionada a solução de BCA reagente. A solução final foi incubada por 30 minutos a 37 °C e sua absorbância foi medida a 562 nm. A concentração de proteínas foi determinada pela comparação da absorbância das amostras de interesse com uma curva de calibração preparada com albumina de soro bovino (BSA).

5.6 Marcação das Proteínas da Membrana de Eritrócito

Após serem expostas ao período de estresse oxidativo, as membranas de eritrócito foram precipitadas por centrifugação a 300×g durante 10 minutos a 4 °C e então diluídas em uma solução tamponante (5 mM de fosfato, pH 8,0). Estas soluções foram incubadas a 4 °C por 2 horas e em seguida centrifugadas seis vezes a 20000×g por 30 minutos a 4 °C tendo o sobrenadante cuidadosamente removido em cada lavagem. Em seguida foi adicionado as membranas uma alíquota do marcador 3-maleimida proxil (MAL-5) diluído em etanol na razão de 50 mg/mL, adquirido da empresa Sigma Chem. Co. (St Louis, MO). As amostras reagentes foram incubadas por 12 horas a 4 °C e o excesso de marcador foi retirado por centrifugação.

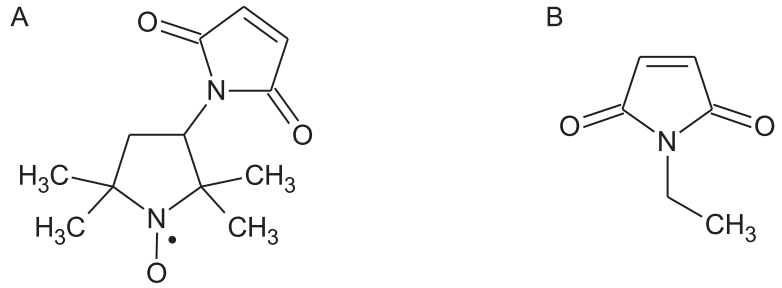

Figura 5.3: Marcador de spin 3-maleimida proxil (MAL-5) (painel A) e a molécula bloqueadora de sítios sulfidrila n-etilmaleimida (NEM) (painel B).

Para marcar separadamente os sítios sulfidrila menos reativos, as membranas de eritrócito foram previamente incubadas com 2 mM de N-etilmaleimida (NEM) por 1, 2, 4 e 6 horas a 4 °C antes da adição da alíquota do marcador de spin MAL-5 (Figura 5.3).

5.7 Condições de Operação do Espectrômetro de RPE

As medidas foram realizadas no laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica da Universidade Federal de Goiás (UFG). O equipamento utilizado foi um espectrômetro Bruker ESP300 equipado com uma cavidade ressonante ER4102 ST operando em banda-X (aproximadamente 9,4 GHz). Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente (24-26 °C) com os seguintes parâmetros[2]: potência de microonda, 10 mW; freqüência de modulação, 100 KHz; amplitude de modulação, 1,024 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção, 41 ms.

[2]Todos os parâmetros instrumentais foram ajustados para a detecção do sinal de marcadores de spin baseados no nitróxido. Uma descrição detalhada sobre os efeitos causados pela variação destes parâmetros na linha espectral pode ser encontrada em *Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Pratical Applications* [31].

Capítulo 6

Resultados

6.1 Hemólise Oxidativa

A capacidade de uma molécula em promover estresse oxidativo é comumente relacionada à sua capacidade hemolítica. Os níveis de hemólise oxidativa para uma concentração de hematócrito 2% estão representados na Figura 6.1 como função da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e também do tempo (Painéis A e B).

Moléculas que atenuam os danos causados pela hemólise oxidativa são tratadas como antioxidantes [20, 24, 32]. Os efeitos protetores contra a hemólise oxidativa induzida com uma concentração de 0,8 mM de H_2O_2 para as moléculas antioxidantes ácido ascórbico e α-tocoferol estão apresentados na Figura 6.1 (Painel C). A molécula de ácido ascórbico apresenta seu máximo efeito protetor em uma concentração de 160 μM (hemólise praticamente nula) ao passo que o α-tocoferol mostra seu maior efeito em uma concentração de 300 μM (hemólise reduzida em aproximadamente 30%).

A Figura 6.1 (Painel D) mostra ainda os efeitos de proteção do ácido ascórbico e do α-tocoferol na presença de aumentos graduais na concentração de H_2O_2. Enquanto a molécula de ácido ascórbico mantém os níveis hemolíticos em no máximo 5% em todo o intervalo de concentração de H_2O_2 analisado, o α-tocoferol apresenta uma diminuição de seu efeito protetor a partir de uma concentração de 0,4 mM de H_2O_2.

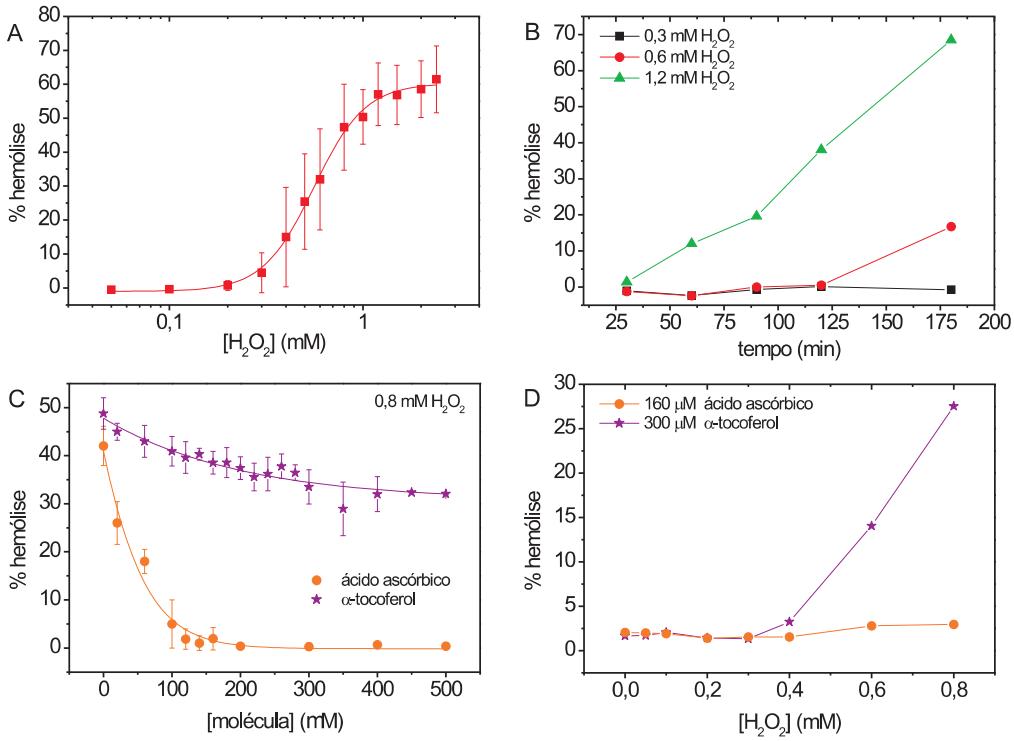

Figura 6.1: Hemólise induzida por estresse oxidativo para uma concentração de hematócrito 2% incubada em soluções contendo diferentes concentrações da ERO H_2O_2 (Painel A) e em função do tempo de exposição dos eritrócitos à concentrações de H_2O_2 selecionadas (Painel B). Efeitos protetores contra a hemólise induzida por 0,8 mM de H_2O_2 para várias concentrações das moléculas de ácido ascórbico e α-tocoferol (Painel C). Efeitos de proteção contra a hemólise oxidativa das moléculas de ácido ascórbico e α-tocoferol na presença de aumentos graduais na concentração de H_2O_2 (Painel D).

6.2 Oxidação Lipídica

Os espectros de RPE do marcador 5-DSA incorporado em membranas de eritrócitos previamente expostos a diferentes concentrações de H_2O_2 estão apresentados na Figura 6.2. Acréscimos graduais na concentração de H_2O_2 levam a um aumento da rigidez relativa da membrana reportada pelo parâmetro espectral $2A_{\|}$.

O comportamento do parâmetro de RPE $2A_{\|}$ e do estresse hemolítico induzido pelo peróxido de hidrogênio para uma concentração de hematócrito 2% são indicados na Figura 6.3. A peroxidação lipídica avaliada pelo parâmetro $2A_{\|}$ apresenta uma curva com o mesmo padrão da encontrada para o efeito hemolítico (sigmoide).

Entretanto, mesmo em concentrações muito baixas (onde o efeito hemolítico é praticamente nulo), o parâmetro $2A_{\|}$ indica níveis consideráveis de peroxidação lipídica. É impor-

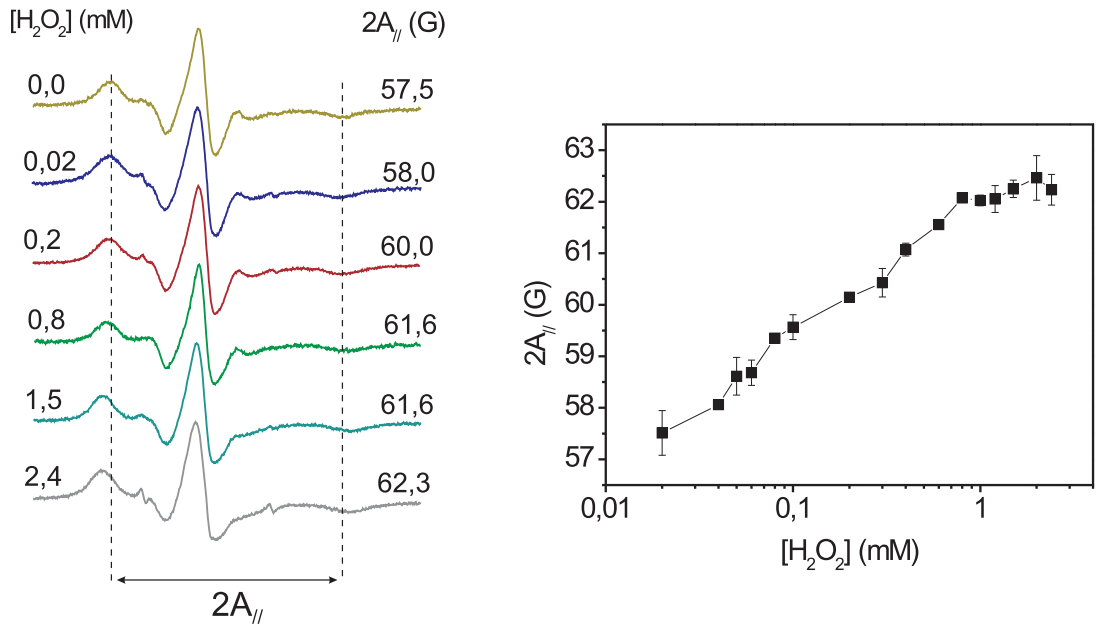

Figura 6.2: Espectros de RPE do marcador 5-DSA incorporado nas membranas de eritrócito na presença de aumentos graduais de H_2O_2. As linhas pontilhadas verticais indicam como o parâmetro $2A_{||}$ é obtido diretamente do espectro. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. A figura mostra também a curva obtida para o parâmetro $2A_{||}$ como função da concentração de H_2O_2.

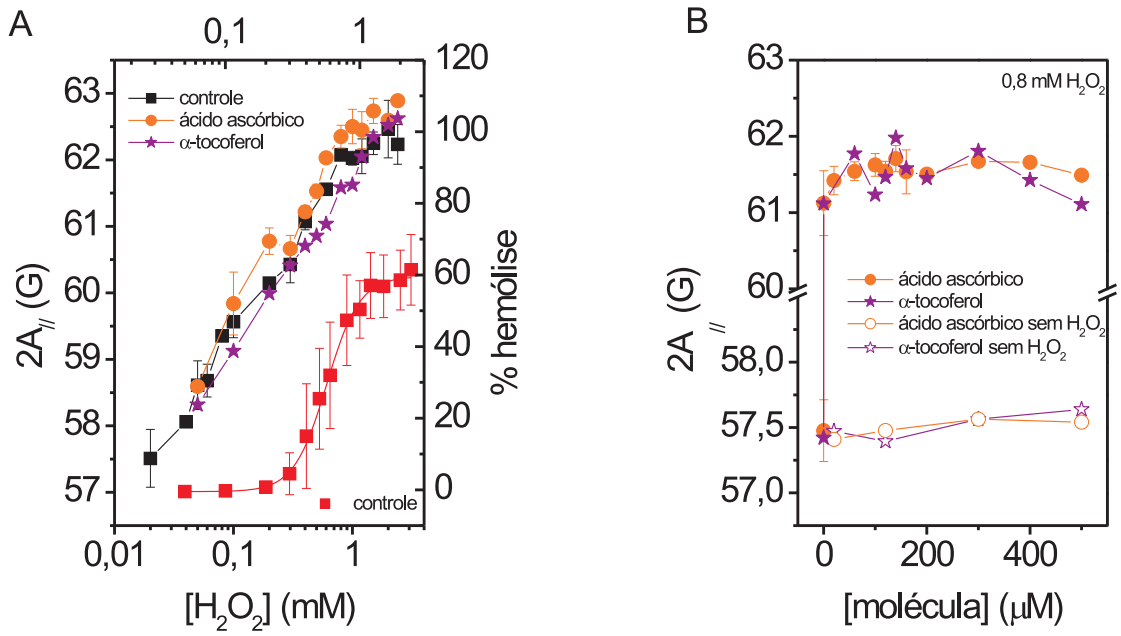

Figura 6.3: O Painel A mostra o parâmetro de RPE $2A_{||}$ do marcador de spin 5-DSA incorporado nas membranas de eritrócito como função da concentração de H_2O_2 além da curva hemolítica obtida em função da concentração de H_2O_2 para uma concentração de hematócrito 2% (quadrados vermelhos). O Painel B apresenta o parâmetro de RPE ($2A_{||}$) como função da concentração das moléculas de ácido ascórbico e α-tocoferol para uma oxidação produzida com 0,8 mM de H_2O_2. Os símbolos vazios indicam os resultados para as membranas não tratadas com H_2O_2.

tante enfatizar que mesmo as amostras tratadas com 160 μM de ácido ascórbico e 300 μM de α-tocoferol não apresentam diferenças significativas no valor de $2A_{\|}$ em relação à curva controle.

A Figura 6.4 mostra ainda que o processo de oxidação desencadeado pelo peróxido de hidrogênio acontece rapidamente já que a rigidez relativa da membrana avaliada pelo parâmetro $2A_{\|}$ permanece praticamente inalterada para diferentes tempos de exposição das amostras ao H_2O_2 mesmo na presença da vitamina C.

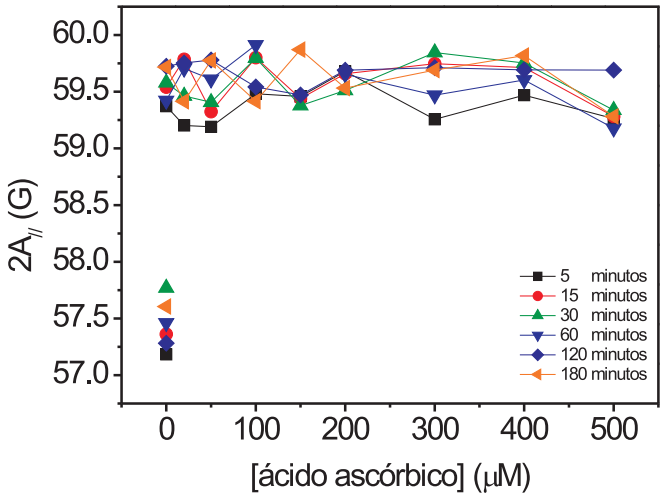

Figura 6.4: Parâmetro de RPE $2A_{\|}$ do marcador de spin 5-DSA incorporado nas membranas de eritrócito como função da concentração de ácido ascórbico para diferentes tempos de exposição das amostras a 100 μM de H_2O_2.

Diminuições na formação do produto MDA-TBA (Figura 6.5) indicam que as moléculas utilizadas neste trabalho tem efeito protetor contra a peroxidação lipídica assim como mostram os resultados obtidos no teste hemolítico.

Contudo, a permanência da rigidez relativa da membrana (parâmetro $2A_{\|}$ indicados na Figura 6.3) sugere que a oxidação da bicamada lipídica não é o fator preponderante para o aumento de rigidez encontrado através do método dos marcadores de spin. A formação de ligações cruzadas entre espectrina e hemoglobina oxidadas [33] e/ou ligações cruzadas não redutíveis e/ou a formação de hemicromos[1] [35], altera o micro ambiente onde o marcador de spin se encontra, diminuindo sua liberdade de movimento o que resulta na rigidez relativa

[1]Complexos de hemoglobina formados pela ligação do Ferro(III) com um resíduo de aminoácido de uma cadeia polipeptídica [34].

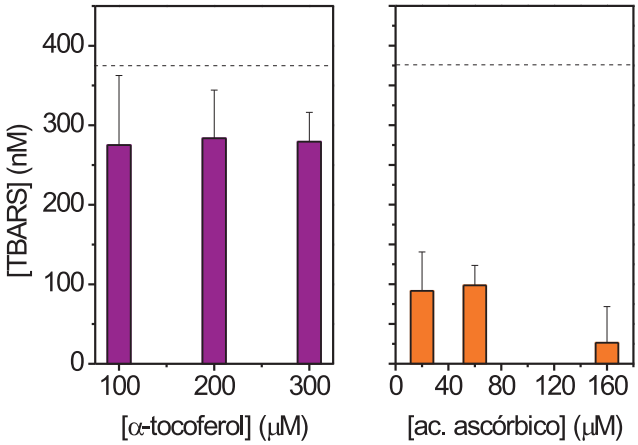

Figura 6.5: Diminuição na formação do produto resultante da oxidação lipídica (MDA-TBA) para várias concentrações das moléculas de α-tocoferol e ácido ascórbico. A linha tracejada indica a quantidade do produto MDA-TBA formado pela oxidação induzida por 0,8 mM de H_2O_2.

reportada pelo $2A_{\|}$ mesmo na ausência de peroxidação lipídica.

Isto pode ser visualizado nos espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA apresentados na Figura 6.6. Aparentemente a oxidação promovida pelo 2,2'-Azobis(2-metilpropanamida) dicloridrato (AAPH) não compromete fortemente os grupos tióis das proteínas o que reduz a formação do complexo espectrina-hemoglobina. Desta forma, as amostras tratadas com AAPH apresentam valores inferiores para o parâmetro $2A_{\|}$ mesmo para concentrações vinte vezes superiores as de H_2O_2.

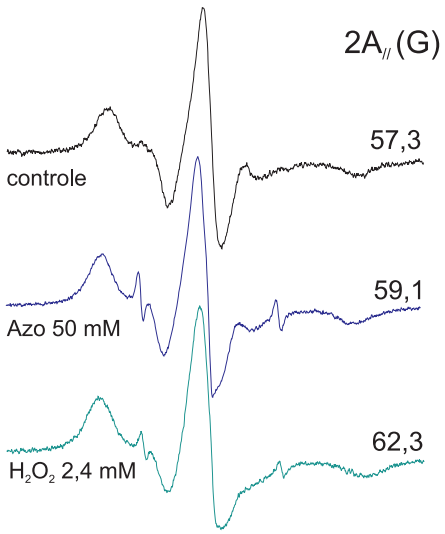

Figura 6.6: Espectros de RPE do marcador 5-DSA para amostras expostas a oxidação causada por AAPH e H_2O_2. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G.

Sendo assim, as moléculas de ácido ascórbico e α-tocoferol, parecem ser capazes de inibir a peroxidação lipídica (suficiente para diminuir a hemólise) mas não a formação dos radicais que iniciam a oxidação de outros constituintes da membrana do eritrócito, como por exemplo, as proteínas.

6.3 Caracterização dos Sítios Sulfidrila

Afim de obter mais informações a respeito da permanência da rigidez relativa da membrana indicada pelo parâmetro $2A_{\|}$ e sobre os efeitos da oxidação desencadeada pelo peróxido de hidrogênio, o método dos marcadores de spin foi empregado também para o estudo das proteínas da membrana do eritrócito. Os espectros de RPE do marcador de spin MAL-5, o qual se liga covalentemente aos sítios sulfidrila (SH) das proteínas que compõem a membrana do eritrócito, revelaram a existência de dois sítios SH distintos. Enquanto o primeiro (sítio 1) é caracterizado por uma menor exposição ao ataque oxidativo e por uma maior reatividade à ligantes de sítio SH, o segundo (sítio 2) é mais susceptível a ataques oxidativos e apresenta baixa reatividade com ligantes quando comparado ao primeiro sítio (Figura 6.7).

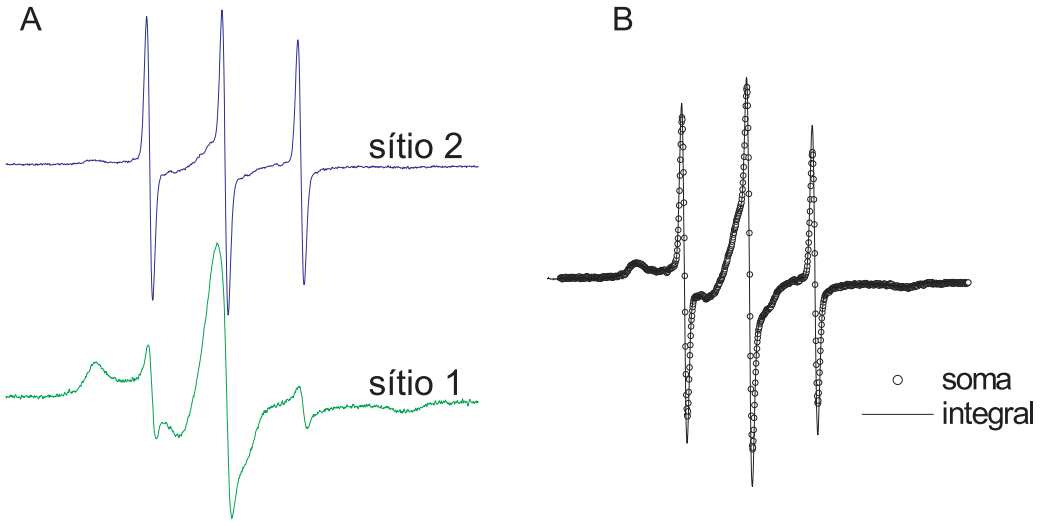

Figura 6.7: Espectros de RPE do marcador de spin MAL-5 que se liga covalentemente aos sítios sulfidrila das proteínas da membrana do eritrócito. O Painel A mostra os espectros característicos de dois sítios SH distintos. O Painel B apresenta a superposição do espectro controle (marcação integral dos sítios SH por 12 horas) e o espectro obtido através da composição dos espectros referentes aos sítios 1 e 2 na proporção 75 e 25 % respectivamente. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G.

Para demonstrar a maior reatividade dos sítios internos (sítios 1) foi adotada uma estratégia de marcação rápida, na qual o marcador de spin fica em contato com a amostra por um curto intervalo de tempo. A Figura 6.8 apresenta os espectros resultantes desta marcação para vários tempos selecionados. Fica evidente que não há diferenças significativas entre o maior e o menor intervalo de tempo escolhido, mostrando que a grande maioria dos marcadores de spin se ligaram preferencialmente aos sítios internos. Os sítios menos reativos (sítios 2), são selecionados desde que os sítios mais reativos não estejam disponíveis para reação com o marcador de spin.

Neste trabalho a molécula N-etilmaleimida foi usada para bloquear as interações entre os marcadores e os sítios mais reativos. Após serem tratadas com N-etilmaleimida por diferentes intervalos de tempo as amostras foram marcadas por 12 horas (tempo suficiente para que o marcador se ligue aos sítios menos reativos). Os espectros resultantes desta marcação estão apresentados na Figura 6.8 (Painel B). Pode se observar que a partir de duas horas de exposição ao N-etilmaleimida todos os sítios mais reativos parecem já estar inacessíveis ao marcador, fazendo com que este se ligue então obrigatoriamente aos sítios menos reativos. Desta forma,

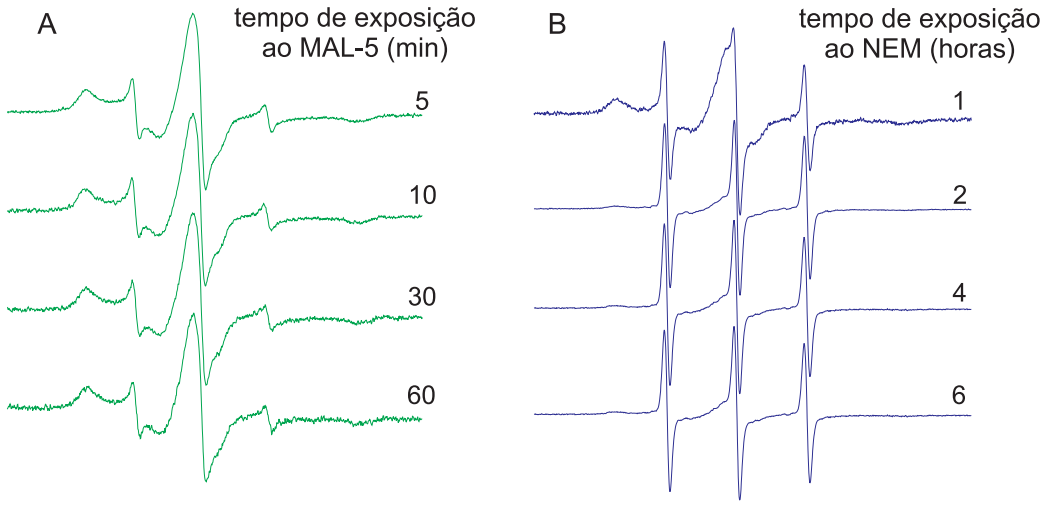

Figura 6.8: O Painel A apresenta os espectros do marcador de spin MAL-5 ligado ao sítio SH de maior reatividade (sítio 1) para diferentes tempos de reação entre o marcador e os sítios sulfidrila das proteínas da membrana do eritrócito. O Painel B mostra os espectros do marcador MAL-5 ligado aos sítios menos reativos (sítio 2) para diferentes tempos de incubação prévia das amostras com a molécula ligante de sítios SH N-etilmaleimida. Todos os espectros apresentados no Painel B foram marcados durante 12 horas. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G.

um espectro obtido após 12 horas de reação entre o marcador e a amostra (sem exposição prévia ao N-etilmaleimida) é o resultado da marcação dos sítios SH 1 e 2 simultaneamente como mostrado na Figura 6.7.

6.4 Oxidação Protéica

Cada espectro do marcador de spin MAL-5 é composto pela superposição de duas componentes espectrais (W e S). Estas componentes são resultado do equilíbrio termodinâmico de duas populações de marcadores com diferentes estados de mobilidade (Figura 6.9). A componente de menor mobilidade (componente S) representa os marcadores ligados ao esqueleto protéico via ligação de hidrogênio enquanto a componente de maior mobilidade (componente W) diz respeito aos marcadores em contato com o solvente [36, 37].

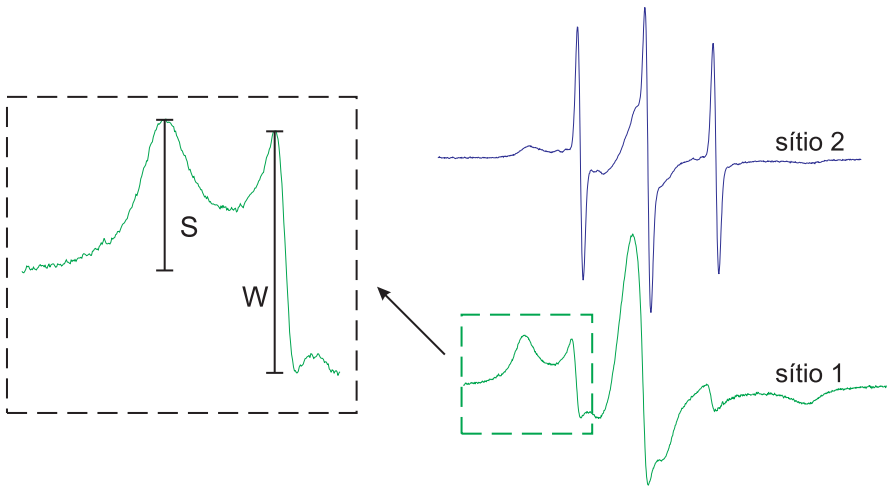

Figura 6.9: Espectros de RPE do marcador de spin MAL-5 com destaque para as componentes espectrais S e W. A componente S diz respeito a fração de marcadores de movimento mais restrito e a componente W (predominante nos sítios 2) a fração de marcadores de movimento menos restrito. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G.

Devido as características do sítio 2, os marcadores de spin ligados covalentemente a estes sítios, apresentam maior capacidade de realizar ligações com o solvente do que os do sítio 1. Isto revela que o radical nitróxido está mais exposto ao solvente no caso do sítio 2. Com isso, a componente W dos espectros dos marcadores ligados a este tipo de sítio se torna muito mais evidente (Figura 6.10). Sendo assim, um estudo da razão entre as componentes W e S

no espectro composto, revela qual dos sítios (1 ou 2) é mais vulnerável aos efeitos do ataque oxidativo. Por exemplo, se no processo de oxidação o sítio 1 for mais atingido que o 2, haverá uma redução da componente S, predominante neste sítio, pois no momento da marcação de spin os marcadores reagiriam menos com estes sítios oxidados.

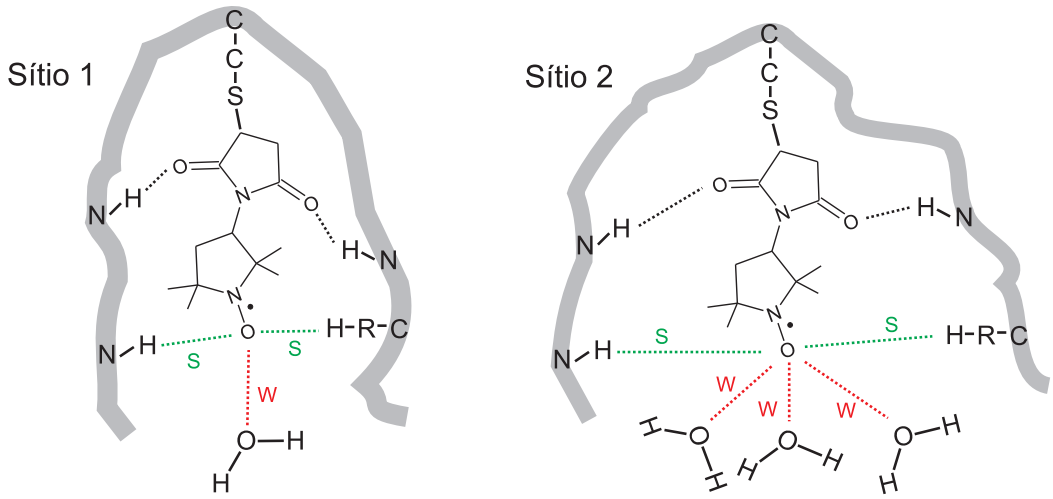

Figura 6.10: Esquema para as possíveis ligações do marcador de spin MAL-5 nos sítios sulfidrila 1 e 2.

O comportamento da razão W/S está indicado na Figura 6.11.

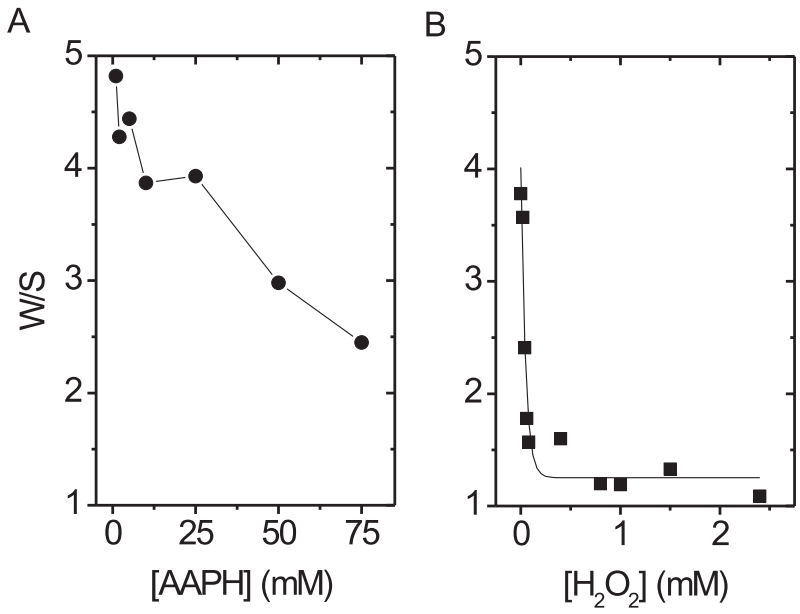

Figura 6.11: Razão entre as componentes espectrais W e S para várias concentrações de AAPH (Painel A) e de H_2O_2 (Painel B).

Enquanto o AAPH tem um efeito mais discreto, diminuindo a razão W/S a partir de uma concentração elevada (50 mM), o H_2O_2 mostra um efeito mais acentuado, reduzindo consideravelmente a razão W/S a partir de 60 μM. Isto indica que os sítios 2 (menos reativos porém mais expostos) das proteínas da membrana do eritrócito são mais susceptíveis aos ataques oxidativos iniciados pelos agentes oxidantes utilizados neste trabalho.

Por outro lado, o aumento da intensidade do sinal do marcador MAL-5 e o crescimento da concentração total de proteínas nas amostras tratadas com peróxido de hidrogênio indicados na Figura 6.12 sugerem que durante o processo de oxidação acontece a ligação entre a hemoglobina oxidada e as proteínas da membrana do eritrócito.

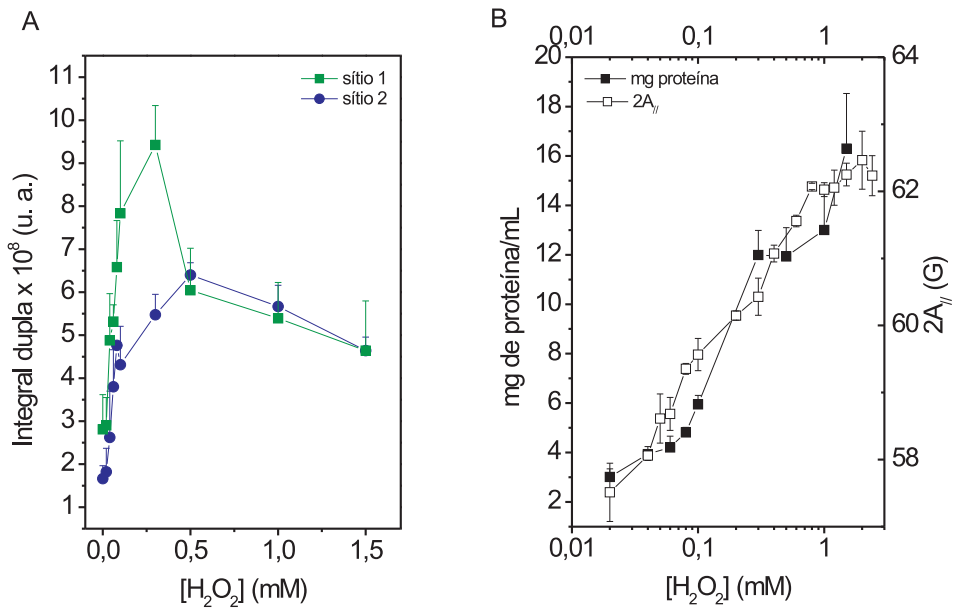

Figura 6.12: Intensidade do sinal do marcador MAL-5 ligado as proteínas da membrana do eritrócito como função da concentração de H_2O_2. O decréscimo no valor da intensidade para as três últimas concentrações indica a degradação dos grupos SH onde o marcador se liga covalentemente (Painel A). Comparação entre a rigidez relativa da membrana avaliada pelo marcador lipídico e a concentração total de proteínas presentes na membrana de eritrócito oxidada como função da concentração de H_2O_2 (Painel B).

Além disso, como apresentado na Figura 6.13 um aumento de aproximadamente 1,5 G no parâmetro $2A_{||}$ dos espectros de RPE do marcador MAL-5 ligado a amostras expostas ao estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 indica uma restrição do movimento segmental das proteínas da membrana do eritrócito provavelmente devido à formação de um complexo com a hemoglobina oxidada.

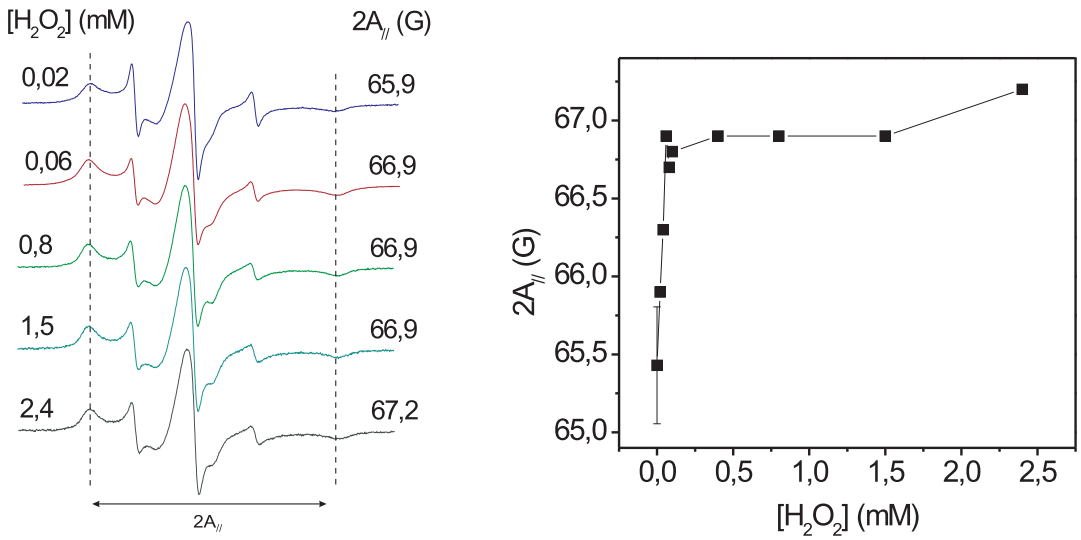

Figura 6.13: Espectros de RPE do marcador MAL-5 ligado aos grupos sulfidrila das proteínas da membrana do eritrócito na presença de aumentos graduais de H_2O_2. As linhas pontilhadas verticais indicam como o parâmetro $2A_{\|}$ é obtido diretamente do espectro. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G. A figura mostra também a curva obtida para o parâmetro $2A_{\|}$ como função da concentração de H_2O_2.

Os efeito protetor da molécula de ácido ascórbico contra a oxidação protéica foi avaliado e está apresentado na Figura 6.14. Diferenças muito sutis na razão W/S dos espectros de RPE

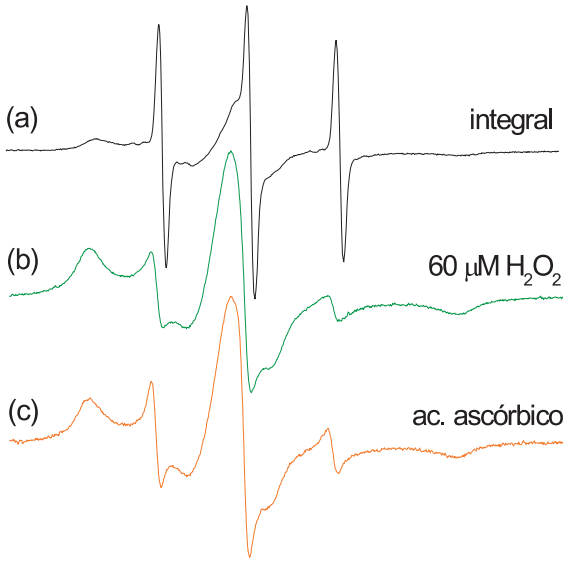

Figura 6.14: (a) Espectro de RPE do marcador de spin MAL-5 ligado as proteínas da membrana do eritrócito. (b) Amostra oxidada com 60 μM de H_2O_2. (c) Amostra previamente tratada com 160 μM de ácido ascórbico e oxidada com 60 μM de H_2O_2. A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G.

das amostras tratadas com este antioxidante sugerem que esta molécula não é capaz de impedir o ataque oxidativo nas proteínas da membrana do eritrócito e consequentemente a ligação entre

a hemoglobina oxidada e as proteínas da membrana do eritrócito.

6.5 Efeito Protetor da Catalase

Os resultados obtidos para o efeito protetor da catalase indicam que esta enzima tem uma real capacidade antioxidante em eritrócitos humanos. Desde que a catalase não seja inibida na preparação das amostras com a não adição de azida de sódio na solução tamponante, os níveis hemolíticos são reduzidos drasticamente, alcançando no máximo 5% em todo o intervalo de concentrações de peróxido de hidrogênio medido (Figura 6.15). Verificou-se ainda, que um aumento na rigidez relativa da membrana observada através do parâmetro $2A_{\|}$ (para o marcador lipídico 5-DSA), aparece somente em concentrações de H_2O_2 muito elevadas (20 mM), cerca de duzentas vezes superiores as necessárias na ausência da catalase (Figura 6.3).

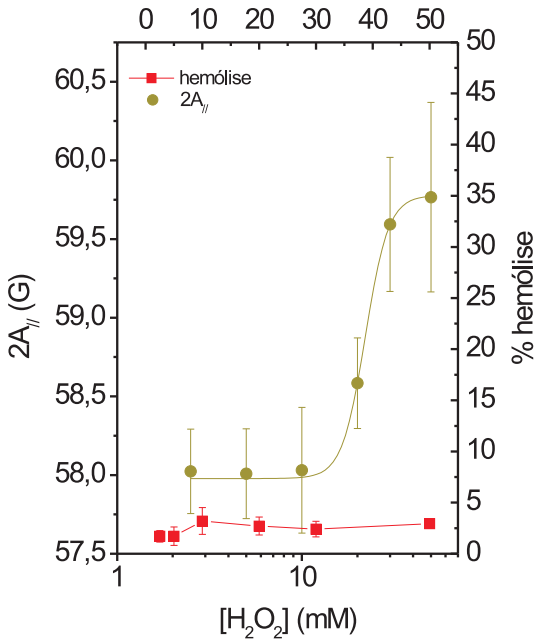

Figura 6.15: Efeito protetor da catalase contra a hemólise oxidativa induzida com várias concentrações de H_2O_2. A figura também apresenta a curva obtida para o parâmetro espectral $2A_{\|}$ do marcador de spin 5-DSA em função da concentração de peróxido de hidrogênio.

Capítulo 7

Discussão

Lipídios poliinsaturados são instáveis com respeito a ataques oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio. O fato da oxidação lipídica se propagar como uma reação em cadeia torna os lipídios muito sensíveis a presença do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) juntamente com pequenas concentrações de metais contidos em metaloproteínas [38]. Neste sentido, as células vermelhas do sangue tem sido usadas como modelo para a avaliação dos danos oxidativos causados pelo H_2O_2 além de uma variedade de outros indutores de oxidação como o Cu^{2+}, o 2,2'-Azobis(2-metilpropanamida) dicloridrato (AAPH) e o sistema xantina/xantina oxidase [20, 39]. Estudos de Fluorescência [20, 39], Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) [33] além de métodos Fotométricos [2] sugerem que o estresse oxidativo promovido pelas EROs pode ser diminuído através do uso de moléculas antioxidantes. Como demonstrado por Tedesco e colaboradores [20], uma incubação prévia de eritrócitos humanos em vinho tinto diminui consideravelmente (cerca de até 75%) a hemólise oxidativa promovida pelo H_2O_2. Resultados similares foram encontrados por Halder e Bhaduri [39] para o chá produzido à partir da *Camellia sinensis* (chá preto). Fazendo uso de marcadores de spin através da espectroscopia de RPE este trabalho busca informações complementares sobre a atuação das EROs e sobre os efeitos dos antioxidantes nas membranas de eritrócito.

Entre os antioxidantes naturais, o ácido ascórbico é considerado um dos mais poderosos e menos tóxicos. Encontra-se em concentrações elevadas em muitos tecidos, sendo que sua concentração no plasma humano é de aproximadamente 60 μM [40]. Após a interação com

EROs, o ascorbato é oxidado ao dehydro-ascorbato e este é reciclado para ácido ascórbico pela enzima dehidro-ascorbato redutase. Assim, o dehidro-ascorbato é encontrado somente em níveis muito baixos em comparação ao ascorbato. Como um seqüestrador de EROs, o ascorbato tem se mostrado eficaz contra o ânion superóxido, o radical hidroxil e o oxigênio singlete. Está bem documentado que o ácido ascórbico protege o eritrócito contra a oxidação por H_2O_2, no entanto, o mecanismo é pouco entendido, tendo sido sugerido que o ácido ascórbico reage com a hemoglobina no estado ferril resultante da reação do grupo heme com o H_2O_2 [40]. O grupo heme no estado ferril pode ser detectado por espectroscopia ótica [41] e o radical livre também formado na oxidação com peróxidos pode ser detectado por RPE [41].

Já a molécula de α-tocoferol tem sido considerada como uma bloqueadora das reações radicalares em cadeia [42, 43] que devido sua natureza hidrofóbica opera no micro ambiente lipídico. A capacidade antioxidante do tocoferol está associada a sua capacidade de doar um átomo de hidrogênio para os lipídios radicais, sua localização e movimento dentro da membrana, além da eficácia da reciclagem do radical tocoferil por redutores presentes no citosol, tais como o ácido ascórbico [44]. Desta forma, os efeitos do α-tocoferol como antioxidante são, portanto, restritos aos seus efeitos diretos em membranas e lipoproteínas. Entretanto, as propriedades antioxidantes do α-tocoferol se tornaram um paradigma químico muito bem estabelecido na literatura [43]. De fato, a vitamina E pode agir como antioxidante *in vitro* em suspensões de fosfolipídios [42, 43], nas células vermelhas do sangue [6, 45] ou mesmo em células de *Hevea brasiliensis* [43, 46]. Contudo, há uma dúvida de que, *in vivo*, mesmo se administrada em concentrações farmacológicas o α-tocoferol realmente atue como um antioxidante. Experimentos recentes têm indicado que ao contrário de outros antioxidantes, o α-tocoferol é o precursor de uma forma mais ativa de vitamina E: o fosfato de α-tocoferil; uma espécie que em última análise pode ser considerada como moduladora das funções celulares [43, 47, 48]. Por outro lado, os dados apresentados neste trabalho mostram que o ácido ascórbico bem como o α-tocoferol apresentaram efeitos protetores contra a hemólise oxidativa muito significativos.

Muitos trabalhos têm avaliado o grau de peroxidação lipídica usando marcadores de

spin da classe DOXIL com a idéia de que as ligações cruzadas entre os lipídios sob peroxidação levam ao enrijecimento da parte lipídica da membrana que supostamente pode ser detectado pelo marcador de spin. Como exemplo pode ser citado o trabalho de Nepomuceno e colaboradores [49] onde o efeito protetor do dipiridamol em membranas de mitocôndria contra o estresse oxidativo do Fe^{2+} foi estudado. Entretanto, em nosso laboratório tem sido investigada a ocorrência de possíveis enrijecimentos em vesículas de fosfatidilcolina de ovo após peroxidação lipídica induzida por AAPH ou Fe^{2+} e peróxido de hidrogênio. Embora o teste de MDA indicasse peroxidação lipídica, entre os três marcadores de spin utilizados, 5-, 12- e 16-DOXIL estearato, somente o 12-DOXIL indicou um enrijecimento muito discreto (dados não mostrados). Efeitos semelhantes têm sido encontrados na literatura para esses mesmos marcadores em microssomos de fígado de rato sob peroxidação induzida por NADPH na presença de ADP-Fe^{3+} [50] e também em vesículas de fosfolipídios de soja com peroxidação induzida por ferro-ascorbato [51]. Entretanto, uma redução na fluidez da membrana como a observada neste trabalho e no trabalho de Nepomuceno e colaboradores [49] (aumento no parâmetro de ordem S de 0,56 para 0,60) é um indicativo de oxidação das proteínas da membrana. Para confirmar esta interpretação, este trabalho usou um marcador de proteína cujos dados foram consistentes com os obtidos com o marcador lipídico. Enquanto a peroxidação lipídica foi observada pela hemólise oxidativa para uma concentração de peróxido de hidrogênio de 0,8 mM as alterações sobre ambos os marcadores ocorreram em torno de 0,1 mM. Dada a importância desta metodologia de detecção por RPE, este assunto será explorado com novos experimentos, em continuidade.

O uso do método dos marcadores de spin no estudo das proteínas da membrana do eritrócito revelou a existência de dois grupos tióis não equivalentes onde o marcador MAL-5 pode se ligar. Há duas diferenças básicas entre esses dois tipos de grupos SH identificadas por RPE: a exposição ao solvente e reatividade com o marcador derivado do maleimido. Um espectro típico de RPE do marcador de spin MAL-5 covalentemente ligado as proteínas da membrana do eritrócito apresenta a coexistência de duas componentes espectrais distintas, W

e S. Uma abordagem mais profunda sobre a origem destas componentes está apresentada nos trabalhos de Alonso e colaboradores [36, 37]. Um aumento na razão W/S geralmente está associado à desnaturação e/ou a degradação protéica [52, 53] já que mudanças conformacionais do esqueleto protéico podem levar a uma maior exposição do sítio SH, a qual aumenta o contato do marcador com o solvente. Por outro lado, um decréscimo na razão W/S reflete o aumento de interações proteína-proteína [53–56] como, por exemplo, a agregação entre proteínas oxidadas da membrana do eritrócito e hemoglobina. Com isso, um estudo da razão W/S leva a um maior entendimento sobre as consequências do estresse oxidativo sobre os dois sítios SH identificados nas proteínas da membrana do eritrócito. De fato, o comportamento da razão W/S apresentado neste trabalho sugere que o sítio mais exposto ao solvente é o mais vulnerável aos ataques oxidativos em virtude de sua configuração estrutural aberta.

Como discutido por Snyder e colaboradores [33] uma incubação prévia dos eritrócitos com moléculas antioxidantes inibe parcialmente a peroxidação lipídica, mas não causa efeito na formação da metahemoglobina ou na formação do complexo proteína-hemoglobina. Normalmente uma pequena porcentagem de hemoglobina sofre autooxidação sob condições fisiológicas, dando origem a metahemoglobina e ao radical superóxido [19]. Radicais livres altamente reativos (tais como o radical hidroxil) atacam os grupos tióis da hemoglobina, na posição β-93 ou outros constituintes da membrana do eritrócito. Entre as possíveis consequências da atividade oxidante destes radicais podemos citar a degradação irreversível da hemoglobina e de outras proteínas levando a formação de hemicromos, o decréscimo no estado de oxidação dos grupos tióis da hemoglobina (criando ligações cruzadas entre os sítios SH da hemoglobina) além de danos oxidativos as proteínas da membrana [19, 57].

O estresse oxidativo que leva a formação da ligação cruzada entre a espectrina e a hemoglobina representa uma espécie de dano oxidativo generalizado na membrana das células vermelhas do sangue. Este tipo de dano ocorre normalmente *in vivo* nas células mais velhas e pode ser reproduzido *in vitro* através do tratamento dos glóbulos vermelhos normais com peróxido de hidrogênio. A formação do complexo hemoglobina-espectrina está associado com

a formação progressiva de equinócitos e com o aumento da rigidez da membrana [33, 35, 58].

Desta forma, o estresse oxidativo que resulta na ligação cruzada entre a hemoglobina e as proteínas da membrana do eritrócito leva a um aumento da rigidez relativa da membrana que pode ser detectada através dos espectros de RPE de marcadores estruturados na membrana. A importância da aderência da hemoglobina nas membranas de eritrócito pode ser observada nos espectros de RPE do marcador 5-DOXIL incorporado em membranas de eritrócitos tratados com H_2O_2 e AAPH. Enquanto as hemácias expostas ao H_2O_2 apresentaram um aumento do parâmetro $2A_{\|}$ de 5 G as tratadas com AAPH apresentam um aumento de apenas 2 G (mesmo em concentrações muito superiores), sugerindo que os 3 G adicionais, indicando elevada rigidez, no caso do H_2O_2, são causados pela ligação entre hemoglobina oxidada e as proteínas da membrana do eritrócito.

Os efeitos protetores do ácido ascórbico e α-tocoferol contra a oxidação da membrana de eritrócito avaliada pela técnica RPE não foram substanciais quando comparados ao efeito protetor da catalase. Ao contrário das vitaminas C e E esta enzima antioxidante foi capaz de reduzir drasticamente o efeito do peróxido de hidrogênio (hemólise oxidativa bem como aumento da rigidez relativa da membrana reportada pelo marcador 5-DSA) em eritrócitos intactos sugerindo que uma proteção efetiva contra as oxidações lipídica e protéica está intimamente relacionada com o bloqueio da reação de Fenton (no caso eliminando o peróxido de hidrogênio).

De modo geral, os testes da hemólise oxidativa e de formação do MDA, os quais são amplamente usados na literatura para determinação dos efeitos de moléculas oxidantes, parecem não fornecer informações precisas acerca de efeitos do estresse oxidativo nas membranas do eritrócito. Visto que, apesar de reportarem os efeitos protetores nos lipídios da membrana das células vermelhas do sangue, estes testes não apresentam informações suficientes sobre os danos causados nas proteínas da membrana do eritrócito.

Capítulo 8

Conclusões

1. Quando o eritrócito é submetido ao estresse oxidativo desencadeado pelo peróxido de hidrogênio, os danos oxidativos às proteínas da membrana, detectados por marcadores de spin lipídico e protéico, ocorrem muito antes da peroxidação lipídica avaliada pelo efeito hemolítico. Os danos nas proteínas foram observados para concentrações de peróxido de hidrogênio cerca de 8 vezes mais baixas em relação aos danos nos lipídios.

2. As moléculas de ácido ascórbico e α-tocoferol foram capazes de inibir a hemólise e formação de MDA induzida por H_2O_2, sugerindo proteção contra peroxidação lipídica, mas não reduziram os danos oxidativos sobre os outros constituintes da membrana do eritrócito, especialmente as proteínas.

3. O aumento da rigidez relativa da bicamada lipídica, observado através de marcadores de spin lipídicos não se deve à peroxidação lipídica, mas sim às oxidações das proteínas da membrana do eritrócito. Este trabalho mostrou uma correlação direta entre as informações obtidas através de um marcador lipídico e um protéico.

4. As proteínas da membrana do eritrócito possuem dois tipos de grupos sulfidrilas que diferem em sua configuração estrutural (fechada com menor exposição ao solvente ou aberta com maior exposição ao solvente), reatividade aos ligantes de sítios SH e sensibilidade aos ataques oxidativos.

5. É bem conhecido na literatura que o estresse oxidativo em eritrócito, especialmente o induzido pelo peróxido de hidrogênio, leva à ligação das hemoglobinas oxidadas nas membranas. Os dados deste trabalho sugerem que este efeito aparece como um aumento adicional no parâmetro $2A_{\parallel}$ do marcador 5-DSA. Em trabalhos onde a rigidez devido à oxidação da membrana foi detectada, o aumento máximo medido no $2A_{\parallel}$ é de 2 G, enquanto neste trabalho foram medidos aumentos de até 5 G devido à ligação da Hgb na membrana.

6. A catalase foi a única protetora da oxidação protéica causada por H_2O_2 em eritrócitos intactos, denotando seu eficiente papel na degradação do peróxido de hidrogênio. A proteção exercida pelo ácido ascórbico e α-tocoferol contra a peroxidação lipídica foi muito discreta quando comparada à proteção da catalase.

Capítulo 9

Perspectivas

Como a técnica de RPE através do método dos marcadores de spin se mostrou capaz de avaliar os efeitos do estresse oxidativo promovidos por EROs tanto na bicamada lipídica quanto nas proteínas da membrana do eritrócito com eficiência (ao contrário do teste hemolítico e de formação de MDA), alguns ensaios podem ser realizados para explorar as informações complementares desta metodologia. Estes ensaios teriam como objetivo:

- avaliar a oxidação dos dois tipos de sítios SHs em separado, ou seja, após induzida a oxidação, realizar a marcação seletiva de cada um dos sítios e quantificar o grau de oxidação a partir dos espectros dos sítios 1 e 2 de modo independente;

- avaliar a oxidação das proteínas da membrana em ghosts de eritrócitos induzida pela hemoglobina adicionada em concentrações diluídas juntamente com peróxido de hidrogênio, constatar se há o enrijecimento da membrana através do marcador 5-DSA e verificar se neste caso de menor estresse oxidativo os agentes antioxidantes apresentam efeito protetor nas proteínas e lipídios da membrana. Neste caso, avaliar também espectrofotometricamente a aderência da hemoglobina na membrana de ghosts e verificar se a ligação da hemoglobina à membrana leva a um aumento adicional do parâmetro $2A_{\|}$ do 5-DSA.

- estudar outras moléculas antioxidantes conhecidas como as catequinas, quercitinas e dipiridamol, entre outros.

Bibliografia

[1] I. Durak, M. Kaçmaz, M. Y. B. Çimen, U. Büyükkoçak, e H. S. Öztürk. Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. International Journal of Cardiology, **77**, 293–297, 2001.

[2] I. Durak, M. Kavutcu, M. Y. B. Çimen, A. Avcı, S. Elgün, e H. S. Öztürk. Oxidant/antioxidant status of erythrocytes from patients with chronic renal failure: effects of hemodialysis. Medical Principles and Practice, **10**, 187–190, 2001.

[3] M. Y. B. Çimen, Ö. B. Çimen, M. Kaçmaz, H. S. Öztürk, R. Yorgancioğlu, e I. Durak. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. Clinical Rheumatology, **19**, 275–277, 2000.

[4] S. Buyukkocak, H. S. Öztürk, M. N. Tamer, M. Kacmaz, M. Y. B. Çimen, e I. Durak. Erythrocyte oxidant/antioxidant status of diabetic patients. Journal of Endocrinological Investigation, **23**, 228–230, 2000.

[5] M. Zanna, Z. Janka, e J. Kálmán. Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, **28**, 648–676, 2007.

[6] M. Y. B. Çimen. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clinica Chimica Acta, **390**, 1–11, 2008.

[7] M. A. Al-Omar, C. Beedham, e I. A. Alsarra. Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. Saudi Pharmaceutical Journal, **12**, 1–18, 2004.

[8] C. M. Spickett, A. Jerlich, e O. M. Panasenko. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. Acta Biochimica Polonica, **47**, 889–899, 2000.

[9] H. J. Forman e M. Torres. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, **166**, 4–8, 2002.

[10] G. M. Rosen, S. Pou, C. L. Ramos, M. S. Cohen, e B. E. Britigan. Free radicals and phagocytic cells. The FASEB Journal, **9**, 200–209, 1995.

[11] T. T. Rohn, L. K. Nelson, G. Waeg, e M. T. Quinn. U-101033E (2,4-diaminopyrrolopyrimidine), a potent inhibitor of membrane lipid peroxidation as assessed by the production of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and 4-hydroxynonenal-protein adducts. Biochemical Pharmacology, **56**, 1371–1379, 1998.

[12] L. M. Snyder, N. L. Fortier, L. Leb, J. McKenney, J. Trainor, H. Sheerin, e N. Mohandas. The role of membrane protein sulfhydryl groups in hydrogen peroxide-mediated membrane damage in human erythrocytes. Biochimica et Biophysica Acta, **937**, 229–240, 1988.

[13] Afaf Kamal-Eldin, editor. Lipid Oxidation Pathways. AOCS Press, Illinois, 2003.

[14] R. M. Johnson, G. Goyette Jr., Y. Ravindranath, e Y. Ho. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H_2O_2 levels in erythrocytes. Free Radical Biology & Medicine, **39**, 1407–1417, 2005.

[15] B. Tavazzi, D. Di Pierro, A. M. Amorini, G. Fazzina, M. Tuttobene, B. Giardina, e G. Lazzarino. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. European Journal of Biochemistry, **267**, 684–689, 2000.

[16] D. Pratico e N. Delanty. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. The American Journal of Medicine, **109**, 577–585, 2000.

[17] Yoshihito Yawata. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.

[18] Annie Cavanagh. Wellcome Images, http://images.wellcome.ac.uk/, 2006.

[19] H. Nohl e K. Stolze. The effects of xenobiotics on erythrocytes. General Pharmacology, **31**, 343–347, 1998.

[20] I. Tedesco, M. Russo, P. Russo, G. Iacomino, G. L. Russo, A. Carraturo, C. Faruolo, L. Moio, e R. Palumbo. Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. The Journal of Nutritional Biochemistry, **11**, 114–119, 2000.

[21] E. S. Lima e D. S. P. Abdalla. Lipid Peroxidation: Mechanisms and evaluation in biological samples. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, **37**, 293–303, 2001.

[22] R. P. Hebbel, J. W. Eaton, M. Balasingam, e M. H. Steinberg. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. The Journal of Clinical Investigation, **70**, 1253–1259, 1982.

[23] K. S. Montine, J. F. Quinn, J. Zhang, J. P. Fessel, L. J. Roberts, e J. D. Morrow. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. Chemistry and Physics of Lipids, **128**, 117–124, 2004.

[24] S. M. L. Vasconcelos, M. O. F. Goulart, J. B. F. Moura, V. Manfredini, M. S. Benfato, e L. T. Kubota. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. Química Nova, **30**, 1323–1338, 2007.

[25] Lawrence J. Berliner, editor. Spin Labeling: Theory and Applications. Academic Press, New York, 1976.

[26] H. M. Swartz, J. R. Bolton, e D. C. Borg. Biological Applications of Electron Spin Resonance. J. Wiley, New York, 1972.

[27] H. S. Gilbert, D. D. Stump, e E. F. Roth Jr. A method to correct for errors caused by generation of interfering compounds during erythrocyte lipid peroxidation. Analytical Biochemistry, **137**, 282–286, 1984.

[28] L. W. M. Fung e M. E. Johnson. Recent developments in spin label EPR methodology for biomembranes studies. Currents Topics in Bionergetics, **Academic Press**, 107–157, 1984.

[29] John M. Walker, editor. The Protein Protocols Handbook. Humana Press, New Jersey, 2002.

[30] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, e D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, **150**, 76–85, 1985.

[31] J. E. Wertz e J. R. Bolton. Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Pratical Applications. Chapman and Hall, New York, 1986.

[32] Feng N. Ko, George Hsiao, e Yueh H. Kuo. Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and β-thalassemic red blood cells. Free Radical Biology & Medicine, **22**, 215–222, 1997.

[33] L. M. Snyder, N. L. Fortier, J. Trainor, J. Jacobs, L. Leb, B. Lubin, D. Chiu, S. Shohet, e N. Mohandas. Effect of Hydrogen Peroxide Exposure on Normal Human Erythrocyte Deformability, Morphology, Surface Characteristics, and Spectrin-Hemoglobin Cross-linking. The Journal of Clinical Investigation, **76**, 1971–1977, 1985.

[34] Johannes Everse, Kim D. Vandegriff, e Robert M. Winslow, editors. Methods in Enzymology - Hemoglobins Part B: Biochemical and Analytical Methods. Academic Press, New York, 1994.

[35] A. G. Kriebardis, Mariana H. Antonelou, K. E. Stamoulis, E. Economou-Petersen, L. H. Margaritis, e Issidora S. Papassideri. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells. Journal of Cellular and Molecular Medicine, **11**, 148–155, 2007.

[36] A. Alonso, J. V. Silva, e M. Tabak. Hydration effects on the protein dynamics in stratum corneum as evaluated by EPR spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta, **1646**, 32–41, 2003.

[37] A. Alonso, W. P. Santos, S. J. Leonor, e M. Tabak. Stratum corneum protein dynamics as evaluated by a spin label maleimide derivative. Effect of urea. Biophysical Journal, **81**, 3566–3576, 2001.

[38] C. U. Carlsen, J. K. S. Møller, e L. H. Skibsted. Heme-iron in lipid oxidation. Coordination Chemistry Reviews, **249**, 485–498, 2005.

[39] J. Halder e A. N. Bhaduri. Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, **244**, 903–907, 1998.

[40] S. Mendiratta, Z. Qu, e J. M. May. Erythrocytes defenses against hydrogen peroxide: the role of ascorbic acid. Biochimica et Biophysica Acta, **1380**, 389–395, 1998.

[41] A. D. Svistunenko, R. P. Patel, S. V. Voloshchenko, e M. T. Wilson. The globin-based free radical of ferryl hemoglobin is detected in normal human blood. The Journal of Biological Chemistry, **272**, 7114–7121, 1997.

[42] L. R. C. Barclay e K. U. Ingold. Autoxidation of biological molecules. 2. Autoxidation of a model membrane. Comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and in chlorobenzene. Journal of the American Chemical Society, **103**, 6478–6485, 1981.

[43] A. Azzi. Molecular mechanism of α-tocopherol action. Free Radical Biology & Medicine, **43**, 16–21, 2007.

[44] M. G. Traber e J. Atkinson. Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Radical Biology & Medicine, **43**, 4–15, 2007.

[45] E. C. Kennett e P. W. Kuchel. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane. IUBMB Life, **55**, 375–385, 2003.

[46] K. J. Whittle, B. G. Audley, e J. F. Pennock. The incorporation of [14C] methionine into chromanols and quinones by Hevea brasiliensis latex. Biochemical Journal, **103**, 21–22, 1967.

[47] Y. Negis, J. M. Zingg, E. Ogru, R. Gianello, R. Libinaki, e A. Azzi. On the existence of cellular tocopheryl phosphate, its synthesis, degradation and cellular roles: a hypothesis. IUBMB Life, **57**, 23–25, 2005.

[48] Y. Negis, N. Aytan, N. Ozer, E. Ogru, R. Libinaki, R. Gianello, A. Azzi, e J. M. Zingg. The effect of tocopheryl phosphates on atherosclerosis progression in rabbits fed with a high cholesterol diet. Archives of Biochemistry and Biophysics, **450**, 63–66, 2006.

[49] M. F. Nepomuceno, A. Alonso, L. Pereira-Da-Silva, e M. Tabak. Inhibitory effect of dipyridamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria. Free Radical Biology & Medicine, **23**, 1046–1054, 1997.

[50] M. T. Curtis, D. Gilfor, e J. L. Farber. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. Archives of Biochemistry and Biophysics, **235(2)**, 644–649, 1984.

[51] R. C. Bruch e W. S. Thayer. Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. Biochimica et Biophysica Acta, **733(2)**, 216–222, 1983.

[52] G. Bartosz e M. Gaczyńska. Effect of proteolysis on the electron spin resonance spectra of maleimide spin labeled erythrocyte membranes. Biochimica et Biophysica Acta, **821**, 175–178, 1985.

[53] M. Soszyński e G. Bartosz. Decrease in accessible thiols as an index of oxidative damage to membrane proteins. Free Radical Biology & Medicine, **23**, 463–469, 1997.

[54] M. Gaczyńska e G. Bartosz. What is the origin of the strongly immobilized signal of membrane-bound maleimide spin label? Studia Biophysica, **120**, 155–161, 1987.

[55] C. H. Trad e D. A. Butterfield. Menadione-induced cytotoxicity effects on human erythrocyte membranes studied by electron paramagnetic resonance. Toxicology Letters, **73**, 145–155, 1994.

[56] K. Hensley, J. Carney, N. Hall, W. Shaw, e D. A. Butterfield. Electron paramagnetic resonance investigations of free radical-induced alterations in neocortical synaptosomal membrane protein infrastructure. Free Radical Biology & Medicine, **17**, 321–331, 1994.

[57] D. J. Scothorn, W. E. Wojcicki, E. J. Hustedt, A. H. Beth, e C. E. Cobb. Synthesis and characterization of a novel spin-labeled affinity probe of human erythrocyte band 3: characteristics of the stilbenedisulfonate binding site. Biochemistry, **35**, 6931–6943, 1996.

[58] L. M. Snyder, L. Leb, J. Piotrowski, N. Sauberman, S. C. Liu, e N. L. Fortier. Irreversible spectrin-haemoglobin crosslinking *in vivo*: a marker for red cell senescence. British Journal of Haematology, **53**, 379–384, 1983.