

## AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DA VITAMINA E EM CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS

Yandilla Suellen dos Santos da Silva<sup>1</sup>; Adriana Fontes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina- CCB – UFPE; E-mail: yandillasuellen@yahoo.com.br,

<sup>2</sup>Docente do Departamento de Biofísica e Radiobiologia – CCB – UFPE; E-mail: adriana.fontes.biofísica@gmail.com

**Sumário:** Durante o armazenamento em bancos de sangue, os eritrócitos sofrem progressiva deterioração, o que pode comprometer a integridade pós-transfusional das hemácias na circulação sanguínea. Muitas destas lesões de armazenagem são causadas por danos oxidativos nessas células. Alguns estudos relataram que a vitamina E é um dos antioxidantes mais importantes que pode atuar sobre os lipídios das membranas celulares. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar se as propriedades antioxidantes da vitamina E são capazes de melhorar as condições de armazenamento de concentrados de hemácias (CHs). Devido à sua natureza hidrofóbica, foram preparadas emulsões de vitamina E. As caracterizações das emulsões mostraram a presença de partículas na escala nanométrica e confirmaram a presença de vitamina E nas formulações preparadas. Após essa etapa, os CHs foram divididos em duas unidades. Uma delas recebeu as emulsões e a outra foi usada como controle. As formulações foram adicionadas às bolsas de sangue de forma asséptica e, em seguida, os CHs foram armazenados a 4°C. As análises de controle de qualidade realizadas no 35º dia de armazenamento mostraram que não houve diferença significativa entre as bolsas que continham ou não a formulação de vitamina E. Os resultados de avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com o sistema com a vitamina E em SAG-M apresentou diminuição relativa na produção de ROS de pelo menos 35% durante o armazenamento. A elasticidade das hemácias para o sistema com SAG-M foi então medida usando uma pinça óptica. Os resultados mostraram que a capacidade de deformação dessas hemácias não diferiu significativamente do controle durante todo o armazenamento.

**Palavras-chave:** Antioxidante; Concentrados de Hemácias; Elasticidade; Espécies Reativas de Oxigênio; Vitamina E.

### INTRODUÇÃO

A deformabilidade celular é uma propriedade crítica para as hemácias na microcirculação, pois para transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos, as mesmas precisam passar por vasos bem menores que o seu tamanho, portanto se as hemácias não forem deformáveis, não conseguirão desempenhar bem essa função. As hemácias são células essenciais para a manutenção do organismo humano por promover as trocas gasosas. Como essas células são ricas em oxigênio, tornam-se também alvos da ação de espécies reativas que se originam a partir desse gás. Quando as hemácias estão presentes na circulação sanguínea normal, elas dispõem de um sistema antioxidante natural que minimiza ou elimina esses radicais [1]. Entretanto, para a obtenção de concentrados de hemácias (CHs) utilizados para fins transfusionais é necessário se remover aproximadamente 80% do plasma de uma unidade de sangue total e, com isso, perde-se grande parte da capacidade antioxidante nativa associada a esse fluido biológico. Assim, ao longo do período de armazenamento (35 ou 42 dias dependendo da solução preservante) essas células ficam susceptíveis aos danos oxidativos que podem levar às chamadas “lesões de estoque”.

Dentre as lesões de estoque podemos destacar a perda da deformabilidade eritrocitária [2]. Uma possibilidade de melhor se preservar as características funcionais dessas hemácias estocadas, na perspectiva de também ampliar o seu período de armazenamento, é através da utilização de antioxidantes. Ao longo dos anos, trabalhos demonstraram que a ação antioxidante da vitamina E está principalmente relacionada ao bloqueio da peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas e algumas vezes nas lipoproteínas [3]. Neste contexto, considerando-se que muitas das lesões de estoque estão relacionadas com a peroxidação dos lipídios de membrana das hemácias dos CHs, o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo comparativo entre os concentrados que receberam adição da emulsão da vitamina E e os que não receberam, fornecendo assim a possibilidade de avaliar ações da vitamina E como possível antioxidante em CHs. Para isso, foi necessário: preparar e caracterizar nanoemulsões de vitamina E, avaliar os danos oxidativos nas células através de medidas de espécies reativas de oxigênio (ROS) e avaliar a ação desses sistemas antioxidantes na deformabilidade de hemácias estocadas através das pinças ópticas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**1. Emulsões de Vitamina E:** Devido a sua natureza hidrofóbica, a vitamina E precisa ser solubilizada em meio aquoso. Utilizamos dois meios aquosos: solução salina 0,9% ou SAG-M (solução aditiva já utilizada em CHs contendo: salina, adenina, glicose e manitol). A formulação dessas emulsões envolveu a combinação de 3 componentes: meio aquoso (50 mL de salina ou 50 mL de SAG-M), óleo (160 mg de vitamina E) e os tensoativos (Tween 20, 265 mg e Tween 80, 265 mg). Essa emulsão é importante para veicular substâncias lipofílicas no organismo [4] e nesse caso é importante para melhorar a interação da vitamina E com os eritrócitos nos CHs. A caracterização das emulsões foi realizada pelo espalhamento dinâmico de luz (DLS, Zetasizer Nano, Malvern).

**2. Amostras de Eritrócitos:** As hemácias foram obtidas a partir de segmentos de CHs de CPD/SAG-M estocadas no HEMOPE (Parecer n°. 003/09). Cada bolsa avaliada foi dividida em duas unidades de 160 mL de volume total. Uma delas recebeu 10 mL da nanoemulsão de vitamina E (ou em solução salina ou em SAG-M). A outra unidade recebeu a mesma quantidade do solvente respectivo (sem a emulsão) e foi considerada como controle. As formulações foram adicionadas às bolsas de sangue de forma asséptica e, em seguida, os CHs foram armazenados a 4°C.

**3. Avaliação de ROS:** Para avaliar os danos oxidativos causados nas células pelo ROS (principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), foi realizada a marcação das hemácias com o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) nas unidades de CHs (três para cada tipo de solvente, SAG-M ou solução salina). Para cada unidade e para cada dia (8, 21 e 35), as análises foram realizadas em duplicata. Para isso 50 µL de cada amostra (com e sem a vitamina E) foi lavada 3 vezes por centrifugação. Posteriormente as células foram incubadas com 0,5 µL de DCFH-DA por 30 minutos. Depois disso, as amostras foram lavadas novamente 2 vezes por centrifugação e foram avaliadas por citometria de fluxo (FACSCalibur System, Becton Dickinson). Também foi realizada a avaliação de um controle positivo usando 1 µL de peróxido de hidrogênio diluído em 100 µL ou 50 µL de salina. A citometria de fluxo identifica a conversão do DCFH-DA em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). O DCFH-DA é convertido em DCF (um composto fluorescente) pela presença de ROS no interior celular, assim quanto maior for a fluorescência detectada, maior é a quantidade de ROS produzida pela célula. Foram aqui avaliadas 3 bolsas de CHs.

**4. Avaliação da Deformabilidade:** A deformabilidade foi avaliada usando uma pinça óptica. O sistema de pinças ópticas consiste de um feixe de laser infravermelho (IPG Photonics) focalizado no material de análise por uma objetiva de 100x de um microscópio

(Olympus). O sistema possui captura de imagem acoplado e uma platina motorizada controlada por computador (Prior Scientific), com o qual é possível se movimentar as células. As hemácias foram capturadas pelo laser e arrastadas com velocidades controladas e distância constante através do soro sanguíneo, o que promoveu à deformação das mesmas nesse fluido. Ao se correlacionar a alongação das células com as velocidades determina-se então a constante elástica, a qual chamamos elasticidade [2]. Quanto maior o valor da elasticidade, menos deformável é a célula, assim como se aplica para a constante de mola. A mensuração da elasticidade também foi feita nos dias 8, 21, 35 de armazenamento. Para cada bolsa (com e sem vitamina E) foram analisadas 20 células aproximadamente. Aqui foram também avaliadas 3 bolsas de CHs.

## RESULTADOS

**1. Emulsões de Vitamina E – Caracterização:** As análises pelo DLS foram realizadas um dia por semana durante 1 mês. As gotículas da formulação com salina e com SAG-M mostraram tamanhos nanométricos (tamanhos médios de aproximadamente 30 e 22 nm, respectivamente). As partículas da emulsão com salina aumentaram 6% durante esse período. A emulsão em SAG-M apresentou um aumento de 3,7%, indicando que as formulações das emulsões de vitamina E se mantiveram estáveis em função do tempo.

**2. Avaliação de ROS:** A Tabela 1 mostra as percentagens (com os respectivos desvios-padrão) da redução/aumento relativo de ROS em função do dia de armazenamento. Após cada análise, nós comparamos as amostras com e sem a emulsão de vitamina E, e verificamos o aumento/diminuição relativa da produção de ROS (os valores negativos representam a porcentagem de diminuição ROS e os valores percentuais positivos representam o aumento). A emulsão com solução salina não produziu qualquer redução significativa ou aumento de ROS para qualquer dia de medições. Por outro lado, as amostras incubadas com as emulsões preparadas com a solução conservante já usada em concentrados de hemácias, o SAG-M, apresentaram uma redução eficaz de ROS de pelo menos 35% em todos os dias de armazenamento analisados.

**Tabela 1 – Diminuição/Aumento relativo de ROS em função do dia de armazenamento.**

Dias	Vitamina E em Emulsão com Salina ROS (%)	Vitamina E em Emulsão com SAG-M ROS (%)
8	4,0 ± 10	-35,5 ± 4
21	-4,6 ± 11	-52,7 ± 10
35	6,5 ± 12	-36,0 ± 9

**3. Avaliação da Elasticidade:** A Tabela 2 mostra os valores encontrados para a elasticidade. Não existiu diferença significativa entre o controle e as amostras com vitamina E nos três dias de medidas  $p > 0,2$ .

**Tabela 2 – Elasticidade dos eritrócitos em função do armazenamento. Controle (apenas SAG-M) e Teste (emulsão de vitamina E com SAG-M).**

Dias	Elasticidade Controle (x 10 <sup>-4</sup> dina/cm)	Elasticidade Teste (x 10 <sup>-4</sup> dina/cm)
8	4,7 ± 0.4	4,6 ± 0.3
21	4,9 ± 0.5	4,5 ± 0.5
35	5,9 ± 0.4	6,1 ± 0.4

## DISCUSSÃO

Os resultados para a avaliação de ROS estão em concordância com outros trabalhos (realizados *in vivo* e *in vitro*) que mostraram a atividade antioxidante da vitamina E em hemácias em outras condições [5, 6]. Os resultados para a mensuração da elasticidade mostraram que não existiu diferença significativa entre o controle e as amostras com

vitamina E nos três dias de medidas. A constante elástica das células, em função do armazenamento, diminuiu um pouco quando comparado com outros trabalhos [2], provavelmente porque foi adicionada uma quantidade extra de 10 mL de SAG-M nas bolsas (para ambas amostras), o que acaba melhorando a suplementação de ATP para as células. Esses resultados estão de acordo com alguns estudos na literatura, os quais sugerem que a perda da deformabilidade pode estar mais relacionada à oxidação de proteínas e que essas biomoléculas sofrem oxidação com níveis baixos de radicais livres. Dessa maneira, como a capacidade antioxidante da vitamina E está mais focada nos fosfolipídios [7] e alguns trabalhos mostraram um relacionamento mais direto entre a rigidez dos eritrócitos e a oxidação de proteínas [7, 8], se faz relevante o estudo da atividade de antioxidantes agindo nas proteínas da membrana na tentativa de uma melhor preservação da deformabilidade das hemácias em CHs. Outra hipótese que pode justificar os resultados encontrados para elasticidade pode estar relacionada à formulação de vitamina E, feita com surfactantes, que de certa forma poderia acabar sendo um pouco prejudicial por atuar nas membranas das hemácias, apesar de nenhum sinal de hemólise adicional ter sido observado. A ação positiva da vitamina E pode estar sendo compensada por uma ação negativa dos surfactantes. Por essa razão estamos iniciando testes para a veiculação da vitamina E a partir de lipossomas.

## CONCLUSÕES

Nossos resultados indicaram que a formulação da vitamina E em SAG-M diminuiu pelo menos 35% de ROS ao longo do período de estocagem, mas não melhorou a deformabilidade dos eritrócitos. Temos duas hipóteses para esse fato: ele pode estar relacionado com a presença dos surfactantes na emulsão, onde a ação positiva da vitamina E pode estar sendo compensada por uma ação negativa dos surfactantes. Outra hipótese que pode justificar os dados encontrados é que a deformabilidade eritrocitária pode estar mais relacionada com a oxidação das proteínas da membrana e a vitamina E tem ação antioxidante mais relacionada aos fosfolipídios. Dessa forma, é importante o estudo de novas formas de veiculação da vitamina E, tais como as formulações lipossomais e também o estudo de outras substâncias antioxidantes com ação mais direta nas proteínas de membrana.

**AGRADECIMENTOS:** Agradecemos ao CNPq, a UFPE, a CAPES e a FACEPE.

## REFERÊNCIAS

1. TEDESCO I.; RUSSO M.; RUSSO P.; JACOMINO G.; RUSSO G. L.; CARRATURO A.; FARULO C.; MOIO L.; PALUMBO R. – *Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells*. **J Nutr Biochem**, 11, 114-119, 2000.
2. FONTES A.; BARJAS CASTRO M. L.; FERNANDES H. P.; THOMAZ A. A.; HURUTA R. R.; POZZO L.; BARBOSA L. C.; COSTA F. F.; SAAD S. T. O.; CESAR, C. L. – *Red blood cells mechanical and electrical properties using optical tweezers*. **Journal of Optics**. A, Pure and Applied Optics (Print), 13, 044012, 2011.
3. KAY M.M.B.; BOSMAN G.J.C.G.M.; SHAPIRO S.S.; BENDICH A.; BASSEL P.S. – *Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: Vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 83, 2463-2467, 1986.
4. HO H. O.; HSIAO C. C.; SHEU M. T. *Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs*. **J Pharm Sci**, 85,138-43, 1996.
5. CHUNG W.Y., BENZIE I.F., *Probe-assisted flow cytometric analysis of erythrocytes membrane response to side-specific oxidant stress*, **Cytometry**, 1:40,182-8, 2000.
6. RACEK J., HERÝNOVÁ R., HOLECEK V., JERÁLEK Z., SLÁMA V., *Influence of antioxidants on the quality of stored blood*, **Vox Sang.**, 72, 16-19, 1997.
7. SNYDER L.M., FORTIER N. L., TRAINOR J., JACOBIS J., LEB L., LUBIN B., SHOLET C. S., MOHANDAS N., *Effect on normal human Erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, an spectrin-hemoglobin cross-linking*, **J Clin Invest**, 76, 1971-1985, 1985.

8. KRIEBARDIS G., ANTONEIOU M.H., STAMOULIS K.E., ECONOMOU-PETERSEN E., MARGARITIS L.H., PAPASSIDERI I.S., *Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells*, **J Cell Mol Med**, 11, 148-155, 2007.