

COMPORTAMENTO DOS ERITROCITOS HUMANOS NA PRESENÇA DO STRESS INDUZIDO POR UM GERADOR DE SUPERÓXIDO*

Lourdes Mira, Cristina Pinto, Carlos Manso

Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina de Lisboa, Portugal.

RESUMO

Na presença de hidroquinona gera-se superóxido no sangue que pode ser detectado por nitrozul de tetrazólio. Existe um factor limitante que provavelmente resulta de modificação da estrutura química da própria hidroquinona. Um extracto de favas tem uma capacidade geradora de superóxido, em contacto com o sangue, semelhante à hidroquinona. Admite-se que este facto resulte da presença de substâncias como a vicina e convicina, com estrutura parecida. Após a incubação com hidroquinona, o espectro de absorção da oxihemoglobina sofre alterações características, que se interpretam como resultantes da formação de metahemoglobina, coeglobina e hemicrómios. Estas alterações parecem ser mais precoces em indivíduos com carência de desidrogenase da glucose-6-fosfato.

O mecanismo pelo qual as drogas oxidantes provocam hemólise é discutível e ainda hoje não totalmente esclarecido. O problema reveste-se de maior importância nos casos em que o glóbulo vermelho apresenta défice do seu potencial redutor, mais frequentemente resultante de carência de desidrogenase da glucose-6-fosfato (DG-6-P) responsável pela hemólise medicamentosa e pelo favismo.¹

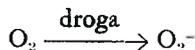
As explicações iniciais responsabilizavam o peróxido de hidrogénio, formado no interior do glóbulo vermelho, pela desnaturação e separação das cadeias de hemoglobina, seguida da formação de derivados insolúveis, que precipitavam e causavam rotura da membrana.² Esta hipótese admitia assim que as alterações iniciais se davam no interior do GV, sendo a rotura da membrana a sua consequência directa.

Contudo, mais recentemente admitiu-se a intervenção do radical superóxido (O_2^-) como causador directo da hemólise, através da sua acção oxidativa sobre os ácidos gordos não saturados (AGNS) da membrana.³ Estaríamos assim perante uma lesão primária da membrana que originaria a hemólise, em contraposição com a ideia inicial.

Esta hipótese foi aperfeiçoada recentemente, implicando oxidantes mais potentes, tais como o singlete oxigénio (1O_2), o radical hidroxilo ($OH\cdot$) ou radicais lipoperoxil ($LO\cdot$) como os principais responsáveis pelo ataque aos AGNS da membrana.⁴

Vejamus, em resumo, como se processaria a sequência de reacções:

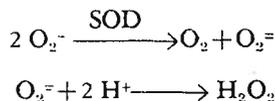
1. Um oxidante em contacto com elementos do plasma ou do eritrocito (flavinas, hemoproteínas, oligoelementos) causaria a produção de radical superóxido:



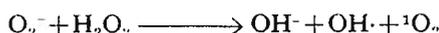
* Trabalho subsidiado pelo INIC

2. O radical $O_2\cdot$ tanto poderia ser gerado no plasma como no interior do GV. No primeiro caso, está demonstrado que ele pode penetrar no interior do GV, através dos canais aniônicos.³

3. No interior do GV a presença de superóxido dismutase (SOD) neutralizaria o radical $O_2\cdot$, formando H_2O_2 :⁴

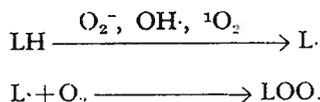


4. O superóxido e o peróxido de hidrogénio reagem entre si, de acordo com a reacção de Haber-Weiss:⁴



Nesta reacção geram-se dois potentes oxidantes, o radical hidroxilo ($OH\cdot$) e o singlete oxigénio 1O_2 .

5. Todos estes derivados do oxigénio, mas em especial os dois últimos, são susceptíveis de iniciar o ataque aos AGNS da membrana do GV, provocando abstracção de hidrogénio. Daqui resulta que o lípido (L:H) se transforma num radical lipoil (L·). Este reage com oxigénio formando um radical lipoperoxil ($LOO\cdot$):

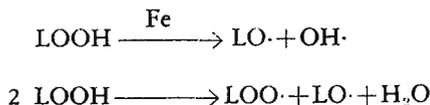


6. O radical lipoperoxil reage com outra molécula de AGNS, formando um lipoperoxido semiestável, que regenera a molécula de lipoil



temos assim um processo de reacção em cadeia, em que sucessivamente se vão formar moléculas de radicais lipídicos.

7. Estas reacções podem sofrer amplificação, por fissão homolítica de ligações covalentes, gerando assim radicais livres, na presença de heme ou metais (Fe, Cu):



8. Em resultados deste tipo de reacções, dá-se a clivagem dos AGNS em fragmentos de 3 a 5 carbonos. Na sequência deste fenómeno, cria-se fragilidade da membrana, altera-se a sua permeabilidade, e, eventualmente, dá-se a sua rotura⁷.

O presente trabalho é uma comunicação prévia, em que descrevemos alguns estudos preliminares, destinados a contribuir para o esclarecimento deste problema.

ABREVIATURAS USADAS NO TEXTO

GV — glóbulo vermelho
 DG-6-P — desidrogenase da glucose-6-fostato
 SOD — superóxido dismutase
 Hq — hidroquinona

NBT — nitrozul de tetrazólio
 AGNS — ácido gordo não saturado
 LH — " " " "
 L· — radical lipoil

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado sangue humano, obtido do Serviço de Transfusões de Sangue do Hospital de Santa Maria, com mais de 3 semanas de armazenamento. Nalgumas experiências usou-se sangue fresco de indivíduos normais ou com carência de DG-6-P. Nestes casos o sangue era colhido na mesma mistura anticoagulante, em proporções iguais às utilizadas pelo Serviço de Transfusões.

Hidroquinona (Hq) foi obtida de BDH (Quinol, reagent grade), Nitro-blue-tetrazolium (NBT) obtido de Sygma. SOD foi isolada e purificada no nosso Laboratório, a partir de sangue humano, por um processo a publicar brevemente. Contém 3750 μ /ml. Para a detecção de superóxido gerado utilizaram-se dois sistemas:

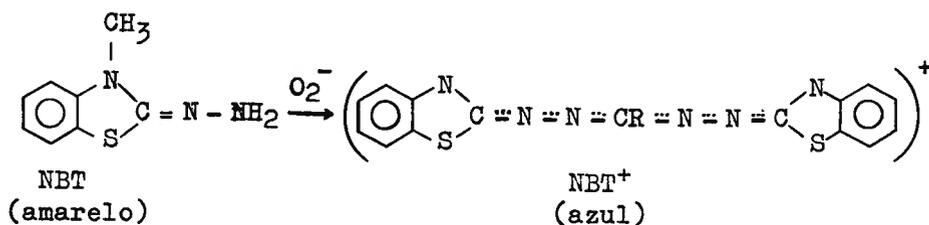
a — *detecção com NBT*

- 1 — sangue total — 3 ml
- 2 — tampão (tris 0,5 M + NaCl 0,145 M) pH=10,2 — 0,5 ml
- 3 — NBT ($12,4 \cdot 10^{-4}$ M) — 1 ml
- 4 — hidroquinona — dissolvida em água, em concentrações variáveis, de modo a obter uma concentração final na mistura de ensaio entre 0 e $1,3 \cdot 10^{-3}$ M.

O pH final desta mistura é de 8,4.

No sistema controle a única diferença consiste na substituição de 0,1 ml de tampão por 0,1 ml de SOD.

Incuba-se a 37° C durante 30 min. Centrifuga a 4° C a 2500-g durante 20 min. O sobrenadante é diluído a 1:5 e transferido para uma cuvette de quartzo e a absorbância lida a 595 nm contra água, num espectrofotômetro Unicam SP-8100. O NBT é transformado pelo O_2^- de acordo com a seguinte reacção:⁸

b — *detecção com adrenalina*

Este sistema foi utilizado nos estudos destinados a avaliar a capacidade de hemoglobina em captar O_2^- . Não era possível utilizar o NBT, em virtude da absorção pela hemoglobina interferir com este corante.

- 1 — tampão (tris 0,5 M, NaCl 0,145 M) pH=10,2 — 2,5 ml
- 2 — adrenalina ($7,2 \cdot 10^{-3}$ M) — 0,1 ml
- 3 — Hq ($4,2 \cdot 10^{-3}$ M) — 0,1 ml
- 4 — oxihemoglobina (0,98 g/dl) — 0,2 ml

A adrenalina na presença de O_2^- gera adrenocrómio, cuja absorvância a 480 nm é seguida.

c — detecção com NBT do O_2^- produzido por extracto de favas

Foi utilizado um homogenizado de favas em água a 1/1 (P/V) o sistema consiste em:

1 — tampão (tris 0,5 M NaCl 0,145 M) pH=10,2 — 2,5 ml

2 — NBT ($1,5 \cdot 10^{-3}$ M) — 0,1 ml

3 — 0,1 e 0,2 ml de sobrenadante do extracto de favas, centrifugado a 2000 · g

4 — 0,1 ml de Hq ($7,2 \cdot 10^{-5}$ M) quando indicado

A variação de absorvância é medida directamente a 595 nm.

Tanto em b) como em c) são feitos controlos com adição de SOD nas quantidades indicadas.

d — determinação dos espectros de absorção da hemoglobina

Incubaram-se a 37° sistemas idênticos ao descrito em a), substituindo NBT por soro fisiológico. A duração da incubação foi variável de 30 a 240 min., ao fim da qual se centrifuga e dos GV se faz um hemclisado, adicionando água destilada na proporção de 0,02 ml de GV para 10 ml de água.

Adiciona-se depois a água necessária para obter uma solução de hemoglobina com a absorvância de 0,180 a 525 nm (ponto isobéptico da oxi e da metahemoglobina).

Faz-se o espectro de absorção entre 500 e 700 nm. A oxihemoglobina é detectada a 578 e a 540 nm, a metahemoglobina a 630 nm, a coeglobina a 700 nm. Os hemicrómios são detectados pela diminuição de absorvância a 560 nm.⁹ Foram utilizados estes comprimentos de onda, em virtude de serem aqueles em que a distinção entre as 4 espécies é mais fácil e que não correspondem necessariamente às absorvâncias máximas.

RESULTADOS

1 — Geração de O_2^- pelo sangue total na presença de Hq, tendo como detector NBT

Na Figura 1 descreve-se o efeito de concentrações variáveis da Hq sobre a quantidade de O_2^- produzido numa incubação de 30 min. a 37° C. Verifica-se que a concentração de Hq=0,025 mM é aquela em que é maior a diferença entre as absorvâncias da mistura de reacção e de controlo. A partir de 0,35 mM, a curva tende a tornar-se horizontal e a aproximar-se da curva controlo.

Na Figura 2 analisa-se o efeito da variação dos tempos de incubação. Não se incluem as curvas controlo, a fim de simplificar o gráfico. Embora se note um aumento de geração de O_2^- com o aumento do tempo de incubação, o aspecto geral das curvas é semelhante, levando a pensar na presença de um factor limitante que poderia ser a concentração de NBT.

A fim de clarificar este ponto, realizou-se a experiência descrita na Figura 3. Nesta, a concentração de NBT em B é idêntica às dos casos anteriores, ao passo que em A ela é metade e em C do dobro. Como se verifica, a presença do dobro da concentração de NBT em pouco faz variar o gráfico. Concluimos que o factor limitante não é a concentração deste indicador.

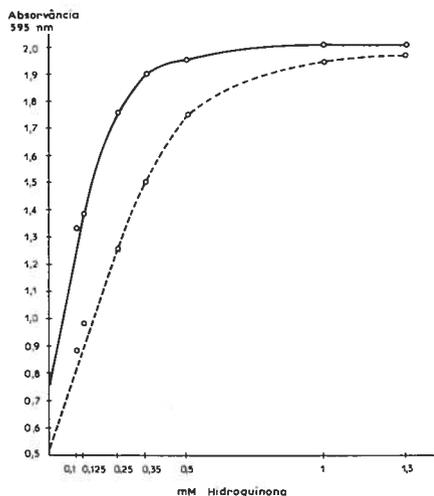


Figura 1 — Geração de O_2 por hidroquinona em concentrações variáveis, na presença de sangue humano com mais de 3 semanas. A tracejado curva controle na presença de SOD. O superóxido gerado é calculado pela diferença na vertical entre as duas curvas. Notar a tendência para a horizontalização a partir da concentração de $Hq=0,35$ mM. NBT é utilizado como detector

Figura 2 — Idêntica à Figura 1, usando tempos de incubação variáveis. As curvas controle com SOD não foram incluídas para evitar sobreposição de gráficos

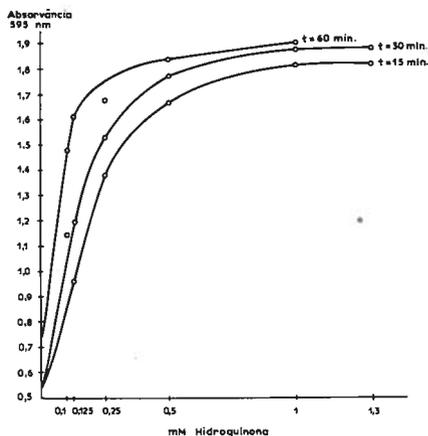
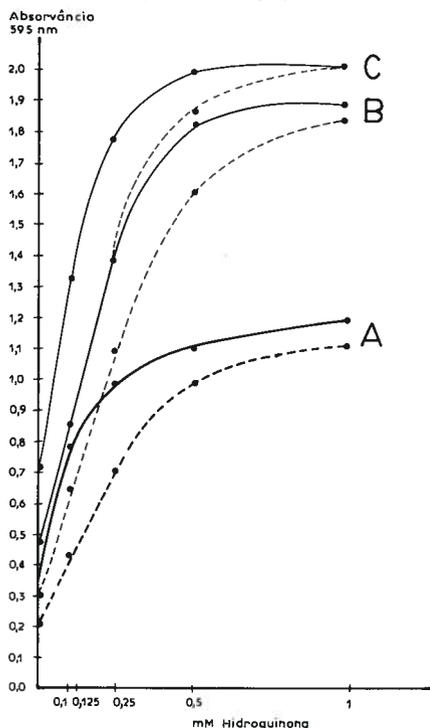


Fig. 3 — Efeito da variação da concentração do indicador. Em B a concentração de NBT é idêntica à da Figura 1. Em A é metade. Em C é o dobro. Notar que a tendência para a horizontalização aparece na mesma zona nas 3 experiências, donde se conclue que o NBT não é factor limitante

2 — Contribuição do plasma e dos GV na geração de O_2^-

A fim de avaliarmos qual a quantidade de O_2^- gerado no plasma e qual a quantidade gerada nos eritrocitos realizámos a experiência indicada na Figura 4. Nesta compara-se a actividade de 3 ml de sangue total contra a actividade de 1,5 ml de plasma adicionado de 1,5 ml de soro fisiológico. A contribuição dos GV é dada pela diferença entre as duas.

Na ausência de Hq a quantidade de O_2^- produzida pelo plasma é menor que a produzida pelos GV. Na presença de 0,1 mM de Hq contudo, a produção de O_2^- pelo plasma é ligeiramente maior que pelos GV. Porém, quando se aumenta a concentração de Hq para 0,5 mM, a produção de O_2^- pelo plasma fica reduzida a um valor insignificante, ao passo que ainda é bastante elevada a quantidade produzida pelos GV.

Concluimos que existe um factor limitante a elevadas concentrações de hidroquinona que afecta mais o plasma que o eritrocito e que poderá ser um produto de transformação da própria hidroquinona.

Este assunto será analisado na discussão.

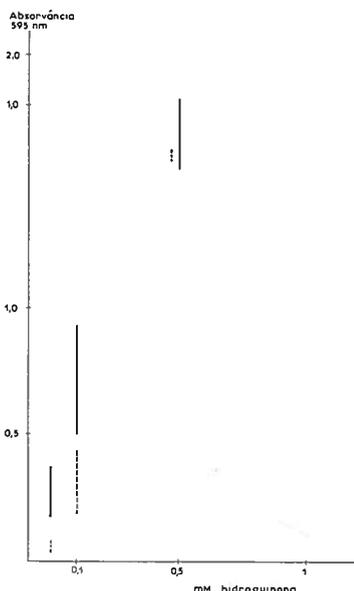


Figura 4 — Geração de O_2^- pelo plasma (tracejado) e pelo sangue total (cheio). Notar a produção de uma pequena quantidade na ausência de Hq. A produção pelo plasma é maior que pelo sangue total, na presença de 0,1 mM de Hq, porém, na presença de 0,5 mM de Hq, quase não se detecta a produção de O_2^- pelo plasma

3 — A oxihemoglobina como neutralizador de O_2^-

A Figura 5 foi desdobrada, a fim de evitar a sobreposição de um número excessivo de linhas.

A linha *a* representa o gráfico da autooxidação da adrenalina a pH=10,2. Nestas condições, a adrenalina autooxida-se espontaneamente em adrenocrómio com geração de O_2^- .

A linha *b* é um controlo na presença de SOD, em que se verifica a quase total ausência de variação de absorvância

Em *c* temos adrenalina mais Hq e em *d* a mesma mistura na presença de SOD. Quando as concentrações de SOD aumentam (curvas *c*, *d*, *e*, *f*) nota-se que a produção de O_2^- diminui progressivamente.

Uma diminuição maior resulta da presença de oxihemoglobina (curva *g*) que actua neste sistema como captador do electrão do superóxido, transformando-se em metahemoglobina. Este efeito é mais pronunciado em *b*, quando se adiciona oxihemoglobina e SOD.

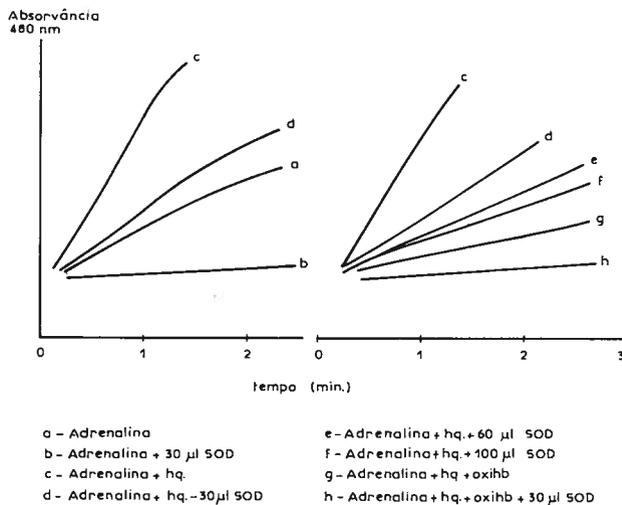


Figura 5—Efeito da hemoglobina como neutralizador de superóxido (curva *g*).
 A SOD tem um efeito aditivo com hemoglobina nesta experiência

4— Utilização de um extracto de favas como gerador de O_2^-

Na figura 6 estudámos a influência do sobrenadante de um homogenizado de favas (curva *a*). O seu controlo com SOD revela uma diferença indiscutível (curva *c*).

Quando se aumenta para o dobro a quantidade do extracto (curva *b*) obtém-se uma geração de O_2^- análoga à obtida por Hq na concentração de $7,2 \cdot 10^{-5} M$ (curva *d*)

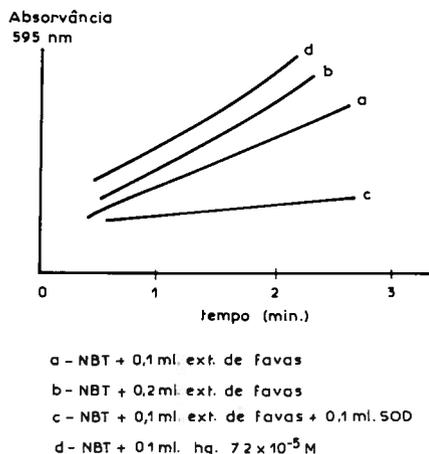


Figura 6— Efeito de um extracto de favas como gerador de superóxido. A reacção é seguida continuamente no espectrofotómetro. Notar que a curva *b*, com 0,2 ml de extracto é paralela à curva *d*, com $Hq=7,2 \cdot 10^{-5} M$

5 — *Variação do espectro de absorção da hemoglobina*

Na Figura 7 analisa-se a influência da Hq na variação do espectro de absorção da hemoglobina. Trata-se do sangue de um indivíduo normal, colhido na véspera da experiência.

O Gráfico A é um controle, incubado 30 minutos a 37°, na ausência de Hq. Os Gráficos B, C e D são espectros de absorção feitos após 30, 120 e 240 minutos de incubação a 37° na presença de Hq, conforme foi descrito.

Não se nota diferença após incubação de 30 minutos. Contudo, após 120 minutos de incubação, diminuem as absorvâncias a 578 e a 540 nm, características da oxihemoglobina e aumentam as absorvâncias a 630 nm, característica da metahemoglobina e a 700 nm características da coeglobina. A absorvância a 560 nm diminui, o que interpretamos como resultado da formação de hemicrômios. Estes efeitos são mais pronunciados após 240 minutos de incubação.

Na Figura 8 temos uma experiência semelhante, utilizando agora o sangue de um carente total de DG-6-P, com história de hemólise por favismo.

Nota-se já aos 30 minutos de incubação um acentuado decréscimo na oxihemoglobina e um ligeiro aumento da metahemoglobina. Também os hemicrômios aumentaram após 30 minutos

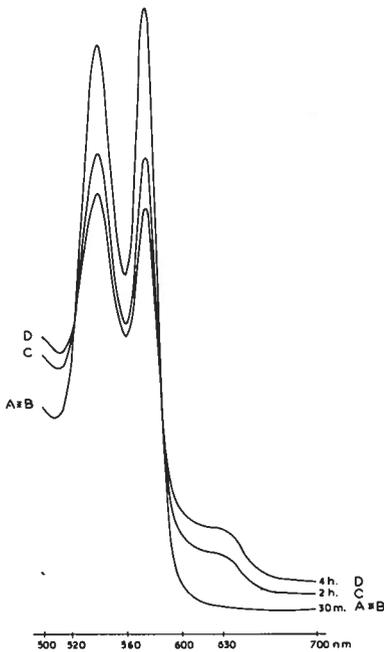


Figura 7 — Espectro de absorção da hemoglobina dum indivíduo normal
A — controle; B — após 30 min. incubação com Hq; C — após 120 min.; D — após 240 min. Notar as ΔA a 578, 540 nm (oxiHb), a 630 nm (metaHb), a 700 nm (coeglobina) e $-\Delta A$ a 560 nm (hemicrômios)

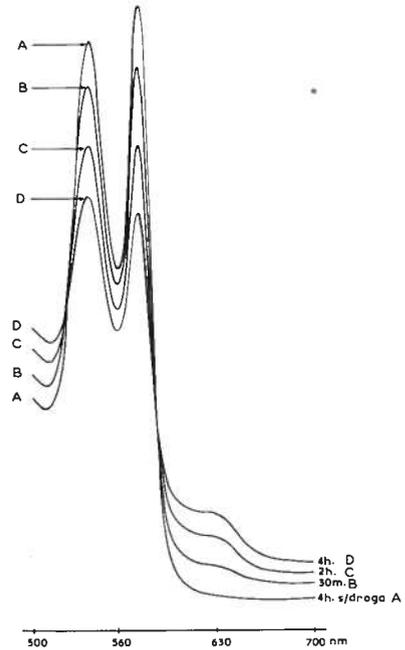


Figura 8 — Espectro de absorção da hemoglobina dum indivíduo carente em DG-6-P. Notar uma maior precocidade no aparecimento das alterações, já visíveis à meia hora

DISCUSSÃO

A análise da geração de superóxido pelo sistema Hq-sangue total, usando como detector o NBT, revela a presença de um factor limitante que não parece ser a concentração deste corante, pois, aumentando a concentração de NBT, o processo passa-se de modo idêntico.

Quando procurámos saber se o superóxido se gera no plasma ou no interior do eritrocito, verificámos que, a concentrações baixas de Hq, o principal locus de produção é o plasma que contribue com pouco mais de 50 % do total. Isto é compreensível se admitirmos que a maior parte da droga dissolvida se encontra neste compartimento. Ignoramos se ela penetra ou não no GV. No caso de penetrar ela seria o gerador dentro do glóbulo. A menor produção de O_2^- por este, resultaria da presença de SOD que rapidamente neutralizaria uma grande parte, só podendo ser detectado aquele que passasse para o exterior do eritrocito.

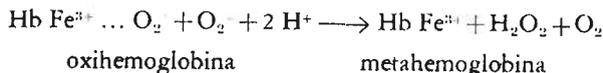
Caso a Hq não penetre no GV, a maior produção de O_2^- quando os eritrocitos estão presentes poderia estar relacionada com oligoelementos presentes na membrana, tais como hemoproteínas, enzimas contendo metais, etc., que activassem essa produção.

De qualquer modo o facto que resta explicar é a presença de um factor limitante, especialmente notório quando se utiliza plasma na presença de doses elevadas de Hq. Admitimos como explicação para este facto uma alteração da própria Hq, semelhante ao que se passa com a menadiona.¹⁰

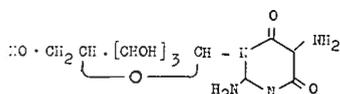
Com efeito a menadiona é transformada em radical livre, mudando de propriedades. Se o mesmo suceder com a Hq, uma possível explicação seria que a elevadas concentrações de O_2^- este destruiria a Hq que se tornaria factor limitante por desaparecer. A maior produção de O_2^- no GV resultaria da presença de SOD que protege a menadiona e poderia do mesmo modo impedir a transformação da Hq se porventura esta penetra no GV.

A confirmar estes factos estariam experiências que realizámos mas não mencionadas no texto. Uma foi o estudo da variação da absorvância da Hq a 525 nm, em que se notam variações apreciáveis durante um período de 4 horas. A outra foi a redução do NBT por concentrações variáveis de Hq numa solução de gelatina, em que se verifica uma variação linear, seguida de patamar horizontal semelhante ao que se passa no plasma. Destes factos concluímos que é altamente provável que o factor limitante seja a própria alteração da Hq pelo O_2^- .

A neutralização do O_2^- pela oxihemoglobina já é conhecida há bastante tempo⁴ e resulta, segundo estes Autores, da seguinte reacção:



A geração de superóxido por um extracto de favas não é de admirar, até porque já há muito tempo estão descritas quinonas nestas leguminosas (vicina e convicina, citadas por Kellogg e Fridovich⁴). Assim, a hemólise do favismo seria análoga à hemólise por droga.



Vicina (Index Merck, 6.^a ed., 1952)

Finalmente, o estudo do espectro de absorção da hemoglobina permitiu-nos tirar algumas conclusões interessantes. Assim, a incubação dos GV com Hq não produz qualquer alteração nos indivíduos normais (foram estudados vários, com resultados idênticos ao apresentado no texto) ao fim de 30 minutos. Porém, para incubações mais prolongadas nota-se o aparecimento de metahemoglobina, coeglobina e hemicrómios.

O mesmo se passa num caso de carente de DG-6-P, apenas mais precocemente, o que leva a crer que o sistema de defesa neste caso é mais vulnerável.

SUMMARY

HUMAN ERYTHROCYTE BEHAVIOUR UNDER STRESS INDUCED BY A SUPEROXIDE GENERATOR

Human blood generates superoxide ion in the presence of hydroquinone. It can be detected by nitrobluetetrazolium. In this system there is a limiting factor, probably as a result of the structural modification of hydroquinone itself. An extract of fava beans has an elevated capacity to generate superoxide, in contact with blood, similar to hydroquinone. It is admitted that this fact is the result of the presence of compounds such as vicine and convicine, chemically similar to hydroquinone. After incubation with hydroquinone, the absorption spectrum of oxyhemoglobin undergoes characteristic alterations, which are interpreted as resulting from the formation of methemoglobin, choleglobin and hemichromes. These alterations seem to occur earlier in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.

BIBLIOGRAFIA

1. MANSO C: A desidrogenase da glucose-6-fosfato nos glóbulos vermelhos dos bantos de Moçambique. Edições Académica, Lourenço Marques p. 302. 1968.
2. BEUTLER E: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and nonspherocytic congenital hemolytic anemia. *Seminars Hemat* 1965; 2: 91.
3. LEIPZIG R, BREWER J, OELSHLEGEL F: Possible role for superoxide and superoxide dismutase in G6PD type hemolytic anemia. In *Isozymes*. Vol. II. Ed. Clement Marker. Academic Press p. 667. 1975.
4. KELLOGG E, FRIDOVICH I: Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxid. *J Biol Chem* 1977; 252: 6721.
5. LYNCH R, FRIDOVICH I: Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J Biol Chem* 1978; 253: 4697.
6. MAC CORD J, FRIDOVICH I: Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049.
7. CHOW C: Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am J Clin Nut* 1979; 32: 1066.
8. BACHRACH U, BEN-JOSEPH M: Tumor cells, polyamines and polyamine derivatives. In *Polyamines in normal and neoplastic growth*. Ed. Russel. Raven Press. p 15. 1973.
9. RICHTERICH R: Clinical chemistry. Ed. S. Karger. p 330. 1969.
10. WINTERBOURN C, FRENCH J, CLARIDGE R: The reaction of menadione with haemoglobin *Biochem J* 1979; 179: 665.

Pedido de separatas: *Carlos Manso*
Instituto de Química Fisiológica
Hospital de Santa Maria
1600 Lisboa - Portugal