

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE HEMOGLOBINA

Maria Celiana Pinheiro Lima

Tese em Ciência e Tecnologia de Polímeros, submetida ao corpo docente do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor, em Ciência e Tecnologia de Polímeros, sob orientação da Professora Cristina Tristão de Andrade.

Rio de janeiro

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tese de Doutorado: Isolamento, purificação e modificação química de hemoglobina

Autor: Maria Celiana Pinheiro Lima

Orientadora: Cristina Tristão de Andrade

Data de defesa: 14 de março de 2006

Aprovada por:

Cristina Tristão de Andrade, DSc- Orientador
IMA/UFRJ

Marcelo Ganzarolli, DSc
IQ/UNICAMP

Edwin Gonzalo Azero Rojas, DSc
UNIRIO

Ana Luisa Palhares, DSc
FF/UFRJ

Maria de Fátima Vieira Marques, DSc
IMA/UFRJ

Rio de Janeiro
2006

Lima, Maria Celiana Pinheiro

Isolamento, purificação e modificação química de hemoglobina / Maria Celiana Pinheiro Lima. - Rio de Janeiro, 2006.

xvi, 109f? il.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Polímeros) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – IMA, 2006.

Orientador: Cristina Tristão de Andrade.

1. Hemoglobina. 2. Sangue Artificial. 3. Purificação. 4. Dissacarídeos oxidados. 5. Polímeros – Teses. I. Andrade, Cristina Tristão (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano. III. Título.

Esta Tese de Doutorado foi desenvolvida nos laboratórios do Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com apoio do Conselho Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico esta tese ao meu irmão *Airton Cesar Pinheiro Lima (in memorian)*, que tão jovem partiu deixando como ensinamento a amizade acima de tudo.

Agradeço a DEUS por TUDO que ele é para mim, e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

A meus pais por me ensinarem que o aprendizado é o bem mais precioso que o ser humano pode conquistar.

A meus irmãos, agora somente Marcio e Neiliane, por acreditarem e torcerem por mim.

Ao meu AMOR, Eduardo David, pelo carinho, amor e compreensão a mim dedicado durante todo este difícil período de tese.

CRÉDITOS

Não pode passar despercebido o apoio das diversas instituições que colaboraram para a concretização desta tese, entre os quais se destacam:

A equipe do Professor Luiz Carlos Trugo (*in memoriam*), agora representada pela Professora Carmen Donangelo do Instituto de Química (IQ-UFRJ), pelo uso do HPLC.

A Professora Ana Luisa Palhares da Faculdade de Farmácia (FF-UFRJ) pelas análise de agregação plaquetária e vasoconstrição.

Aos abatedouros Micoljean e J.N. de Abreu Comércio de Carnes LTDA, pelo fornecimento do sangue bovino.

O apoio financeiro dado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

A professora Cristina Tristão de Andrade pela orientação, amizade e dedicação durante este período.

Agradeço aos amigos que contribuíram com apoio, incentivo e compreensão a todas as atribuições decorrentes desta pesquisa, sobremaneira a Gisela, Marcia, Patrícia, Rachel, Felipe, Thiago Valadares, Diego, Fernanda, Leandro, Ivan, Thiago Ribeiro e Regina.

Um MUITO OBRIGADA a todos os alunos de iniciação científica que trabalharam comigo neste projeto: Renata, Felipe, Thiago Valadares e Diego.

A Adriana e Mariana do Instituto de Química – UFRJ, por auxiliar no uso do HPLC.

Agradeço a amizade da minha turma de 2002, em especial a Paula, Tatiane e Luciana.

Ao meu GRANDE amigo André, por todo seu carinho, apoio e incentivo em todas as minhas decisões.

A todos os amigos que direta ou indiretamente torcem por mim.

A todos os professores do IMA, pois sempre que precisei foram atenciosos e amigos.

Aos funcionários do IMA, que muito contribuíram para a realização deste trabalho em especial o Sr. Geraldo e o Jorge (da secretaria), sempre muito prestativos nas horas de maior aflição estavam prontos para ajudar-me.

A minha nova família David, por todo o apoio, incentivo e por terem me adotado como filha e irmã (Sr. Edson David, Sra. Rosângela David, Tatiane David e Taiane David).

A minhas avós, Nilza e Lídia, por sempre torcerem e rezarem por mim.

“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer por nós”.

Marcel Proust

Resumo da Tese apresentada no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (DSc), em Ciência e Tecnologia de Polímeros.

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE HEMOGLOBINA

Maria Celiana Pinheiro Lima

Orientadora: Cristina Tristão de Andrade

Substitutos para o sangue são desenvolvidos com a função principal de carrear os gases oxigênio e dióxido de carbono durante período limitado de tempo. Não se espera que esses produtos apresentem as funções metabólicas, hemostáticas e de defesa, características do sangue. O uso da hemoglobina bovina (HbBv) como carreador de oxigênio pode ser justificado pelo fato de o sangue bovino estar disponível em quantidades abundantes e os íons cloretos presentes no plasma atuarem como regulador alostérico. A obtenção de derivados de hemoglobina (Hb) tem por objetivo a estabilização de sua forma tetrâmera, para evitar toxicidade renal e o aumento da massa molar, para aumentar o tempo de vida útil da Hb na circulação corpórea. Antes ser usada como um carreador de oxigênio a hemoglobina necessita ser isolada, purificada, modificada quimicamente e testadas quanto a citotoxicidade. No presente trabalho, a HbBv foi isolada por diferentes métodos de lise, em seguida, purificada para a extração de resíduos da membrana eritrocitária, por cromatografia de troca iônica, usando duas resinas diferentes (Q-SFF e AGMP-1), a eficiência da purificação foi analisada pela técnica de HPLC e pelas técnicas de eletroforese NATIVA e SDS-PAGE, onde concluímos ter uma HbBv livre de contaminantes, e pronta para ser modificada quimicamente. As reações de modificação química foram realizadas com dissacarídeos oxidados (o-sacarose e o-trealose). Foram obtidos diferentes bioconjugados de HbBv/dissacarídeo oxidado, e foi avaliado o grau de modificação química da HbBv pelas técnicas de HPLC e eletroforese SDS-PAGE. E o efeito desses produtos quanto à agregação plaquetária e vasoconstrição, também foram analisadas *in vitro*.

Abstract of Dissertation presented to Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano of Universidade Federal do Rio de Janeiro, as partial fulfillment of the requirement for the degree of Doctor in Science (DSc), Science and Technology of Polymers.

ISOLATION, PURIFICATION AND CHEMICAL MODIFICATION OF THE HEMOGLOBIN

Maria Celiana Pinheiro Lima

Advisor: Cristina Tristão de Andrade

Substitutes for the blood are developed with the only function of carrier the gases oxygen and carbon dioxide during limited period of time. It is not waited that those products present the metabolic functions, hemostatics and of defense, characteristics of the blood. The use of the bovine hemoglobin (HbBv) as carried of oxygen can be justified for the fact of the bovine blood to be available in abundant amounts and his regulator alostérico to be the chloride ions present in plasma. The obtaining of derived of hemoglobin (Hb) has for objective the stabilization of her tetrameric form, to avoid renal toxicity and increase of the mass molar, to increase the time of useful life of Hb in the corporal circulation. Before to be used as a carrier of oxygen the hemoglobin needs to be isolated, purified, chemically modified and tested as the cytotoxicity. In the present work, HbBv was isolated by different lyze methods, soon afterwards, purified for the extraction of membrane residues of the cell membrane, by anion exchange chromatography, using two different resins (Q-SFF and AGMP-1), the efficiency of the purification was analyzed by technique of HPLC and for techniques of NATIVE and SDS-PAGE electrophoresis, where we concluded to have HbBv free from pollutants, and available to be chemically modified. The reaction of chemical modification was accomplished with oxidized disaccharides (o-sucrose and o-trehalose). Different bioconjugate of HbBv / oxidized disaccharide were obtained, and the degree of chemical modification of HbBv was evaluated by the techniques of HPLC and SDS-PAGE electrophoresis. The effect of this products in the plateles aggregation and vasoconstriction, also were analyzed *in vitro*.

Parte desta Tese foi apresentada nos seguintes eventos:

- Lúcio A. M. Barros, **Maria Celiana P. Lima** e Cristina T. Andrade, “*Avaliação do processo de purificação de hemoglobina humana*”, Anais do 7^a. Congresso Brasileiro de Polímeros (ABPol), Belo Horizonte – MG, 2003, 200-01;
- **Maria Celiana P. Lima**, Renata Lopes L. da Silva e Cristina T. Andrade, “*Avaliação das condições de hemólise de células vermelhas humanas e bovinas*”, Anais do 7^a. Congresso Brasileiro de Polímeros (ABPol), Belo Horizonte – MG, 2003, 646-47.
- **Maria Celiana P. Lima**, Renata Lopes L. da Silva, Felipe F. de Lima e Cristina T. Andrade, “*Avaliação do processo de purificação de hemoglobina bovina*”, Anais do III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB), UNICAMP, Campinas - SP, 2004, 92.
- **Maria Celiana P. Lima**, Renata Lopes L. da Silva, Felipe F. de Lima e Cristina T. Andrade, “*Uso de Cromatografia de Troca Iônica na Eliminação de Fosfolípidos do Sangue Bovino Hemolisado*”. V Encontro Regional de Polímeros (ABPol-Leste), realizado no Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano da UFRJ, outubro de 2004.
- Felipe Fortes de Lima, **Maria Celiana P. Lima** e Cristina T. de Andrade, “*Purificação de hemoglobina bovina: Quantificação de fosfolípidos residuais*”. XXVI Jornada de Iniciação Científica e Cultural da UFRJ, novembro, 2004, 62.
- Renata Lopes L. da Silva, **Maria Celiana P. Lima** e Cristina T. de Andrade, “*Purificação de hemoglobina bovina: Eliminação de proteínas da parede celular e do soro bovino*’. XXVI Jornada de Iniciação Científica e Cultural da UFRJ, novembro, 2004, 63.
- **Maria Celiana P. Lima** e Cristina Tristão de Andrade, “*Quantification of residual phospholipids in samples of purified bovine hemoglobin*”. IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Águas de Lindóia-SP, 29 junho a 02 julho, 2005.
- Thiago Valadares de Araújo Santos, Edwin G. Azero, **Maria C. P. Lima**, Cristina T. de Andrade, “*Purificação e Caracterização de Hemoglobina*

Bovina". III Semana de Integração Acadêmica-UNIRIO, 27 junho a 01 julho, 2005.

- Thiago Valadares de Araújo Santos, **Maria Celiana P. Lima**, Cristina T. de Andrade, Edwin Gonzalo Azero, "*Purificação da Hemoglobina Bovina e Avaliação da Conformação Nativa por Eletroforese*". XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, outubro, 2005, 63.
- Diego Steffani Baptista, Renata Lopes Landeira da Silva, **Maria Celiana P. Lima**, Cristina T. de Andrade, "*Efeito do Tipo de Hemólise na Extração de Fosfolípídeos Residuais em Soluções de Hemoglobina Bovina*", XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, outubro, 2005, 63.
- **Maria Celiana P. Lima** e Cristina Tristão de Andrade, "*Modificação química da hemoglobina bovina com dissacarídeos oxidados*", 8^a. Congresso Brasileiro de Polímeros (ABPol), Águas de Lindóia – SP, 2005, 47-48.

ARTIGO PUBLICADO: Andrade, C.T., Barros, L.A.M., **LIMA, M.C.P.** and Azero, E.G. (2004); "*Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions*", International Journal of Biological Macromolecules, **34**, 233-240.

SUMÁRIO

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 Sangue	04
2.2 Hemácias	05
2.3 Fosfolipídeos	08
2.3.1. Fosfoglicerídeos	08
2.3.2. Esfingolipídeos	09
2.4. Hemoglobina	10
2.4.1. Hemoglobina bovina	14
2.5. Carreadores de oxigênio	15
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAIS EMÉTODOS	30
4.1. Materiais	30
4.2. Metodologia	31
4.2.1. Isolamento das hemácias	31
4.2.2. Determinação da concentração de albumina	32
4.2.3. Hemólise	32
4.2.4. Microscopia óptica	33
4.2.5. Purificação adicional da HbBv	33
4.2.5.1. Lavagem da resina de troca iônica	33
4.2.5.2. Dinamização das resinas	34
4.2.5.3. Cromatografia em flash 12i	34
4.2.5.4. Cromatografia líquida em coluna	36

4.2.6. Determinação da concentração de hemoglobina	36
4.2.7. Avaliação da purificação da HbBv	37
4.2.7.1. Extração dos fosfolípidos residuais	37
4.2.7.2. HPLC	37
4.2.8. Eletroforese	38
4.2.8.1. Preparação das soluções para a eletroforese	38
4.2.8.2. Preparação dos géis para a eletroforese	40
4.2.8.3. Preparação das amostras para a eletroforese	41
4.2.8.4. Corrida eletroforética	41
4.2.8.5. Coloração e descoloração dos géis	41
4.2.8.6. Preparação dos padrões de proteínas para a eletroforese	41
4.2.9. Obtenção dos reagentes formadores de ligação cruzadas	42
4.2.9.1. Reações de oxidação dos dissacarídeos	42
4.2.9.2. Caracterização dos reagentes modificadores da HbBv ..	42
4.2.10. Reações de modificação da HbBv com os dissacarídeos oxidados	43
4.2.11. Caracterização dos produtos de HbBv modificados	44
4.2.11.1. Eletroforese SDS	44
4.2.11.2. HPLC	44
4.2.12. Testes biológicos <i>in vitro</i> dos produtos de HbBv modificados .	45
4.2.12.1. Estudo da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) de coelho <i>in vitro</i>	45
4.2.12.1.1. Obtenção do PRP e PPP	46
4.2.12.2. Teste preliminares de vasoconstrição <i>in vitro</i>	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. Determinação do teor de albumina no sobrenadante	49

5.2.	Ocorrência da hemólise	50
5.3.	Cromatografia de troca iônica	52
5.3.1.	Cromatografia em flash 12i	52
5.3.2.	Cromatografia líquida em coluna	57
5.4.	Determinação da concentração de hemoglobina	59
5.5.	Análise de HPLC	62
5.6.	Análise de eletroforese	71
5.7.	Obtenção dos reagentes formadores de ligação cruzada	74
5.8.	Modificação química da HbBv analisada por HPLC e por eletroforese	76
5.9.	Testes biológicos <i>in vitro</i> dos produtos de HbBv modificados ..	86
5.9.1.	Estudo da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) de coelho <i>in vitro</i>	86
5.9.2.	Teste preliminar de vasoconstrição <i>in vitro</i>	87
6.	CONCLUSÕES	91
7.	SUGESTÕES	92
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	ÍNDICE DE FIGURAS	103
	ÍNDICE DE TABELAS	109

1. INTRODUÇÃO

Um esforço considerável tem sido mobilizado para o desenvolvimento de expansores plasmáticos, capazes de carrear oxigênio, denominados substitutos para o sangue [1-6]. A molécula de hemoglobina (Hb) é capaz de carrear oxigênio mesmo fora da hemácia, após a eliminação da membrana celular, e tem sido usada como material de partida para a obtenção de substitutos temporários para o sangue [3,4,7].

Apesar dos avanços tecnológicos, o procedimento de transfusão ainda apresenta riscos para a saúde do doador e do receptor, como os riscos relacionados à transmissão de vírus (hepatite B e da hepatite C, HIV), à contaminação bacteriana, à transmissão de malária, da leishmaniose e da doença de Chagas [8-13].

Vários fatores incentivam o desenvolvimento de substitutos para o sangue. O mais importante deles constitui-se na demanda crescente, associada ao número decrescente de doações, e este fator é agravado com o envelhecimento da população e o aumento da expectativa de vida. Um déficit de 4 milhões de bolsas de sangue por ano foi projetado até 2030 nos EUA, país que gasta por ano o correspondente a 30 bilhões de dólares para manter os bancos de sangue. No Brasil, além de informações deficientes sobre doações, 20% dos doadores são considerados inaptos [14, 15]. Daí ser comum ouvirmos apelos insistentes de autoridades para que a população acorra aos bancos para doação.

Substitutos para o sangue vêm sendo desenvolvidos há vários anos. Esses produtos não substituem o sangue em funções metabólicas mais complexas e inter-relacionadas; a principal função desses produtos é a de transportar o oxigênio e o dióxido de carbono por um período limitado de tempo. Uma solução estável carreadora temporária de oxigênio ainda teria outras aplicações, como na conservação de órgãos para transplante e no aumento *in vivo* da sensibilidade de órgãos a terapias por radiação [16]. Além disso, um sistema carreador teria valor terapêutico em situações nas quais o sangue não é capaz de fornecer oxigênio aos tecidos, como em casos de infarto [17]. Como a tipagem prévia não se faz necessária, as transfusões instantâneas seriam facilitadas [18].

Existem várias razões para explorar o uso da hemoglobina bovina (HbBv) na questão dos carreadores de oxigênio. O sangue bovino está disponível em quantidade praticamente ilimitada pois, só no primeiro trimestre de 2005, o IBGE

(Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) mostrou um número de 6,489 milhões de cabeças de bovinos abatidos em abatedouros com inspeções municipais, estaduais e federais. Quando se considera o volume de sangue desperdiçado ou sub-aproveitado, muitas vezes descartado na natureza, verifica-se o quanto esse produto poderia valorizar-se caso viesse a ser usado como fonte de matéria-prima para a produção de hemoglobina e, adicionalmente, para a produção de substituto para o sangue. Fluidos obtidos a partir de hemoglobina bovina poderiam ser convencionalmente usados em cirurgias, perfusão e armazenamento de órgãos, na medicina veterinária. Uma variedade de outras aplicações poderia ser imaginada, onde a utilização da hemoglobina humana (HbA) não é necessária e de alto custo. Com relação à antigenicidade (capacidade de reagir com anticorpos resultantes de uma resposta imunológica) da hemoglobina bovina, torna-se relevante citar que o desenvolvimento de carreadores de oxigênio à base de Hb requer várias modificações na molécula de Hb. Conseqüentemente, alguns derivados destas modificações podem representar algum risco imunológico, independentemente da espécie de hemoglobina usada [15, 19].

A hemoglobina bovina tem uma afinidade por oxigênio menor do que a hemoglobina humana [20,21]. Isto é devido a sua alta sensibilidade a ânions [22,23], de forma que íons cloreto e não fosfatos orgânicos são os moduladores *in vivo* da afinidade de O₂ à HbBv. Como resultado, na concentração fisiológica de íons cloreto, a afinidade por O₂ da hemoglobina bovina livre do eritrócito é menor do que a da hemoglobina presente no sangue humano e bovino. Estas características conferem à HbBv a habilidade de liberar mais facilmente o oxigênio contra a pressão parcial de O₂ nos tecidos. Na realidade, o maior impedimento para o uso da hemoglobina humana (HbA) livre do estroma (SFH) como um carreador de oxigênio é que, fora da hemácia, a HbA perde fosfato orgânico, fator alostérico responsável pela regulação da afinidade ao O₂; a interação com o O₂ torna-se alta, o que dificulta a sua liberação para os tecidos [19].

Como podemos perceber, existe uma grande preocupação em desenvolver-se um sistema carreador de oxigênio eficiente e seguro. Muito já foi pesquisado nesta área, mas ainda não se tem um material aprovado para uso comercial. Quatro produtos encontram-se em fase de testes clínicos; dentre eles, temos um com excelentes resultados à base de Hb bovina, denominado de Hemopure. Resultados mostraram que ligações cruzadas intramoleculares na Hb humana com fumaril-

diaspirina não aumentaram a sua afinidade por oxigênio. Porém, a hemoglobina bovina tratada com este mesmo agente de ligação cruzada causou uma boa afinidade por O₂ e o tempo de retenção na circulação foi prolongado em 10 vezes com relação à Hb não-modificada [19, 24, 25]. Devido às vantagens acima relacionadas, aos resultados da literatura e às características do produto em fase de testes clínicos, a realização de modificações químicas na Hb bovina com intuito de obter-se um sistema carreador de oxigênio constitui-se na meta principal do presente trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SANGUE

O sangue [26, 27, 28] é o líquido que flui pelo sistema circulatório entre os diversos órgãos, e transporta nutrientes, hormônios, eletrólitos, água, resíduos do metabolismo celular e diversas outras substâncias. O sangue circula no organismo humano, onde carrega oxigênio dos pulmões para os tecidos, e o oxigênio é liberado nos capilares. Ao retornar dos tecidos, o sangue conduz dióxido de carbono e os demais resíduos do metabolismo celular, para eliminação através da respiração, do suor, da urina ou das fezes.

O sistema de defesa do organismo contra doenças e a invasão de germes patogênicos está concentrado no sangue. O equilíbrio e a distribuição de água, a regulação do pH através dos sistemas-tampão, o controle da coagulação e a regulação da temperatura correspondem a outras importantes funções exercidas pelo sangue.

O sangue é um tecido que contém uma fase sólida, que compreende os elementos figurados, e uma fase líquida, que corresponde ao plasma (Figura 1). A fase celular corresponde a 45% do volume de sangue e o restante (55%), ao plasma. Os elementos celulares do sangue são as hemácias, glóbulos vermelhos ou eritrócitos, os leucócitos ou glóbulos brancos e as plaquetas ou trombócitos.

As hemácias são as células encarregadas do transporte de oxigênio e gás carbônico do metabolismo celular; os leucócitos constituem um exército de defesa do organismo contra a invasão por agentes estranhos e as plaquetas são fragmentos celulares, fundamentais aos processos de hemostasia (ação ou efeito de estancar uma hemorragia) e coagulação do sangue.

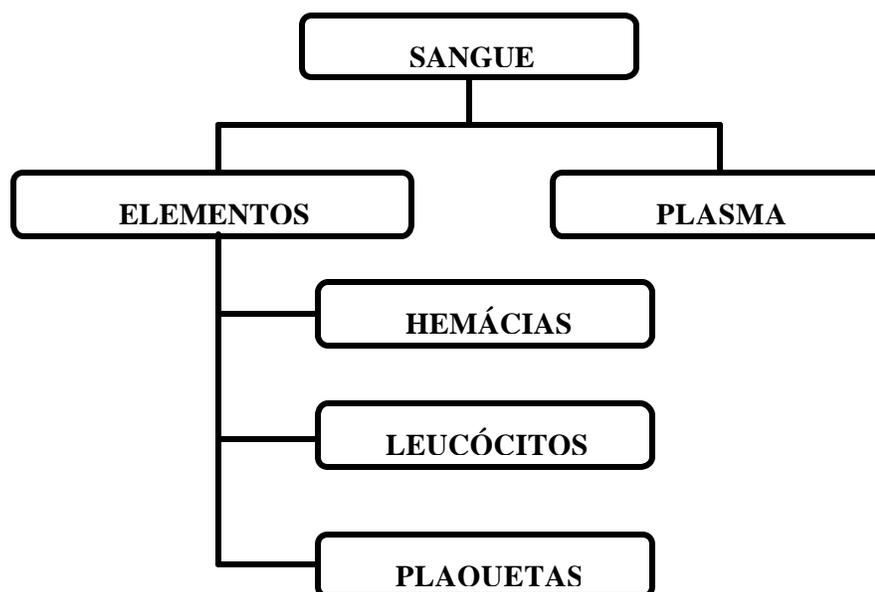


Figura 1 – Diagrama que mostra a composição do sangue [27]

O plasma é constituído por 10% de elementos sólidos e 90% de água. Os elementos sólidos do plasma são, principalmente, as proteínas, lípidos, hidratos de carbono, eletrólitos, sais orgânicos e minerais, enzimas, vitaminas e hormônios. Em cada litro de sangue existem cerca de 60 a 80 gramas de proteína. A maior parte delas é constituída pela albumina; em menores proporções estão as globulinas, relacionadas à formação de anticorpos para a defesa do organismo e o fibrinogênio, uma proteína fundamental nos processos de agregação plaquetária e de coagulação. As proteínas plasmáticas são muito sensíveis aos diversos tipos de traumatismos, inclusive o térmico. Se submetidas a temperaturas elevadas, da ordem de 45°C, podem ser desnaturadas perdendo suas funções.

2.2. HEMÁCIAS

Glóbulos vermelhos, eritrócitos ou hemácias são células anucleadas, bastante complexas, constituídas apenas por membrana plasmática e citoplasma. Originam-se na medula óssea pela proliferação e maturação dos eritroblastos, fenômeno chamado eritropoese. As hemácias possuem forma final anucleada, homogênea de corpúsculos circulares, bicôncavas e de diâmetro médio de 8 μ m e espessura de 2 μ m na periferia e cerca de 1 μ m na sua porção central. As funções primordiais dos

glóbulos vermelhos são a de transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos, mantendo a perfusão tissular adequada, e transportar CO₂ dos tecidos aos pulmões. A hemoglobina, que constitui 95% das proteínas das hemácias e está localizada em seu interior, é a responsável por estas funções [27,28].

A forma bicôncava das hemácias é devida a um excesso de membrana, em relação ao conteúdo celular (Figura 2). A membrana em excesso permite à hemácia alterar a sua forma na passagem pelos capilares, sem sofrer distensão ou ruptura. Este formato da hemácia favorece a existência de uma grande superfície de difusão [27,28].

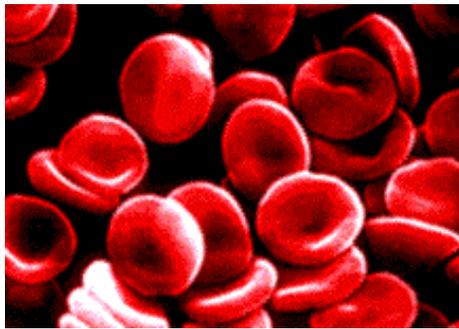


Figura 2 – Estrutura bicôncava das hemácias [28]

A membrana eritrocitária é constituída por uma complexa mistura de fosfolipídeos, colesterol não-esterificado e glicolipídeos arranjados sob forma de camada dupla, onde estão distribuídos ao acaso canais protéicos transmembrana e receptores (Figura 3). Os fosfolipídeos são constituídos por fosfatidilcolina (FC) e esfingomiéline (EM), localizados principalmente na porção externa da bicamada lipídica, enquanto a fosfatidilserina (FS) e a fosfatidiletanolamina (FE) encontram-se predominantemente na camada interna. Uma translocase dependente de ATP, denominada lipase, faz o transporte destes fosfolipídeos para a camada interna. Aparentemente, a exposição de FS e FE na superfície da membrana pode induzir a ativação de fatores da coagulação e causar adesão das hemácias aos macrófagos [28].

As proteínas da membrana são de dois tipos: integrais e periféricas. As proteínas integrais, representadas pela banda 3 e glicoforinas, são glicoproteínas que atravessam toda a dupla camada de lipídeos, enquanto as proteínas periféricas formam o citoesqueleto eritrocitário, localizado logo abaixo da camada lipídica. O citoesqueleto é constituído basicamente de espectrinas alfa e beta, anquirina,

filamentos curtos de actina, tropomiosina, aducina e proteínas 4.1 e 4.2 (ou palidina), 4.9 (ou dematina) e p55. Estas proteínas sustentam cerca de 60% da dupla camada lipídica pelas ligações entre: a) anquirina e banda 3; b) proteína 4.1 e glicoforinas A e C; c) interação direta da espectrina e proteína 4.1 com cargas negativas dos lipídeos. O citoesqueleto é fundamental para a manutenção da forma bicôncava e da flexibilidade da hemácia e, conseqüentemente, para sua estabilidade em circulação [28].

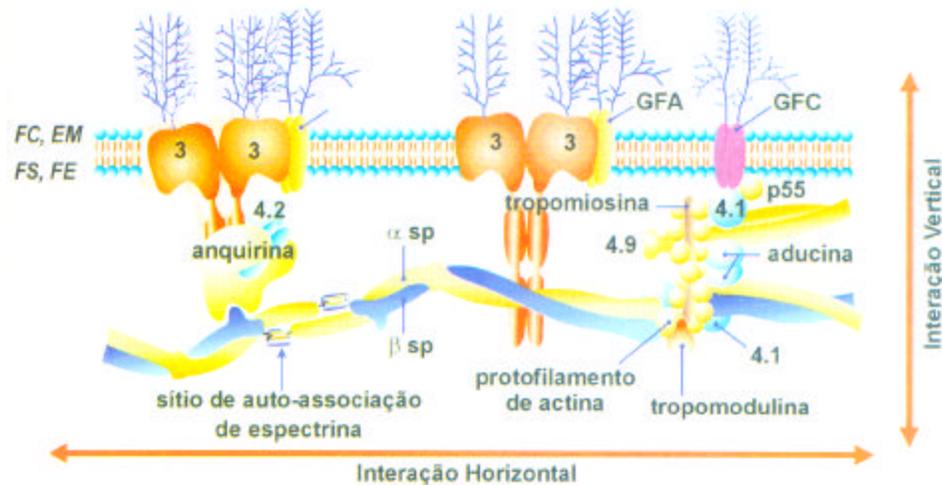


Figura 3 – Representação esquemática dos constituintes da membrana eritrocitária. Observar a dupla camada lipídica constituída por fosfatidilcolina (FC), esfingomielina (EM), fosfatidilserina (FS) e fosfatidiletanolamina (FE), as proteínas integrais banda 3 (3) e glicoforinas A (GFA) e C (GFC) e as proteínas periféricas espectrinas alfa e beta (α sp e β sp), anquirina, proteínas 4.1, 4.2, 4.9, p55, actina, tropomiosina, aducina e tropomodulina. Vários antígenos eritrocitários encontram-se localizados nas proteínas integrais [28]

A composição lipídica da membrana da hemácia bovina consiste de esfingomielina > fosfatidiletanolamina > fosfatidilcolina. Já para a hemácia humana, encontramos a seguinte composição: fosfatidilcolina > fosfatidiletanolamina > fosfatidilserina > esfingomielina [29, 30].

Após cerca de 120 dias em circulação, em virtude de seu esgotamento metabólico e alterações degenerativas, as hemácias são removidas e destruídas intracelularmente em células do sistema monocítico-macrofágico, especialmente no baço, fígado e medula óssea. De grande interesse é o mecanismo pelo qual as

hemácias envelhecidas são reconhecidas e eliminadas de circulação. Vários fatores contribuem para isso, em especial a redução da atividade metabólica e oxidação da hemoglobina. Um mecanismo largamente aceito para explicar a eliminação de hemácias envelhecidas é a formação de agregados de proteína de banda 3 (uma das mais abundantes proteínas transmembranais da hemácia) estabilizados por moléculas de hemoglobina oxidadas (hemicromos). Estes agregados seriam reconhecidos como antígenos por anticorpos IgG autólogos e complemento. Com a decomposição de uma densidade crítica de anticorpos e moléculas de complemento, as hemácias que estão envelhecendo (senescentes) seriam reconhecidas e eliminadas. Após fagocitada, a hemácia é decomposta em seus componentes, sendo os mais importantes a membrana e a hemoglobina. Proteínas e fosfolipídeos da membrana são digeridos. A hemoglobina é decomposta em globina (que é metabolizada dando origem a aminoácidos) e heme, que por sua vez, com a abertura do anel de protoporfirina, libera o ferro e forma a bilirrubina, onde o ferro permanece no macrófago e será reaproveitado na síntese de hemoglobina [28].

2.3. FOSFOLIPÍDEOS

Os fosfolipídeos são derivados ou do glicerol, um álcool com três átomos de carbono, ou da esfingosina, um álcool mais complexo. Os fosfolipídeos derivados do glicerol são denominados de fosfoglicerídeos.

2.3.1. Fosfoglicerídeos

Um fosfoglicerídeo consiste de um esqueleto de glicerol, duas cadeias de ácidos graxos e um álcool fosforilado. Nos fosfoglicerídeos, um dos grupos hidroxílicos primários do glicerol é esterificado com ácido fosfórico; os outros grupos hidroxílicos são esterificados com ácidos graxos. O composto fundamental da série é, portanto, o éster fosfórico do glicerol. Esse composto tem um átomo de carbono assimétrico e pode ser designado tanto como D-glicerol-1-fosfato ou como L-glicerol-3-fosfato. Por essa ambigüidade, a estereoquímica dos derivados do glicerol é baseada na numeração estereoespecífica (sn) dos átomos de carbono. Em adição aos dois resíduos de ácidos graxos esterificados a grupos hidroxílicos nos átomos de carbono 1 e 2, os fosfoglicerídeos contêm um grupo polar na cabeça, a saber, um

álcool designado X-OH, cujo grupo hidroxílico é esterificado a ácido fosfórico (Figura 4) [29].

Devido ao fato de os fosfoglicerídeos possuírem cabeça polar além de suas caudas com grupos hidrocarbonetos não-polares, eles são chamados de lipídeos anfílicos ou polares. Os diferentes tipos de fosfoglicerídeos diferem quanto ao tamanho (ácidos graxos com 16 e 18 átomos de carbono são os mais comuns), forma (ácidos graxos podem ser saturados ou insaturados, a configuração das duplas ligações é quase sempre *cis*), e quanto à carga elétrica de seus grupos polares da cabeça. Geralmente existe um ácido graxo saturado e um insaturado, o último na posição 2 do glicerol [29,31].

Os fosfoglicerídeos mais abundantes em plantas superiores e animais são a fosfatidiletanolamina (FE) e a fosfatidilcolina (FC), as quais contêm como grupos da cabeça os aminoácidos etanolamina e colina, respectivamente. A Figura 4 mostra uma representação esquemática da estrutura dos fosfoglicerídeos. Na fosfatidilserina (FS), o grupo do aminoácido L-serina é esterificado a ácido fosfórico [29].

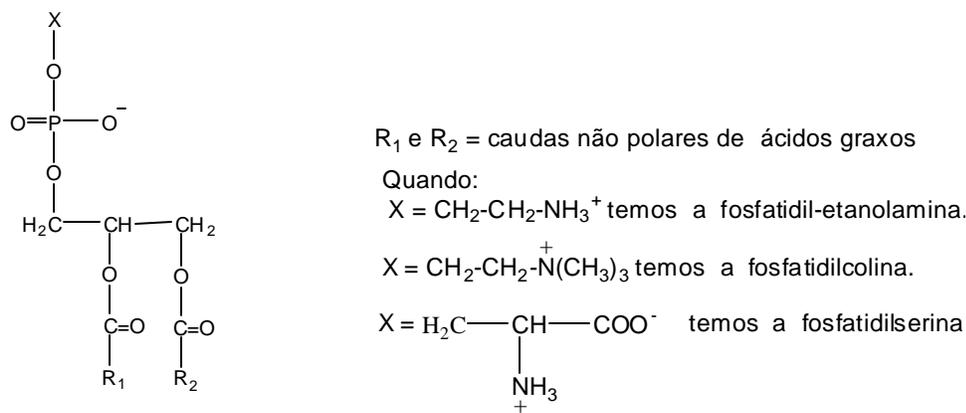


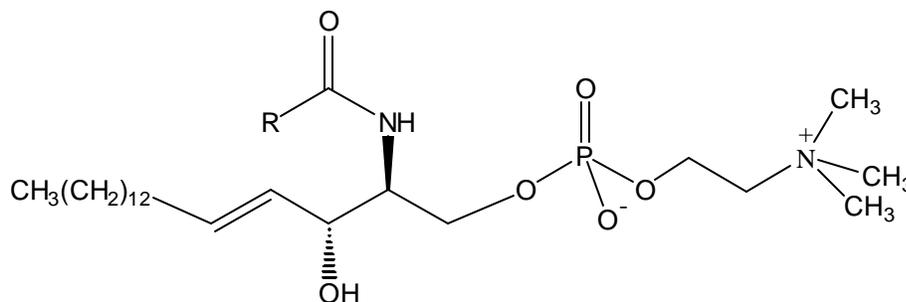
Figura 4 – Estrutura dos fosfoglicerídeos [29]

2.3.2. Esfingolipídeos

Os esfingolipídeos são lipídeos complexos contendo como esqueleto a esfingosina, ou uma base relacionada. São importantes componentes da membrana, tanto em células vegetais quanto em células animais. Todos os esfingolipídeos contêm uma molécula de ácido graxo, uma molécula de esfingosina ou um de seus

derivados, e um grupo polar na cabeça, que em vários esfingolípídeos é muito grande e complexo [29].

A esfingomielina é o único fosfolípídeo das membranas que não é derivado do glicerol. Ao contrário, o esqueleto na esfingomielina é a esfingosina, um amonoálcool que contém uma longa cadeia hidrocarbonada insaturada. Na esfingomielina, o grupamento amino do esqueleto esfingosina está ligado a um ácido graxo por uma ligação amida. Adicionalmente, o grupamento hidroxila primária da esfingosina é esterificado por fosforil colina [29]. As esfingomielinas (Figura 5) têm propriedades físicas muito similares às da fosfatidil-etanolamina e da fosfatidilcolina; elas são íons híbridos (zwitterions) em pH 7,0 [29].



R = cauda não polar de ácidos graxos.

Figura 5 – Estrutura da esfingomielina [29]

Quando é realizada a hemólise da parede celular das células vermelhas do sangue, os resíduos de fosfolípídeos remanescentes, EM e FC podem ocasionar coagulação sanguínea tornando-se tóxicos e provocando uma reação inflamatória sistêmica, caracterizada pela ativação do complemento. FS e FE normalmente se encontram no interior da membrana dos eritrócitos, e apresentam uma afinidade particular pela hemoglobina, quando comparados aos outros fosfolípídeos. A interação de FS e FE com a Hb causa atividade inflamatória [32, 33].

2.4. HEMOGLOBINA

A molécula de hemoglobina é formada por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias α constituídas de 141 resíduos de aminoácidos cada e duas cadeias β encadeadas por 146 resíduos de aminoácidos cada. As cadeias α e β têm seqüências de aminoácidos diferentes e encontram-se arranjadas em estruturas

tridimensionais semelhantes, mediante interações não-polares e ligações de hidrogênio. A molécula de hemoglobina apresenta uma conformação quase esférica (globular), com diâmetro de 55 Å, onde as quatro cadeias formam um tetrâmero protéico como mostra a Figura 6, a qual apresenta o grupo heme (cinza e azul) e o átomo de ferro central (vermelho) [34,35].

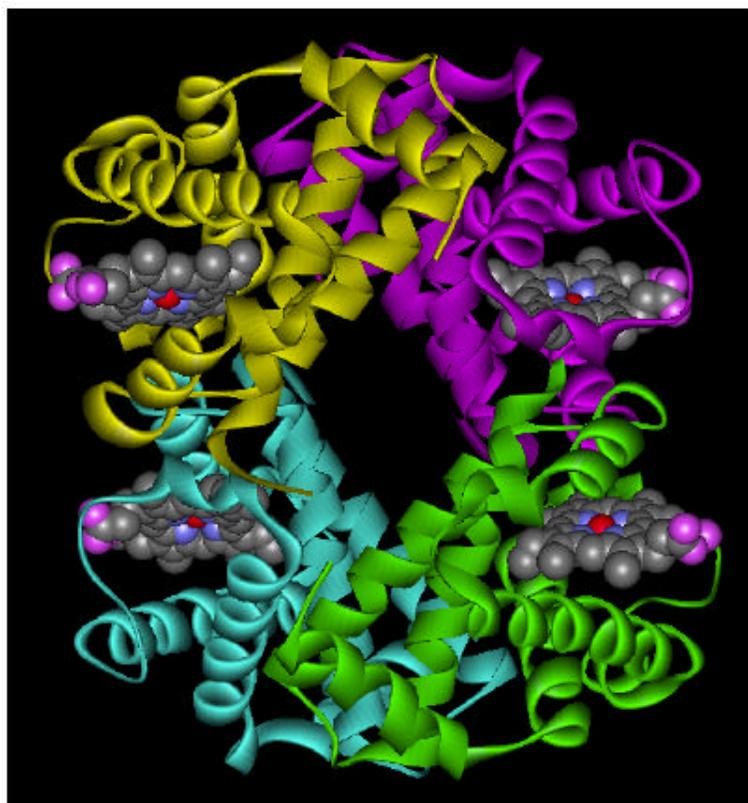


Figura 6 – Modelo espacial da estrutura da hemoglobina desoxigenada e suas quatro cadeias: duas (amarela e rosa) e duas (ciano e verde) com seus respectivos hemes [36]

Além da parte protéica, a Hb contém grupos não-protéicos (prostéticos) de conformação planar denominados heme (ferroprotoporfirina). Os grupos heme consistem de quatro anéis pirrol arranjados concentricamente em torno de um átomo de ferro. Estes grupos heme formam complexos reversíveis com a molécula de O_2 , o que permite que ela seja transportada dos pulmões até os tecidos. Esta ligação entre o complexo heme e a molécula de oxigênio (Figura 7) é fraca e instável e

depende de uma série de fatores, tais como pH, temperatura e, principalmente, da pressão parcial de O_2 na qual a hemoglobina se encontra [37].

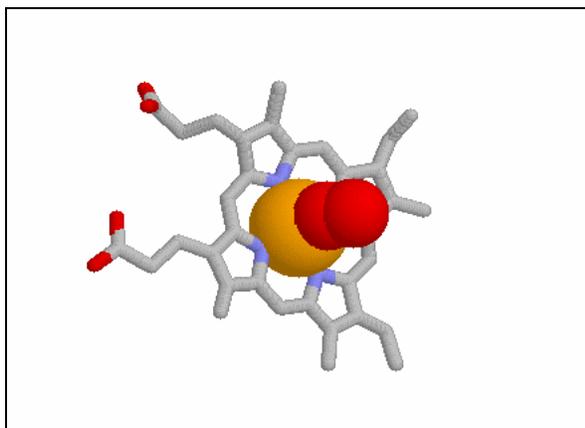


Figura 7 – Complexo ferro-protoporfirina ligado a uma molécula de O_2 [36]

O complexo entre a Hb e o O_2 forma-se rápido e reversivelmente, sendo que cada molécula de Hb pode combinar-se com quatro moléculas de O_2 , cada uma delas ligada a um dos grupos heme da proteína. Assim, a primeira molécula de O_2 liga-se fracamente à desoxi-hemoglobina (Hb não oxidada), embora acelere a ligação de mais O_2 a outras sub-unidades heme da Hb, até atingir a liberação do oxigênio. O mesmo fenômeno acontece no sentido inverso, para a liberação do oxigênio. Isto significa que a Hb tende a ligar-se à quarta molécula de O_2 trezentas vezes mais rápido do que à primeira. A esse fenômeno dá-se o nome de cooperatividade. Esta cooperatividade entre os grupos heme é originada a partir das estruturas conformacionais assumidas pelas unidades protéicas da molécula de Hb.

A transição da estrutura T (desoxigenada) para a estrutura R (oxigenada) explica as diferenças na afinidade ao O_2 , exibidas pela desoxi- e pela oxihemoglobina. Em uma baixa concentração de oxigênio, quando a Hb se encontra principalmente desoxigenada, a estrutura quaternária no estado T (tensa) é favorecida. Com o aumento na concentração de oxigênio e, portanto do grau de saturação, o equilíbrio é deslocado para uma estrutura de alta afinidade, estado relaxado (R) [31, 38-42].

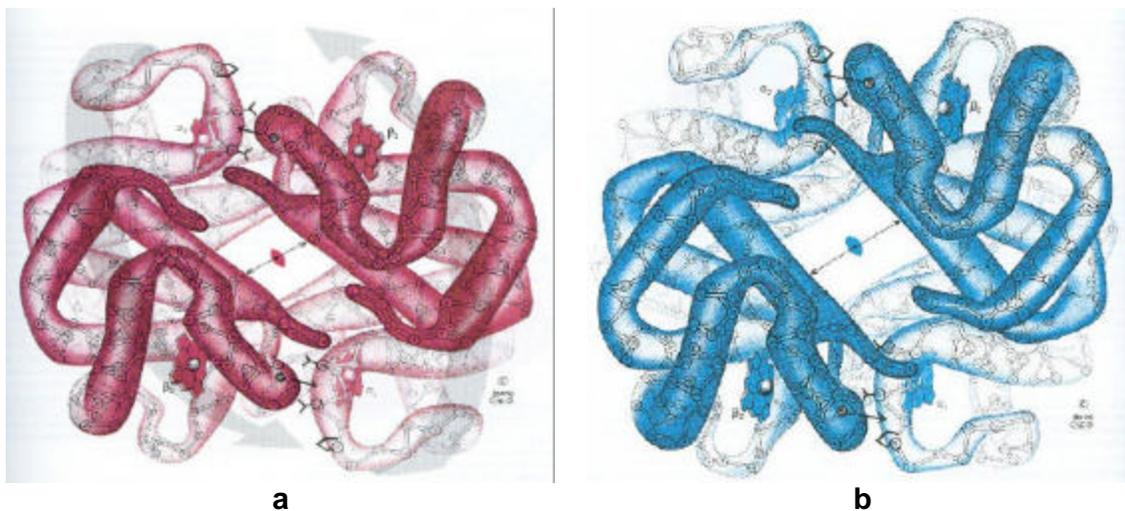


Figura 8 – Estrutura da Hb oxigenada/relaxada (a) e desoxigenada/tensa (b)
[31]

O transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos é efetuado pela hemoglobina situada no interior das hemácias. Nos tecidos, o CO_2 produzido pelo metabolismo celular difunde-se até as hemácias, onde é hidratado em uma reação catalisada pela anidrase carbônica e convertido a ácido carbônico, que se ioniza em bicarbonato (HCO_3^-) e H^+ . O bicarbonato é transportado pelo sangue até os pulmões, onde é eliminado como CO_2 ; os íons H^+ são removidos pela hemoglobina que, além de transportar oxigênio, exerce um efeito tamponador e impede que os íons H^+ possam alterar o pH do sangue, com conseqüências prejudiciais para o organismo [43].

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é tanto maior quanto maior for o pH. Por outro lado, quando há diminuição na concentração de O_2 , a transição de oxihemoglobina para desoxi-hemoglobina é acompanhada de mudanças conformacionais, essas alterações na molécula provocam um aumento da afinidade de alguns radicais da proteína por H^+ . A análise deste fenômeno revela o papel fundamental da hemoglobina na manutenção do pH plasmático pois, à medida que a concentração de O_2 diminui e a concentração de H^+ aumenta, a hemoglobina libera O_2 e capta H^+ . Quando a concentração de O_2 aumenta e a de H^+ diminui, a Hb liga-se ao O_2 e passa a liberar H^+ . Essas são as condições encontradas ao nível de tecidos e de alvéolos pulmonares, respectivamente. Este efeito do pH e da

concentração de CO_2 sobre a ligação e liberação do oxigênio pela hemoglobina é chamado de efeito Bohr [29, 31, 43].

Existem quatro reguladores primários na ligação hemoglobina-oxigênio: CO_2 ; 2,3 difosfoglicerato (2,3-DPG); HCO_3^- e Cl^- . O ácido 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) é um intermediário do metabolismo da glicose e este penetra entre as cadeias de hemoglobina, onde uma molécula se liga a dois grupos amino terminais de cadeias diferentes, e compete com o oxigênio, deslocando-o. A concentração de 2,3-DPG aumenta quando o eritrócito carece de oxigênio e seu efeito soma-se ao provocado pelo aumento de íons hidrogênio e dióxido de carbono, acelerando a dissociação da oxi-hemoglobina para suprir as células com mais oxigênio [44].

2.4.1. Hemoglobina bovina

É possível comparar as cadeias α e β da hemoglobina de espécies diferentes. Para esta comparação, alinham-se as cadeias de acordo com o maior número de aminoácidos coincidentes. Na maioria dos casos, ou há uma substituição de aminoácido ou um aminoácido simplesmente encontra-se ausente. A diferença é mostrada na Tabela 1 [44].

Tabela 1 - Número de aminoácidos diferentes dos da hemoglobina humana [44]

Espécie	α	β
Chimpanzé	0	0
Cavalo	18	26
Boi	17	26

A afinidade ao oxigênio por células vermelhas bovinas pode ser modulada por adição ou redução de íons Cl^- da mudança de pH do meio. Em condições fisiológicas de pH e de íons Cl^- , a afinidade da hemoglobina bovina ao oxigênio é menor do que a hemoglobina humana. Em presença de íons Cl^- , a hemoglobina bovina não é sensível ao 2,3-DPG, enquanto que na ausência de íons Cl^- , as hemoglobinas bovina e humana respondem ao 2,3-DPG de forma semelhante. Isto é devido à ligação altamente preferencial do halogênio pela conformação *desoxi* no sistema

bovino. A reação da desoxi-hemoglobina com 2,3-dibromo-salicil-fumarato resulta em uma diminuição da afinidade ao oxigênio. As células vermelhas bovinas não contêm 2,3-DPG e, então, podem ser armazenadas sob refrigeração em solução salina por pelo menos 2 meses sem modificações significativas em relação à afinidade ao oxigênio. A baixa meia-vida plasmática em ratos, demonstrada em alguns experimentos, também incentiva a utilização dessa proteína como um carreador de oxigênio em experimentos de perfusão de órgãos [45]. Outro fator a favor da utilização da Hb bovina é que ela aparentemente não leva a uma rápida formação de anticorpos quando injetada em outras espécies [46].

2.5. CARREADORES DE OXIGÊNIO

Em 1916, Sellards e Minot [47] introduziram células vermelhas do sangue (RBC) hemolisadas em humanos com a intenção de avaliar a tolerância ao hemolisado. Reconhecendo que a hemoglobina extracelular existe em certos invertebrados, Amberson e colaboradores [48] foram creditados com o primeiro estudo *in vivo*, que estabeleceu a capacidade das soluções de hemoglobina de transportar O_2 em mamíferos. Em 1933, usando um hemolisado bovino, eles o introduziram em gatos com funções neurológicas intactas e observaram a morte desses animais após 5 horas, não por causa da hemoglobina ser incapaz de carrear oxigênio, mas devido à hemorragia. Por volta de 1967, foi observado que pequenas quantidades de estroma (tecido conjuntivo que constitui as hemácias) levava a choque anafilático [49]. Posteriormente, Savitsky [50] demonstrou que uma solução de hemoglobina pura não-modificada, usada como um substituto para o sangue, resultava em várias toxicidades, tais como no aumento da pressão sanguínea, bradicardia, coagulação prejudicada e disfunção renal.

Duas estratégias para o desenvolvimento de um carreador artificial de oxigênio foram consideradas [51]. A primeira envolve as soluções carreadoras à base de hemoglobina, em que a molécula de oxigênio está ligada ao carreador. Na segunda, a molécula de oxigênio está dissolvida na substância carreadora, representando o grupo dos perfluorocarbonos.

As soluções de hemoglobina modificada e emulsões de perfluorocarbono são diferentes e estão resumidos na Tabela 2 [52].

Tabela 2 – Vantagens e desvantagens das soluções de hemoglobina e das emulsões de fluorocarbono [52]

	Vantagens	Desvantagens
<i>Soluções de hemoglobina</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Transporte e entrega de O₂ - Curva sigmoideal de dissociação de O₂ - Fácil de manusear 	<ul style="list-style-type: none"> - Efeitos colaterais como vasoconstrição e interferência no método de análise colorimétrico
<i>Emulsões de fluorocarbono</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Transporte e entrega de O₂ - Poucos efeitos colaterais - Toxicidade desconhecida 	<ul style="list-style-type: none"> - Acúmulo no retículo endoplasmático - Surfactantes fazem-se necessários e causam toxicidade

Algumas características devem ser incorporadas em um sistema substituto de hemácias [2, 53]:

- Universal (sem incompatibilidade);
- Isenta de desencadear alergia;
- Sem riscos de transmissão de doenças (vírus);
- Propriedades fisiológicas normais (osmolaridade, viscosidade);
- Sem outras atividades que não o transporte e liberação de oxigênio;
- Longo tempo de permanência vascular;
- Capacidade de ser armazenado por tempo prolongado;
- Estável a alterações de temperatura;
- Custos reduzidos na produção;
- Capacidade de produção em larga escala;

Como potenciais áreas clínicas de aplicação destes produtos, a maior parte dos estudos [54-56] com substitutos sanguíneos tem sido conduzidas em cirurgias cardiovasculares, com o propósito primário de evitar a transfusão alogênica neste grupo de paciente. O método visa a utilização da substância carreadora em combinação com doação autóloga per-operatória. Em outro método, o composto em estudo é administrado somente quando os limites para transfusão são atingidos.

Várias aplicações [18, 57,58], além da cirurgia cardíaca, têm sido descritas, entre elas a reposição e estabilização da volemia em pacientes politraumatizados, em cirurgia eletiva (ortopedia, oncologia) associada à hemodiluição normovolêmica ou como reposição volêmica per-operatória, ou em condições que necessitem do aumento do transporte de oxigênio, como na doença vascular periférica e na angioplastia.

Carreadores de oxigênio à base de hemoglobina utilizam como substrato a molécula de hemoglobina obtida de unidade de sangue com data de validade expirada, do sangue bovino ou obtidas por meio da engenharia genética [59].

A hemoglobina livre de estroma (SFH) não pode ser usada diretamente depois de purificada como fluido transportador de O_2 na circulação porque se dissocia em dímeros, que são rapidamente oxidados e excretados pelos rins (Figura 9). Devido à redução do peso molecular da Hb (64 kDa), os dímeros são facilmente filtrados pelos glomérulos, causando toxicidade renal e reduzindo o tempo de meia-vida na circulação. Um aumento na meia-vida plasmática ocorre a troca da eliminação pelos rins destes produtos de Hb modificadas para o metabolismo pelo fígado e sua excreção na bile que é um modo mais desejável de eliminação. Além disso, a Hb livre de estroma encontra-se também isolada dos fosfatos orgânicos (DPG), substâncias que regulam a afinidade do complexo Hb- O_2 . Deste modo, a hemoglobina não tem a capacidade de transportar o oxigênio de maneira eficiente para os tecidos. Temos também problemas causados por reações anafiláticas que são devidos a lipopolissacarídeos ligados à molécula de Hb e à coagulação vascular, que resulta de resíduos do estroma liberados durante a obtenção da Hb [52]. Por outro lado, a hemoglobina é um material biocompatível que transporta O_2 nas quantidades para o metabolismo tecidual e, por isso, modificações químicas da hemoglobina livre de estroma devem ser feitas para usá-la em formulações de expansores plasmáticos com capacidade transportadora de O_2 e assim serem

utilizados como substitutos para o sangue. Várias estratégias foram usadas no sentido de aumentar as propriedades fisiológicas da SFH para propiciar sua função como carreador de oxigênio eficiente e para as terapias necessárias. As modificações químicas incluem a formação de ligações cruzadas intramoleculares, a polimerização, a conjugação e o uso de combinação tecnológica para sintetizar Hb que seja eficiente e segura [37, 58, 60-72].

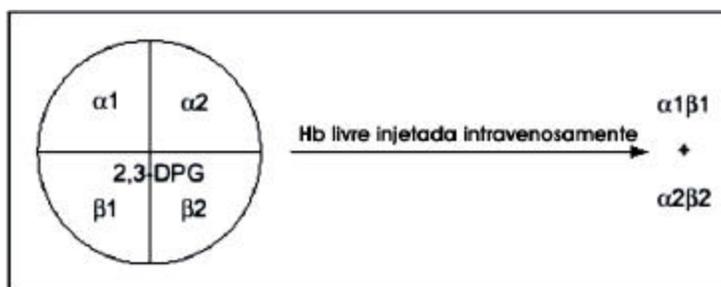


Figura 9 - Molécula de Hb livre como um tetrâmero, constituído de quatro sub-unidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$), e que retém 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), o qual auxilia no transporte do O_2 . Quando a Hb livre é injetada intravenosamente, ocorre a dissociação do tetrâmero e a formação de dois dímeros, o que é tóxico para os rins [60]

Tais modificações requerem o uso de agentes de ligações cruzadas que promovam a reticulação intramolecular das cadeias de Hb e aumentem o tempo de retenção vascular, evitando sua eliminação pelos rins, ou seja, evitando a formação dos dímeros. As modificações químicas que a Hb tem sofrido para transformá-la em um carreador de oxigênio envolvem um número limitado de reações, que incluem essencialmente alquilação redutiva e a acilação de grupos amina primária, amidação de funções carboxílicas, e alquilação S de grupos sulfidrila. Os reagentes para a modificação química da hemoglobina devem ser atóxicos, não-imunogênicos e devem apresentar o mínimo de atividade detergente para evitar a desnaturação da proteína [17].

Antes de a Hb ser submetida a reações de modificação química, ela precisa ser obtida com alto grau de pureza. O critério para que a hemoglobina seja considerada pura reside na eliminação total dos fosfolipídeos oriundos da parede celular e das proteínas residuais do plasma [73]. Estudos mostram que as condições de hemólise interferem no grau de pureza da Hb. Para quatro procedimentos

diferentes utilizando água, solução tampão de tris-HCl pH7,4, solução de NaCl a 0,001 M e ultra-som, o último método levou a maiores percentuais de células hemolisadas, maior concentração de Hb e menor quantidade de fosfolípidos após purificação de uma solução de Hb humana [36, 74].

Existem dois sítios principais nos quais os agentes de ligação cruzada podem ligar-se às hélices da Hb. O primeiro sítio corresponde aos resíduos de lisina 82 da cadeia de globina α , o que leva à formação de uma ligação cruzada α - α . O segundo sítio ocorre entre as cadeias da globina β nos resíduos de lisina 99 e resulta em uma ligação do tipo β - β na Hb. Os grupamentos ϵ -amino do resíduo de lisina são os mais abundantes na molécula da Hb e grande parte deles está na superfície da proteína [17]. Contudo, existem ao todo 44 resíduos de lisina com grupos ϵ -amino nas cadeias laterais, 28 resíduos de ácido aspártico, 24 resíduos de ácido glutâmico com grupamentos ácido carboxílico nas cadeias laterais, alguns grupos imidazóis da histidina; grupos guanino da histidina e grupos fenólicos da tirosina, que podem participar de várias reações [17]. São em geral caracterizadas como reações de sítio específico as reações de piridoxilação, carboximetilação, alquilação-S e reações para a formação de ligações cruzadas, que utilizem reagentes carregados negativamente, enquanto que reações de polimerização e conjugação a polímero, tais como reações com glutaraldeído, glicolaldeído e polissacarídeos oxidados por NaIO_4 ocorrem essencialmente ao acaso em diversos sítios na superfície da proteína. A aparente especificidade de um reagente é freqüentemente um simples reflexo da diferença na velocidade de reação e pode mudar com o meio e razão reagente/proteína [75, 76]. Modificações químicas sucessivas levam ao aumento da heterogeneidade dos produtos e em alguns casos, os diversos reagentes competem por um mesmo sítio reativo. Cada modificação pode obviamente ter conseqüências nas propriedades da proteína. As sub-unidades ligadas durante os diferentes tipos de reação de modificação estão representadas pela Figura 10.

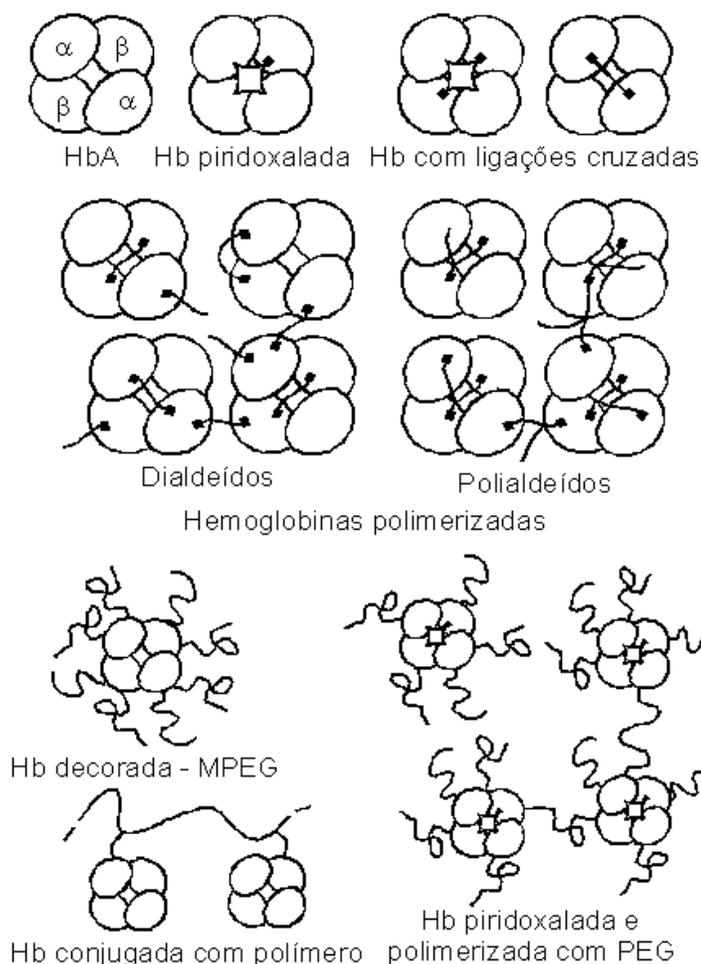


Figura 10 – Esquema das principais reações de modificação química em hemoglobinas [17]

O uso de agentes de ligação cruzada para aplicações específicas em bioquímica tem-se difundindo. Existe uma ampla variedade de reagentes sintéticos e naturais. Eles são usados em estudos da estrutura e das funções de proteínas e de outras macromoléculas [83-85]. Os agentes de ligação cruzada mais citados na literatura são: derivados salicílicos [(bis-3,5-dibromossalicílico) fumarato, sebacato, succinato e glutarato], derivados de carboxilato de benzeno [pentacarboxilato de benzeno (BPC), tetracarboxilato de benzeno (BTC)], derivados de fosfato de piridoxila [tetrafosfato de bis-piridoxila (bis-PL)P4 e 5-fosfato de 2-nor-2-formilpiridoxal (NFPLP)] bem como modificações nas unidades de aminoácido da Hb recombinante, que resultam na infusão das cadeias ?? da Hb. Muitos outros agentes de ligação cruzada vêm sendo utilizados sem apresentar resultados relevantes para estudos *in vivo*. Agentes tais como a rafinose oxidada e glutaraldeído têm-se

mostrado efetivos para a obtenção de Hb polimerizada. O poli(glicol etilênico) (PEG), um PEG modificado na forma de γ -carboximetil- γ -carboximetoxipolioxietileno, reage com a Hb no exterior do tetrâmero, aumentando o \overline{M}_w (Figura 10). Muitos destes agentes de modificação química atualmente são usados em produtos que se encontram em fases diferentes de testes clínicos [80].

Dentre os principais produtos à base de Hb modificada que se encontram em fase de testes clínicos, pode-se citar o *Hemolink* (Hemosol Inc.), o *PolyHeme* (Northfield Laboratories Inc.), o *PHP* (Apex Bioscience) e o *Hemopure* (Biopure Corp.), que têm mostrado resultados favoráveis para uso farmacológico.

O *Hemolink* é obtido a partir da reação de Hb humana com a α -rafinose (polialdeído obtido a partir do trissacarídeo rafinose após oxidação com periodato), que leva à formação de ligações cruzadas intra- e intermoleculares. Apresentou meia-vida entre 14 e 20 horas, podendo ser armazenado a 4 °C por aproximadamente um ano [81, 82]. Este produto encontra-se na fase III dos estudos clínicos no Canadá e Reino Unido, onde 299 pacientes submetidos a cirurgia cardíaca receberam 750 mL do produto. Os resultados sugerem um perfil favorável em relação à sua segurança e eficácia. O *Hemolink* surge como uma importante alternativa à transfusão alogênica de sangue em razão da facilidade da doação autóloga per-operatória em cirurgias cardíacas. A aprovação clínica do produto foi solicitada no Canadá, porém dois estudos estão em andamento no Reino Unido e Estados Unidos [83,84].

Para a obtenção do *PolyHeme*, a Hb humana foi piridoxalada e polimerizada com glutaraldeído. O produto parece consistir de uma mistura heterogênea [37]. O piridoxal fosfato é uma co-enzima natural relacionada à vitamina B6, com função análoga ao DPG. As cargas negativas do grupo fosfato posicionam o reagente no sítio antes preenchido com o DPG. O grupo imina formado é reduzido a amina com boroidreto de sódio.

O *PHP* resulta da piridoxilação da Hb humana seguida da formação de ligações cruzadas intra- e intermoleculares com o poli(glicol etilênico) [85].

O *Hemopure* consiste de Hb bovina polimerizada por meio da formação de ligações cruzadas com glutaraldeído e purificada para reduzir o tetrâmero de Hb residual em menos de 3%. Pouca informação é dada sobre a caracterização química, mas os sítios mais prováveis de reação com o glutaraldeído são os grupos

?-amino de resíduos de lisina [17]. Apresenta meia-vida circulante em torno de 9 a 24 horas, menor afinidade ao oxigênio ou seja um baixo P_{50} (pressão parcial de oxigênio na qual 50% dos hemes estão ocupados) ($P_{50} = 34$ mmHg), podendo ser armazenada em temperatura ambiente por até dois anos [87]. O *Hemopure* foi avaliado em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca e vascular [56, 87]. Nos pacientes submetidos à revascularização do miocárdio, a transfusão sangüínea foi evitada em 34% contra 0% no grupo controle. Estudos pré-clínicos [88-90] envolvendo a ressuscitação hipovolêmica em modelo animal sugerem que o uso do *Hemopure* restaura rapidamente a função cardiovascular, o que permite suficiente perfusão tissular e transporte de oxigênio. Jahr e colaboradores [91] demonstraram em pacientes submetidos à cirurgia ortopédica uma redução na transfusão em 59,4% no grupo *Hemopure*, 42 dias após a cirurgia. Este percentual alcançou 96,3% dos pacientes no dia da cirurgia. Estes resultados, segundo os autores, significam a efetividade do composto em eliminar a necessidade de transfusão em um grande percentual de pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas. Segundo Stowell C.P. [92] o *Hemopure* foi aprovado para uso limitado em humanos na África do Sul, e o *Oxyglobin*, um produto semelhante ao *Hemopure*, foi licenciado para uso na medicina veterinária.

No presente estudo, a hemoglobina é de origem bovina, e a reação que utilizamos foi a de oxidação de dissacarídeos com periodato de sódio. A oxidação com periodato de sódio é uma reação simples e bastante usada como ferramenta na elucidação estrutural de carboidratos complexos [93]. A oxidação de amido com periodato até pouco tempo atrás, era uma das poucas reações usadas para obter-se novas propriedades com aplicações industriais [94,95]. No entanto, a modificação por oxidação com periodato tem sido proposta para outros polissacarídeos como a pullulana [95], a escleroglucana [97-100] e a goma guar [101] como materiais funcionalizados capazes de reagir com quitosana ou ainda serem utilizados para interação com metais pesados [98].

A reação com o periodato é seletiva, pois ela ocorre entre átomos de carbonos com hidroxila vicinal. A Figura 11 mostra diferentes unidades de açúcares reagindo com o periodato de sódio. Observa-se que a única unidade não-oxidada é a (b) devido às ligações glicosídicas na posição 1 e 3 não permitirem duas hidroxilas vicinais. Quando em uma cadeia principal as unidades são ligadas (1? 3), a

oxidação com periodato leva à introdução de grupamentos aldeído somente nas cadeias laterais, sem degradação da cadeia principal [93].

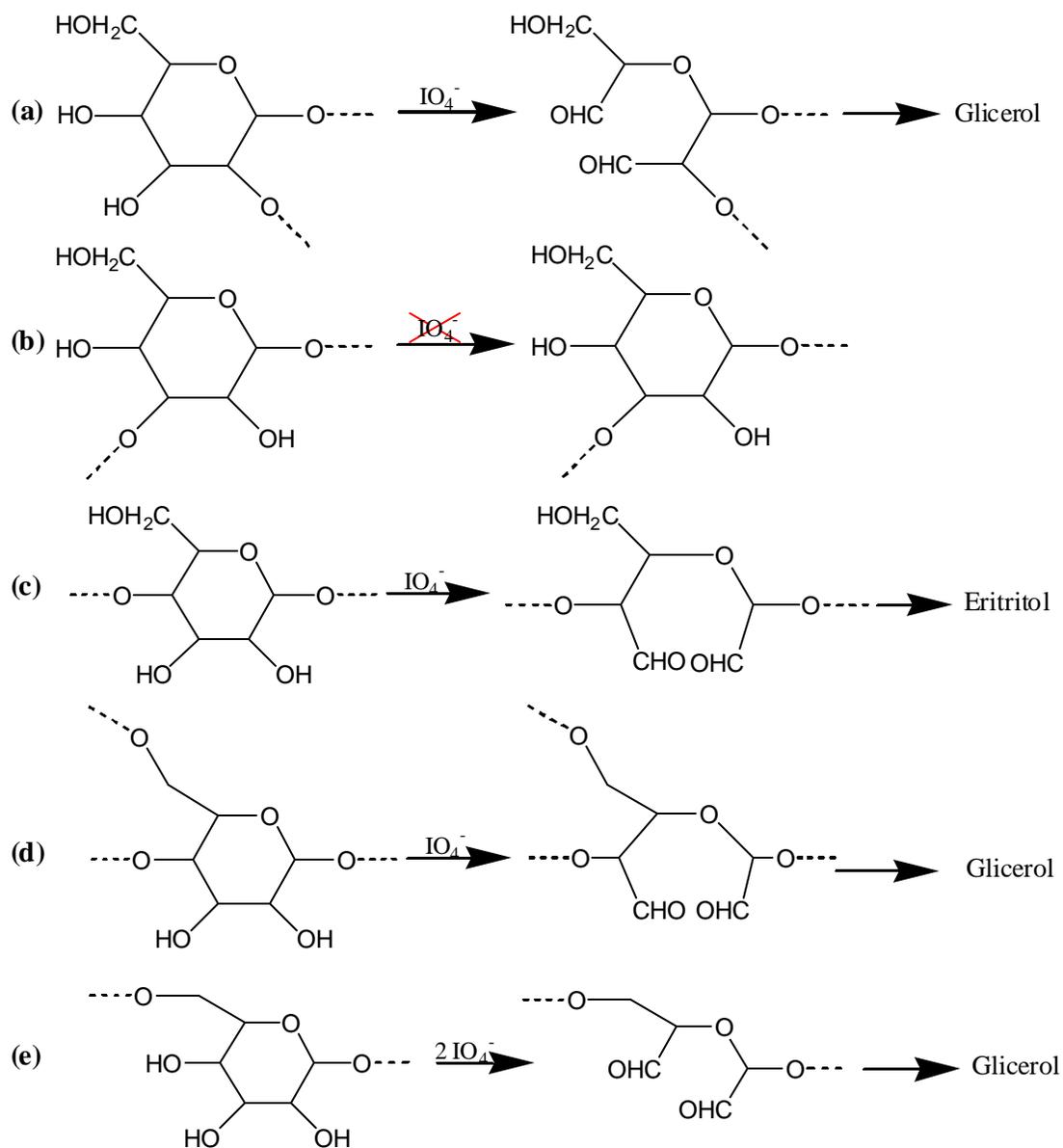


Figura 11 – Seletividade da reação de periodato de sódio com unidades de açúcar substituídos em diferentes posições [93]

A análise do consumo de periodato possibilita a determinação da proporção de unidades duplamente oxidadas. O controle da estequiometria periodato/polissacarídeo pode produzir materiais com diferentes graus de oxidação.

Os grupos aldeído das unidades oxidadas podem reagir com borohidreto de sódio (NaBH_4) para formar o poliálcool correspondente [102] ou com clorito de sódio (NaClO_2) para formar os correspondentes policarboxilatos [97]. O estudo de derivados aldeídicos funcionalizados é interessante devido a sua alta reatividade com grupamentos amina de quitosana ou até mesmo de proteínas.

Até 2003, todos os esforços em busca de um substituto para o sangue baseavam-se em obter um produto que apresentasse propriedades similares àquelas das células vermelhas humanas. Esta primeira geração de produtos que se encontram em fase de testes foi desenvolvida de acordo com esses parâmetros. Tais produtos apresentaram resposta hipertensiva, que foi inicialmente atribuída à diminuição da concentração de óxido nítrico (NO), causada pela interação com os sítios da Hb. O NO produzido no interior das células endoteliais, desempenha um importante papel na manutenção do tônus vascular [58].

O NO endotelial é produzido quando a enzima sintetase de óxido nítrico (ecNOS) é ativada pelo complexo cálcio/calmodulina. A calmodulina é uma proteína de baixo peso molecular que se liga ao cálcio e sua função é ativar a ecNOS. A conversão do aminoácido L-arginina a NO e L-citrulina é catalisada em duas etapas como pode ser visto na Figura 12. O mesmo doador de elétron, nicotinamida-adenina de nucleotídeo fosfato (NADPH), é necessário em ambas as etapas. Na primeira etapa, ocorre uma oxidação, na qual a L-arginina é hidroxilada para N-hidroxi-L-arginina ligada à enzima ecNOS. Na segunda etapa, ocorrem reações de oxi-redução e levam à produção de água, NO e L-citrulina. Os átomos de oxigênio que são incorporados ao NO e à L-citrulina derivam-se de moléculas distintas de oxigênio, o que significa que duas moléculas de oxigênio ligam-se à enzima durante um ciclo catalítico para gerar o NO. Em ambas as etapas, ocorre formação de H_2O . As reações de hidroxilação são ativadas por cálcio e calmodulina, e são aceleradas pela tetra-hidrobiopterina ($\text{H}_4\text{biopterina}$). Esta enzima estabiliza a atividade da ecNOS; a ausência da $\text{H}_4\text{biopterina}$ causa inativação parcial na enzima ecNOS, que continua a oxidar NADPH, mas não consegue juntar os elétrons liberados nesta reação para a síntese do NO. Quando isso ocorre, os elétrons são transferidos para o oxigênio (O_2) para formar superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e água.

Portanto, a H₄biopterina é necessária para manter a enzima ecNOS ativa *in vivo* [103, 104].

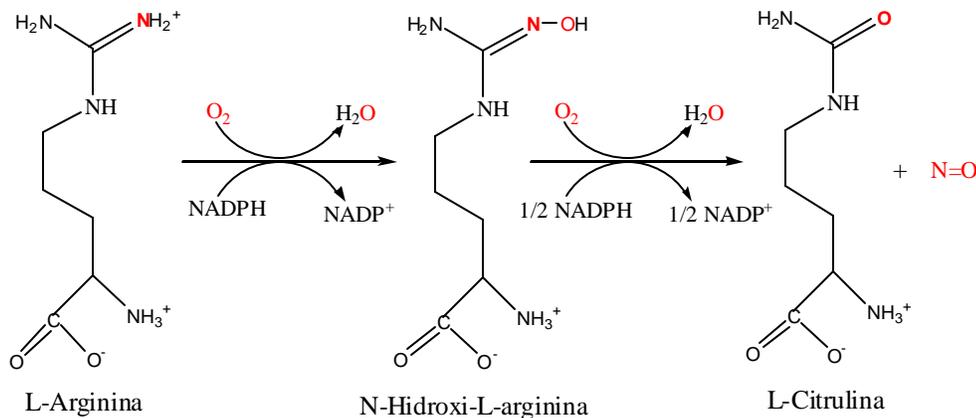


Figura 12 - Biossíntese do NO. A ecNOS catalisa a oxidação do nitrogênio guanidino da L-arginina para formar NO e L-citrulina. N-hidroxi-L-arginina é formada como um intermediário [103]

As células endoteliais presentes no interior dos vasos sanguíneos liberam o óxido nítrico dentro do espaço intersticial da parede vascular. Quando o NO está presente causa relaxação da parede do músculo liso, por este modo a quantidade de NO liberada pode controlar a vasoatividade da parede vascular. Qualquer fator que venha a reduzir a produção de NO resultará em vasoconstrição. Por outro lado, fatores que acarretem um aumento na produção de NO resultará em vasodilatação. O NO também age no plexo nervoso e em outros sítios no corpo [58].

As junções intercelulares das células endoteliais (Figura 13) permitem a passagem do tetrâmero de hemoglobina; assim, a Hb liga-se ao NO e o tetrâmero deixa a circulação e age como um seqüestrador de NO resultando em vasoconstrição. Murray reportou espasmo esofágico em paciente tratados com Hb modificada, que apresentavam uma alta concentração de Hb com ligações intramoleculares, portanto este espasmo pode ter sido devido à remoção de NO pelo tetrâmero de Hb [105].

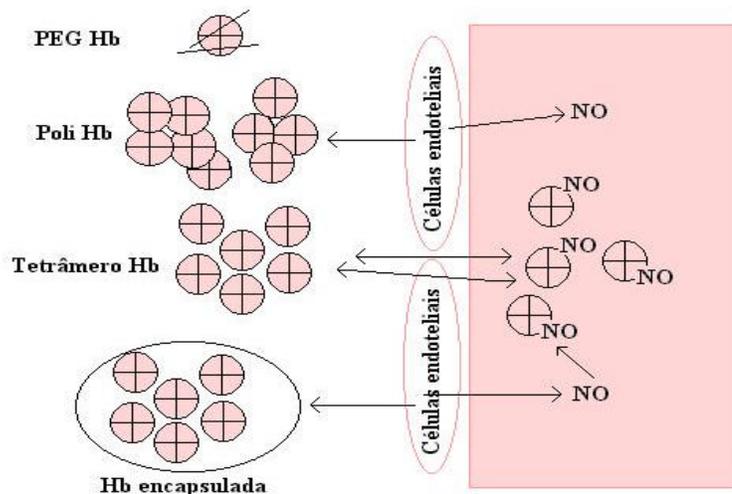


Figura 13 – Diferentes tipos de Hb modificadas. O tetrâmero de Hb por ser pequeno pode mover-se através da junção entre as células endoteliais e ligar-se ao NO. Esta Hb ligada ao NO causa redução na concentração de NO livre e, como consequência, a vasoconstrição [58]

Portanto, as hemoglobinas modificadas intramolecularmente são usadas como substâncias terapêuticas em caso de choque hipotensivo. Substitutos para o sangue preparados de poli-hemoglobina, Hb encapsulada e Hb conjugada, dependendo da preparação, podem conter uma quantidade variável de tetrâmeros da Hb, os quais também podem ligar-se ao NO e causar vasoconstrição. Portanto, ao preparar um substituto para o sangue deve-se evitar a presença de uma grande quantidade de tetrâmeros de Hb. Uma outra maneira é, quando for administrar um substituto temporário para o sangue com uma alta concentração de Hb tetramérica, adicionar concomitantemente agentes farmacêuticos para contrabalancear os efeitos da vasoconstrição. Outra alternativa é usar a tecnologia recombinante para mudar um aminoácido com o intuito de bloquear o sítio de adsorção do NO. Um outro modo consiste em remover o tetrâmero da Hb. Gould [106-108] preparou poli-Hb com menos de 1% de tetrâmero de Hb para teste clínicos. Isto permitiu a infusão de 3000 mL de poli-Hb sem efeitos colaterais. Shorr também reportou a remoção do tetrâmero de Hb da PEG-conjugada para reduzir efeitos esofagianos [109].

Estudos realizados por Winslow [110], com tecnologias mais modernas, permitiram a investigação do transporte de O_2 através da microcirculação e a conclusão de que os carreadores de oxigênio com valores de P_{50} entre 5 e 10 mmHg, e com baixa difusão macromolecular, apresentaram perfis mais parecidos

aos do concentrado de células vermelhas (RCB) quanto ao transporte de O_2 . A resposta hipertensiva dos carreadores de O_2 obtida nos testes clínicos foram atribuídas à conseqüência da super-oxigenação dos tecidos. O estudo comparou o perfil da curva de transporte do O_2 das células vermelhas humanas com três tipos diferentes de Hb; Hb peguilada (Hb-PEG), Hb com ligação cruzada a cadeias ?? (Hb-??) e solução de Hb purificada. A Hb-PEG e a solução de Hb purificada possuem valores de P_{50} semelhantes ($\sim 12\text{mmHg}$). No entanto, apresentaram perfis bastante diferentes, o que levou à conclusão de que o parâmetro P_{50} não se constitui no fator determinante do comportamento de transporte e liberação de O_2 . No entanto, os parâmetros reológicos mostraram-se muito importantes. A Figura 14 apresenta o gráfico obtido nos estudos de Winslow [110].

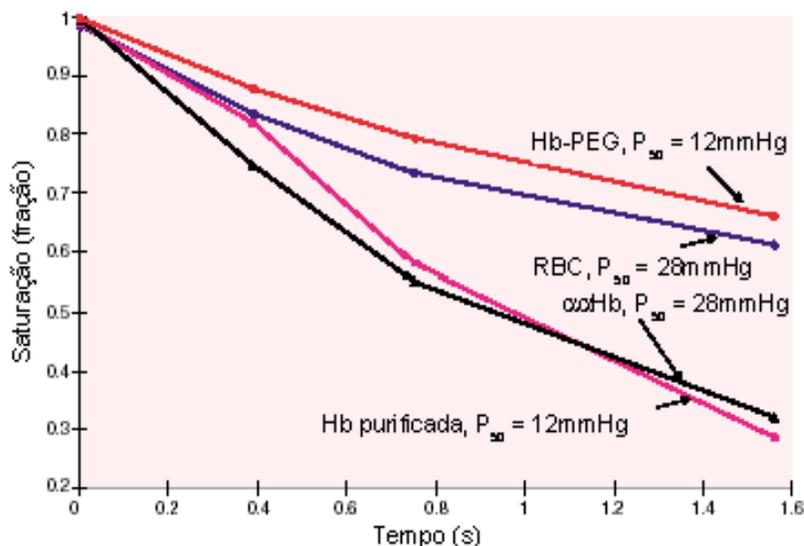


Figura 14 - Gráfico de saturação *versus* tempo para Hb-PEG, Hb purificada e Hb-?? [110]

Essa descoberta desencadeou uma revisão dos conceitos até então bem estabelecidos e a introdução de novos parâmetros de avaliação para um carreador de oxigênio. Na Tabela 3 estão listados os parâmetros utilizados para a primeira geração de produtos e o paradigma atual.

Tabela 3 - Comparação entre os paradigmas antigo e atual [52]

Propriedade	Paradigma antigo	Paradigma atual
Ligação com oxigênio	Como a do sangue: P ₅₀ ~ 28 mmHg	P ₅₀ ~ 5-10 mmHg
Viscosidade	Como a da água ~ 1cP	~ 4 cP
Pressão oncótica	Como a do sangue ~15 mmHg	Aumentada
Concentração de Hb	Como a do sangue ~ 15 g/dL	A menor possível
Meia-vida plasmática	A mais longa possível	A mais longa possível
Uso clínico	Substituto para as células vermelhas	Agente transportador de oxigênio

Para o desenvolvimento de substitutos para o sangue, faz-se necessária a produção de hemoglobina de alta pureza, sob condições de esterilização, pois essa será a base para a produção de carreadores de oxigênio condizentes com a sua finalidade funcional. O processo utilizado não pode levar à desnaturação da proteína. Após este procedimento, deve ser realizada a modificação química da Hb, de modo a evitar-se a dissociação de tetrâmero de Hb a dímeros. O produto obtido deve carrear oxigênio, e não deve apresentar toxicidade para a aplicação *in vivo*.

A contribuição efetiva do presente trabalho consistiu da purificação e caracterização da HbBv. A sua modificação química foi conseguida mediante a reação da HbBv purificada com dissacarídeos oxidados (sacarose e trealose). A caracterização desses produtos de modificação da HbBv foi realizada por HPLC e eletroforese SDS-PAGE para a determinação do grau de modificação química. Testes que avaliam a toxicidade *in vitro* foram realizados.

3. OBJETIVOS

Obter uma hemoglobina bovina livre de contaminantes para ser utilizada como um sistema carreador de oxigênio, em substituição ao sangue, por meio de reações de modificação química na HbBv. Para isso foi necessário:

- Isolar a HbBv.
- Purificar a solução de HbBv quanto a presença de fosfolipídeos livres e quanto a presença de outras proteínas diferentes da HbBv.
- Sintetizar um novo reagente formador de ligações cruzadas, a partir de açúcares não-redutores, tais como, sacarose e trealose.
- Caracterizar o agente formador de ligações cruzadas por meio de espectroscopia de absorção na região do infravermelho;
- Realizar reações de modificação química com a HbBv.
- Caracterizar os produtos obtidos quanto ao grau de modificação química.
- Caracterizar a HbBv quimicamente modificada quanto a aspectos de toxidez no sistema vascular: efeito de agregação plaquetária e vasoconstrição.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

O sangue bovino foi fornecido pelo Abatedouro JN de Abreu Comércio de Carnes SIE nº 572 sob inspeção Estadual. Os animais foram abatidos e o sangue coletado diretamente da ferida de sangria em frasco já contendo a solução anticoagulante (63 mL da solução CPDA-1/450 mL de sangue). No momento da coleta, evitou-se o contato entre o frasco coletor e a pele do animal. Depois de coletado, o sangue foi mantido sob refrigeração a aproximadamente 5°C. Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau de pureza analítica.

Cada 100 mL da solução CPDA-1 é composta de: 2,63 g de citrato de sódio dihidratado, 0,33 g de ácido cítrico, 0,22 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 3,19 g de dextrose monohidratada e 0,027 g de adenina.

Reagentes: Citrato de sódio dihidratado (*Vetec-BR*), ácido cítrico, fosfato de sódio monobásico (*Vetec-BR*), dextrose (*Vetec-BR*), NaCl (*Vetec-BR*), MgCl₂ (*Vetec-BR*), NaOH (*Vetec-BR*), H₃PO₄ (*Vetec-BR*), ácido láctico (*Vetec-BR*), mono-oleato de sorbitan (Tween-80) (*Vetec-BR*), diclorometano (*Vetec-BR*), glicerol (*Vetec-BR*), azul de bromo fenol (*Vetec-BR*), álcool etílico (*Vetec-BR*), CBR-250 (*Vetec-BR*), metaperiodato de sódio (*Vetec-BR*), boroidreto de sódio (*Vetec-BR*), Albumina bovina (Sigma-USA), Tris (Sigma-USA), acrilamida (Sigma-USA), bisacrilamida (Sigma-USA), N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (Temed) (Sigma-USA), fosfolípidos padrões (Sigma-USA), proteínas padrões (MW-SDS-70L kit) (Sigma-USA), glicina (Sigma-USA), dodecil sulfato de sódio (Sigma-USA), β-mercaptoetanol (Sigma-USA), trealose (Sigma-USA), ácido araquidônico (Sigma-USA), sacarose (Reagen-BR), Ácido clorídrico (Tédia-USA), persulfato de amônio (Tédia-USA), clorofórmio (Tédia-USA), metanol (Tédia-USA), acetonitrila (Tédia-USA), Hemoglobina padrão (Doles Reagentes-BR), Reagente de cor (Doles Reagentes-BR),

Resinas: Q-Sepharose fast flow da Pharmacia Biotech (Wikströms, Suécia) e AGMP-1 da Bio-Rad (Bromley, Inglaterra).

Equipamentos: Espectrofotômetro Thermolyne Turner modelo SP-870 (Dubuque, USA), Ultra-som 500 W Cole Parmer (Vernon Hills, USA), Microscópio Olympus América Inc. Modelo BX 60M (Melville, USA), Centrifuga Hermle Z 383K National Labnet Company Inc. (New Jersey, USA), Flash 12i Biotage (Charlottesville, USA), sistema de HPLC equipado com uma bomba da Pharmacia-Biotech LKB 2248 (Uppsala, Swedwn), equipada com válvula de injeção Rheodyne 7125 (Cotati, USA), integrador HP 3396 Series II da Hewlett Packard (Palo Alto, USA), Eletroforese vertical P81 da Owl Scientific, Inc. (Woburn, USA) acoplada com um transformador de voltagem Electrofhoresis Power Supply E835 da Consort (Turnhout, Bélgica), agregômetro Chrono-Log modelo 560-CA (Havertown, USA), Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho da Perkin Elmer, modelo 1720X (Beaconsfield, UK), Rotavapor Buchi, Rotavapor R-114 (Suiça).

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Isolamento de hemácias

No laboratório, o sangue bruto foi submetido à carbonilação, pelo borbulhamento de CO durante 180 segundos, sob leve agitação. Esta etapa é realizada para estabilizar a hemoglobina sob a forma de HbCO.

Leucócitos, plaquetas e proteínas diferentes da Hb devem ser eliminados. Para tal, 200 g sangue de bovino foram centrifugados a 1000x g durante 20 min, e a solução sobrenadante foi descartada, a centrifuga utilizada foi a Hermle Z 383K da National Labnet Company Inc. (New Jersey, USA). O concentrado de hemácias foi lavado com igual quantidade de solução isotônica (0,9% NaCl). A mistura do concentrado de hemácias com a solução isotônica foi homogeneizada lentamente, e centrifugada a 1000x g durante 20 minutos. Em seguida, a solução sobrenadante foi coletada e submetida à análise por espectrofotometria no visível para determinar-se a concentração de albumina, que avalia a eficiência da lavagem. O procedimento de lavagem foi repetido até que a análise revelasse a ausência de albumina.

4.2.2. Determinação da concentração de albumina

Para a determinação da concentração de albumina, o espectrofotômetro Thermolyne Turner modelo SP-870 (Dubuque, USA) foi usado. Uma solução cromogênica foi preparada com 50 mg de verde de bromocresol, 6,5 mL de NaOH 1N, 3,0 mL de ácido láctico a 90%, 1,0 mL de mono-oleato de sorbitan (Tween-80) e 50 mL de água deionizada [111]. O pH foi levado a 4,0 com ácido láctico e o volume completado a 100 mL com água deionizada. Desta solução foram coletados 10 mL e adicionados 50 mL de água deionizada. Essa solução recebe a denominação de solução cromogênica.

Para a determinação da curva padrão, foi preparada uma solução de albumina a 4%, a partir desta solução foram preparadas por diluição outras soluções de concentrações (3%, 2%, 1%, 0,5% e 0,1%). As soluções de leitura no espectrofotômetro foram preparadas pela adição de 0,025 mL de cada amostra de solução de concentração conhecida, e o como branco foi utilizado água. Cada 0,025 mL, tanto de solução como de água foi adicionado a 5,0 mL de solução cromogênica, agitado e então foi realizada a leitura da absorbância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 626 nm. Para cada amostra foram feitas cinco leituras e a média foi colocada na curva de absorbância *versus* concentração de albumina e foi então obtida a equação da reta para a determinação de albumina nos sobrenadantes. A medida de absorbância nas amostras sobrenadante foi realizada adicionando 0,025 mL de solução sobrenadante a 5,0 mL de solução cromogênica, agitado e lido no espectrofotômetro. Com as amostras também foram realizadas cinco leituras.

4.2.3. Hemólise

Experimentos realizados nos laboratórios do IMA-UFRJ com sangue humano mostraram que o método usado para a lise de hemácia tem um papel importante não só sobre o rendimento, como também sobre o processo posterior de purificação da Hb [74].

A hemólise foi realizada em meio hipotônico (água, NaCl 0,001M e tampão Tris/HCl 0,01 M pH 7,4) nas proporções 1:1 e 1:2 (concentrado de células vermelhas (RBC):solução hipotônica). Após a adição do meio hipotônico ao RBC as misturas

foram deixadas em repouso durante uma noite a 8 °C na ausência da luz. A hemólise foi realizada também por ultra-som em um Processador Ultra-sônico 500 W Cole Parmer (Vernon Hills, USA) com sonda padrão de 13 mm de diâmetro e amplitude ajustada em 40% durante 5 min em banho de gelo.

Após a lise, as amostras sofreram tratamento térmico a 60°C em banho d'água, na ausência de luz, durante 1 h, para desnaturar todas as proteínas hidrossolúveis excetuando-se a HbBv-CO. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000x g durante 40 min. Os sobrenadantes foram coletados e os precipitados descartados. As amostras foram filtradas primeiramente em carvão ativo sob vácuo e, posteriormente, em membrana Millipore de 0,22 µm, dando origem a soluções de hemoglobina para a purificação adicional.

4.2.4. Microscopia óptica

Para avaliar-se a ocorrência da hemólise, foi realizado um estudo por microscopia ótica das amostras de RBC antes e após a hemólise. As amostras foram preparadas por esfregaços sangüíneos, colocando-se uma gota de amostra a um centímetro da extremidade de uma lâmina de microscopia. Outra lâmina foi colocada com uma inclinação de 45° em relação à primeira. A lâmina inclinada foi deslizada rapidamente em direção à extremidade oposta à gota. Depois de seco, o esfregaço foi rotulado e submetido à análise por microscopia em um microscópio Olympus America Inc. Modelo BX 60M (Melville, USA).

4.2.5. Purificação adicional da HbBv

4.2.5.1. Lavagem da resina de troca iônica

Na purificação da solução de hemoglobina bovina foram usadas as resinas comerciais AG MP-1 da Bio Rad (Bromley, Inglaterra) e a resina Q Sepharose Fast Flow (Q-SFF) da Pharmacia Biotech (Wikströms, Suécia).

Ambas as resinas são aniônicas fortes e possuem grupo funcional composto de uma amina quaternária. No entanto, elas possuem matrizes diferentes; a resina AG MP-1 apresenta uma matriz de poliestireno macroporoso, já a resina Q-SFF

Flash 12i é composto de um reservatório para solvente com entrada de ar comprimido, de um módulo de injeção de amostras, do módulo Flash 12i e de uma válvula reguladora, conforme pode ser visto na Figura 16.

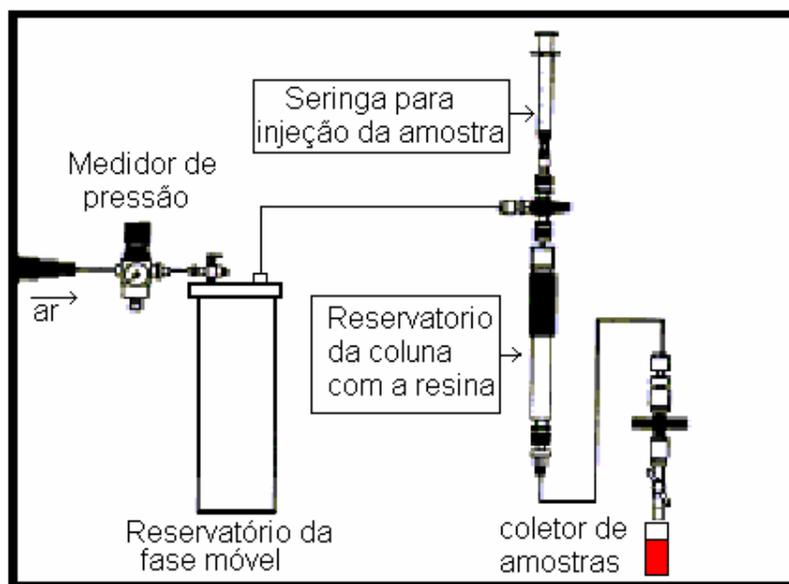


Figura 16 – Os principais componentes do sistema Flash 12i

Antes da utilização do sistema Flash 12i, as resinas trocadoras de íons foram condicionadas. As resinas foram colocadas na coluna de polietileno (7,5 cm comprimento x 12 mm diâmetro) fornecida pela Biotage para o sistema de cromatografia Flash modelo 12i e condicionadas dentro da própria coluna por meio da passagem da solução-tampão 0,001M Tris-HCl pH 7,4 pela coluna até não mais ocorrer variação de pH. Aproximadamente 12 g de resina foram adicionados à coluna. Para cada amostra de 1 mL de HbBv em diferentes meios hipotônicos foram preparadas colunas como descrito anteriormente. Foram também preparados cartuchos contendo metade de resina AG MP-1 e metade Q-SFF, ao qual foi denominado de leito-misto.

A coluna preenchida com a resina foi introduzida no módulo Flash 12i. A solução tampão 0,01M Tris-HCl a pH 7,4 foi diluída dez vezes com água deionizada e introduzida no reservatório de solvente. Aplicou-se ar comprimido no reservatório de solvente sob pressão de 10 dyn/cm². O fluxo de solvente foi aberto para o módulo Flash 12i e foram coletadas amostras do solvente para garantir que o sistema funcionava corretamente.

O fluxo de solvente foi fechado e 1 mL da amostra de solução hemolisada foi introduzido com auxílio de seringa. O fluxo do solvente foi reaberto e frações de 1 mL da solução hemolisada foram coletadas. A coluna não foi reutilizada; todo o processo de limpeza e de condicionamento da resina foi refeito para cada uma das amostras injetadas.

4.2.5.4. Cromatografia líquida em coluna

Na técnica de cromatografia líquida em coluna foi usada uma coluna de vidro com diâmetro de 5,5 cm e 20,0 cm de altura. Esta metodologia foi utilizada para obtermos uma grande quantidade de sangue purificada, pois pelo sistema de cromatografia em Flash 12i, para cada 1 mL de amostra injetada apenas 2 mL de solução de HbBv eram coletados, porém diluídos. Por esta técnica foram usados 23 mL de resina para purificar 100 mL de solução de HbBv. A coluna foi empacotada manualmente por gravidade e foi deixada passar solução-tampão de Tris -HCl pH 7,4 durante um dia para verificar-se a eficiência do fluxo. Sempre antes da injeção da solução de HbBv, o pH era medido. Para esta metodologia foram usados as resinas AG MP-1, Q-SFF e um leito misto composto de ambas as resinas.

4.2.6. Determinação da concentração de hemoglobina

A concentração de Hb na solução hemolisada e nas frações coletadas após passagem pela coluna de cromatografia foi determinada pelo método da cianomete-hemoglobina, utilizando-se o mesmo espectrofotômetro que foi usado na determinação da concentração de albumina. O reagente de cor concentrado da Doles Reagentes (10 mL) foi diluído a 1000 mL com água deionizada. O reagente é composto de fosfato de potássio monobásico a 0,1 M, ferricianeto de potássio a 0,06 M, cianeto de potássio a 0,077 M e Triton X-100 a 0,082 M. Foram pipetados 20 µL de cada amostra de solução de HbBv e adicionados 5 mL do reagente de cor diluído. A solução foi homogeneizada e deixada em repouso por três minutos. A leitura da absorbância foi efetuada no comprimento de onda de 540 nm, como branco foi utilizada água deionizada.

A curva padrão de Hb foi realizada usando como padrão cianeto de hemoglobina da Doles Reagentes, pois esta solução de hemoglobina possui

concentração conhecida de 14%. A partir desta foram realizadas diluições para obter concentrações de (10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25% e 0,1%) de hemoglobina. Cada concentração foi lida a absorbância na proporção de 0,02 mL de solução de Hb em 5 mL de reagente de cor. Foi realizada cinco leituras para cada concentração e o gráfico de absorbância *versus* concentração de hemoglobina foi obtido e através da equação da reta é possível determina a concentração de Hb nas amostras antes e após purificação por resina de troca iônica.

A curva de eluição foi construída para a amostra com as concentrações de Hb das frações coletadas *versus* o volume. E as duas frações mais concentradas foram misturadas para a avaliação de fosfolipídeos residuais e eletroforese.

4.2.7. Avaliação da purificação da HbBv

4.2.7.1. Extração dos fosfolipídeos residuais

A extração de fosfolipídeos das amostras foi feita de acordo com o método modificado de Bligh e Dyer [112]. Foram adicionados 25 mL de água deionizada a 2,0 g de solução hemolisada. A 20 mL desta solução, 50 mL de álcool metílico (CH₃OH) e 25 mL de cloreto de metileno (CH₂Cl₂) foram acrescentados. A mistura foi agitada durante 10 minutos e 25 mL de CH₂Cl₂ e 25 mL de cloreto de potássio a 2 M foram adicionados. Essas condições foram mantidas por mais 10 minutos. A solução foi deixada em repouso em funil de decantação durante 30 minutos e a camada inferior foi recolhida. A camada inferior foi seca em rotavapor (Buchi, Rotavapor R-114, Switzerland) sob vácuo a 40°C na ausência da luz, posteriormente redissolvida em 1 mL de clorofórmio e filtrada em filtro de teflon de 0,2 µm. Em seguida, as amostras foram analisadas por HPLC nas condições descritas abaixo.

O mesmo procedimento foi usado para a solução de HbBv após purificação por cromatografia de troca iônica.

4.2.7.2. HPLC

A técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e fase normal foi usada para a análise quantitativa de fosfolipídeos remanescentes nas soluções de HbBv isolada e HbBv purificada pelas resinas AGMP-1 e Q-SFF. Soluções-mãe de

fosfolipídeos foram preparadas na concentração de 0,15%. Os fosfolipídeos utilizados foram fosfatidilserina (FS, PM = 745,08), fosfatidiletanolamina (FE, PM = 718,02), fosfatidilcolina (FC, PM = 760,10) e esfingomielina (EM, PM = 875,41). Estes fosfolipídeos foram misturados para formar a solução-padrão de acordo com a sensibilidade do equipamento.

A extração de fosfolipídeos foi realizada para avaliar o processo de purificação da amostra de HbBv, anteriormente hemolisada e submetida à cromatografia de troca iônica. Em seguida, a amostra foi analisada por HPLC em comparação a soluções-padrão de fosfolipídeos de concentrações conhecidas. Neste experimento, foi utilizada uma coluna de 250 mm x 4,6 mm (diâmetro interno), empacotada com sílica de 5 μ m e com poros de 100 Å (Luna 5 μ Silica (2) Phenomenex, Montgomeryville, Torrance, CE, USA). A fase móvel consistiu de uma mistura de acetonitrila/metanol/ácido fosfórico, na proporção 900:95:5, respectivamente. Utilizou-se uma bomba de HPLC Pharmacia LKB-HPLC pump 2248 da Pharmacia-Biotech (Uppsala, Sweden), equipada com válvula de injeção Rheodyne 7125 de 20 μ L (Cotati, CA, USA), integrador HP 3396 Series II da Hewlett Packard (Palo Alto, USA) e detector de UV-Vis Shimadzu, modelo SPD-10AV (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Md, USA) do IQ/UFRJ. Os solutos foram detectados a 210 nm. O fluxo foi mantido a 1,1 mL/min durante todo o experimento.

4.2.8. Eletroforese

4.2.8.1. Preparação das soluções para eletroforese

Solução-tampão Tris.HCl 1M, pH 6,8

Foram pesados 60,56g de base Tris dissolvidos em água bidestilada até aproximadamente 450 mL. O pH foi levado a 6,8 com ácido clorídrico e o volume foi completado a 500 mL com água deionizada. A solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 μ m e armazenada entre 2 e 8°C.

Solução-tampão Tris.HCl 1,5M, pH 8,8

Foram pesados 90,84 g de base Tris, a metodologia descrita no item anterior foi seguida, levando-se o pH até 8,8.

Solução de acrilamida/bis-acrilamida (T=30%, C=3%)

Foram pesados 58,2 g de acrilamida e 1,8 g de bis-acrilamida dissolvidos em água bidestilada, a quente, até um volume final de 200 mL. A solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 µm e armazenada entre 2 e 8°C em frasco âmbar.

Solução de persulfato de amônio 10%

Foi pesado 0,1 g de persulfato de amônio, que foi dissolvido em 1 ml de água deionizada. Esta solução foi preparada na hora do uso.

Solução-mãe de Tris.Glicina (Tris a 250 mM e Glicina a 1,92 mM), pH 8,3, para serem usadas em câmaras anódica e catódica

Foram pesadas 30,28 g de Tris e 144,0 g de Gly ambas dissolvidas a quente, com água bidestilada até o volume final de 1 L. Este tampão não precisou ser ajustado. A solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 µm e armazenada em câmara fria. Antes de usar, este tampão foi diluído 10 vezes com água bidestilada.

Soluções de incubação

Eletroforese nativa: solução foi composta de 1,2 mL de glicerol 87%, 0,5 mL de solução de azul do bromo fenol (ABF) 0,02% e 8,8 mL de solução-tampão de tris/HCl a pH 6,8.

Eletroforese desnaturante (SDS): A solução foi composta de 1,6 mL de solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 10%, 0,8 mL de glicerol a 87%, 0,4 mL de β-mercaptoetanol, 0,2 ml de solução de azul de bromo fenol (ABF) 0,05%, 1,0 ml de solução-tampão Tris.HCl a pH 6,8 e 4 ml de água deionizada.

4.2.8.2. Preparação dos géis para a eletroforese

Eletroforese desnaturante descontínua em presença de SDS

Tabela 4- Reagentes utilizados na preparação do gel fracionador (T = 7,5%)

Reagente	Volume (ml)
Solução de Acrilamida/Bis T=30%, C=3%	1,25
Solução-tampão Tris.HCl a 1,5 M, pH 8,8	1,25
SDS a 10%	0,50
Água bidestilada	2,00
Temed	0,07
Persulfato de amônio a 10 %	0,07

Tabela 5 - Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador (T = 3,5%)

Reagente	Volume (ml)
Solução de Acrilamida/Bis T=30%, C=3%	0,60
Solução-tampão Tris/HCl a 1,0 M, pH 6,8	0,63
SDS a 10%	0,50
Água bidestilada	3,30
Temed	0,10
Persulfato de amônio a 10%	0,10

As placas de vidro sobrepostas foram pinçadas e vedadas com gel de agar-agar 15%. A solução de gel fracionador foi colocada até uma altura de 1 cm abaixo da altura onde deve ser colocado o pente para a preparação dos poços de amostragem. Após a polimerização do gel, o volume restante foi completado com a solução de gel concentrador e o pente foi colocado. Após aproximadamente 20 minutos, a reação de polimerização foi dada como finalizada.

4.2.8.3. Preparação das amostras para eletroforese

As amostras foram preparadas pela mistura da solução de incubação em composição apropriada para interagir com 10 µg de proteína, por poço do gel. O volume de amostra injetado em cada poço foi de 10 µL.

4.2.8.4. Corrida eletroforética

A análise de eletroforese em gel de acrilamida foi realizada numa cuba vertical P81 da Owl Scientific, Inc. (Woburn, USA) acoplada com uma fonte da Consort Electroforesis Power Supply E835 (Turnhout, Bélgica).

As placas de vidro foram colocadas no suporte do aparelho e o volume das câmaras catódica e anódica foi completado com solução-tampão de corrida. As amostras foram aplicadas nos poços com o auxílio de uma micro-seringa (10 µl) e a corrida eletroforética foi iniciada mantendo-se as condições entre 30 mA e 120 V. Após o tempo (~ 2 h) necessário para a separação das bandas, a corrida foi interrompida.

4.2.8.5. Coloração e descoloração dos géis

Para a coloração do gel, a solução de CBR-250 a 1%, diluída em solução acética/etanólica (10%/45%) foi utilizada. O gel ficou mergulhado na solução corante durante 12 horas. O gel foi descorado com solução acética/etanólica (10%/45%) até ficar incolor apenas com as bandas protéicas coradas durante um período de aproximadamente 12 horas. O gel foi seco em papel celofane com solução acética a 7% e glicerol, e armazenado na geladeira.

4.2.8.6. Preparação dos padrões de proteínas para a eletroforese

Foi usado um kit de proteínas padrões da Sigma (MW-SDS-70L kit), composto das seguintes proteínas: β-Lactoalbumina (14,2 kDa); Tripisinogeno (24,0 kDa); Anidrase carbônica (29,0 kDa); Gliceraldeído-3-fosfato (36,0 kDa) e Albumina bovina (66,00 kDa).

O padrão foi preparado pela mistura de todas as proteínas acima citadas, numa concentração de 0,1% de cada proteína na solução de incubação para SDS-PAGE.

4.2.9. Obtenção dos reagentes formadores de ligações cruzadas

4.2.9.1. Reação de oxidação dos dissacarídeos

As Figuras 17 e 18 mostram as reações estequiométricas da sacarose e da trealose, respectivamente, com o metaperiodato de sódio (NaIO_4) para a obtenção do sacarídeo oxidado (o-sacarídeo). A reação foi realizada na ausência de luz e a temperatura ambiente durante 42 horas, sob agitação. A reação foi terminada com glicol etilênico na razão molar de 1:1 com relação ao NaIO_4 , sob agitação durante 30 min.

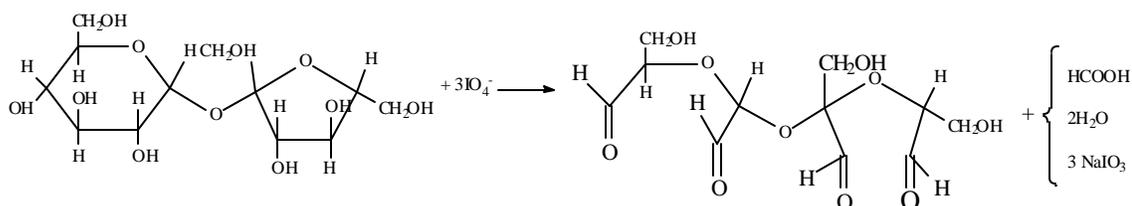


Figura 17 – Reação de oxidação da sacarose

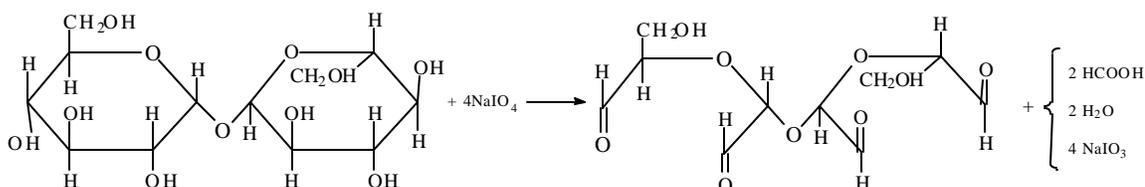


Figura 18 – Reação de oxidação da trealose

4.2.9.2. Caracterização dos reagentes modificadores da HbBv

Os dois dissacarídeos oxidados, a serem usados como agentes de formação de ligações cruzadas na HbBv foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região do infravermelho, em espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo 1720X (Beaconsfield, UK). Para tal caracterização, após a reação de oxidação, uma pequena fração (~10 mL) foi isolada por evaporação da água, o precipitado foi

redissolvido em álcool etílico, filtrado a vácuo e uma nova secagem no rotavapor foi realizada. O sólido resultante foi analisado por espectroscopia na região do infravermelho.

4.2.10. Reações de modificação da HbBv com os dissacarídeos oxidados

As reações foram realizadas com os dois sacarídeos oxidados (o-sacarídeo) em diferentes razões molares (o-sacarídeo:HbBv). As soluções de HbBv e o-sacarídeo foram desoxigenadas sob N_2 por 30 min antes da reação. Eles foram colocados para reagir sob borbulamento de N_2 e agitação magnética e na ausência de luz. O agente redutor boroidreto de sódio ($NaBH_4$) foi adicionado com o objetivo de estabilizar a ligação imina entre o sacarídeo oxidado e a HbBv por meio de sua transformação em grupo amina. Essa reação de redução foi realizada durante 30 min. O ácido ascórbico foi adicionado na concentração de 0,2% no início da reação, para evitar a oxidação da HbBv. Após a reação, as amostras foram colocadas em diálise utilizando membrana da Spectrum MW 12-14.000 (Rancho Dominguez, USA) em solução tampão tris -HCl pH 7,4 por 24 horas a 4°C, sob agitação e na ausência da luz. A solução tampão foi trocada a cada 12 horas, e o volume de tampão foi de 2,5 L.

As reações foram realizadas em diferentes razões molares de sacarídeo oxidado/HbBv, tempo reacional e razão molar agente redutor ($NaBH_4$)/sacarídeo oxidado. As razões molares encontram-se listadas na Tabela 6. As amostras foram denominadas da seguinte maneira:

[o-sacarídeo]:[HbBv]/tempo de reação/[$NaBH_4$]:[o-sacarídeo]

Tabela 6 – Condições reacionais para os sacarídeos oxidados

o-sacarose	o-trealose
5:1/2h/2:1	5:1/2h/2:1
5:1/2h/5:1	6,36:1/6h/10:1
5:1/2h/10:1	20:1/2h/2:1
20:1/2h/2:1	20:1/4h/5:1
20:1/2h/5:1	20:1/4h/15:1
20:1/2h/10:1	40:1/3,2h/10:1
5:1/6h/2:1	40:1/6h/1,59:1
5:1/6h/5:1	40:1/6h/18,4:1
5:1/6h/10:1	40:1/6h/10:1A
5:1/24h/2:1	40:1/6h/10:1B
5:1/24h/5:1	60:1/4h/2:1
5:1/24h/10:1	60:1/4h/5:1

4.2.11. Caracterização dos produtos de HbBv modificados

4.2.11.1. Eletroforese SDS

As amostras de HbBv modificadas foram analisadas por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na concentração de 7,5% para o gel fracionador e 3,5% para o gel concentrador. A solução padrão foi a mesma utilizada no procedimento da eletroforese utilizada na purificação, assim como o método de preparação das amostras.

4.2.11.2. HPLC

A técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em fase normal foi usada para a análise quantitativa do grau de modificação química dos produtos de HbBv. Foi preparada uma solução de HbBv a 0,1% em meio tamponante.

Em seguida, as amostras foram analisadas por HPLC em comparação à solução de HbBv sem modificar. Neste experimento, foi utilizada uma coluna Biosep Sec S 3000 da Phenomenex com 300 mm x 7,0 mm (diâmetro interno) (Montgomeryville, USA). A fase móvel consistiu de uma solução tampão de 0,1N de

Tris/HCl a pH 7,4 com 0,2 M de $MgCl_2$. O $MgCl_2$ serve para dissociar dímeros não reticulados. Utilizou-se uma bomba de HPLC Pharmacia LKB-HPLC pump 2248 da Pharmacia-Biotech (Uppsala, Sweden), equipada com válvula de injeção Rheodyne 7125 de 20 μ L (Cotati, CA, USA), integrador HP 3396 Series II da Hewlett Packard (Palo Alto, USA) e detector de UV-Vis Shimadzu, modelo SPD-10AV (Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Md, USA) do IQ/UFRJ. Os solutos foram detectados a 280 nm. O fluxo foi mantido a 0,7 mL/min durante todo o experimento.

4.2.12. Testes biológicos *in vitro* dos produtos de HbBv modificados

4.2.12.1. Estudo da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) de coelho *in vitro*

A agregação plaquetária foi determinada em PRP (plasma rico em plaquetas) citratado de coelhos, através do método turbidimétrico de BORN & CROSS [113], monitorada no agregômetro Chrono-Log modelo 560-CA (Havertown, USA). Este método consiste na monitorização da agregação plaquetária através da transmitância, onde um feixe de luz, de comprimento de onda igual a 240 nm atravessa a suspensão de plaquetas. O aparelho é calibrado para que o PRP corresponda a 0% de transmitância, e o plasma pobre em plaquetas (PPP) corresponda a 100% de transmitância. Após a adição do agente agregante ao PRP, observa-se inicialmente uma queda de transmitância luminosa, refletindo as alterações na forma plaquetária (*shape-change*), seguida da formação de agregados plaquetários (Figura 19). Tais agregados permitem a passagem de luz através da suspensão plaquetária, aumentando quantitativamente a transmitância, proporcionalmente ao processo de agregação [114,115].

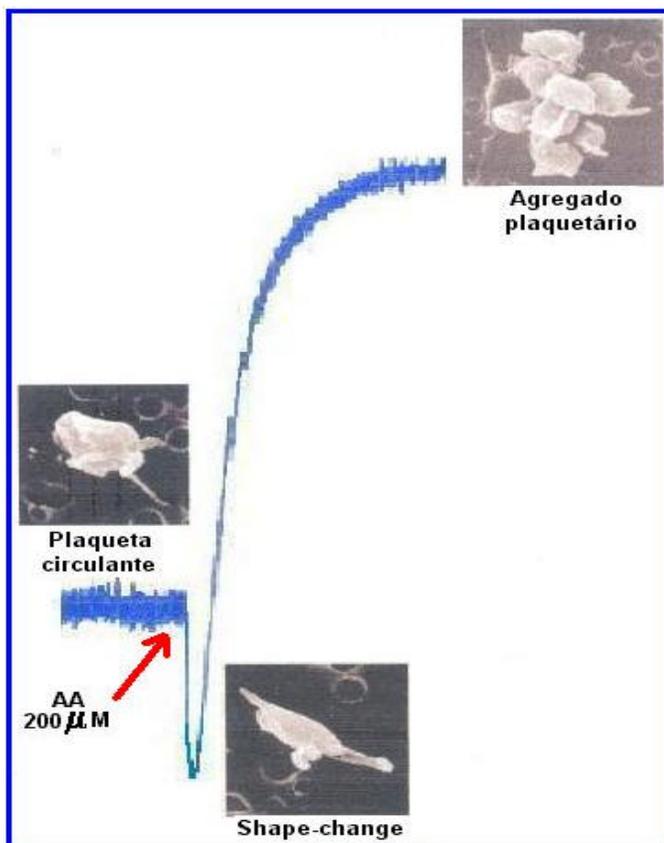


Figura 19 – Curvas de agregação plaquetária induzidas por ácido araquidônico [115]

As substâncias analisadas foram pré-incubadas com 400 μ L de PRP durante 5 min, a 37°C sob agitação de 1200 rpm, antes da adição do agonista. O agonista empregado foi o ácido araquidônico (200 μ M) e este foi mantido a 0°C. Os ensaios foram realizados em duplicata, mantidos até a obtenção máxima de agregação ou até 5 min após a adição do agonista. A agregação plaquetária promovida pelo ácido araquidônico é expressa em porcentagem de agregação.

4.2.12.1.1. Obtenção de PRP e PPP

Coelhos albinos de ambos os sexos, pesando entre 2,5 - 3,5 kg, foram utilizados para a obtenção de sangue através de punção da artéria central da orelha.

O sangue foi coletado em solução aquosa de citrato trissódico 3,8%, na proporção de 9 volumes de sangue para 1 volume de citrato. O PRP foi obtido por centrifugação do sangue durante 12 minutos a 200x g , a temperatura ambiente. O

plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido por centrifugação do concentrado de células vermelhas após a retirada do PRP a 500x g, por 12 minutos, a temperatura ambiente. O PRP obtido foi utilizado nas três horas após sua coleta, pois após esse período as plaquetas perdem sua capacidade máxima de agregação [114].

4.2.12.2. Testes preliminares de vasoconstrição *in vitro*

Cobaias albinas de ambos os sexos, pesando entre 400 e 600g foram utilizadas nesse experimento. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e posterior exsangüinação. Em seguida, suas aortas foram extraídas, mantidas em solução fisiológica na seguinte composição em mmol/L: NaCl 119; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; CaCl₂ 1,6; glicose 11,5 e oxigenada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5%CO₂), procedendo-se à remoção do tecido conectivo e adiposo aderido. Dessas aortas foram obtidos segmentos (6-8 anéis) de 2 mm cada [116].

Esses anéis foram adaptados em cubas de vidro de 2,0 mL contendo solução fisiológica e aeração contínua com mistura carbogênica. As cubas são mantidas em um banho termostatizado Ugo Basile 4050 (Comerio, Itália) (Figura 20) sob temperatura constante de 37,0 ± 0,5°C, mimetizando assim as condições fisiológicas *in vitro*. Os anéis da aorta foram conectados a transdutores de força isométrica Ugo Basile 7011-4 (Comerio, Itália), submetidos a uma tensão de 10 mN e mantidos em repouso por 1 hora, com troca de solução fisiológica em intervalos de 15 minutos, para obter-se o equilíbrio a essa tensão.



Figura 20 – Aparelho de órgão isolado com duas cubas, Ugo Basile 4050 [115]

Após o equilíbrio da preparação, o órgão é tratado com agonistas que irão induzir contrações e relaxações (Figura 21). Essas serão transduzidas, amplificadas e registradas em um registrador potenciométrico Chrono-Log Corporation 21025 (Comerio, Itália). A contração do músculo liso vascular é induzida com a adição à preparação fenilefrina a 10^{-6} M. No platô da contração muscular é adicionado acetilcolina a 10^{-6} M a cuba experimental para confirmar a integridade do endotélio vascular. O endotélio é considerado íntegro quando o relaxamento observado após a adição de acetilcolina for maior que 80% e destruído quando o relaxamento for menor do que 10%.

Após a obtenção da contração máxima, lava-se a preparação com a solução nutriente, em intervalos de 15 minutos, até que a mesma retorne à linha de base. Em seguida, é realizado o ensaio com a amostra. Para tal, foram adicionados 200 μ L de amostra a concentração de 0,03 g/mL de hemoglobina. Após a adição, esperamos 10 minutos para ver alteração de tensão. Após o ensaio com a amostra, lavamos o sistema com solução fisiológica até estabilização e em seguida realizamos outro teste de contração/relaxação com os agonistas para ver a integridade do órgão, só então pudemos adicionar uma outra amostra.

Foram testadas a HbBv sem modificar e a HbBv modificada com a o-trealose na seguinte composição: o-trealose 40:1/6h/18,4:1.

As preparações de aorta foram utilizadas apenas no dia de sua retirada, com uma durabilidade de cerca de 12 horas. As respostas foram expressas em % de contração, considerando-se 100% de contração aquela obtida com o agonista. Os volumes administrados nas cubas não excederam 0,1% do volume total.

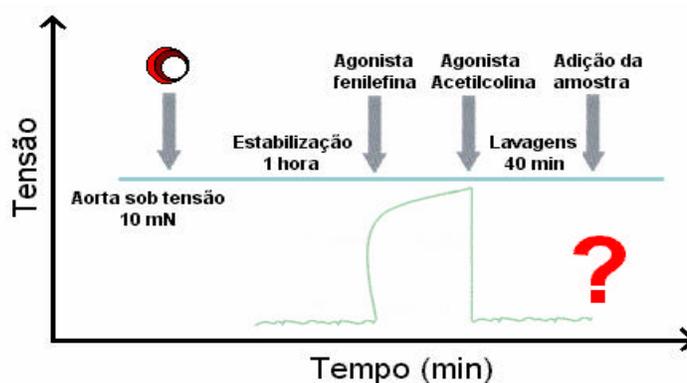


Figura 21 – Esquema ilustrativo do experimento de órgão isolado

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ALBUMINA NO SOBRENADANTE

Duas a três lavagens são suficientes para a eliminação dos leucócitos, plaquetas e proteínas hidrossolúveis no concentrado de células vermelhas do sangue humano [17]. A Figura 22 mostra a curva-padrão de albumina que foi construída para que se obtivesse a equação da reta **{[albumina]=(absorbância+0,06)/14,18}**, a partir da qual foi possível o cálculo da concentração de albumina nos sobrenadantes, para avaliar-se a eficiência das lavagens. A Figura 23 mostra a concentração de albumina após cada lavagem do concentrado de hemácias com solução isotônica de NaCl. Como pode ser observado, foram necessárias quatro lavagens para a eliminação total da albumina do concentrado de células vermelhas bovinas.

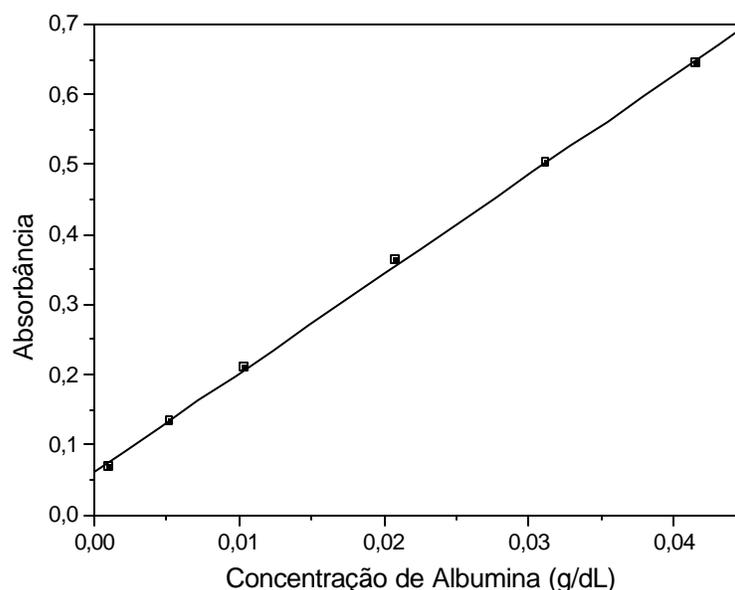


Figura 22 – Curva de calibração da concentração de albumina *versus* absorbância

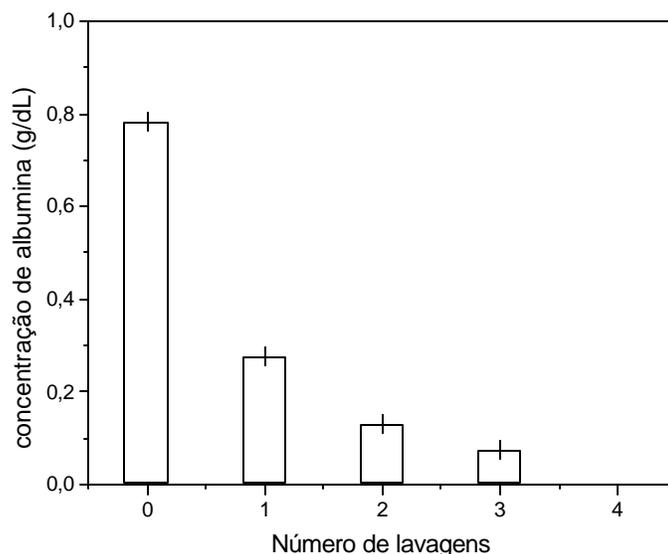
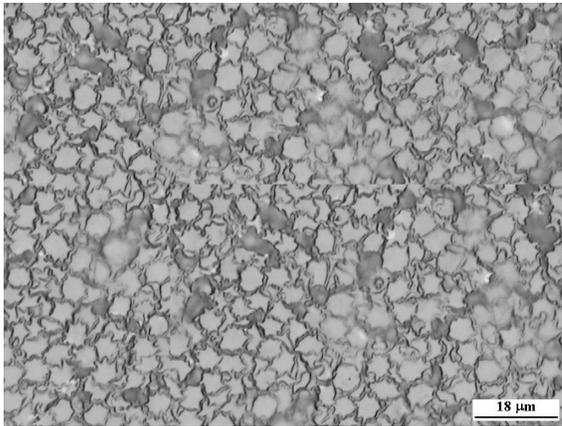


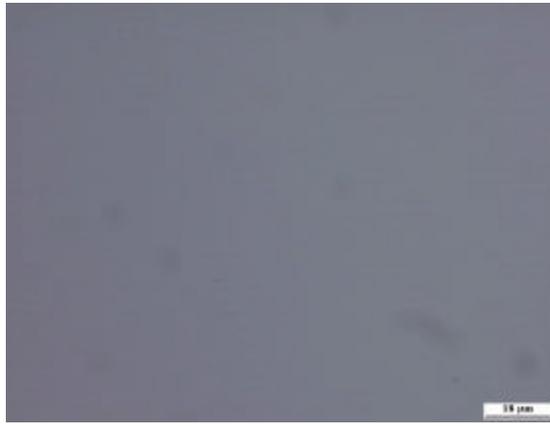
Figura 23 – Efeito do número de lavagens no procedimento de extração de albumina do concentrado de células vermelhas

5.2. OCORRÊNCIA DA HEMÓLISE

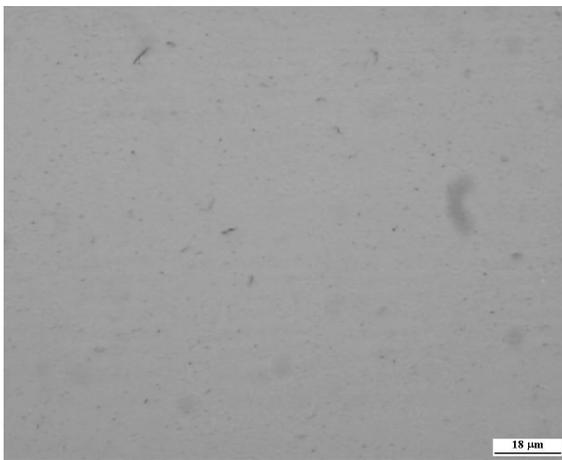
O processo de hemólise foi acompanhado por microscopia óptica. A Figura 24a mostra a micrografia de hemácias intactas, ou seja, antes da hemólise e apresenta membrana celular bem definida. A ausência de células intactas mostra a eficiência da hemólise por ultra-som (Figura 24b). No processo de hemólise por meios hipotônicos foram utilizados água deionizada (Figuras 24c e 24d), solução de NaCl 0,001M (Figuras 24e e 24f) e solução tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,4 (Figuras 24g e 24h) nas proporções 1:1 e 1:2 (concentrado de células vermelhas bovinas: meio hipotônico), respectivamente. Todos os meios (nas duas proporções) provocaram drástica hemólise no concentrado de hemácias estudado, pois não se observa a presença de células intactas, somente resíduos de membrana celular foram observados nas micrografias, exceto na lise por ultra-som, pois este quebra a membrana eritrocitária em partes não detectadas por microscopia óptica.



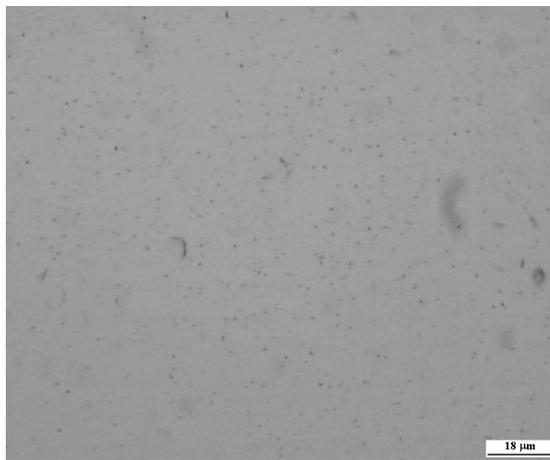
a - HbBv antes da hemolise.



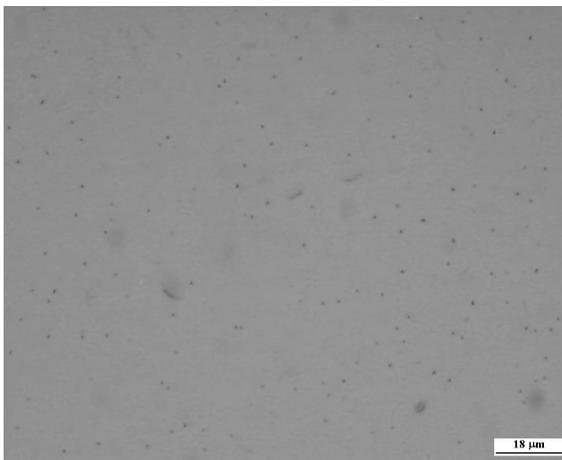
b - HbBv Ultra-som.



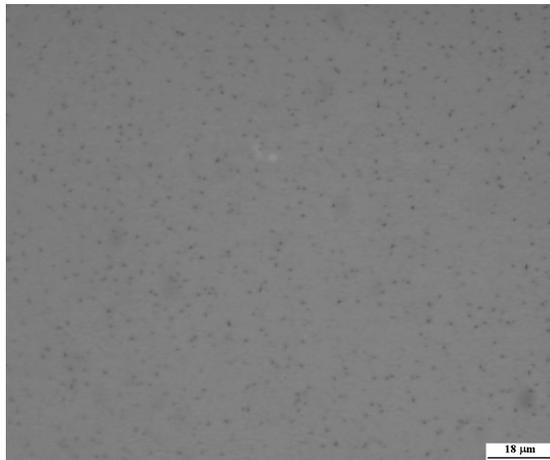
c - HbBv-H₂O 1:1



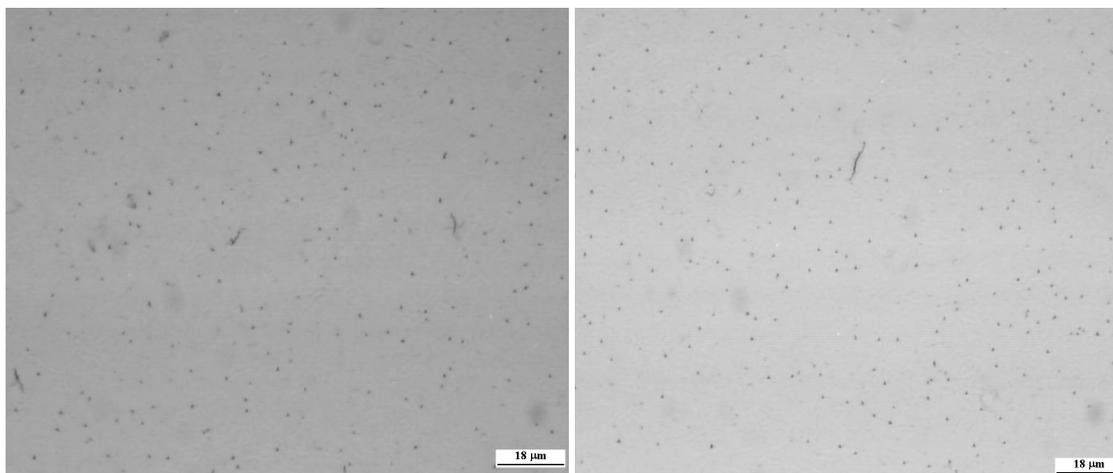
d - HbBv-H₂O 1:2



e - HbBv-NaCl 1:1



f - HbBv-NaCl 1:2



g – HbBv-Tris 1:1

h – HbBv-Tris 1:2

Figura 24 – Micrografias das células vermelhas bovina antes da lise (a) e dos hemolisados (b-h)

Após a hemólise, a amostra sofreu tratamento térmico durante uma hora a 60°C em câmara escura para desnaturar as proteínas hidrossolúveis diferentes da hemoglobina. Após este tratamento, foi realizada uma centrifugação a 200x g durante 45 min, seguida de filtração em carvão ativo e membrana 0,22 µm para a retirada de proteínas diferentes da HbBv que compõem a membrana celular.

5.3. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

5.3.1. Cromatografia em Flash 12i

As amostras foram purificadas no sistema de cromatografia Flash 12i, usando dois tipos de resinas comerciais aniônicas fortes, a AG MP-1 e a Q-SFF, a coluna “cartucho de polietileno” foi preenchida individualmente com cada resina e também um cartucho foi preenchido utilizado as duas resinas, o qual foi denominado de leito misto (L. Misto).

As amostras foram denominadas da seguinte maneira: HbBv-meio de lise, proporção (concentrado de células vermelhas:meio hipotônico) e tipo de resina, por exemplo: **HbBv-H₂O 1:1 Q-SFF**.

Uma quantidade de 1mL de solução de hemoglobina foi eluída na cromatografia em Flash 12i e as curvas de eluição obtidas foram preparadas em

relação a cada tipo de hemólise e de resina utilizada. Os fluxos médios observados em cada análise estão discriminados na Tabela 7.

Tabela 7 – Fluxo médio das eluições por cromatografia em Flash 12i

Amostra AGMP-1	Fluxo (mL/min)	Amostra Q-SFF	Fluxo (mL/min)	Amostra L. Misto	Fluxo (mL/min)
HbBv-H ₂ O 1:1	0,12	HbBv-H ₂ O 1:1	0,45	HbBv-H ₂ O 1:1	0,14
HbBv-H ₂ O 1:2	0,14	HbBv-H ₂ O 1:2	0,68	HbBv-H ₂ O 1:2	0,16
HbBv-NaCl 1:1	0,18	HbBv-NaCl 1:1	0,41	HbBv-NaCl 1:1	0,42
HbBv-NaCl 1:2	0,21	HbBv-NaCl 1:2	0,52	HbBv-NaCl 1:2	0,18
HbBv-Tris 1:1	0,16	HbBv-Tris 1:1	0,56	HbBv-Tris 1:1	0,19
HbBv-Tris 1:2	0,15	HbBv-Tris 1:2	0,57	HbBv-Tris 1:2	0,30
HbBv Ultra -som	0,17	HbBv Ultra -som	0,65	HbBv Ultra -som	0,05

As variações de fluxo podem ser explicadas devido ao empacotamento não ter sido feito industrialmente; conseqüentemente, não apresenta homogeneidade no fluxo entre as amostras, e também devido aos componentes das amostras interagirem com as resinas, alterando suas mobilidades e a pressão em cada área seccional da coluna. A pressão exercida no sistema foi a mesma para todas as amostras, porém a resina Q-SFF apresenta uma taxa de fluxo maior como já era esperado, pois se trata de uma resina de fluxo rápido.

As curvas de eluição das amostras utilizando as resinas (Figuras 25 a 31), mostraram que, apesar das alterações no fluxo, não houve mudanças significativas na distribuição das frações de Hb nos volumes eluídos, ou seja, todas apresentaram comportamento gaussiano típico de uma eluição cromatográfica. Em todos os casos, somente um pico foi detectado. A hemólise por ultra-som apresentou frações de hemoglobina purificada em maiores concentrações (5,95 – 9,74 g/dL) comparados com os meios hipotônicos que apresentou concentração de HbBv na faixa de (1,56 – 4,94 g/dL).

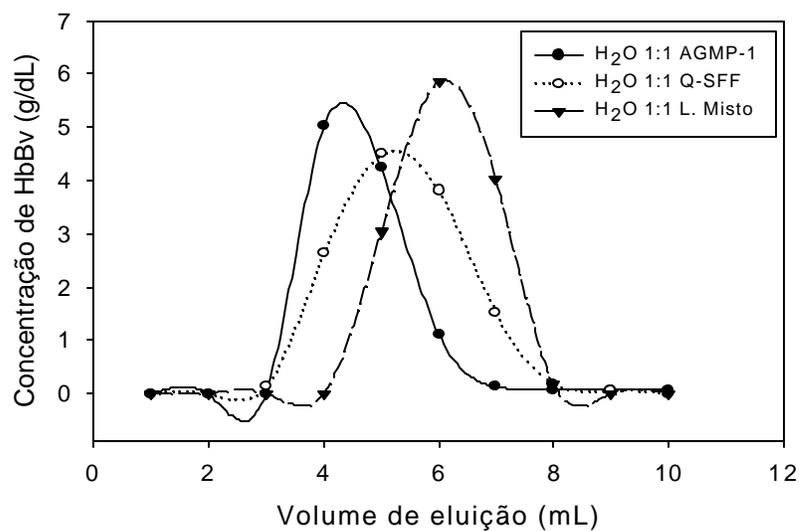


Figura 25 – Curva de eluição da amostra do hemolisado, o em água na proporção 1:1 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto

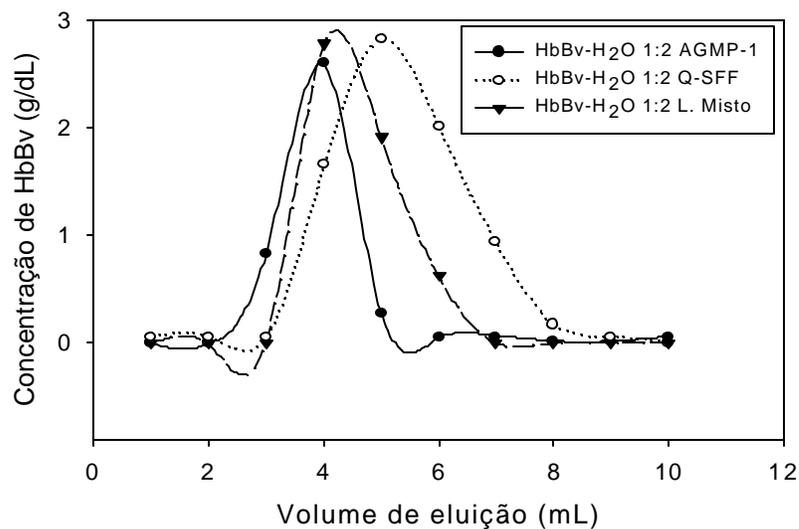


Figura 26 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em água na proporção 1:2 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto

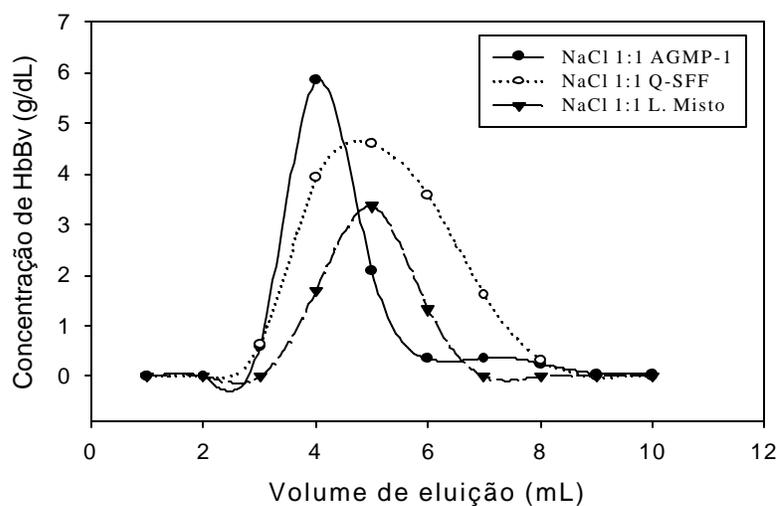


Figura 27 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em NaCl na proporção 1:1 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto

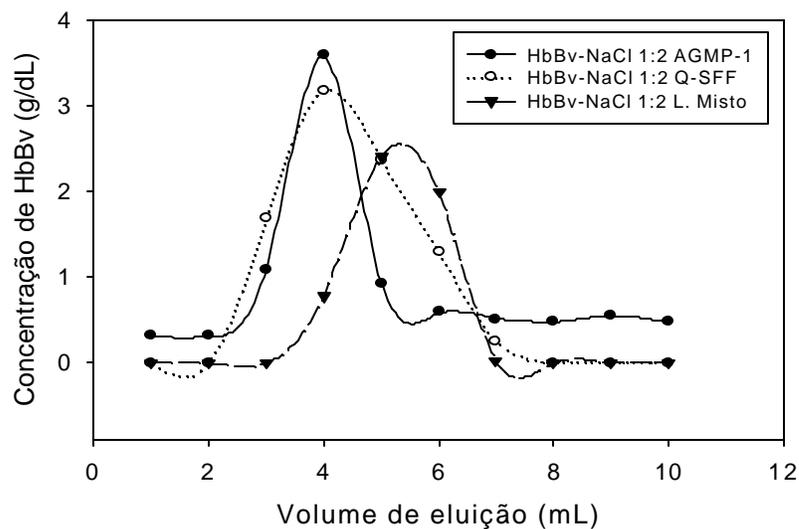


Figura 28 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em NaCl na proporção 1:2 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto

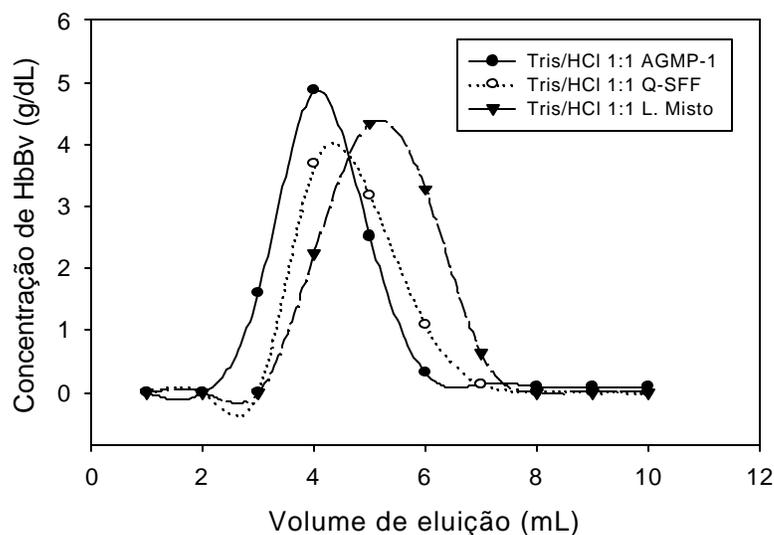


Figura 29 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em Tris-HCl na proporção 1:1 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto

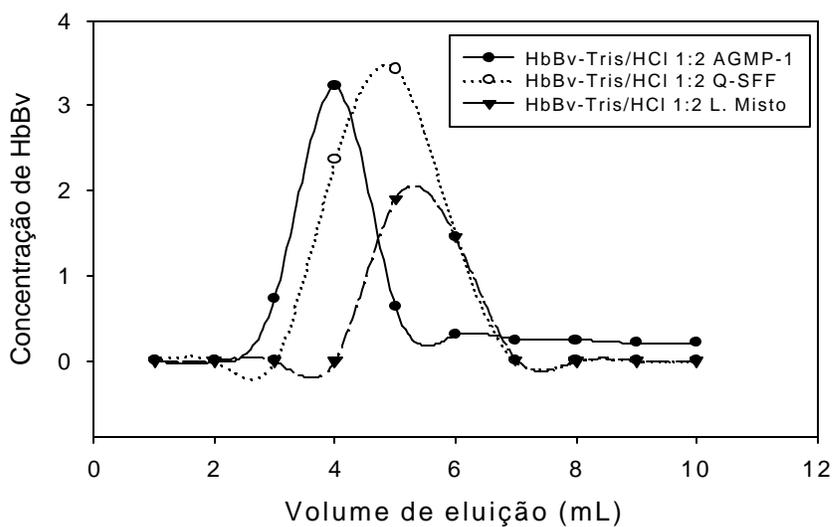


Figura 30 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em Tris-HCl na proporção 1:2 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto

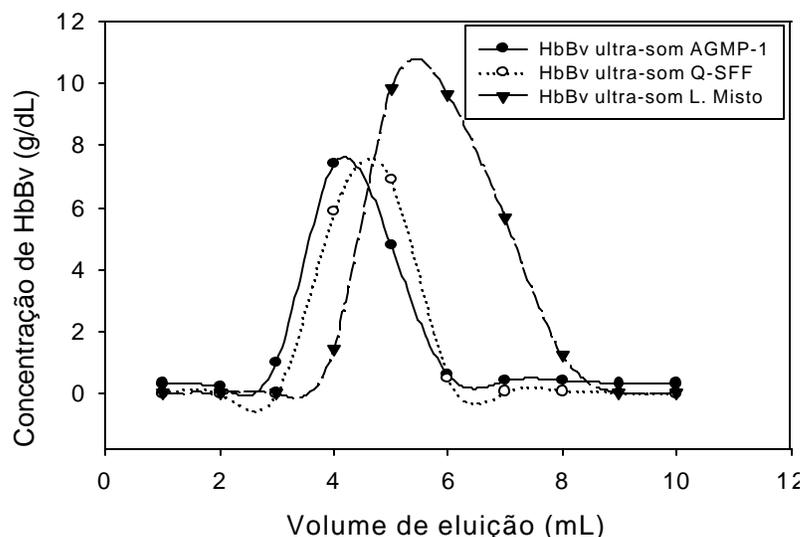


Figura 31 – Curva de eluição da amostra do hemolisado por ultra-som utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto

5.3.2. Cromatografia líquida em coluna

A amostra hemolisada por ultra-som foi purificada por cromatografia de troca iônica com as resinas aniônica forte (Q-SFF, AGMP-1 e L. Misto) com o objetivo de extrair fosfolípidos livres da membrana celular, que poderiam estar presentes como contaminantes junto à solução de HbBv. Na cromatografia líquida em coluna, o volume de solução a ser purificada é superior ao do sistema de cromatografia em Flash 12i, pois necessitamos de um volume maior de solução de hemoglobina purificada para podemos realizar as reações de modificação química para preparar o substituto temporário para o sangue, que é o objetivo principal deste trabalho. As Figuras 32-34 mostram as curvas de eluição obtidas para a amostra hemolisada por ultra-som, a partir do processo de purificação por cromatografia líquida em coluna onde a taxa de fluxo médio foi de 0,28; 0,46; e 0,39 mL/min para as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto, respectivamente.

Como pode ser observado nas curvas de eluição (Figuras 32, 33 e 34), foram obtidas pequenas distorções, em comparação a um comportamento gaussiano ideal, explicada em função do procedimento de empacotamento manual da coluna cromatografia sob condições atmosféricas, e que a resina Q-SFF apresentou uma

maior velocidade de fluxo, logo esta será uma resina com boa aplicação para obtermos maiores quantidades de solução de HbBv purificada em um menor tempo.

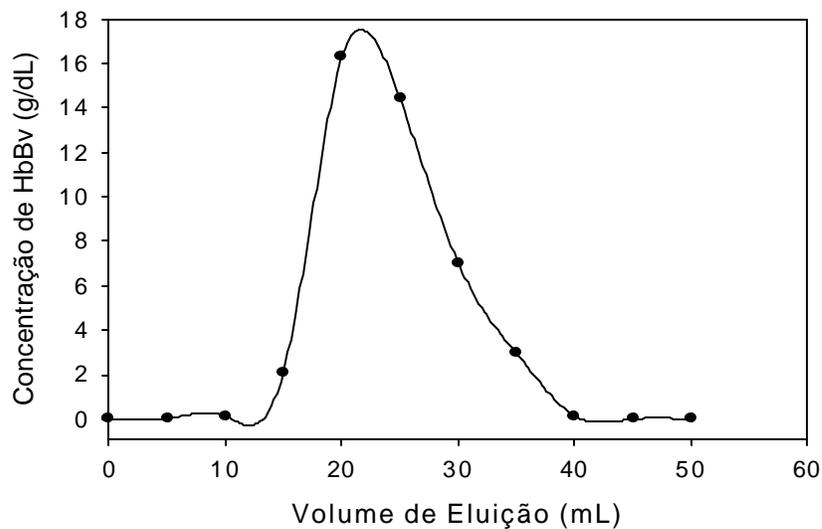


Figura 32 – Curva de eluição da amostra hemolisada por ultra-som usando resina AGMP-1

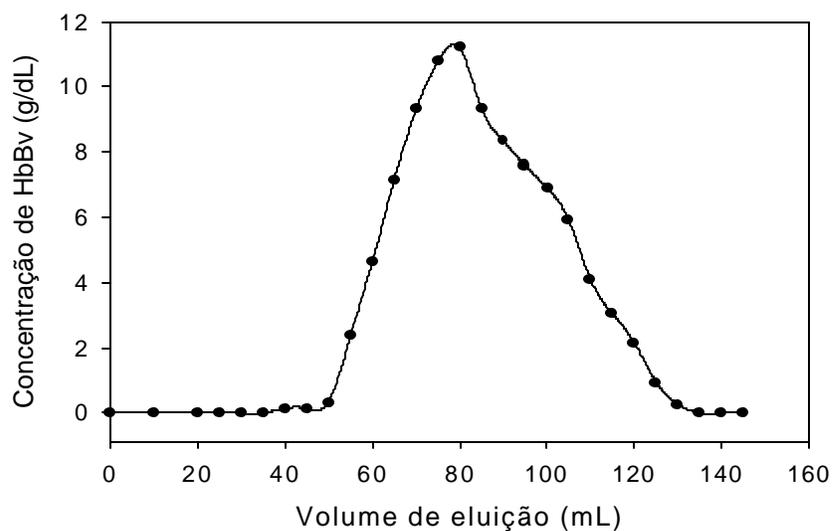


Figura 33 – Curva de eluição da amostra hemolisada por ultra-som usando resina Q-SFF

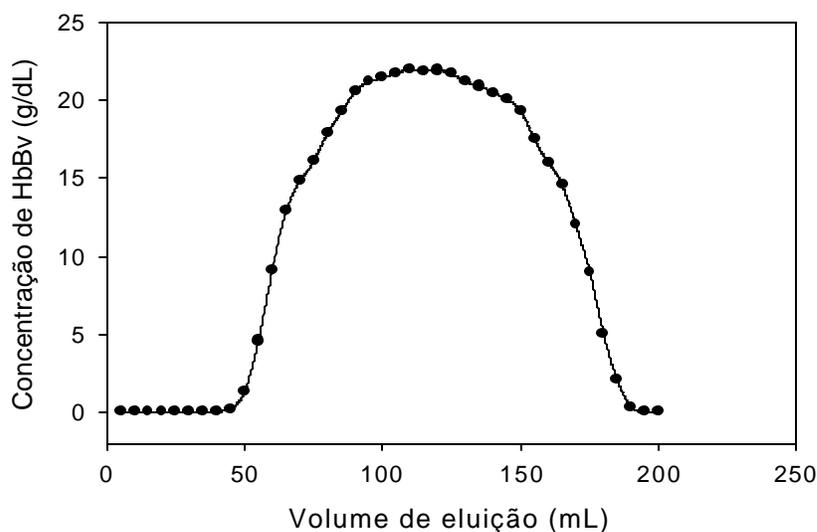


Figura 34 – Curva de eluição da amostra hemolisada por ultra-som usando resina leito misto

5.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA

A concentração de Hb foi calculada para as soluções de hemoglobina antes e após a purificação com resinas de troca iônica, pelo método da cianomete-hemoglobina [117]. Para tanto, uma curva de calibração foi mostrada (Figura 35), com valores de concentração de 0,05 a 14,00 g/dL de Hb padrão da Doles reagentes. A equação da concentração de Hb em relação à absorbância pode ser escrita como: $C = \frac{A \cdot 0,00144}{0,02641}$, onde C é a concentração de Hb em g/dL e A é a absorbância. A concentração de Hb foi calculada e os resultados obtidos são mostrados na Tabela 8, onde o método que apresenta uma maior concentração de hemoglobina é o do ultra-som visto que este não causa diluição na amostra. Dos métodos de lise por meio hipotônico ambos mostraram concentração de HbBv semelhantes.

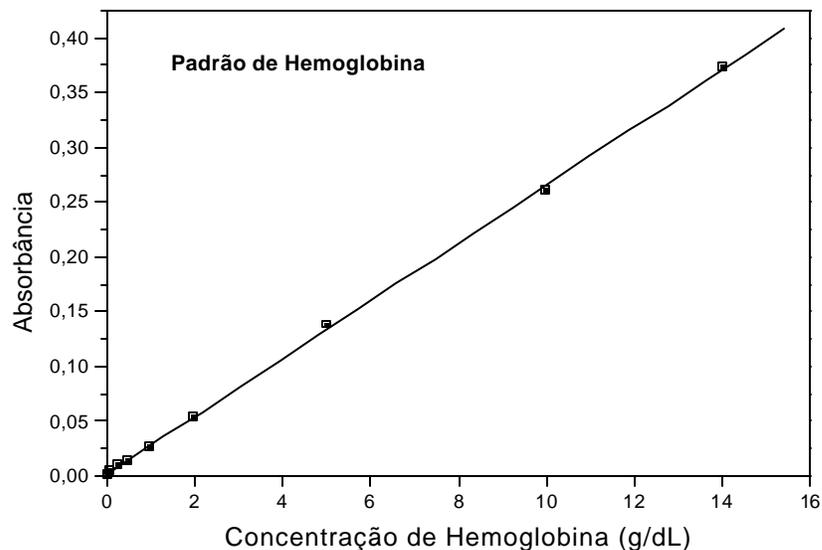


Figura 35 – Curva de calibração da concentração de hemoglobina *versus* absorvância

Tabela 8- Concentração de hemoglobina nas amostras isoladas por diferentes processos de hemólise

Amostras	[HbBv] (g/dL)
HbBv-H ₂ O 1:1	15,81 ± 0,005
HbBv-H ₂ O 1:2	10,33 ± 0,002
HbBv-NaCl 1:1	14,24 ± 0,002
HbBv-NaCl 1:2	9,61 ± 0,002
HbBv-Tris 1:1	14,77 ± 0,002
HbBv-Tris 1:2	8,54 ± 0,001
Ultra-som	23,09 ± 3,60

A Tabela 9 mostra os valores de concentração de hemoglobina após o processo de purificação por cromatografia em Flash 12i onde podemos perceber que, para todas as amostras, ocorreu diluição; porém, a lise por ultra-som resultou em amostras mais concentradas, portanto este método de lise é o mais indicado para obtermos uma solução de HbBv para ser modificada quimicamente. Os valores

de concentração mostrados na Tabela 9 são referentes a média das duas alíquotas mais concentradas da eluição em Flash 12i.

A Tabela 10 apresenta os valores de concentração de HbBv das amostras hemolisadas por ultra-som e purificadas pelo sistema de cromatografia líquida em coluna onde temos uma solução mais concentrada quando utilizamos o leito misto. Os valores de concentração mostrado na Tabela 10 referem-se as médias das amostras mais concentradas, que pode ser visto nas curvas de eluição das Figuras 32-34.

Tabela 9 - Concentração de HbBv após purificação no sistema cromatografia em Flash 12i

Amostra AGMP-1	[HbBv] (g/dL)	Amostra Q-SFF	[HbBv] (g/dL)	Amostra L. Misto	[HbBv] (g/dL)
HbBv-H ₂ O 1:1	4,39? 0,40	HbBv-H ₂ O 1:1	4,40? 0,68	HbBv-H ₂ O 1:1	4,94? 1,28
HbBv-H ₂ O 1:2	1,56? 0,80	HbBv-H ₂ O 1:2	2,21? 0,52	HbBv-H ₂ O 1:2	2,34? 0,61
HbBv-NaCl 1:1	4,88? 0,61	HbBv-NaCl 1:1	4,10? 0,68	HbBv-NaCl 1:1	3,36? 0,15
HbBv-NaCl 1:2	3,07? 1,35	HbBv-NaCl 1:2	3,15? 0,72	HbBv-NaCl 1:2	2,19? 0,29
HbBv-Tris 1:1	4,44? 1,31	HbBv-Tris 1:1	3,42? 0,37	HbBv-Tris 1:1	3,81? 0,75
HbBv-Tris 1:2	2,89? 0,75	HbBv-Tris 1:2	2,47? 0,72	HbBv-Tris 1:2	1,68? 0,32
HbBv Ultra -som	5,95? 1,04	HbBv Ultra-som	6,23? 1,15	HbBv Ultra -som	9,74? 0,15

Tabela 10 – Concentração de HbBv após purificação no sistema de cromatografia líquida em coluna

Amostras	[HbBv] (g/dL)
HbBv Ultra-som AGMP-1	12,59? 4,51
HbBv Ultra-som Q-SFF	7,74? 2,33
HbBv Ultra-som L. Misto	16,69? 2,34

5.5. ANÁLISE DE HPLC

Foi realizado um estudo da análise dos fosfolípidos residuais após a purificação da solução de HbBv por cromatografia de troca iônica tanto no sistema flash 12i como no sistema de cromatografia líquida em coluna. Os fosfolípidos residuais extraídos foram analisados por HPLC, técnica considerada como a mais sensível para identificar o tipo e a quantidade de fosfolípidos presentes em função dos respectivos tempos de eluição, em comparação com os tempos de eluição de amostras-padrão. Os padrões de fosfolípido usados foram a fosfatidilserina (FS), a fosfatidiletanolamina (FE), a fosfatidilcolina (FC) e a esfingomielina (EM), pois são os principais fosfolípidos constituintes da membrana eritrocitária. A Figura 36 mostra o cromatograma da solução-padrão, preparada com os fosfolípidos comerciais, que apresentam tempos de eluição de 4,16 min (FS); 5,3 min (FE); 10,0 min (FC) e 15,2 min (EM). A EM aparece como um pico largo ou duplo, pois a esfingomielina sintética é constituída de diastereoisômeros [118-120].

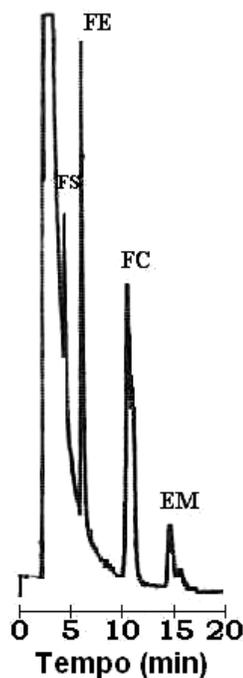


Figura 36 – Cromatograma de HPLC da solução de fosfolípidos-padrão

Os fosfolípidos FS, FE, FC e EM são os principais componentes da membrana das hemácias [114]. As Figuras 37 – 43, mostram os cromatogramas de HPLC das amostras HbBv isoladas por diferentes processos de lise, onde esses

fosfolipídeos estão presentes. Os tempos de eluição para esses fosfolipídeos foram 4,32; 5,55; 9,95 e 15,10 min, respectivamente. Dois outros picos foram detectados a 6,57 e 7,94 min (Figura 43a). Essas substâncias foram denominadas de U1 e U2 por outros pesquisadores, que também as detectaram em soluções de hemoglobina humana [33, 74, 118]. Embora a origem dessas substâncias não tenha sido completamente esclarecida, foi sugerido que são produtos de degradação dos fosfolipídeos, formados durante o tempo de armazenamento das amostras, sendo que um deles foi identificado como um diacilglicerídeo [118].

Todas as amostras, independentemente do tipo de hemólise sofrido, tiveram removidos completamente os fosfolipídios por meio de cromatografia com as resinas em uso. Os picos correspondentes a U2 não mais foram observados e uma redução significativa no teor de U1 pôde ser detectada. Pelos valores mostrados na Tabela 11 podemos observar que o método de hemólise tem influência na eliminação dos fosfolipídeos, pois podemos perceber que, dentre os meios hipotônicos, a lise com água foi a que apresentou uma menor quantidade de fosfolipídeos, já a lise por ultra-som além de originar uma maior concentração de HbBv temos uma menor quantidade de fosfolipídios.

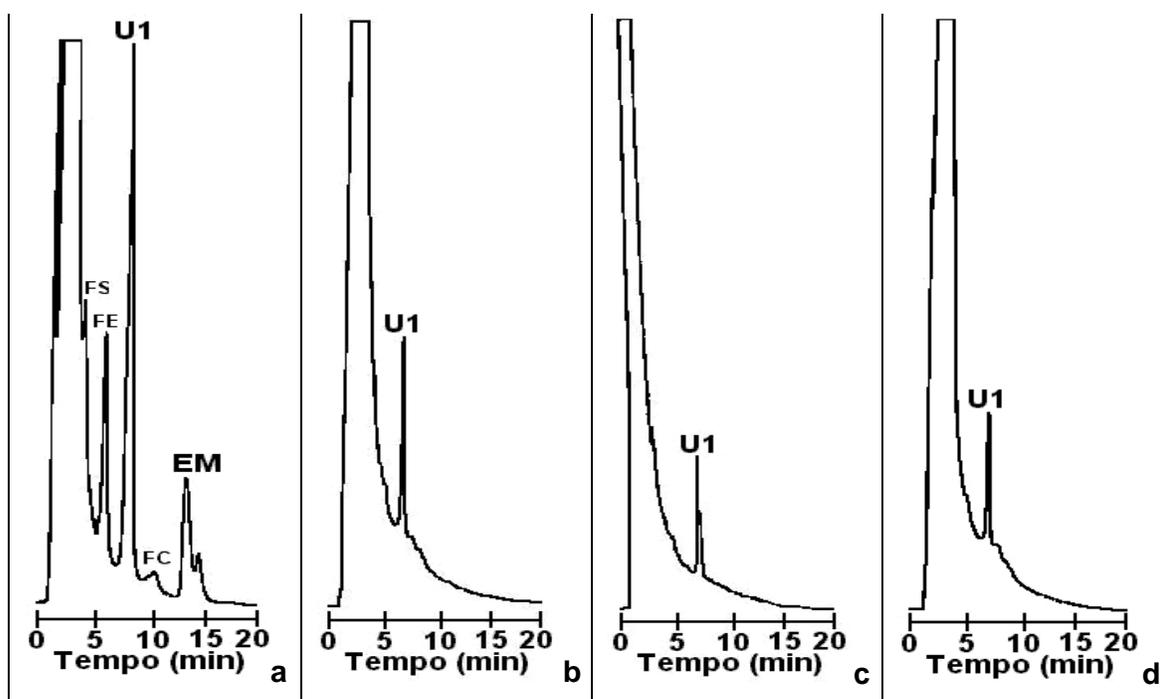


Figura 37 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-H₂O 1:1 não purificada, b) HbBv-H₂O 1:1 AGMP-1, c) HbBv-H₂O 1:1 Q-SFF e d) HbBv-H₂O 1:1 Leito Misto

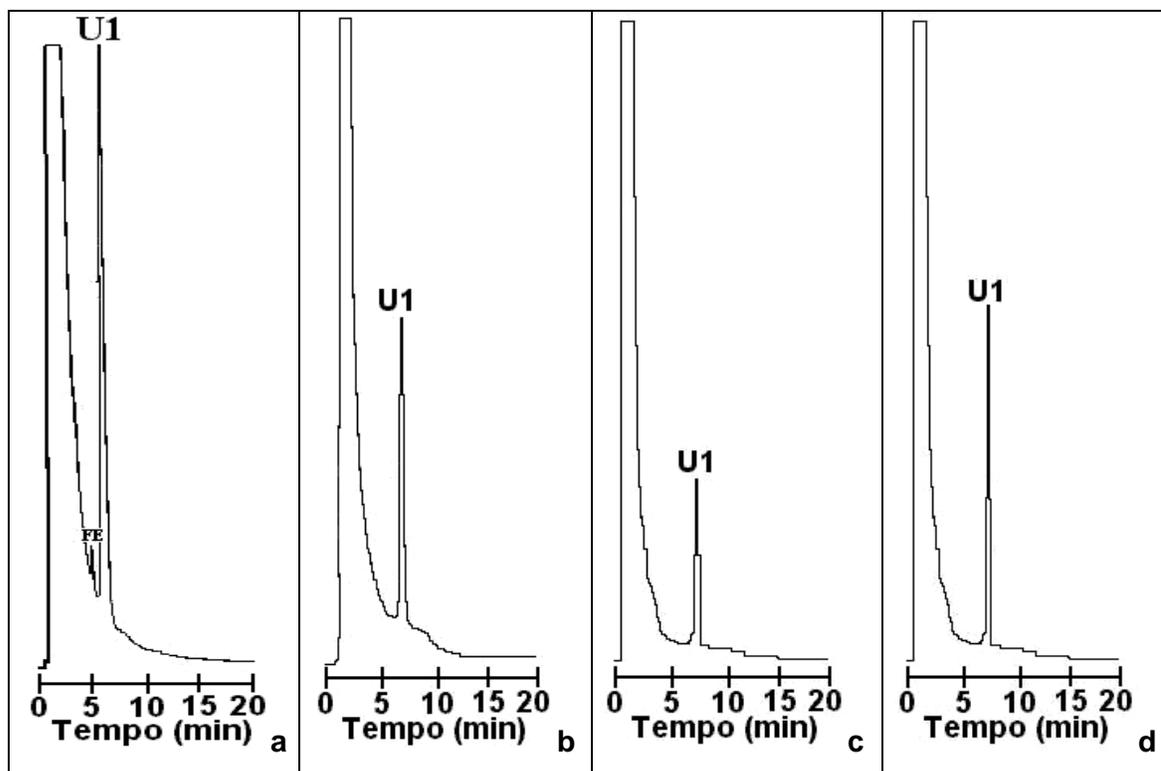


Figura 38 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-H₂O 1:2 não purificada, b) HbBv-H₂O 1:2 AGMP-1, c) HbBv-H₂O 1:2 Q-SFF e d) HbBv-H₂O 1:2 Leito Misto

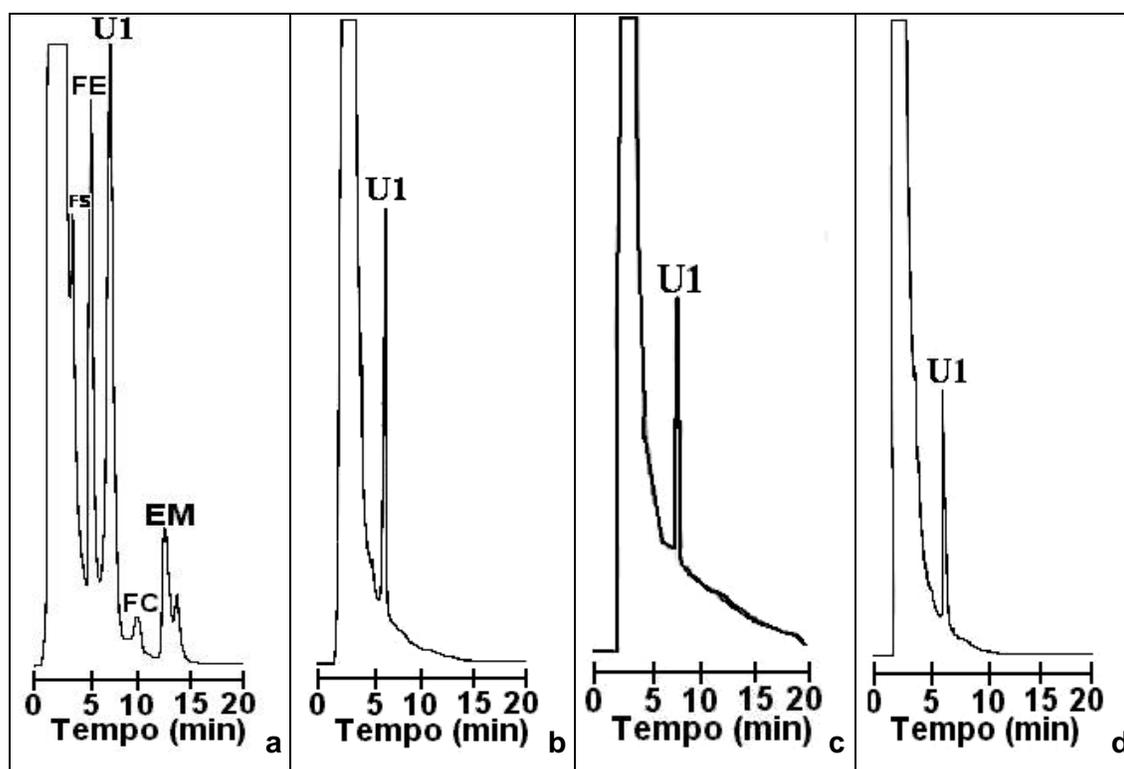


Figura 39 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-NaCl 1:1 purificada, b) HbBv-NaCl 1:1 AGMP-1, c) HbBv-NaCl 1:1 Q-SFF e d) HbBv-NaCl 1:1 Leito Misto

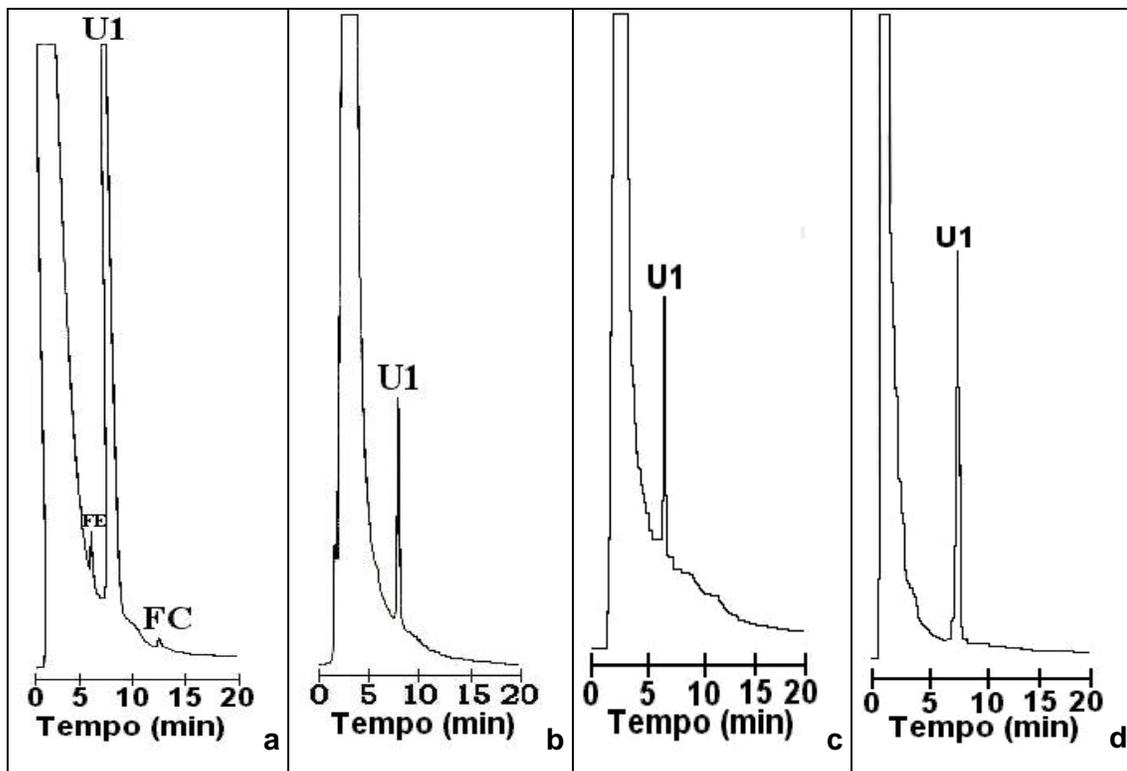


Figura 40 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-NaCl 1:2 não purificada, b) HbBv-NaCl 1:2 AGMP-1, c) HbBv-NaCl 1:2 Q-SFF e d) HbBv-NaCl 1:2 Leito Misto

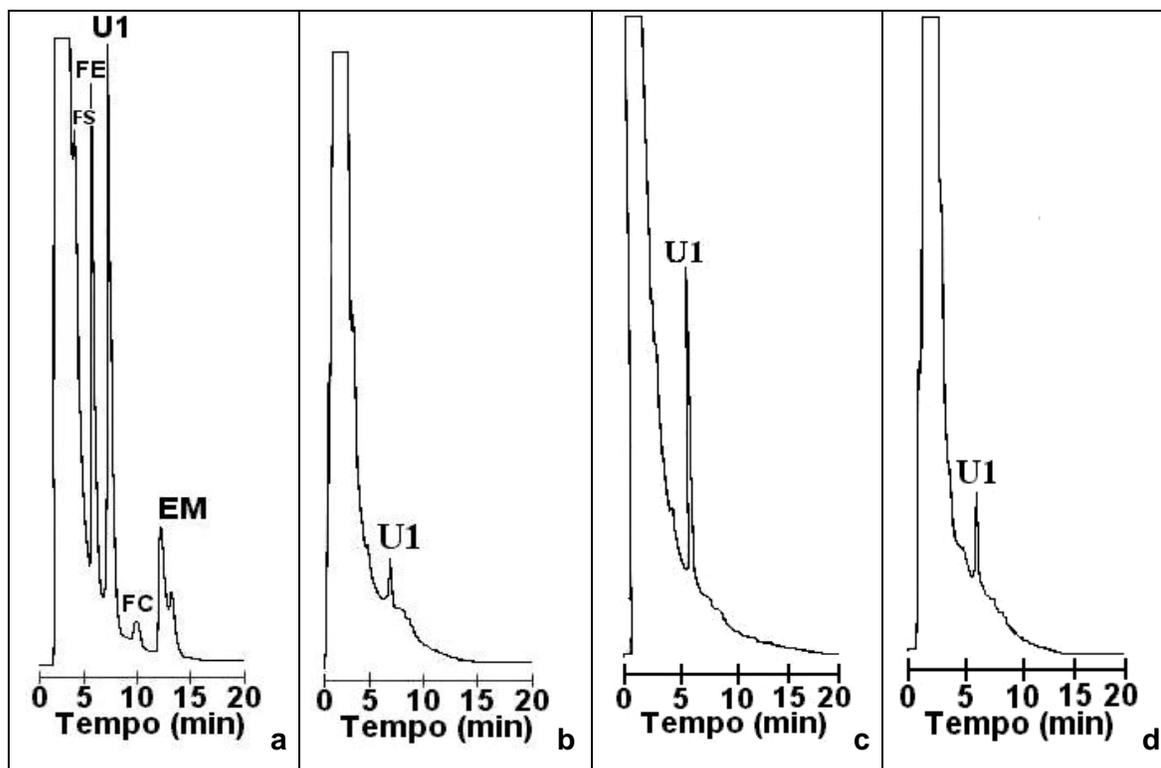


Figura 41 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-Tris 1:1 não purificada, b) HbBv-Tris 1:1 AGMP-1, c) HbBv-Tris 1:1 Q-SFF e d) HbBv-Tris 1:1 Leito Misto

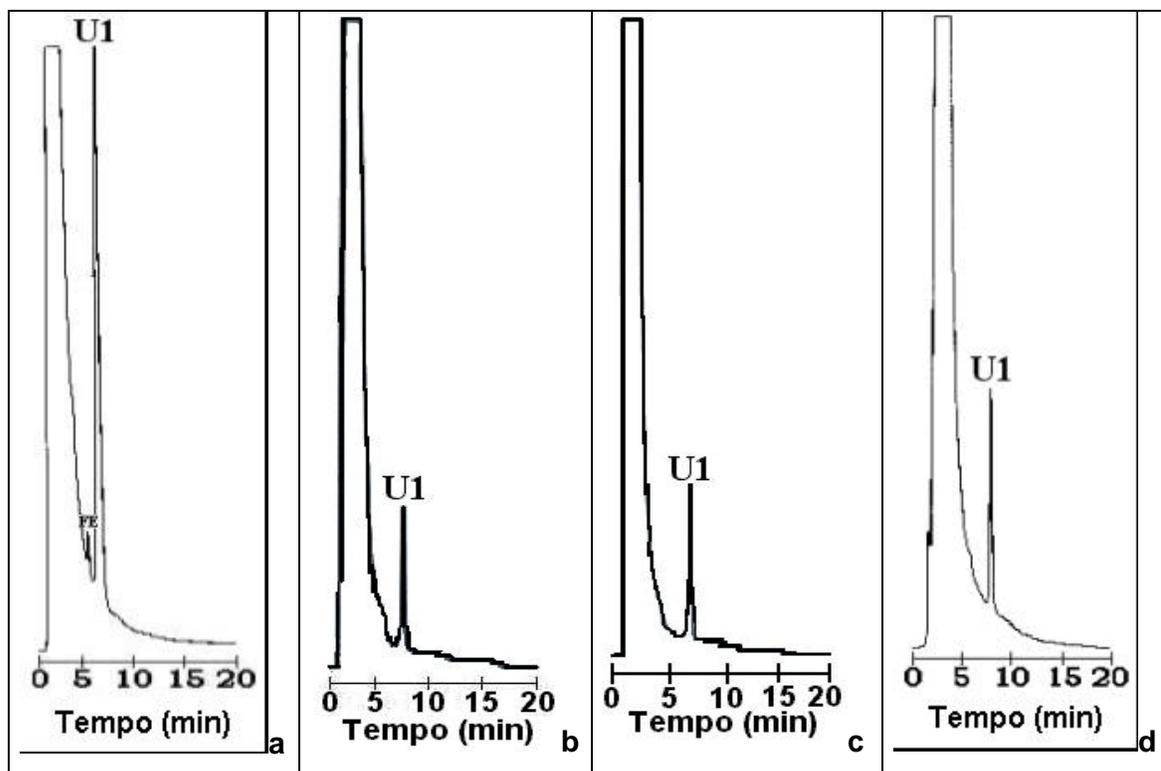


Figura 42 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-Tris 1:2 não purificada, b) HbBv-Tris 1:2 AGMP-1, c) HbBv-Tris 1:2 Q-SFF e d) HbBv-Tris 1:2 Leito Misto

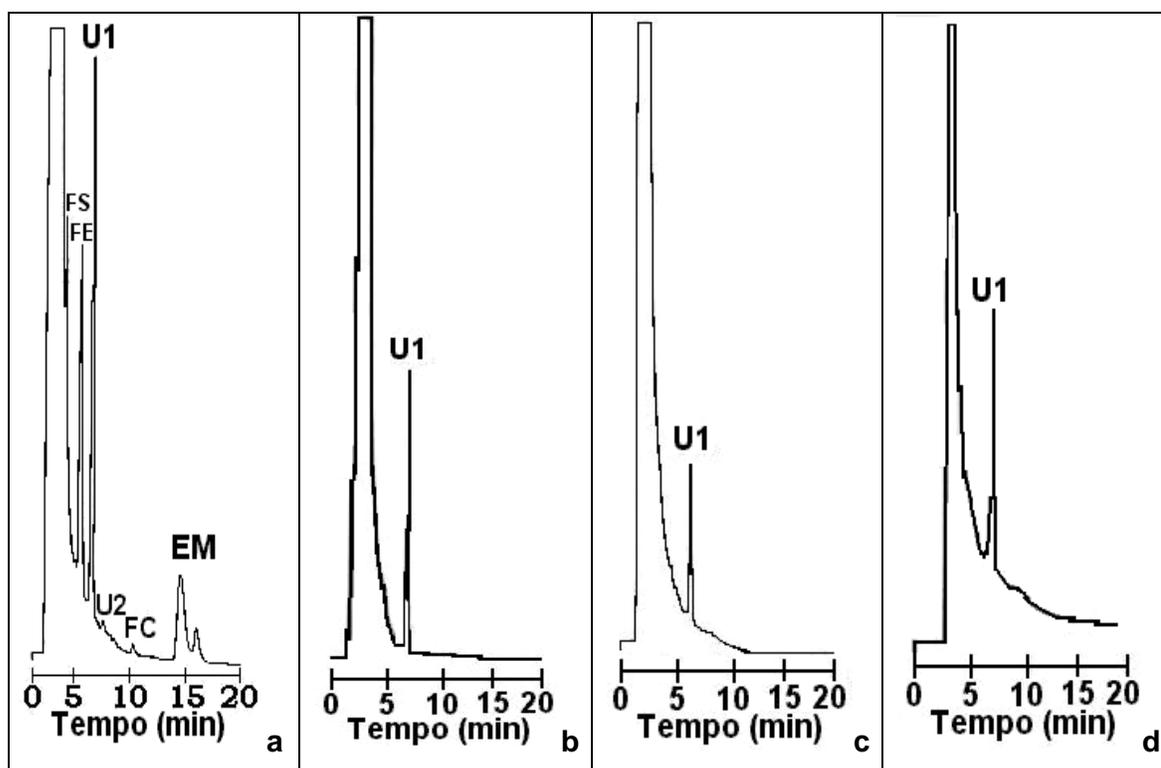


Figura 43 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv Ultra-som não purificada, b) HbBv Ultra-som AGMP-1, c) HbBv Ultra-som Q-SFF e d) HbBv Ultra-som Leito Misto

Tabela 11 - Concentração de fosfolípidos em μg por mL de solução de HbBv em amostras purificadas no sistema Flash 12i

AMOSTRAS	FS $\mu\text{g/mL}$	FE $\mu\text{g/mL}$	FC $\mu\text{g/mL}$	EM $\mu\text{g/mL}$
HbBv-H₂O 1:1	31,39 \pm 3,89	4,57 \pm 0,28	20,02 \pm 3,03	54,96 \pm 3,07
HbBv-H ₂ O 1:1 AGMP-1	nd	nd	nd	nd
HbBv-H ₂ O 1:1 Q-SFF	nd	nd	nd	nd
HbBv-H ₂ O 1:1 L-Misto	nd	nd	nd	nd
HbBv-H₂O 1:2	nd	0,13 \pm 0,03	nd	nd
HbBv-H ₂ O 1:2 AGMP-1	nd	nd	nd	nd
HbBv-H ₂ O 1:2 Q-SFF	nd	nd	nd	nd
HbBv-H ₂ O 1:2 L-Misto	nd	nd	nd	nd
HbBv-NaCl 1:1	97,07 \pm 7,24	14,87 \pm 1,88	77,39 \pm 4,76	93,68 \pm 0,18
HbBv-NaCl 1:1 AGMP-1	nd	nd	nd	nd
HbBv-NaCl 1:1 Q-SFF	nd	nd	nd	nd
HbBv-NaCl 1:1 L-Misto	nd	nd	nd	nd
HbBv-NaCl 1:2	nd	0,21 \pm 0,06	10,05 \pm 2,39	nd
HbBv-NaCl 1:2 AGMP-1	nd	nd	nd	nd
HbBv-NaCl 1:2 Q-SFF	nd	nd	nd	nd
HbBv-NaCl 1:2 L-Misto	nd	nd	nd	nd
HbBv-Tris 1:1	126,89 \pm 11,24	21,21 \pm 1,14	97,63 \pm 9,39	137,48 \pm 4,98
HbBv-Tris 1:1 AGMP-1	nd	nd	nd	nd
HbBv-Tris 1:1 Q-SFF	nd	nd	nd	nd
HbBv-Tris 1:1 L-Misto	nd	nd	nd	nd
HbBv-Tris 2:1	nd	0,56 \pm 0,03	nd	nd
HbBv-Tris 1:2 AGMP-1	nd	nd	nd	nd
HbBv-Tris 1:2 Q-SFF	nd	nd	nd	nd
HbBv-Tris 1:2 L-Misto	nd	nd	nd	nd
HbBv ultra-som	23,46 \pm 2,69	1,66 \pm 0,48	3,71 \pm 1,09	36,87 \pm 0,91
HbBv ultra-som AGMP-1	nd	nd	nd	Nd
HbBv ultra-som Q-SFF	nd	nd	nd	nd
HbBv ultra-som L-Misto	nd	nd	nd	nd

nd – não detectado.

A Figura 44 mostra o cromatograma de HPLC da HbBv purificada pela cromatografia líquida em coluna utilizando as resinas AGMP-1 e Q-SFF. Como pode ser observada, a purificação levou à eliminação completa dos fosfolípidos e de U2, e a uma redução no teor de U1.

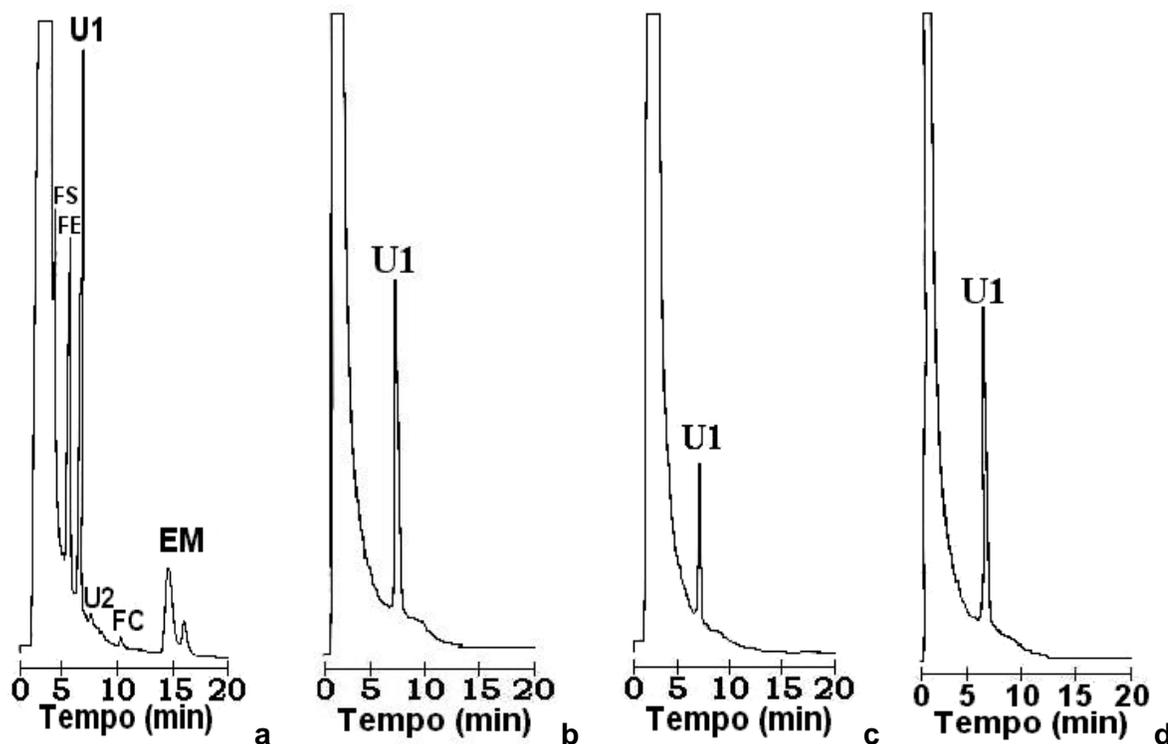


Figura 44 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv Ultra-som não purificada, b) HbBv Ultra-som AGMP-1, c) HbBv Ultra-som Q-SFF e d) HbBv Ultra-som Leito Misto

A Tabela 12 mostra a média das concentrações dos fosfolípidos por mL de solução de HbBv. Como se pode observar, o teor dos fosfolípidos varia na ordem $EM > FS > FE > FC$; ou seja, a eliminação foi proporcional à composição original da membrana. Como anteriormente citado, a composição de fosfolípidos na membrana eritrocitária bovina foi analisada por outros autores que, no entanto, não mencionaram a presença de FS em soluções de HbBv [29, 30]. Ainda na Tabela 12, os fosfolípidos FS, FE, FC e EM não foram detectados na amostra de HbBv purificada, o que confirma a eficiência da purificação.

Tabela 12 - Concentração de fosfolipídeos em μg por mL de solução de HbBv em amostras purificadas no sistema cromatografia líquida em coluna

AMOSTRAS	FS	FE	FC	EM
HbBv ultra-som	23,46 \pm 2,69	1,66 \pm 0,48	3,71 \pm 1,09	36,87 \pm 0,91
HbBv ultra-som AGMP-1	nd	nd	nd	nd
HbBv ultra-som Q-SFF	nd	nd	nd	nd
HbBv ultra-som L-Misto	nd	nd	nd	nd

nd – não detectado.

Após a etapa de purificação e de análise dos fosfolipídeos por HPLC, as amostras purificadas por cromatografia líquida em coluna usando a resina Q-SFF foram mantidas a -18°C por um período de 2 meses. Após esse período de armazenamento, foi decidido que uma nova série de análises deveria ser realizada com estas amostras, com o objetivo de verificar-se a estabilidade dos fosfolipídeos na amostra isolada e dos produtos de degradação na amostra purificada. A Figura 45a mostra que o pico referente à FC não mais foi detectado e houve uma inversão na intensidade dos picos referentes a U1 e U2. O pico atribuído a U2 ficou mais intenso e na amostra de HbBv após a purificação, durante o mesmo período, somente o U2 foi detectado (Figura 45b) com intensidade menor do que U1 da Figura 44c. Esse resultado confirma que tanto U1 como U2 são produtos de degradação, pois as suas concentrações variam com o tempo de armazenamento das amostras. As concentrações de U1 e de U2 variam com o tempo de armazenamento, o que corrobora a idéia de que U1 é instável e se transforma em U2, com o tempo (Figura 44c e 45b).

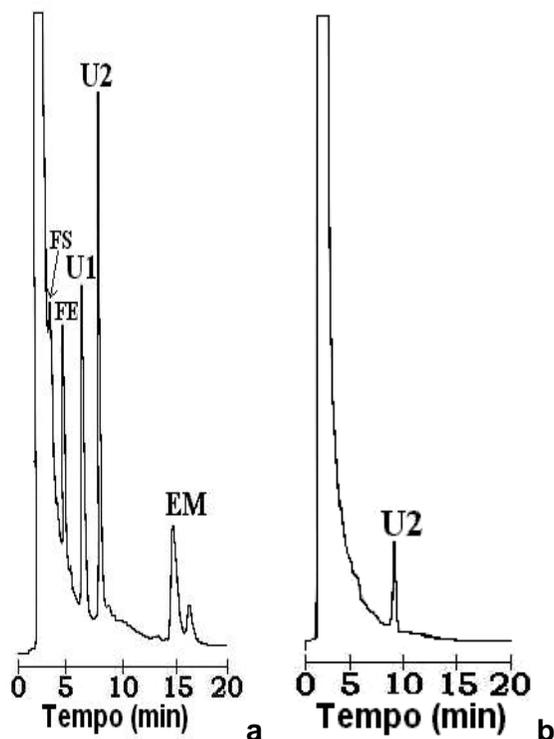


Figura 45 – Cromatogramas de HPLC das amostras após dois meses de armazenamento: a) solução de HbBv ultra-som e b) solução de HbBv ultra-som Q-SFF

A Tabela 13 mostra as concentrações de fosfolídeos na amostra de HbBv isolada e posteriormente armazenada durante 2 meses. Quando os resultados da Tabela 12 são comparados com os dados da Tabela 13, pode ser verificado que o teor da maioria dos fosfolídeos decresceu ao longo do tempo de armazenamento. No caso da FC, a redução na concentração, no mínimo, alcançou níveis tão baixos que não mais foi detectada pela técnica de HPLC.

Tabela 13 – Concentração de fosfolídeos em $\mu\text{g/mL}$ de solução de HbBv após 2 meses de armazenamento

AMOSTRAS	FS $\mu\text{g/mL}$	FE $\mu\text{g/mL}$	FC $\mu\text{g/mL}$	EM $\mu\text{g/mL}$
HbBv ultra-som após 2 meses	7,29 \pm 2,41	1,66 \pm 0,45	nd	34,51 \pm 0,25

nd - não detectado.

5.6. ANÁLISE DE ELETROFORESE

As amostras das soluções de hemoglobina bovina foram também analisadas por eletroforese nativa e desnaturante. Estas técnicas foram utilizadas com intuito principal de verificar o efeito da hemólise e da purificação na conformação da hemoglobina e a presença de proteínas diferentes da HbBv.

Na eletroforese nativa (Figuras 46a, 46b, 48a, 48b e 50a) todos os meios de hemólise e os diferentes tipos de resinas mantiveram a conformação da hemoglobina inalterada como pode ser observado pela baixa mobilidade eletroforética. A eletroforese desnaturante (Figuras 47a, 47b, 49a, 49b e 50b) apresentou apenas uma banda em torno de 14 kDa, que corresponde a cada globina do tetrâmero, portanto os diferentes meios de lise e as resinas AGMP-1 e Q-SFF foram eficientes para eliminação de proteínas contaminantes diferentes de HbBv.

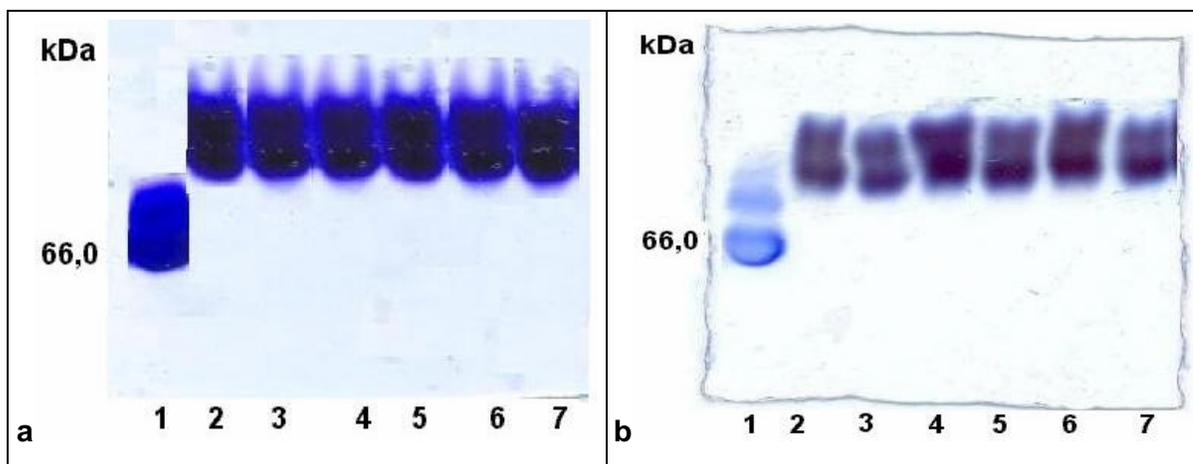


Figura 46 – Eletroforese nativa da HbBv hemolisada nas proporções 1:1 (a) e 1:2 (b); hemolisados antes da purificação: H₂O (linha 2), NaCl (linha 4) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 6). Hemolisados após purificação com resina AGMP -1: H₂O (linha 3), NaCl (linha 5) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 7). Na linha 1 encontra-se o padrão albumina bovina

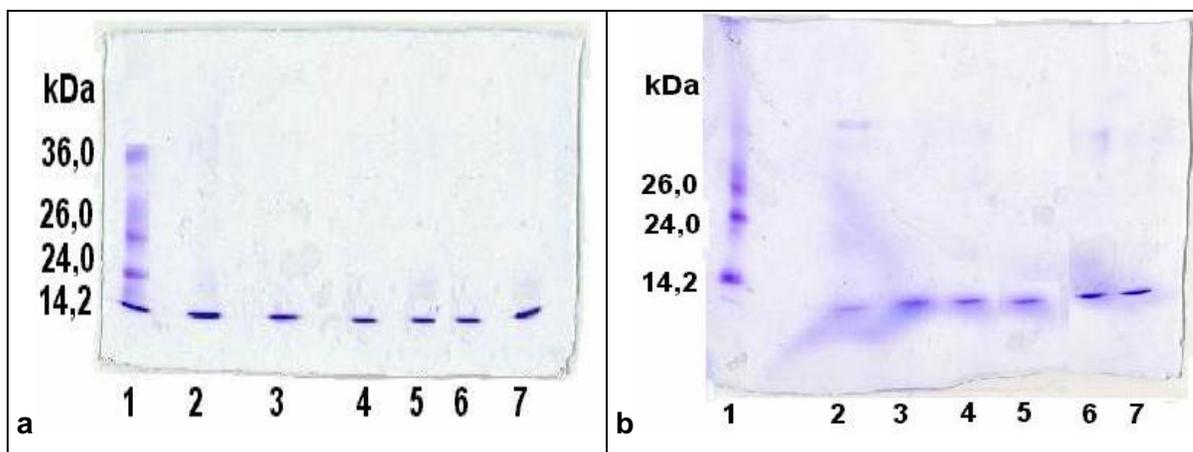


Figura 47 – Eletroforese desnaturante da HbBv hemolisada nas proporções 1:1 (a) e 1:2 (b); hemolisados antes da purificação: H₂O (linha 2), NaCl (linha 4) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 6). Hemolisados após purificação com resina AGMP-1: H₂O (linha 3), NaCl (linha 5) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 7). Na linha 1 encontra-se a mistura de proteínas padrões

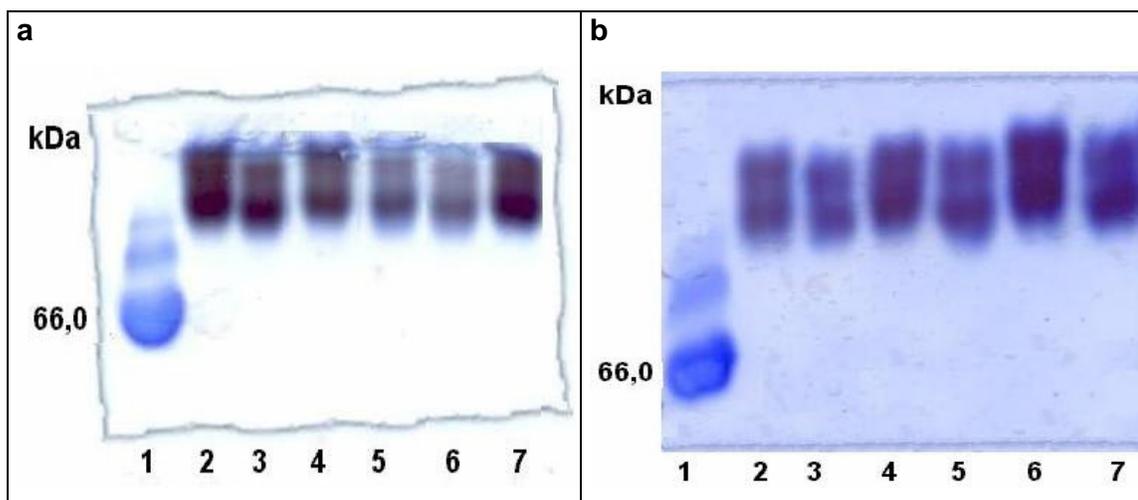


Figura 48 – Eletroforese nativa da HbBv hemolisada nas proporções 1:1 (a) e 1:2 (b); hemolisados antes da purificação: H₂O (linha 2), NaCl (linha 4) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 6). Hemolisados após purificação com resina Q-SFF: H₂O (linha 3), NaCl (linha 5) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 7). Na linha 1 encontra-se o padrão albumina bovina

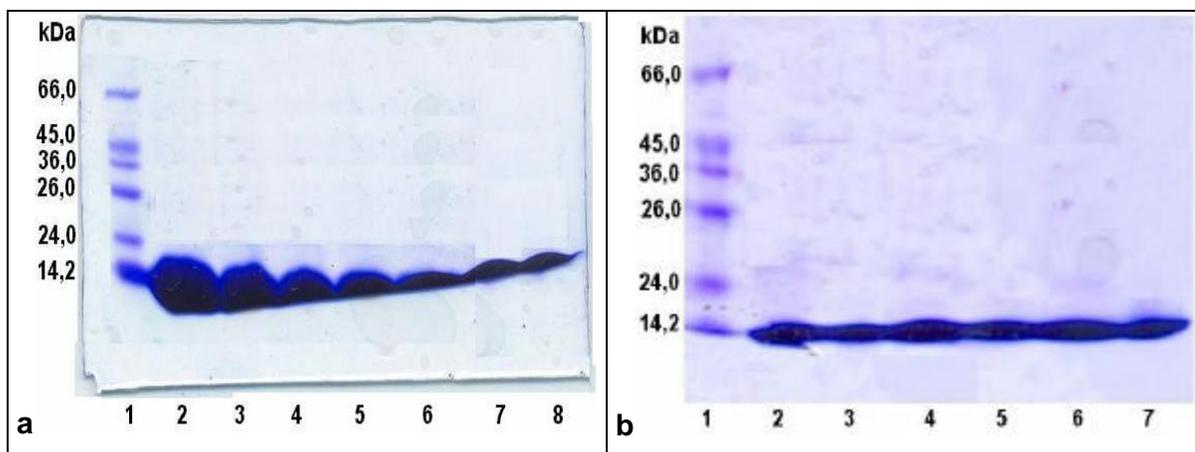


Figura 49 – Eletroforese desnaturante da HbBv hemolisada nas proporções 1:1 (a) e 1:2 (b); hemolisados antes da purificação: H₂O (linha 2), NaCl (linha 4) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 6). Hemolisados após purificação com resina Q-SFF: H₂O (linha 3), NaCl (linha 5) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 7). Na linha 1 encontra-se a mistura de proteínas padrões

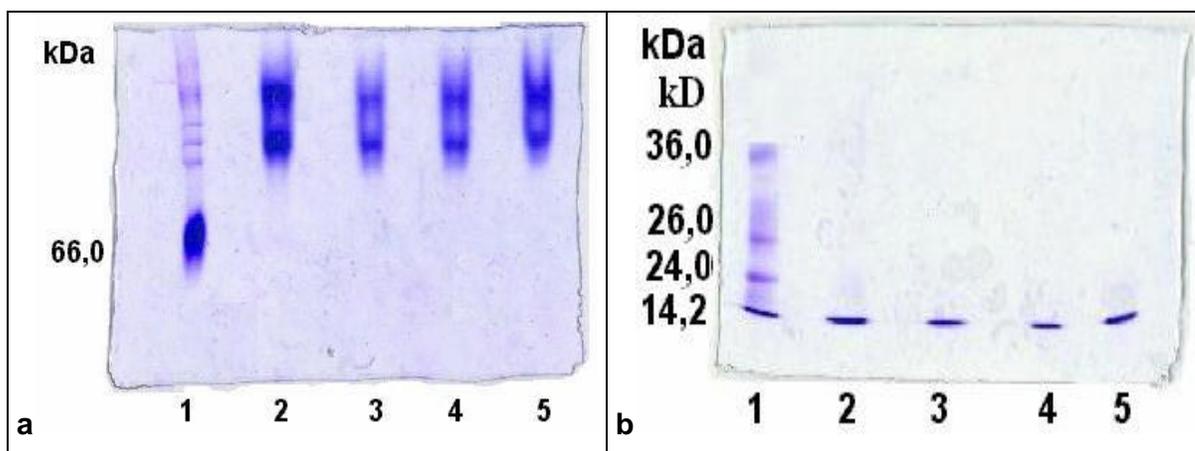


Figura 50 – Eletroforese da HbBv hemolisada pela técnica de ultra-som; nativa (a) e desnaturante (b); hemolisados antes da purificação: (linha 2). Hemolisados após purificação com resina AGMP-1 (linha 3), Q-SFF (linha 4) e Leito Misto (linha 5). Na linha 1 encontra-se o padrão albumina bovina na Figura a e na Figura b linha 1 a mistura de proteínas padrões

5.7. OBTENÇÃO DOS REAGENTES FORMADORES DE LIGAÇÕES CRUZADAS

Sacarídeos e polissacarídeos são estudados como agentes promotores de ligações cruzadas com a Hb, pois os produtos assim modificados, fornecem valores de $P_{50} \approx 8$ mmHg, onde estão de acordo com o paradigma atual proposto por Winslow [72], pois valores de P_{50} baixos facilitam a oxigenação dos órgãos e tecidos. E para aumentar o tempo de meia-vida na circulação deve-se trabalhar com produtos com baixa concentração de Hb e alto peso molecular.

Neste trabalho utilizamos os dissacarídeos sacarose e trealose como reagentes promotores de ligações cruzadas intra e intermoleculares da HbBv (Figura 51). Como já visto, os dissacarídeos foram oxidados com o periodato de sódio (NaIO_4), o qual promove a quebra da ligação C-C com grupos hidroxila vicinais, e leva a tri e tetra-aldeídos. Os aldeídos reagem com resíduos de aminoácidos disponíveis na HbBv formando grupamentos iminas instáveis, que são reduzidos com boridreto de sódio (NaBH_4) e formam grupos amina estáveis (reação de formação de base de Schiff) [121].

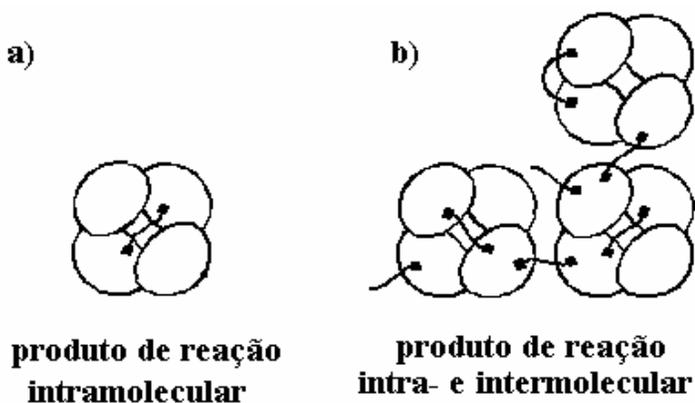


Figura 51 – Estruturas propostas para as espécies formadas a partir de reação da HbBv com os o-dissacarídeos

As Figuras 52 e 53 mostram os espectros de absorção na região do infravermelho para os dissacarídeos sacarose e trealose, respectivamente, e para os produtos resultantes de suas reações de oxidação. A presença do pico a 1720 cm^{-1} , característico de estiramento da ligação C=O de aldeído, indica que ocorreu a formação desses grupos funcionais (-CHO).

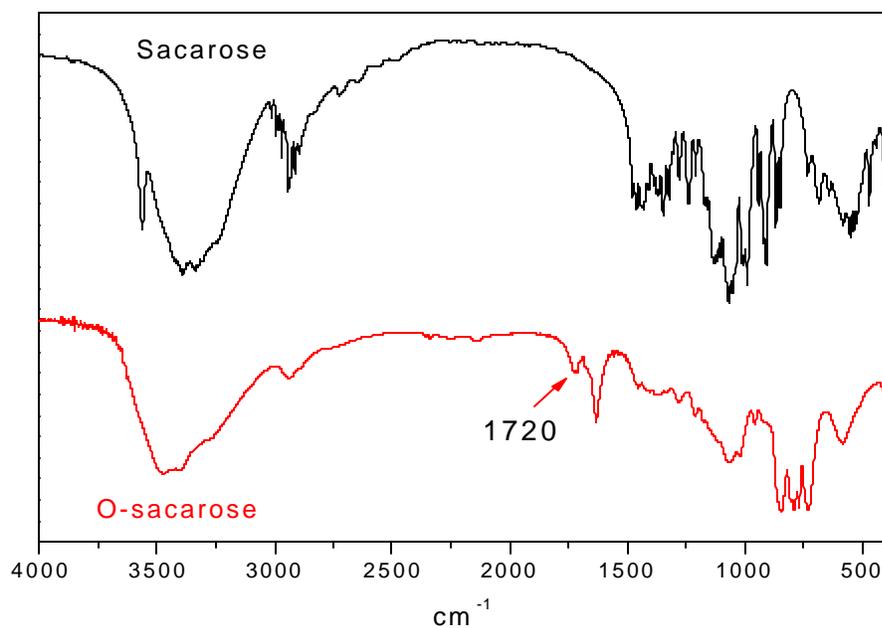


Figura 52 – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para o dissacarídeo sacarose antes (sacarose) e após a reação de oxidação com NaIO₄ (o-sacarose)

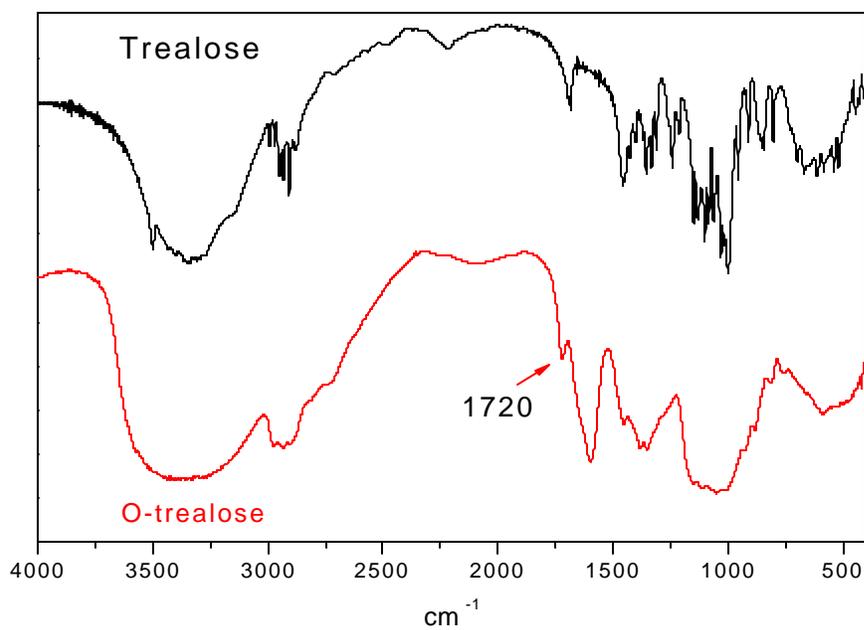


Figura 53 – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para o dissacarídeo trealose antes (trealose) e após reação de oxidação com NaIO₄ (o-trealose)

5.8. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA HbBv ANALISADA POR HPLC E POR ELETROFORESE

A amostra de HbBv purificada e as amostras de HbBv modificadas por meio de reações com os dissacarídeos oxidados, o-sacarose e o-trealose, foram analisadas por HPLC e por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE).

Pela técnica de HPLC, com uma coluna de exclusão por tamanho é possível determinar o grau de modificação química (Figura 51). O cromatograma de HPLC na Figura 54 apresenta um pico a 13,5 min, referente ao tetrâmero de HbBv dissociado devido à adição de $MgCl_2$ no eluente.

O objetivo desta dissociação é a diferenciação dos picos da HbBv purificada, e os picos das HbBv modificadas. Na HbBv modificada, as unidades do tetrâmero mantêm-se unidas por ligações covalentes; portanto, não ocorrerá dissociação e os picos relativos às ligações intra e intermoleculares terão menores tempo de retenção, sendo assim possível suas separações.

Já a técnica de análise em SDS-PAGE, o emulsificante dodecil-sulfato de sódio (SDS) é usado para quebrar as interações físicas responsáveis pela estabilização do tetrâmero (64 kDa). Logo, o tratamento térmico com SDS dissocia o tetrâmero em quatro subunidades (14,2 kDa). Assim, a HbBv purificada exibe uma banda correspondente a 14,2 kDa como pode ser visto nas Figuras 57, 60 e 63 (linha 2). Nas Figuras 57, 60 e 63, a linha 1 corresponde ao padrão de proteínas usado e encontra-se descrito na metodologia.

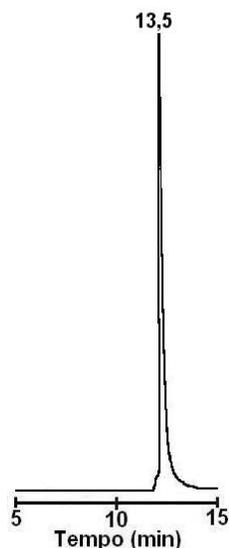


Figura 54 – Cromatograma da HbBv sem modificação

Analisando os produtos de HbBv modificada com o-sacarose nas razões molares 5:1 e 20:1 (o-sacarose:HbBv), foi observado que na proporção 5:1 de o-sacarose apareceu um ombro na região de menor tempo de retenção, como pode ser visto na Figura 55 a-c indicado pelas setas, o que indica modificação química, e quando a proporção de o-sacarose foi aumentada para 20:1, houve a formação de um pico a 13,0 min, indicando a formação de interações intramoleculares, entre as unidade da molécula de HbBv (Figura 56). Através da integração da área sob o pico de HbBv a 13,5 min, na Figura 54, foi calculado o grau de modificação química para a HbBv modificada com o-sacarose na proporção 20:1 de 31,2% para a reação 20:1/2h/2:1, 35,1% para a reação 20:1/2h/5:1 e 4,6% para a reação 20:1/2h/10:1. Isso pode ser confirmado pela eletroforese SDS-PAGE (Figura 57), pois para a razão molar 20:1, todos apresentaram bandas intensas na região de ligação intramolecular com pesos moleculares na faixa de 24,0 kDa, o que corresponde a meros de HbBv ligados.

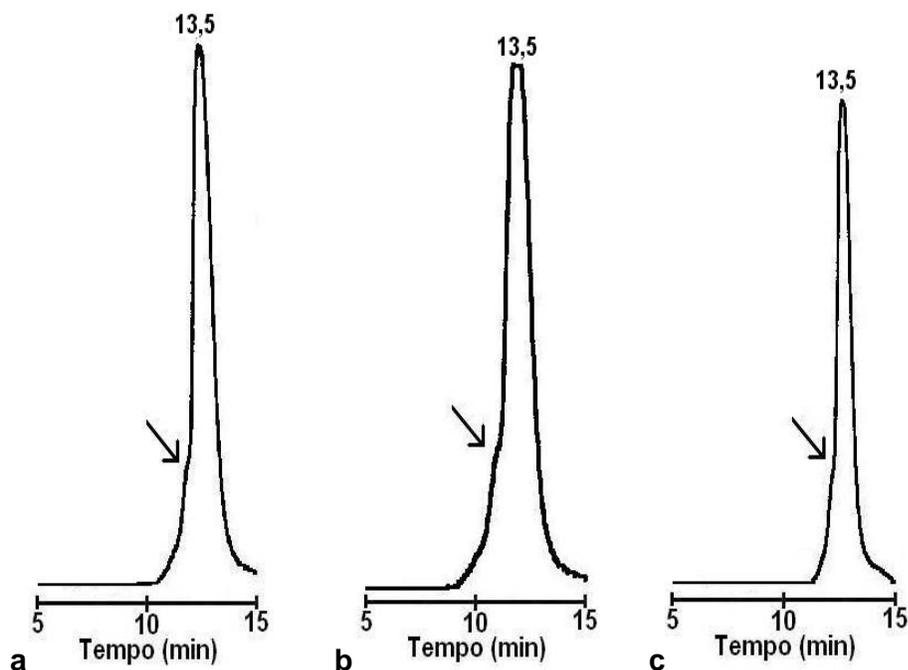


Figura 55 – Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-sacarose:

a) 5:1/2h/2:1, b) 5:1/2h/5:1 e c) 5:1/2h/10:1

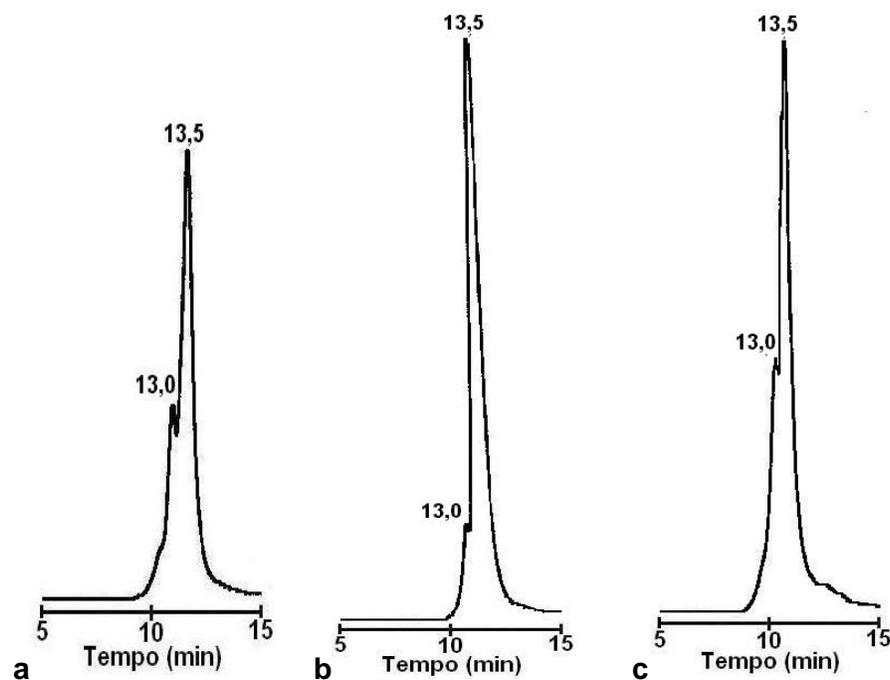


Figura 56 – Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-sacarose:
a) 20:1/2h/2:1, b) 20:1/2h/5:1 e c) 20:1/2h/10:1

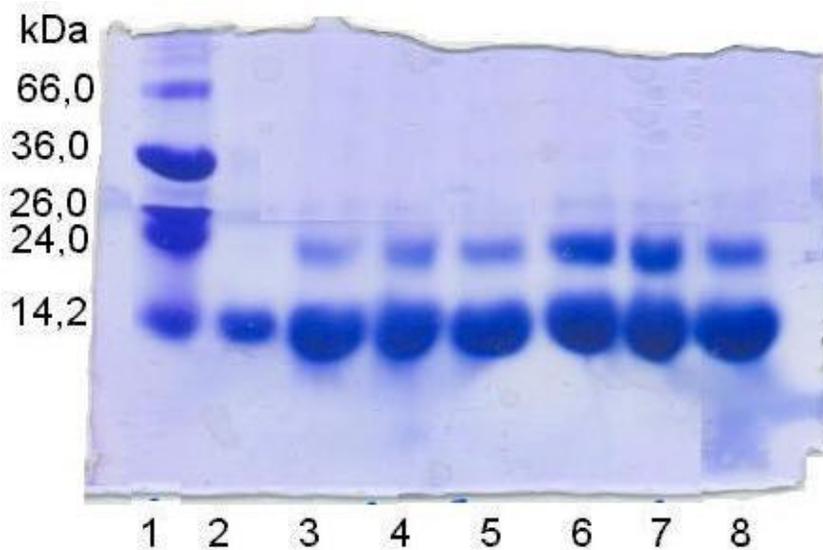


Figura 57 – Eletroforese da HbBv modificada com o-sacarose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), 5:1/2h/2:1 (linha 3), 5:1/2h/5:1 (linha 4), 5:1/2h/10:1 (linha 5), 20:1/2h/2:1 (linha 6), 20:1/2h/5:1 (linha 7) e 20:1/2h/10:1 (linha 8)

Seguindo o estudo com o-sacarose como reagente modificador da HbBv, foi utilizada a concentração 5:1 em diferentes tempos de reação. Foram realizadas reações de 6 e 24 horas. E os resultados de HPLC e SDS-PAGE mostram que, com o aumento do tempo reacional houve um considerável aumento da formação de ligações cruzadas intra e intermolecular, pode ser visto os picos a 13,0 e 12,0 min respectivamente (Figuras 58-60). Na Figura 61 um aumento no tempo reacional seguido de um aumento na concentração de boroidreto de sódio, aumentou consideravelmente o porcentual de espécies modificadas usando a o-sacarose como reagente modificador da HbBv. Palmer conseguiu um aumento de espécies modificadas, quando aumentou o tempo de reações nas quais o glutaraldeído foi usado como agente modificador da HbBv [122].

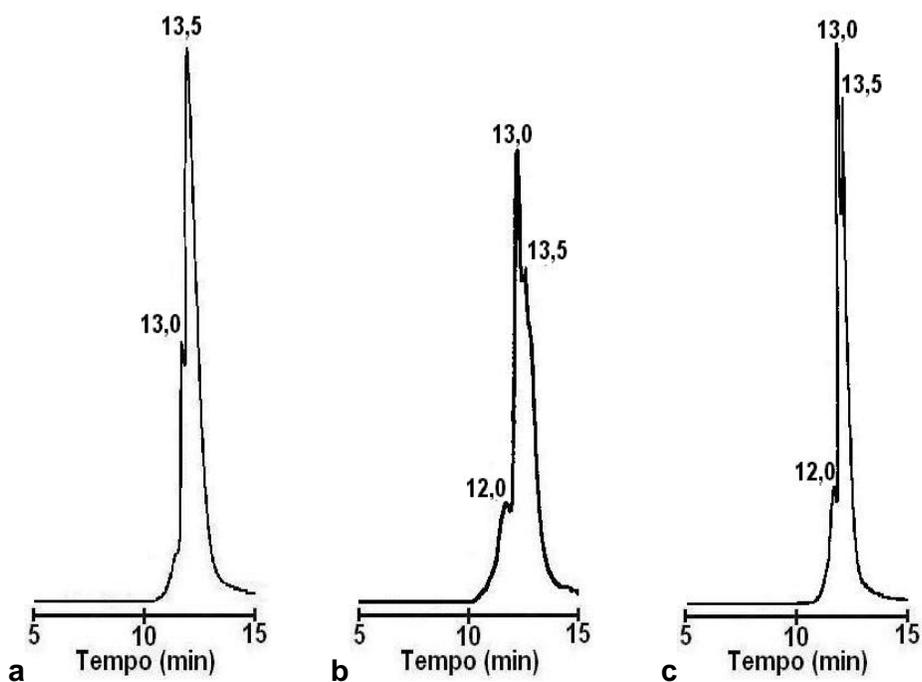


Figura 58 – Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-sacarose:

a) 5:1/6h/2:1, b) 5:1/6h/5:1 e c) 5:1/6h/10:1

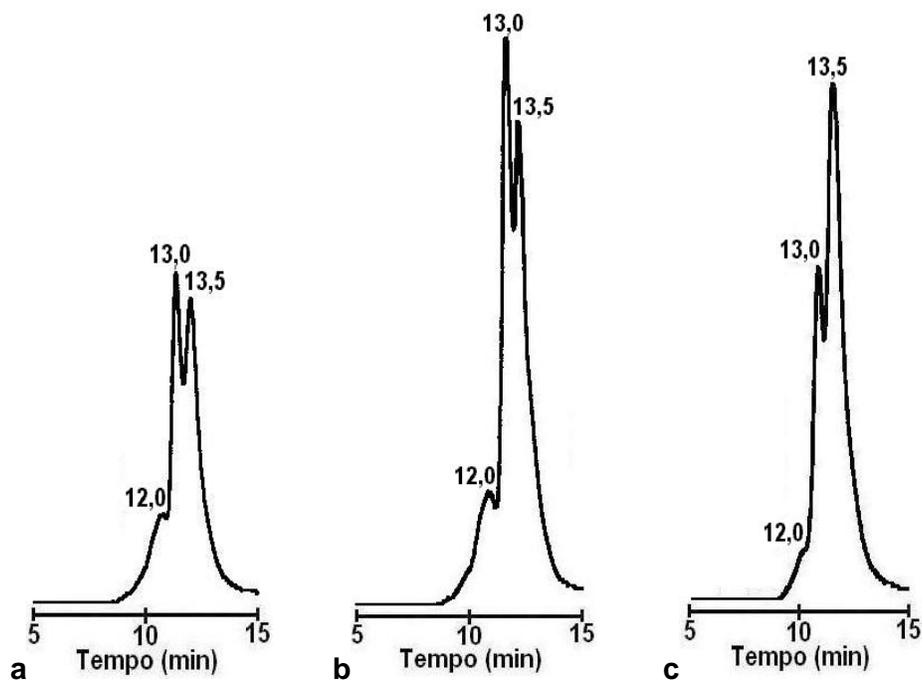


Figura 59 – Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-sacarose:
 a) 5:1/24h/2:1, b) 5:1/24h/5:1 e c) 5:1/24h/10:1

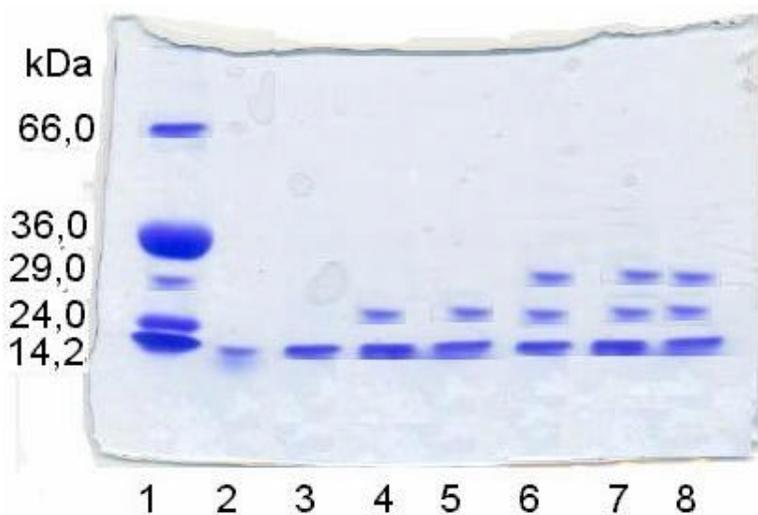


Figura 60 – Eletroforese da HbBv modificada com o-sacarose; padrão (linha 1),
 HbBv sem modificar (linha 2), 5:1/6h/2:1 (linha 3), 5:1/6h/5:1 (linha 4), 5:1/6h/10:1
 (linha 5), 5:1/24h/2:1 (linha 6), 5:1/24h/5:1 (linha 7) e 5:1/24h/10:1 (linha 8)

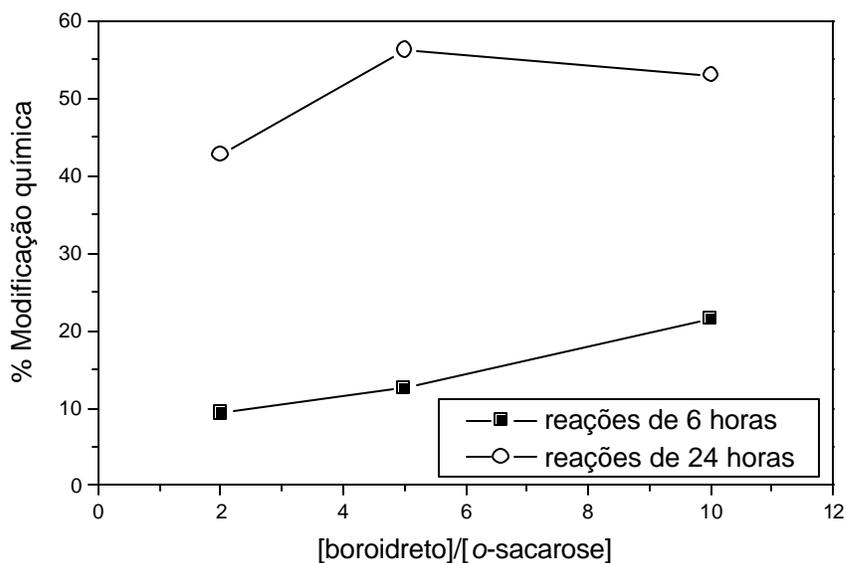


Figura 61 – Porcentual total de modificação versus razão molar [boroidreto]/[o-sacarose]

O estudo com o dissacarídeo o-trealose foi realizado em condições diferentes em relação à o-sacarose. Foi realizado um delineamento experimental central composto e o modelo matemático de superfície de resposta seriam empregados para o estudo de três variáveis independentes (concentração de dissacarídeo oxidado [o-dissacarídeo], tempo (h) e concentração de agente redutor [NaBH₄]) e da interação entre elas. Nesse delineamento, foram adotados três níveis codificados (-1, 0, +1) e dois níveis de variáveis axiais (-?, +?), com quatro repetições do ponto central. Para a variável [o-dissacarídeo], o valor do ponto central foi de 40, e a variação dos níveis codificados foi de 20. Para a variável tempo, o ponto central foi de 6, com variações de 2. O valor do ponto central para a variável [NaBH₄] foi de 10; os outros níveis codificados tiveram intervalos de 5. O valor de ? foi determinado como igual a 1,682. A Tabela 1 resume o delineamento experimental, para o qual os valores máximos e mínimos de cada variável independente foram estabelecidos com base em ensaios preliminares. Esse delineamento foi realizado com auxílio do programa computacional Statistica para Windows versão 5.0 (1995).

Tabela 14 - Variáveis independentes codificadas

Variáveis independentes	Níveis				
	-?	-1	0	+1	+?
[o-dissacarídeo], X_1	6,36	20	40	60	73,63
Tempo (h), X_2	3,2	4	6	8	9,4
[NaBH ₄], X_3	1,59	5	10	15	18,41

Para análise dos resultados, o software Statistica também seria empregado com o uso da Regressão e da Análise de Variância (ANOVA). Um modelo de segunda ordem seria usado para o estudo das variáveis dependentes:

$$y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3$$

Equação (1).

Porém, no desenvolver dos experimentos ocorreram problemas de formação de gel (desnaturação da proteína), em função da concentração de o-trealose em relação ao agente redutor [NaBH₄]. Logo, aqui só serão discutidas as reações que foram possíveis de serem realizadas.

A Tabela 15 mostra para as diferentes condições de reação o grau de modificação química para a HbBv usando o-trealose como reagente de modificação. O tempo é um fator determinante na obtenção de um alto rendimento de modificação química, pois com o tempo de 2 horas, em ambas as concentrações (5:1 e 20:1), o percentual de modificação foi muito baixo. A melhor condição de reação foi para a o-trealose 40:1/6h/18,4:1, pois praticamente todos os tetrâmeros de HbBv foram modificados (Figuras 64e e 65, linha 6), e um grande número de ligações intermoleculares foi formado, mostrado através do pico intenso em 8,0 minutos (Figura 64e), pois como o HPLC não considerou o pico em 13,5 min, esta amostra foi denominada 100% modificada, porém sabe-se que tem um pequeno outro na Figura 64e relativo a tetrâmeros de Hb não modificados. Espécies de altos pesos moleculares também foram formadas nas proporções 60:1/4h/2:1 e 60:1/4h/5:1, o que mostra que o tempo, a concentração de dissacarídeo oxidado e a concentração

do agente redutor são fatores determinantes na obtenção do produto final com um alto grau de modificação química [121,122].

Tabela 15 – Porcentual de modificação química para a HbBv modificada por o-trealose

Amostras	Modificação química (%)
5:1/2h/2:1	2,3
6,36:1/6h/10:1	72,0
20:1/2h/2:1	2,81
20:1/4h/5:1	77,4
20:1/4h/15:1	74,3
40:1/3,2h/10:1	47,4
40:1/6h/1,59:1	76,0
40:1/6h/18,4:1	100,0
40:1/6h/10:1A	47,5
40:1/6h/10:1B	46,8
60:1/4h/2:1	81,1
60:1/4h/5:1	78,0

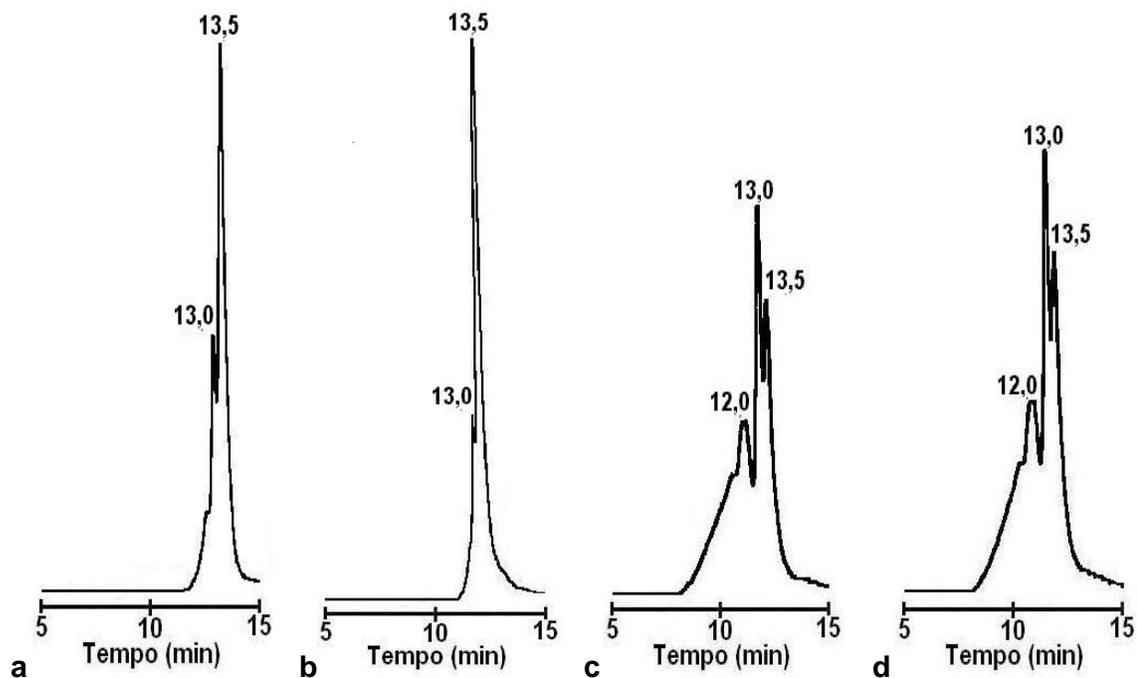


Figura 62 - Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com a o-treose:

a) 5:1/2h/2:1, b) 20:1/2h/2:1, c) 20:1/4h/5:1 e d) 20:1/4h/15:1

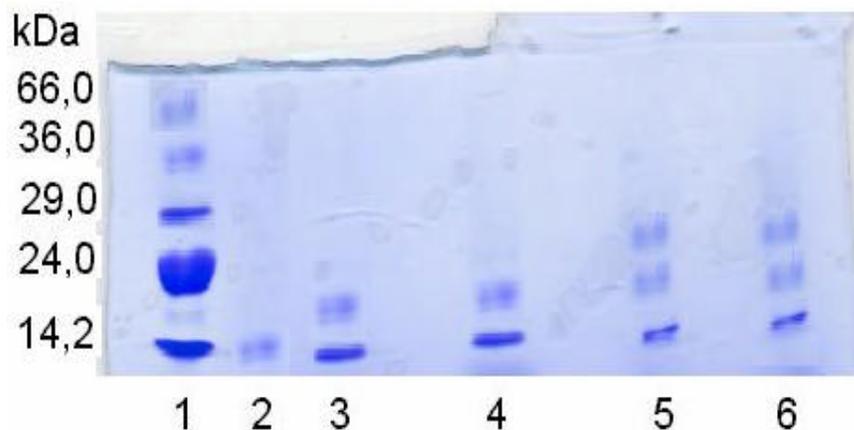


Figura 63 – Eletroforese SDS-PAGE da HbBv modificada com a o-treose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), 5:1/2h/2:1 (linha 3), 20:1/2h/2:1 (linha 4), 20:1/4h/5:1 (linha 5), 20:1/4h/15:1 (linha 6)

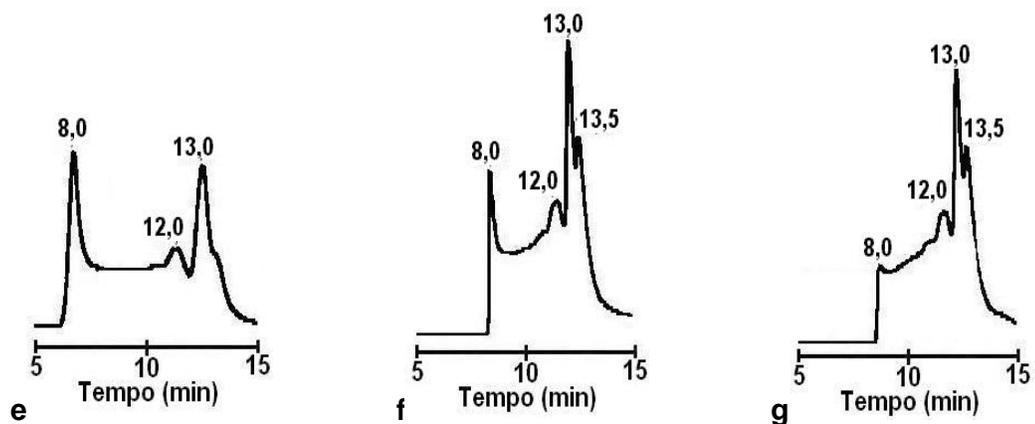
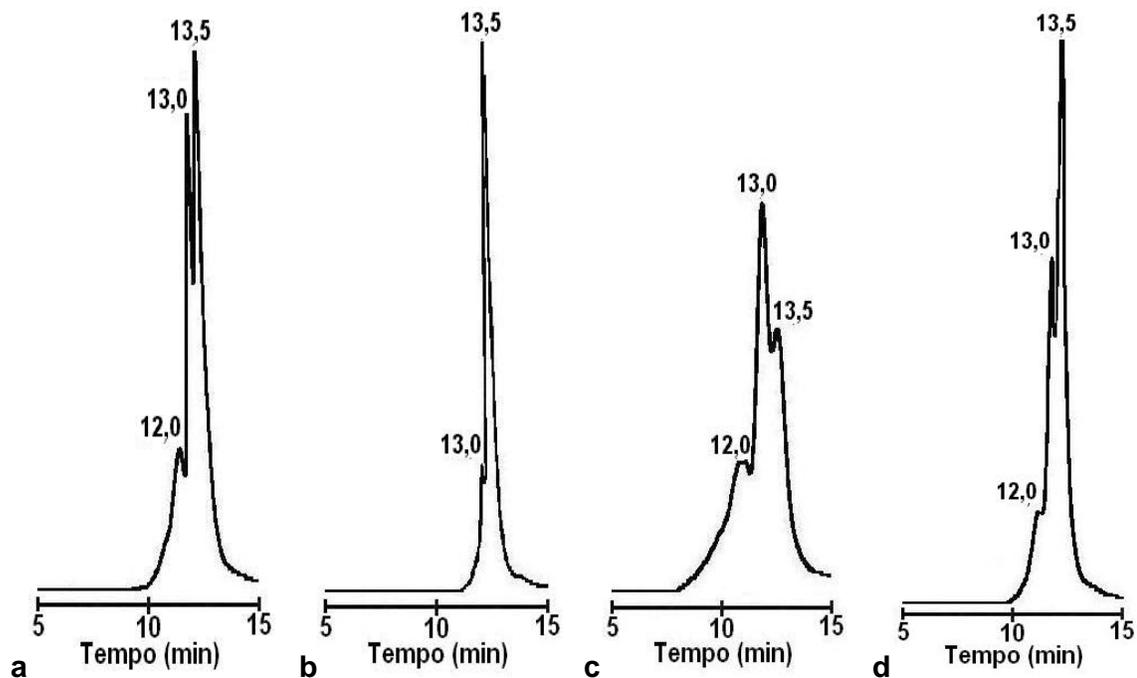


Figura 64 - Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com a o-treose:
 a) 6,36:1/6h/10:1, b) 40:1/3,2h/10:1, c) 40:1/6h/1,59:1, d) 40:1/6h/10:1,
 e) 40:1/6h/18,4:1, f) 60:1/4h/2:1 e g) 60:1/4h/5:1

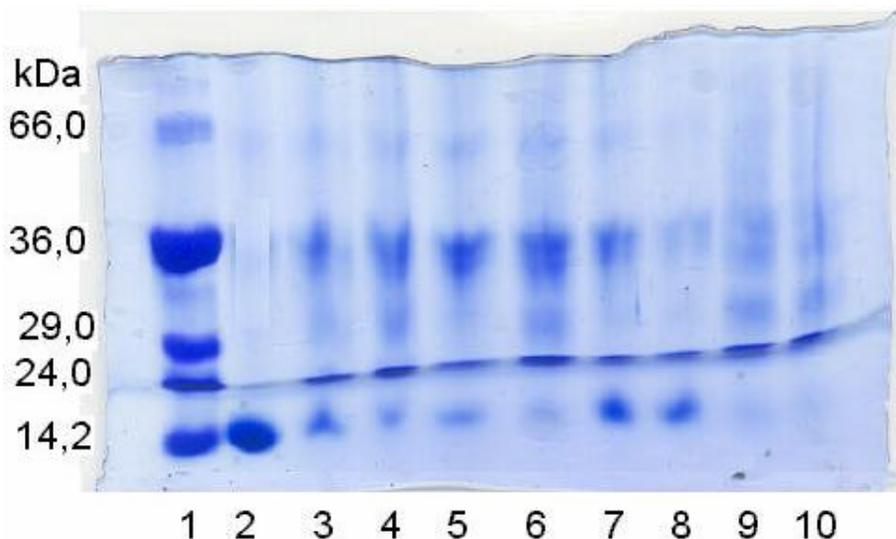


Figura 65 - Eletroforese SDS-PAGE da HbBv modificada com a o-trealose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), 6,36:1/6h/10:1 (linha 3), 40:1/3,2h/10:1 (linha 4), 40:1/6h/1,59:1 (linha 5), 40:1/6h/18,4:1 (linha 6), 40:1/6h/10:1A (linha 7), 40:1/6h/10:1B (linha 8), 60:1/4h/2:1 (linha 9) e 60:1/4h/5:1 (linha 10)

5.9. TESTES BIOLÓGICOS IN VITRO DOS PRODUTOS DE HbBV MODIFICADOS

5.9.1. Estudo da agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) de coelho *in vitro*

Testes de agregação plaquetária foram realizados nos produtos obtidos, com o intuito de analisar se estes produtos teriam alguma influência na atividade de agregação plaquetária. A Figura 66a, mostra o percentual de agregação representada pelo percentual de transmitância induzida pelo agonista ácido araquidônico em função do tempo. A Figura 66b apresenta a curva de agregação plaquetária com o tempo da amostra o-trealose 40:1/6h/18,4:1. O mesmo comportamento foi observado para todas as amostras. Podemos concluir que estes produtos em contato com o sangue não causam mudanças na atividade plaquetária, pois eles não induzem e nem inibem a agregação, pois nenhum efeito no %T foi observado quando os produtos de modificação foram colocados em contato com o concentrado de plaquetas. Também não causam mudanças na forma das plaquetas, que é representada pelo pico abaixo do 0% de agregação (Figura 66a).

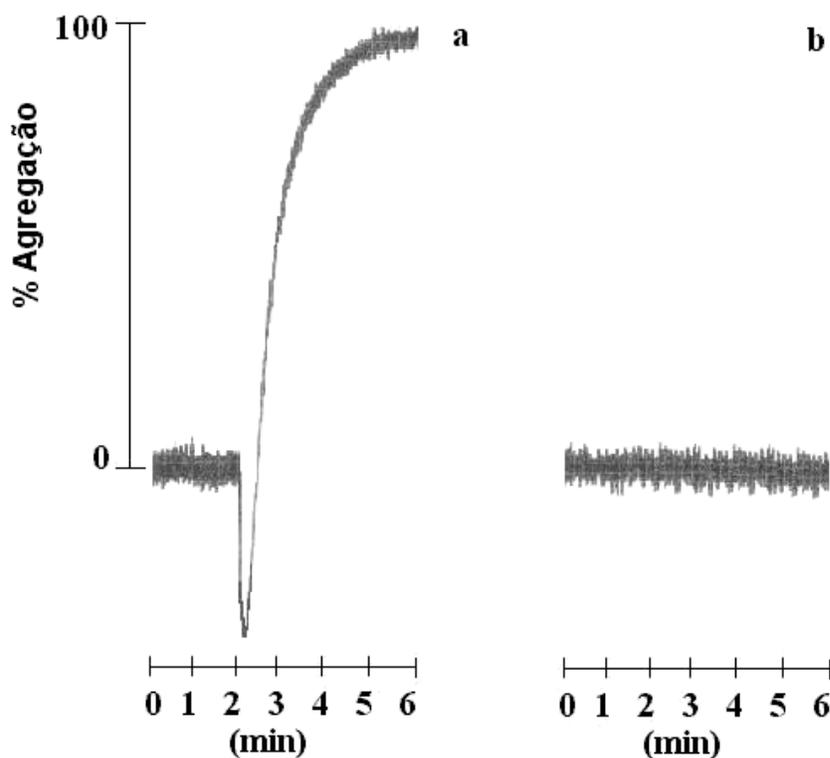


Figura 66 – Cromatograma do percentual de agregação em função do tempo para o estudo da agregação plaquetária: a) Agregação induzida com o ácido araquidônico e b) amostra 40:1/6h/18,4:1 para a o-trealose

5.9.2. Testes preliminares de vasoconstrição *in vitro*

Os anéis da aorta de ratos albinos foram colocados em um banho termostaticado, a 37 °C contendo solução fisiológica. Os anéis foram conectados a transdutores de força isométricas, e submetidos a uma tensão de 10 mN e mantidos em repouso por 1 hora, com troca da solução fisiológica a cada 15 minutos, para obter-se o equilíbrio a essa tensão.

A Figura 67 mostra o comportamento da tensão em função do tempo. A curva representada pela fenilefrina representa como está funcionando o órgão isolado, que é um agonista para a contração e, como pode ser observado, ele sofreu uma contração máxima de 3,4 mN. Como pode ser visto, a amostra de HbBv modificada causou uma maior contração em relação a HbBv não modificada. Isto pode ser explicado devido ao percentual de modificação química. Como tem um grande número de tetrâmeros de HbBv não dissociados na HbBv modificada, isso faz com

que a hemoglobina ligue-se ao NO presente no endotélio e, como consequência, ocorre a vasoconstrição. Em todas as curvas, ocorreu um aumento de tensão em função do tempo. Porém, um patamar de constância para ambas foi atingido em torno de 4 minutos de análise. Este efeito do aumento da tensão nas amostras de HbBv não modificada e modificada pode melhor ser observado na Figura 68, na qual apresenta o porcentual de tensão máxima em um tempo de quatro minutos. Somente foi analisada a HbBv modificada com α -trealose 40:1/6h/18,4:1 devido ao grau de modificação elevado, mas as outras amostras também serão futuramente analisadas.

Também foi adicionado um agonista, a acetilcolina, para avaliar a integridade do endotélio nas aortas quanto ao poder de relaxação. Apenas anéis com o poder de relaxação na faixa de 75-100% foram usados. Para cada injeção das amostras, tanto antes como após a injeção, foi adicionada a acetilcolina para avaliar a integridade do endotélio. O resultado encontra-se na Figura 69, na qual uma mesma aorta, sofreu o procedimento de injeção de três amostras. Pode ser visto que, ela mantém o endotélio inalterado. Com este resultado pode ser concluído que a vasoconstrição realmente acontece com a HbBv modificada; porém, o mecanismo até então dito dependente de NO [17, 58, 123], pode sofrer influências de outros parâmetros presentes no endotélio vascular, pois quando a aorta tinha uma resposta de relaxação menor do que 50%, ou seja, seu endotélio não estava atendendo ao estímulo da acetilcolina, a adição da HbBv modificada, não ocorria a contração. Portanto, a contração induzida pela HbBv é dependente de endotélio e não o destrói.

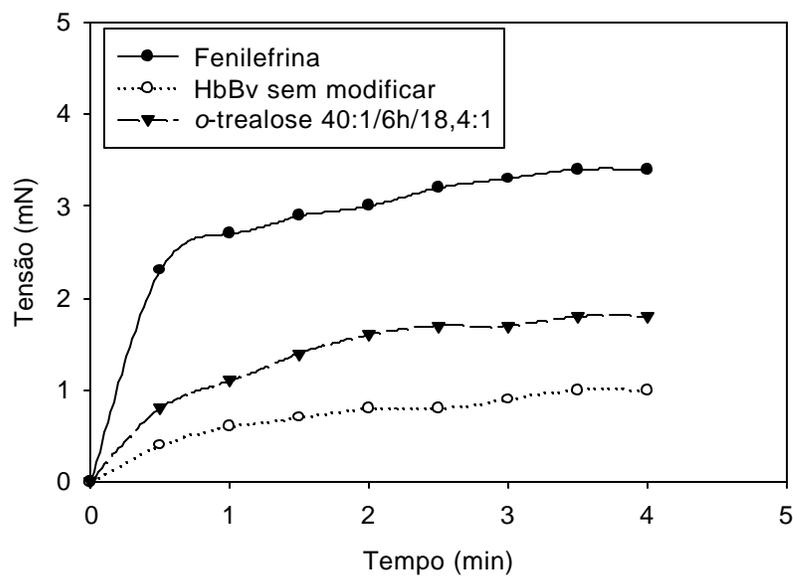


Figura 67 – Comportamento da tensão sofrida pela aorta em função do tempo

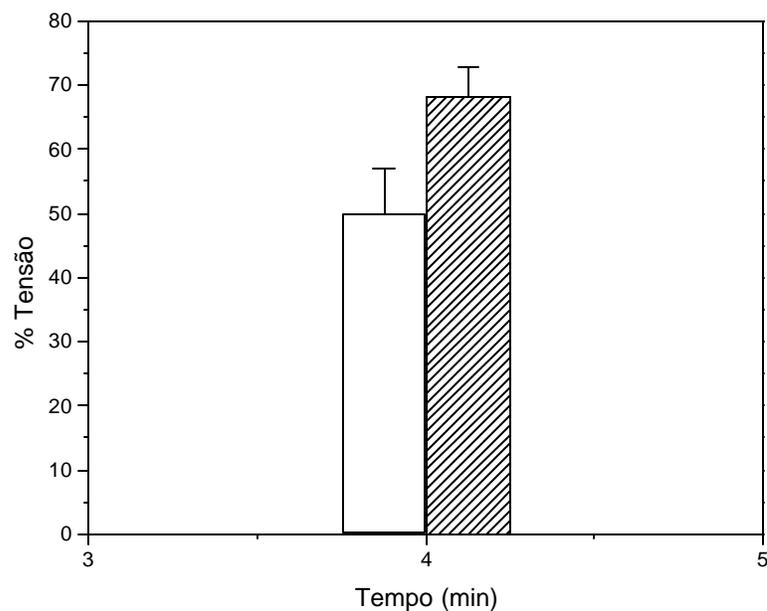


Figura 68 – Gráfico do porcentual de tensão em um tempo de 4 minutos, barra vazia corresponde a HbBv sem modificar e a barra com listas corresponde a HbBv modificada com o-trealose 40:1/6h/18,4:1

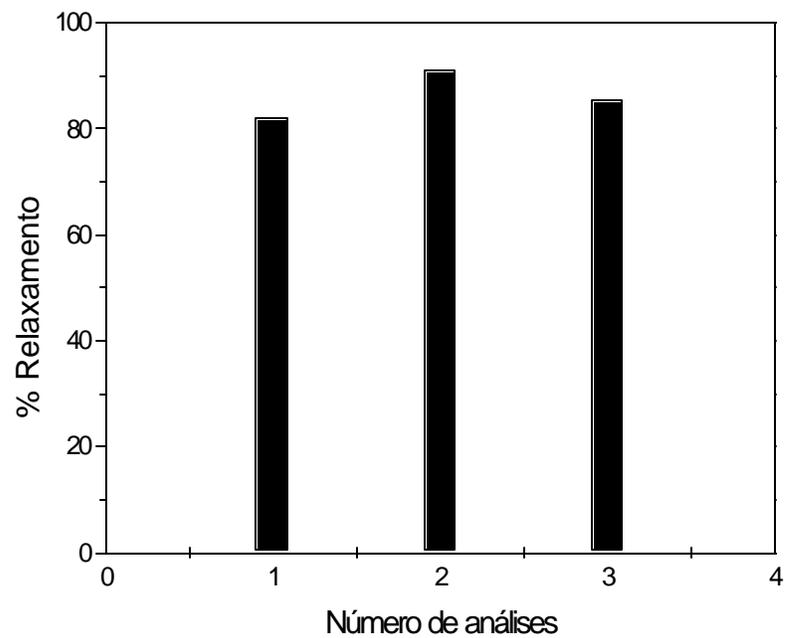


Figura 69 – Gráfico do percentual de relaxação da aorta em função do número de análises

6. CONCLUSÕES

1. Um concentrado de células vermelhas bovinas isento de leucócitos, plaquetas e proteínas hidrossolúveis foi obtido após quatro lavagens.
2. O processo de isolamento da HbBv por meio de hemólise por ultra-som foi o mais eficiente e não levou à diluição na amostra.
3. As purificações adicionais por cromatografia de troca iônica, tanto no sistema Flash 12i, como em coluna por gravidade, não diluiu significativamente as soluções de HbBv e, de acordo com os resultados de HPLC eliminou completamente os fosfolídeos livres (FS, FE, FC, e EM) presentes nas amostras de HbBv isoladas. Os picos U1 e U2 foram denominados produtos de degradação dos fosfolídeos com o tempo de armazenamento das soluções de HbBv e estes produtos são instáveis com o tempo.
4. A técnica de eletroforese desnaturante, em presença de SDS, mostrou a ausência de outras proteínas diferentes da HbBv.
5. Reagentes formadores de ligações cruzadas foram obtidos como resultado da oxidação da sacarose e da trealose, e foram caracterizados por espectroscopia de absorção no infravermelho.
6. Em reações continuadas, a hemoglobina bovina purificada foi modificada quimicamente em presença desses dissacarídeos oxidados. Os produtos dessas reações foram analisados por HPLC e eletroforese SDS-PAGE, que revelaram a formação de poli-HbBv.
7. Os produtos foram avaliados quanto à capacidade de causar agregação plaquetária. Foi observada a completa ausência deste efeito.
8. O efeito de vasoconstrição foi observado na HbBv modificada com α -trealose na proporção 40:1/6h/18,4:1. Este efeito é dependente de endotélio e independente de NO.

7. SUGESTÕES

1. A avaliação quantitativa da propriedade de carreador de oxigênio forneceria dados consistentes para a seleção de condições reacionais e potenciais substitutos para o sangue.
2. Testes que venham a esclarecer sobre o efeito dos derivados de hemoglobina quanto à vasoconstrição deverão ser realizados.
3. A determinação do teor de metemoglobina em cada um dos produtos obtidos fornecerá informação importante quanto à aplicação destes como substituto para o sangue.
4. Outros tipos de reação poderão ser realizados, com o objetivo de diminuir a concentração de Hb modificada intramolecularmente. Pro exemplo, a Hb poderia ser modificada por meio da criação de um sítio de ligação com o NO, para que ela carregue e entregue NO juntamente com o O₂. Esse tipo de ação evitaria o efeito de vasoconstrição, já que o NO tem a função de vasodilatador.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Menu, P., Longrois, D., Faivre, B., Donner, M., Labrude, P., Stoltz, J.F., Vigneron, C. (1999); "Rheological behaviour of red blood cells suspended in hemoglobin solutions. In vitro study comparing dextran-benzene-tetra-carboxylate hemoglobin, stroma free hemoglobin and plasma expanders". *Transf. Sci.*, **20**, 05-16.
2. Spahn, D.R. (2000); "Current status of artificial oxygen carriers". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 143-151.
3. Haney, C.R., Buehler, P.W., Gulati, A. (2000); "Purification and chemical modification of hemoglobin in developing hemoglobin based oxygen carriers". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 153-160.
4. Chang, T.M.S., D'Agnillo, F., Yu, W.P., Razack, S. (2000); "Two future generations of blood substitutes based on polyhemoglobin-SOD catalase and nanoencapsulation". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 213-218.
5. Palaparthi, R., Saini, B.K., Gulati, A. (2001); "Modulation of diaspirin crosslinked hemoglobin induced systemic and regional hemodynamic response by ethanol in normal rats". *Life Sci.*, **68**, 1383-1394.
6. Alayash, A.I., Summers, A.G., Wood, F., Jia, Y. (2001); "Effects of glutaraldehyde polymerization on oxygen transport and redox properties of bovine hemoglobin". *Arch. Biochem. Bioph.*, **391**, 225-234.
7. Carmichael, F.J.L. (2001); "Recent developments in hemoglobin-based carriers – an update on clinical trials". *Transf. Apher. Sci.*, **24**, 17-21.
8. Sanders, K. E., Ackers, G., Sligor, S. (1996); "Engineering and design of blood substitutes", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 534-40.
9. Dodd, R.Y., Sullivan, M.T. (1998); "Creutzfeldt-Jacob disease and transfusion safety: tilting at icebergs?", *Transfusion*, **38**, 221-223.
10. Andrews, N.J., Farrington, C.P., Cousens, S.N., Smith, P.G., Ward, H., Knight, R.S.G., Ironside, J.W., Will, R.G. (2000); "Incidence of variant Creutzfeldt-Jacob disease in the UK", *Lancet*, **356**, 481-82.
11. Houston, F., Foster, J.D., Chong, A., Hunter, N., Bostock, C.J. (2000); "Transmission of BSE by blood transfusion in sheep", *Lancet*, **356**, 999-1000.

12. Wilson, R., Code, C., Ricketts, M.N. (2000), "Risk of acquiring Creutzfeldt-Jacob disease from blood transfusions: systematic review of case-control studies", *Brit. Med. J.*, **321**, 17-19.
13. Carvalho, W. (2002); "Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia", 7ª. Edição, Ed. Coopmed, Belo Horizonte-MG.
14. Vam Vakas, E.C., Taswell, H.F. (1995); "Epidemiology of blood transfusion", *Transfusion*, **35**, 802-812.
15. Moore, E.E. (2003); "Blood substitutes: The future is now", *J. Am. Coll. Surg.*, **196** (1), 1-17.
16. Bunn, H.F. (1995); "The role of hemoglobin based substitutes in transfusion medicine", *Transf. Clin. Biol.*, **2**, 433-39.
17. Riess, J.G. (2001); "Oxygen carriers ("Blood substitutes") – raison d'être, chemistry and some physiology", *Chem. Rev.*, **101**, 2797-2919.
18. Goodnough, L.T., Scott, M.G., Monk, T.G. (1998); "Oxygen carriers as blood substitutes: past, present and future", *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **357**, 89-100.
19. Fronticelli, C., Sato, T., Ortho, C. and Bucci, E. (1986); "Bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin-based oxygen carriers: crosslinking with bis(2,3-dibromosalicyl)fumarate", *Biochimica end Biophysica Acta*, **874**, 76-81.
20. Bunn, H.F. (1971); "Diferences in interaction of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins", *Science*, **172**, 1049-1050.
21. Feola, M., Gonzalez, H., Canizaro, P.C., Bingham, D. And Periman, P. (1983); "Development of a bovine stroma-free hemoglobin solution as a blood substitute", *Surg. Gynec. Obstet.*, **157**, 399-408.
22. Chiancone, E., Norne, J.E., Forsen, S., Antonini, E. and Wyman, J. (1972); "Nuclear magnetic-resonance quadrupole relaxations studies of chloride binding to human oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin", *J. Mol. Biol.*, **70**, 675-688.
23. Fronticelli, C., Bucci, E. and Orth, C. (1984); "Solvent regulation of oxygen-affinity in hemoglobin – sensitivity of bovine hemoglobin to chloride-ions", *J. Biol. Chem.*, **259**, 10841-10844.
24. Walder, J.A., Walder, R.Y. and Arnone, H. (1980); "Development of antisickling compounds that chemically modify hemoglobins specifically within the 2,3-diphosphoglycerate binding-site", *J. Mol. Biol.*, **141**, 195-216.
25. Walder, J.A., Walder, R.Y. and Arnone, A. (1982); "Electrostatic effects within the central cavity of the hemoglobin tetramer", *Fed. Proc.*, **41**, 651.

26. Deulofeu, V e Marenzi, A. D. (1955); "Química Biológica", 7ª. Edição, Editora Guanabara, Rio de Janeiro.
27. Souza, M. H. L. e Elias, D. O. (1995); "Fundamentos da Circulação Extracorpórea", Vol. 1, Centro Editorial Alta Rio, Rio de Janeiro.
28. Zago, M. A., Falcão, R. P. e Pasquini, R. (2004); Hematologia: Fundamentos e prática", 1ª. Edição, Editora Atheneu, São Paulo.
29. Lehninger, A. L. (1993); "Principios de Bioquímica", Traduzido por Lodi, W.R. e Simões, A.A., Editora Livros Médicos Ltda, São Paulo.
30. Fellow, A. (1991); "Rapid isocratic method for the separation and quantification of major phospholipid classes by high-performance liquid chromatography", J. Chromatogr., **567**, 29-37.
31. Strayer, L. (1992); "Bioquímica", traduzido por Campos, J.P., 3ª Edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
32. Feola, M., Simoni, J., Canizaro, P.C., (1991); "Quality control of hemoglobin solutions. I. The purity of hemoglobin before modification", Artific. Organs, **3**, 243-248.
33. Nakai, K., Matsuda, N., Ohta, T., Amano, M., Takahashi, T.A., Sakuma, I., Kitbatake, A., Ito, S., Nakazato, Y., Sekiguchi, S. (1994); "Lysophosphatidylcholine, a component of stromal phospholipids, as a candidate vasoconstrictive factor in stroma-free hemoglobin", Artif. Organs, **3**, 198-205.
34. Shaanan, B. (1982); "The iron-oxygen bond in human oxyhaemoglobin", Nature, **296**, 683-684.
35. Shaanan, B. (1983); "Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 resolution", J. Mol. Biol., **171**, 31-59.
36. Barros, L.O.M. (2003); "Purificação e caracterização de hemoglobina humana: Efeitos dos métodos usados para lise de hemácias", Tese de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro/IMA.
37. www.qmc.ufsc/qmcweb - Minartti, E. (2000); "Sangue artificial: Os químicos em busca de um substituto sintético para o sangue".
38. Perutz, M.F. (1970); "Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin", Nature, **228**, 726-734.
39. Comroe, J.L. (1977); "Fisiologia da Respiração", 2ª. ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 295.

40. Jandl, J.C., Riden, L. (1989); "Pathophysiology", Boston: Blackwell Scientific Publications, 524.
41. Liddington, R. (1992); "High resolution crystal structures and comparisons of T-states deoxyhemoglobin and two liganded T-state hemoglobins", *J. Mol. Biol.*, **228**, 551-579.
42. Vander. A.J., Sherman, J.H., Samosata, L.D. "Human physiology – the mechanism of body function", 6^a ed., McGraw-Hill, New York, (1994).
43. Marzzoco, A., Torres, B.B. (1990); "Bioquímica Básica", editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
44. Raw, I., Freedman, A e Menucci, L. (1981); "Bioquímica: Fundamentos para as Ciências Biomédicas", Volume 1, Editora McGraw-Hill do Brasil, São Paulo.
45. Bucci, E., Fronticelli, C., Orth, C., Martorana, M.C., Acbischer, L., Angeloni, P. (1988); "Bovine hemoglobin as a basis for artificial carriers", *Biomat. Art. cells Art. Organs*, **1-3**, 197-204.
46. Hu, T e Su, Z. (2002); "Preparation of web-defined bovine polyhemoglobin based on dimetyl adipimidate and glutaraldehyde cross-linkage. *Biochemical and Biophysical Ressearch Communications*, **293**, 958-961.
47. Sellards A.W., Minot, G.R. (1916); "Injection of hemoglobin in man and its relation to blood destruction, with special reference to anemias", *J. Med. Res.*, **34**, 469-94.
48. Amberson, W.R., Flexner, J., Steggerda, F.R., Tendler, M.J., Pankrantz, D.S., and Laug, E.P. (1934); "On the of use of Ringer-Locke solution containing hemoglobin as a substitute for normal blood in mammals", *J. Cell. Comp. Physiol.*, **5**, 359-382.
49. Rabiner, S.F., Helbert, J.R., Lopas, H., Friedman, L.H. (1967); "Evaluation of stroma-free hemoglobin solution for use as a plasma expander", *J. Exp. Med.*, **126**, 1127-1142.
50. Savitsky, J.P, Doczi, J., Black, J., Arnold, J.D. (1978); "A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin", *Clin. Pharmacol. Ther.*, **23**, 73-80.
51. Remy, B., Deby-Dupont, G., Lamy, M. L. (1999); "Red blood cell substitutes: fluorocarbon emulsions and hemoglobin solutions", *Br. Med. Bull.*, **55**, 277-298.
52. Chad, R.H.B.S., Paul, W.B.P.D., Anil, G.M.D. (2000); "Purification and chemical modifications of hemoglobin in developing hemoglobin based oxygen carriers", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 153-169.

53. Vuylskete, A. (2001); "Artificial blood substitutes – benefits and risks", SCA Annual Meeting, 144-147.
54. Lamy, M. L., Daily, E. K., Larbuisson, R.P. (2000); "Randomized trial of diaspirin cross-linked hemoglobin solution as an alternative to blood transfusion after cardiac surgery", *Anesthesiol.*, **92**, 646-656.
55. Mazer, C.D., Cheng, D.C.H., Belo, S.E. (2000), "Oxygen supply and demand in patients undergoing CBAG surgery using using intraoperative autologous donation with Hemolink and Pentastarch", *Anesthes.*, **93**, A195.
56. Levy, J.R., Goodnough, L. T., Greilich, P. (1998); "A room-temperature stable hemoglobin eliminates allogenic red blood cell transfusion in post-operative cardiac surgery patients", *Circulation*, **98**, 132.
57. Vlahakes, G.J. (2001), "Haemoglobin solutions in surgery", *Br. J. Surg.*, **88**, 1553-1555.
58. Chang, T.M.S. (1997); "Blood substitutes: principles, methods, products, and clinical trials (vol.1), New York, Karger-Lands System.
59. Shoemaker, S.A., Gerber, M.J., Evans, G.L. (1994), "Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.", **22**, 457-465.
60. Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E. (1988); "Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates", *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 305-310.
61. Winslow, R.M. (1988); "Optimal hematologic variables for oxygen transport, including P₅₀, hemoglobin cooperativity, hematocrit, acid-base status, and cardiac function", *Biomat. Art. Cells Art. Org.*, **16**, 149-171.
62. Nguyen, T.Q. (1986); "Interactions of human hemoglobin with high-molecular-weight dextran sulfate and diethylaminoethyl dextran", *Makromol. Chem.*, **187**, 2567-2578.
63. Ogden, J.E. (1992); "Recombinant hemoglobin in the development of red-blood-cell substitutes", *Trends Biotech.*, **10**, 91-96.
64. Chang, T.M.S. (1992); "Artificial Cells Blood Substitute"; *Immobil. Biotechnol.* **20**, 154-174.
65. Huguet, M.L., Prouchayret, F., Grandgeorge, M. (1993); "Comparison of the properties of dextran and hydroxyethyl starch substituted with benzene tetracarboxylate in terms of their use in blood transfusion", *Carbohydr. Polym.*, **20**, 125-130.

66. Wang, L., Morizawa, K., Tokuyama, S. (1993); "Modulation of oxygen-carrying capacity of artificial red cells", *Polym. Adv. Technol.*, **4**, 8-11.
67. Amire, O.A., Masoudy, J., Saboury, A.A. (1997); "Enthalpy change of the allosteric transition in human haemoglobin A", *Thermochimica Acta*, **303**, 219-224.
68. Park, S.I., Sakay, H., Takeoka, s. (1997); "O₂ binding and dissociation and ligand exchange reaction of O₂ with CO in polymer composite films of hemoglobin", *Polym. Adv. Technol.*, **8**, 366-370.
69. Alayash, A.I. (1999); "Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants?", *Nature Biotech.*, **17**, 545-549.
70. Winslow, R.M. (1999); "New transfusion strategies: red cell substitutes", *Ann. Rev. Med.* **50**, 337-353.
71. Palaparthi, R., Wang, H.S., Gulati, A. (2000); "Current aspects in pharmacology of modified hemoglobins", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 185-198.
72. Winslow, R.M. (2000); "Blood substitutes", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **40**, 131-142.
73. Andrade, C.T., C.T., Barros, Silva, K.M.P., Barbosa, C.C.R., Azero, E.G., Bouskela, E. (2003); "Obtenção de hemoglobina purificada: Uso de resina de troca aniônica para a eliminação de fosfolípidos residuais", *Rev. Bras. Eng. Biom.*, **19**, 39-49.
74. Andrade, C.T., Barros, L.A.M., Lima, M.P.C., Azero, E.G. (2004); "Purification and characterization of human hemoglobin: effect of the hemolysis conditions"; *Int. J. Biol. Macromol.*, **34**, 233-240.
75. Lundblad, R.L. (1991); "Chemical reagents for protein modification"; CRC Press, Boca Raton.
76. Wong, S.S. (1991); "Chemistry of protein conjugation and cross-linking", CRC Press, Boca Raton.
77. Berta, M.C. (1992); "The design and synthesis of cross-linked reagents for hemoglobin modification", Ph.D. Thesis, The University of Maryland.
78. Schumacher, M.R., Dixon, M.M., Kluger, R., Jones, R.T., Brennan, R.G. (1995); "Allosteric transition intermediates modeled by cross-linked hemoglobins", *Nature*, **375**, 84-87.
79. Young, M.M., Tang, N., Hempel, J.C., Oshiro, C.M., Taylor, E.W., Kuntz, J.D., Gibson, B.W., Dollinger, G. (2000); "High throughput protein fold identification by

- using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry”, *Proc. Acad. Sci. USA*, **97**, 5802-5806.
80. Lou Carmichael, F.J. (2001); “Recent developments in hemoglobin-based oxygen carriers – an update on clinical trials”; *Transf. Apher. Sci.*, **24**, 17-21.
 81. Hsia, J.C. “Pasteurizable, freeze-driable hemoglobin-based blood substitute”. **US Patent** No. 4.857.636, 1989.
 82. Pliura, D., Wong, L.T., ER, S.S. “Selective crosslinking of hemoglobin by oxidized, ring-opened saccharides”. **US Patent** No. 5.532.353, 1996.
 83. Carmichael, F.J.L., Biro, G.P., Agensky, L. (2000), “Use of the blood substitute Hemolink in CABG surgery”, *Anesth. Analg.*, **90**, SCA11.
 84. Cheng, D.C.H., (2001), “Safety and efficacy of α -raffinose cross-linked human hemoglobin (Hemolink) in cardiac surgery”, *Can. J. anesth.*, **48**, S41-S48.
 85. Privalle, C., Talarico, T., Keng, T. (2000); “Pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene: A nitric oxide scavenger with antioxidant activity for the treatment of nitric oxide-induced shock”, *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1507-17.
 86. Hughes, G.S., Antal, E.J., Locker, P. (1996); “Physiology and pharmacokinetics of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in humans”, *Crit. Care Med.*, **24**, 756-764.
 87. LaMuraglia, G.M., O`Hara P.J., Baker, W.H. (2000); “The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution”, *J. Vasc. Surg.*, **31**, 299-308.
 88. Manning, J.E., Katz, L.M., Pearce, B. (2001); “Selective aortic arch perfusion with hemoglobin-based oxygen carrier for resuscitation from exsanguinating cardiac arrest in swine”, *Crit. Care Med.*, **29**, 2067-2074.
 89. Cheung, A.T.W., Jahr, J.S., Driessen, B. (2001); “The effects of hemoglobin glutamer-200 (bovine) on the microcirculation in a canine hipovolemia model: a noninvasive computer-assisted intravital microscopy study”, *Anesth. Analg.*, **50**, 832-838.
 90. McNeil J.D., Smith, D.L., Jenkins, D.H. (2001); “Hypotensive resuscitation using a polymerized bovine hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC 201) leads to reversal of anaerobic metabolism”, *J. Trauma*, **50**, 1063-1075.
 91. Jahr, J.S., Dulchavsky, S.A., Garino, J.P. (2002); “Hemodynamic effects of hemoglobin glutamer-250 (Hemopure, HBCO-201) compared to red blood cells in

- pivotal safety and efficacy study in orthopedic surgery patients”, *Anesth. Analg.*, **94**, S-330.
92. Stowell, C.P. (2005); “What happened to blood substitute?”, *Trasnf. Clin. Et Biol.*, **article in press**.
93. Perlin, A.S., Casu, B. (1982); “The polisaccharide”, Ed. Aspinall G.O., *Acad. Press*, **1**, 131.
94. Veelaert, S., de Wit, D., Gotlieb, K.F., Verthé, R. (1997); “The gelation of dialdehyde starch “, *Carbohyd. Polym.*, **32**, 131-139.
95. Veelaert, S., de Wit, D., Gotlieb, K.F., Verthé, R. (1997); “Chemical and physical transitions of periodate oxidized potato starch in water“, *Carbohyd. Polym.*, **33**, 153-162.
96. Brunneel, D., Schacht, E. (1993); “Chemical modification of pullulan: 1. Periodate oxidation“, *Polymer*, **34**, 2628-2632.
97. Crescenzi, V., Gamini, A., Paradossi, G., Torri, G. (1983); “Solution properties of a new polyelectrolyte derived from the polysaccharide scleroglucan“, *Carbohyd. Polym.*, **3**, 273-286.
98. Stokke, B.T., Elgsaeter, A., Smidsod, O., Christensen, B.E. (1995); “Carboxylation of scleroglucan for controlled crosslinking by heavy metal ions“, *Carbohyd. Polym.*, **27**, 5-11.
99. Guo, B., Elsaeter, A., Stokke, B.T. (1998); “Gelation kinetics of scleraldehyde-chitosan co-gels“, *Polym. Gel and Networks*, **6**, 113-135.
100. Christensen, B.E., Aasprong, E., Stokke, B.T. (2001); “Gelation of periodate oxidized scleroglucan (scleraldehyde)“, *Carbohyd. Polym.*, **46**, 241-248.
101. Varma, A.J., Kokane, S.P., Pathak, G., Pradhan, S.P. (1997); “Thermal behavior of galactomannan guar gum and its periodate oxidation products“, *Carbohyd. Polym.*, **32**, 111-114.
102. Schulz, D., Rapp, P. (1991); “Properties of the polyalcohol prepared from the β -D-glucan schizophyllan by periodate oxidation and borohydride redution“, *Carbohyd. Res.*, **222**, 223-231.
103. Feldman, P.L., Griffith, O.W., Stuehr, D.J. (1993); “The surprising life of nitric oxide “; *Chemical & Engineering News*, **71**, 26-38.
104. Schmetterer, L.; Polak, k. (2001); “Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow“; *Prog. In Retinal and Eye Res.*, **20**, 823-847.

105. Murray, J.A., Ledlow, A., Launspach, J. (1995); "The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans", *Gastroenterology*, **109**, 1241-1248.
106. Gould, S.A., Moore, E.E., Moore, F.A., Haenel, J. (1995); "The clinical utility of human polymerized hemoglobin as a blood substitute following trauma and emergent surgery", *J.Trauma*, **39**, 157.
107. Gould, S.A., Sehgal, L.R., Moss, G.S. (1995); "The development of hemoglobin solutions as red cell substitutes: Hemoglobin solutions", *Transf. Sci.*, **16**, 5-17.
108. Gould, S.A., Moss, G.S. (1996); "Clinical development of human polymerized hemoglobin as a blood substitute", *World J. Surg.*, **20**, 1200-1207.
109. Shorr, R.G., Viau, A.T., Abuchowski, A. (1996); "Phase 1B safety evaluation of PEG hemoglobin as an adjuvant to radiation therapy", *Artif. Cells, Blood Subst and Immb. Biotechn. Journ. Int.*, **24**, 407.
110. Winslow, R.M. (2003); "Current status of blood substitute research: towards a new paradigm", *J. Inter. Medicine*, **253**, 508-517.
111. Cisternas, J.R., Varga, J., Monte, O. (2001); "Fundamentos de Bioquímica Experimental", 2^a. ed., São Paulo, Ed. Atheneu, 276.
112. Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959); "A rapid method of total lipid extraction and purification", *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
113. Born, G.V.R., Cross, M.J. (1963); "The aggregation of blood platelets", *J. Physiol.*, **168**, 178.
114. Cazenave, J.P., Benveniste, J., Mustard, F.J., (1979); "Aggregation of rabbit platelets by platelet-activating factor is induced by release reaction and the arachidonate pathway and inhibited by membrane active drugs", *Lab. Invest.*, **41**, 275.
115. Brito, F. C. B., (2001); "Estudo farmacológico de novos derivados fenoxiftalimídicos ácidos e tieno-piridínicos com potencial atividade antiasmática", Dissertação de mestrado, Faculdade de Farmácia-UFRJ.
116. Ettarh, R.R., Sofola, O.A., Adigun, S.A. (2003); "Role of the endothelium in the vascular effects of vitamin C in rats: *Pathophys.*, **9**, 97-101.
117. International Council for Standardisation in Haematology: expert panel on haemoglobinometry. *J. Clin. Pathol.*, 1996, **49**, 276.
118. Nakai, K., Sekiguchi, S. (1997); "Quality control of stroma-free hemoglobin", In: *Artificial red cell*, Ed.: E. Tsuchida, Chichester: John Wiley & Sons, 131-149.

119. Sakai, H., Takeoka, S., Yokohama, H., Seino, Y., Nishide, H., Tshuchida, E. (1993), "Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment", *Prot. Expression Purif.*, **4**, 563-569.
120. Ramstedt, B., Slotte, J.P. (2000); "Separation and purification of sphingomyelin diastereomers by high-performance liquid chromatography", *Anal. Biochem.*, **282**, 245-249.
121. Eike, J.H., Palmer, A.F. (2004); "Oxidized Mono-, di-, tri-, and polysaccharides as potential hemoglobin cross-linking reagents for the synthesis of high oxygen affinity artificial blood substitutes", *Biotechnol. Prog.*, **20**, 953-962.
122. Eike, J.H., Palmer, A.F. (2004); "Effect of NaBH₄ concentration and reaction time on physical properties of glutaraldehyde-polymerized hemoglobin", *Biotechnol. Prog.*, **20**, 946-952.
123. Kosaka, H. (1999); "Nitric oxide and hemoglobin interactions in the vasculatura", *Biochim. Et Biophysic. Acta*, **1411**, 370-377.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama que mostra a composição do sangue	05
Figura 2 - Estrutura bicôncava das hemácias	06
Figura 3 - Representação esquemática dos constituintes da membrana eritrocitária. Observar a dupla camada lipídica constituída por fosfatidilcolina (FC), esfingomiéline (EM), fosfatidilserina (FS) e fosfatidiletanolamina (FE), as proteínas integrais banda 3 (3) e glicoforinas A (GFA) e C (GFC) e as proteínas periféricas espectrinas alfa e beta (? e ?sp), anquirina, proteínas 4.1, 4.2, 4.9, p55, actina, tropomiosina, aducina e tropomodulina. Vários antígenos eritrocitários encontram-se localizados nas proteínas integrais	07
Figura 4 – Estrutura dos fosfoglicerídeos	09
Figura 5 – Estrutura da esfingomiéline	10
Figura 6 – Modelo espacial da estrutura da hemoglobina desoxigenada e suas quatro cadeias: duas ? (amarela e rosa) e duas ? (ciano e verde) com seus respectivos hemes	11
Figura 7 – Complexo ferro-protoporfirina ligado a uma molécula de O ₂	12
Figura 8 – Estrutura da Hb oxigenada/relaxada (a) e desoxigenada/tensa (b)	13
Figura 9 - Molécula de Hb livre como um tetrâmero, constituído de quatro sub-unidades (? 1, ?1, ?2, ?2), e que retém 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), o qual auxilia no transporte do O ₂ . Quando a Hb livre é injetada intravenosamente, ocorre a dissociação do tetrâmero e a formação de dois dímeros, o que é tóxico para os rins	18
Figura 10 – Esquema das principais reações de modificação química em hemoglobinas	20
Figura 11 – Seletividade da reação de periodato de sódio com unidades de açúcar substituídos em diferentes posições	23

Figura 12 – Biosíntese de NO. A ecNOS catalisa a oxidação do nitrogênio guanidino da L-arginina para formar NO e L-citrulina. N-hidro-L-arginina é formada como um intermediário	25
Figura 13 – Diferentes tipos de Hb modificadas. O tetrâmero de Hb por ser pequeno pode mover-se através da junção das células endoteliais e ligar-se ao NO. Esta hb ligada ao NO, causa redução na concentração de NO livre e, como conseqüência, a vasoconstrição ...	26
Figura 14 - Gráfico de saturação <i>versus</i> tempo para Hb-PEG, Hb purificada e Hb-? ?	27
Figura 15 – Estrutura do grupo de troca iônica da resina AG MP-1 (a) e da resina Q-SFF (b)	34
Figura 16 – Os principais componentes do sistema Flash 12i	35
Figura 17 – Reação de oxidação da sacarose	42
Figura 18 – Reação de oxidação da trealose	42
Figura 19 – Curvas de agregação plaquetária induzidas por ácido araquidônico	46
Figura 20 – Aparelho de órgão isolado com duas cubas, Ugo Basile 4050	47
Figura 21 – Esquema ilustrativo do experimento de órgão isolado	48
Figura 22 – Curva de calibração da concentração de albumina <i>versus</i> absorbância	49
Figura 23 – Efeito do número de lavagens no procedimento de extração de albumina do concentrado de células vermelhas	50
Figura 24 – Micrografias das células vermelhas bovina antes da lise (a) e dos hemolisados (b-h)	52
Figura 25 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em água na proporção 1:1 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto	54
Figura 26 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em água na proporção 1:2 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto	54
Figura 27 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em NaCl na proporção 1:1 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto	55

Figura 28 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em NaCl na proporção 1:2 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto	55
Figura 29 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em Tris-HCl na proporção 1:1 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto	56
Figura 30 – Curva de eluição da amostra do hemolisado em Tris-HCl na proporção 1:2 utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto	56
Figura 31 – Curva de eluição da amostra do hemolisado por ultra-som utilizando as resinas AGMP-1, Q-SFF e L. Misto	57
Figura 32 – Curva de eluição da amostra hemolisada por ultra-som usando resina AGMP-1	58
Figura 33 – Curva de eluição da amostra hemolisada por ultra-som usando resina Q-SFF	58
Figura 34 – Curva de eluição da amostra hemolisada por ultra-som usando resina leito misto	59
Figura 35 – Curva de calibração da concentração de hemoglobina <i>versus</i> absorbância	60
Figura 36 – Cromatograma de HPLC da solução de fosfolípídeos-padrão	62
Figura 37 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-H ₂ O 1:1 não purificada, b) HbBv-H ₂ O 1:1 AGMP-1, c) HbBv-H ₂ O 1:1 Q-SFF e d) HbBv-H ₂ O 1:1 Leito Misto	63
Figura 38 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-H ₂ O 1:2 não purificada, b) HbBv-H ₂ O 1:2 AGMP-1, c) HbBv-H ₂ O 1:2 Q-SFF e d) HbBv-H ₂ O 1:2 Leito Misto	64
Figura 39 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-NaCl 1:1 não purificada, b) HbBv-NaCl 1:1 AGMP-1, c) HbBv-NaCl 1:1 Q-SFF e d) HbBv-NaCl 1:1 Leito Misto	64
Figura 40 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-NaCl 1:2 não purificada, b) HbBv-NaCl 1:2 AGMP-1, c) HbBv-NaCl 1:2 Q-SFF e d) HbBv-NaCl 1:2 Leito Misto	65

- Figura 41 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-Tris 1:1 não purificada, b) HbBv-Tris 1:1 AGMP-1, c) HbBv-Tris 1:1 Q-SFF e d) HbBv-Tris 1:1 Leito Misto65
- Figura 42 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv-Tris 1:2 não purificada, b) HbBv-Tris 1:2 AGMP-1, c) HbBv-Tris 1:2 Q-SFF e d) HbBv-Tris 1:2 Leito Misto66
- Figura 43 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv Ultra-som não purificada, b) HbBv Ultra-som AGMP-1, c) HbBv Ultra-som Q-SFF e d) HbBv Ultra-som Leito Misto66
- Figura 44 – Cromatograma de HPLC: a) HbBv Ultra-som não purificada, b) HbBv Ultra-som AGMP-1, c) HbBv Ultra-som Q-SFF e d) HbBv Ultra-som Leito Misto68
- Figura 45 – Cromatogramas de HPLC das amostras após dois meses de armazenamento: a) solução de HbBv ultra-som e b) solução de HbBv ultra-som Q-SFF70
- Figura 46 – Eletroforese nativa da HbBv hemolisada nas proporções 1:1 (a) e 1:2 (b); hemolisados antes da purificação: H₂O (linha 2), NaCl (linha 4) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 6). Hemolisados após purificação com resina AGMP-1: H₂O (linha 3), NaCl (linha 5) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 7). Na linha 1 encontra-se o padrão de albumina bovina71
- Figura 47 – Eletroforese desnaturante da HbBv hemolisada nas proporções 1:1 (a) e 1:2 (b); hemolisados antes da purificação: H₂O (linha 2), NaCl (linha 4) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 6). Hemolisados após purificação com resina AGMP-1: H₂O (linha 3), NaCl (linha 5) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 7). Na linha 1 encontra-se a mistura de proteínas padrões72
- Figura 48 – Eletroforese nativa da HbBv hemolisada nas proporções 1:1 (a) e 1:2 (b); hemolisados antes da purificação: H₂O (linha 2), NaCl (linha 4) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 6). Hemolisados após purificação com resina Q-SFF: H₂O (linha 3), NaCl (linha 5) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 7). Na linha 1 encontra-se o padrão albumina bovina72

- Figura 49 – Eletroforese desnaturante da HbBv hemolisada nas proporções 1:1 (a) e 1:2 (b); hemolisados antes da purificação: H₂O (linha 2), NaCl (linha 4) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 6). Hemolisados após purificação com resina Q-SFF: H₂O (linha 3), NaCl (linha 5) e Tampão Tris/HCl pH 7,4 (linha 7). Na linha 1 encontra-se a mistura de proteínas padrões 73
- Figura 50 – Eletroforese da HbBv hemolisada pela técnica de ultra-som; nativa (a) e desnaturante (b); hemolisados antes da purificação: (linha 2). Hemolisados após purificação com resina AGMP-1 (linha 3), Q-SFF (linha 4) e Leito Misto (linha 5). Na linha 1 encontra-se o padrão albumina bovina Figura a e na Figura b, linha 1 a mistura de proteínas padrões 73
- Figura 51 – Estruturas propostas para as espécies formadas a partir de reação da HbBv com os o-dissacarídeos 74
- Figura 52 – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para o dissacarídeo sacarose antes (sacarose) e após reação de oxidação com NaIO₄ (o-sacarose) 75
- Figura 53 – Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para o dissacarídeo trealose antes (trealose) e após reação de oxidação com NaIO₄ (o-trealose) 75
- Figura 54 – Cromatograma da HbBv sem modificação 76
- Figura 55 – Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-sacarose: a) 5:1/2h/2:1, b) 5:1/2h/5:1 e c) 5:1/2h/10:1 77
- Figura 56 – Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-sacarose: a) 20:1/2h/2:1, b) 20:1/2h/5:1 e c) 20:1/2h/10:1 78
- Figura 57 – Eletroforese da HbBv modificada com o-sacarose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), 5:1/2h/2:1 (linha 3), 5:1/2h/5:1 (linha 4), 5:1/2h/10:1 (linha 5), 20:1/2h/2:1 (linha 6), 20:1/2h/5:1 (linha 7) e 20:1/2h/10:1 (linha 8) 78
- Figura 58 – Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-sacarose: a) 5:1/6h/2:1, b) 5:1/6h/5:1 e c) 5:1/6h/10:1 79

Figura 59 – Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-sacarose: a) 5:1/24h/2:1, b) 5:1/24h/5:1 e c) 5:1/24h/10:1	80
Figura 60 – Eletroforese da HbBv modificada com o-sacarose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), 5:1/6h/2:1 (linha 3), 5:1/6h/5:1 (linha 4), 5:1/6h/10:1 (linha 5), 5:1/24h/2:1 (linha 6), 5:1/24h/5:1 (linha 7) e 5:1/24h/10:1 (linha 8)	80
Figura 61 – Porcentual total de modificação versus razão molar [boroidreto]/[o- sacarose]	81
Figura 62 - Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-trealose: a) 5:1/2h/2:1, b) 20:1/2h/2:1, c) 20:1/4h/5:1 e d) 20:1/4h/15:1	84
Figura 63 – Eletroforese SDS-PAGE da HbBv modificada com o-trealose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), 5:1/2 h/2:1 (linha 3), 20:1/2h/2:1 (linha 4), 20:1/4h/5:1 (linha 5), 20:1/4h/15:1 (linha 6)	84
Figura 64 - Cromatograma de HPLC da HbBv modificada com o-trealose: a) 6,36:1/6h/10:1, b) 40:1/3h2/10:1, c) 40:1/6h/1,59:1, d) 40:1/6h/10:1, e) 40:1/6h/18,4:1, f) 60:1/4h/2:1 e g) 60:1/4h/5:1	85
Figura 65 - Eletroforese SDS-PAGE da HbBv modificada com o-trealose; padrão (linha 1), HbBv sem modificar (linha 2), 6,36:1/6h/10:1 (linha 3), 40:1/3,2h/10:1 (linha 4), 40:1/6h/1,59:1 (linha 5), 40:1/6h/18,4:1 (linha 6), 40:1/6h/10:1A (linha 7), 40:1/6h/10:1B (linha 8), 60:1/4h/2:1 (linha 9) e 60:1/4h/5:1 (linha 10)	86
Figura 66 – Cromatograma do percentual de transmitância em função do tempo para o estudo da agregação plaquetária: a) Agregação induzida com o ácido araquidônico e b) amostra 40:1/6h/18,4:1 para a o-trealose	87
Figura 67 – Comportamento da tensão sofrida pela aorta em função do tempo... 89	89
Figura 68 – Gráfico do percentual de tensão em um tempo de 4 minutos, barra vazia corresponde a HbBv sem modificar e a barra com listas corresponde a HbBv modificada com o-trealose 40:1/6h/18,4:1	89
Figura 69 - Gráfico do percentual de relaxação da aorta em função do número de análises	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Número de aminoácidos diferentes dos da hemoglobina humana	14
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens das soluções de hemoglobina e das emulsões de fluorocarbono	16
Tabela 3 - Comparação entre os paradigmas antigo e atual	28
Tabela 4 - Reagentes utilizados na preparação do gel fracionador (T = 7,5%) ...	40
Tabela 5 - Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador (T = 3,5%)..	40
Tabela 6 - Condições reacionais para os sacarídeos oxidados	44
Tabela 7 - Fluxo médio das eluições por cromatografia em Flash 12i	53
Tabela 8 - Concentração de hemoglobina nas amostras isoladas por diferentes processos de hemólise	60
Tabela 9 - Concentração de HbBv após purificação no sistema cromatografia em Flash 12i	61
Tabela 10 - Concentração de HbBv após purificação no sistema de cromatografia líquida em coluna	61
Tabela 11 - Concentração de fosfolipídeos em ?g por mL de solução de HbBv em amostras purificadas no sistema Flash 12i	67
Tabela 12 - Concentração de fosfolipídeos em ?g por mL de solução de HbBv em amostras purificadas no sistema cromatografia líquida em coluna	69
Tabela 13 - Concentração de fosfolipídeos em ?g/mL de solução de HbBv após 2 meses de armazenamento	70
Tabela 14 – Variáveis independentes codificadas	82
Tabela 15 - Porcentual de modificação química para a HbBv modificada por o-trealose	83

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)