

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B.

**MARISTELA CESQUINI**

**EFEITO DE FLAVONÓIDES NO ERITRÓCITO DE  
INDIVÍDUOS NORMAIS E PORTADORES DE ANEMIA  
FALCIFORME**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>Maristela Cesquini</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

*Satie Hatsushika Ogo*

**Tese apresentada ao  
Instituto de Biologia para  
obtenção do título de  
Mestre em Biologia  
Funcional e Molecular na  
área de Bioquímica**

**Orientadora. Profa. Dra.  
Satie Hatsushika Ogo  
Co-Orientador. Prof. Dr.  
Marcio Alberto Torsoni**

2001

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	C337e
V	
TOMBO BL	48950
PROC.	16-837102
C	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/05/02
Nº CPD	

CM00167277-9

BIB ID 239957

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**C337e**      **Cesquini, Maristela**  
 Efeito de flavonóides no eritrócito de indivíduos normais e portadores  
 de anemia falciforme/Maristela Cesquini. --  
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

**Orientadora: Satie Hatsushika Ogo**

Co-orientador: Marcio Alberto Torsoni  
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
 Instituto de Biologia

1.Flavonóides. 2.Anemia falciforme. 3.Hemoglobina. 4.Eritrócitos.  
 I. Ogo, Satie Hatsushika. II. Torsoni, Marcio Alberto. III. Universidade  
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Campinas, 22 de fevereiro de 2002

**Banca Examinadora**

Profª Drª Satie Hatsushika Ogo (Orientadora)

Satie Hatsushika Ogo

Profª Drª Fernanda Ramos Gadelha

Fernanda Ramos Gadelha

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

José Mauro Granjeiro

Profª Drª Nilce Correa Meirelles

Nilce Correa Meirelles

871022006

*“De tudo, ficaram três coisas:  
a certeza de que estamos sempre começando...  
a certeza de que é preciso continuar...  
a certeza de que seremos interrompidos antes  
de terminar...”*

*Portanto devemos:  
fazer da interrupção um caminho novo...  
da queda, um passo de dança...  
do medo, uma escada...  
do sonho, uma ponte...  
da procura... um encontro...”*

*Fernando Pessoa*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais pelo amor, incentivo e por toda a estrutura que possibilitou ser tudo o que sou.

Ao meu avô por compartilhar das minhas alegrias.

Aos meus irmãos Leonardo e Renato pelo companherismo e paciência, e ao Renato pela ajuda nas dúvidas de química.

Aos meus amigos Gláucia, Fernanda, Silvana, Guida, Joaquim e Eleonora pelos momentos de descontração e pelo apoio na resolução de problemas referentes ou não a tese.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Erika, Eduardo e Kellen pela excelente convivência e pela colaboração durante a resolução deste trabalho.

Ao Paulo pelo amor e incentivo, principalmente durante a última etapa deste trabalho.

À Graziela, minha grande amiga, por cada sorriso, por cada lágrima, pelas nossas discussões sempre muito bem humoradas, por me ajudar a resolver os meus problemas e principalmente, por fazer destes 8 anos de convivência diária um feliz aprendizado.

Ao Marcio, meu co-orientador e amigo. Ao co-orientador, agradeço pela confiança, paciência, incentivo, correções e discussões dos trabalhos desde a iniciação científica até o presente momento. Ao amigo, agradeço pela convivência no laboratório, pelos conselhos e por estar sempre presente quando precisei.

À Satie, pela oportunidade de fazer a minha iniciação científica e mestrado em seu grupo de pesquisa, pela excelente orientação, discussões e apoio durante

todo este período. Agradeço, sobretudo, pela amizade, pelas conversas descontraídas e pela sua força e serenidade que criaram um ambiente harmônico no laboratório.

Aos professores Dra. Fernanda Ramos Gadelha, Dr. José Mauro Granjeiro, Dr. Miguel Arcanjo Areas e a Dra. Nilce Correa Meirelles pela contribuição nas bancas prévia e definitiva.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, D. Cida, Marina e Andréia pela disposição e amizade durante estes anos.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica pela amizade e colaboração.

A CAPES pelo apoio através da bolsa concedida durante o mestrado.

A Deus por ter tanta coisa a agradecer.

## **ÍNDICE**

<b>1 - Introdução</b>	01
1.1 - Eritrócitos como alvo de espécies radicalares	01
1.2 - Espécies reativas e anemia falciforme	06
1.2.1 - Terapias para anemia falciforme baseadas em mecanismos oxidativos	09
1.3 – Flavonóides como drogas protetoras ou promotoras de oxidação	10
<b>2 – Objetivos</b>	16
<b>3 – Materiais e Métodos</b>	18
3.1 – Obtenção do material biológico	18
3.2 – Determinação da concentração de hemoglobina	18
3.3 – Preparação das soluções de flavonóides	18
3.4 – Determinação da oxidação da hemoglobina	19
3.5 – Determinação da peroxidação lipídica da membrana da célula	20
3.6 – Determinação da ligação da hemoglobina à membrana	20
3.7 – Determinação do conteúdo de grupos carbonil de proteína	21
3.8 – Análise estatística	22
<b>4 – Resultados</b>	23
4.1 – Oxidação da hemoglobina	23
4.2 – Ligação da hemoglobina à membrana eritrocitária	29
4.3 – Peroxidação lipídica da membrana eritrocitária	34
4.4 – Determinação dos grupos carbonil de proteínas	41
<b>5 – Discussão</b>	46
<b>6 - Conclusão</b>	60
<b>7 – Referência Bibliográfica</b>	62

<b>8 – Anexo I - Comunicações Científicas</b>	<b>76</b>
<b>9 – Anexo II – Trabalhos publicados e submetidos à publicação</b>	<b>77</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AA	ácido ascórbico
CAT	catalase
DHA	ácido dehidroascórbico
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPH	dinitrophenilhidrazina
ERO	espécie reativa de oxigênio
FI	flavonóide
G-6-P	glicose 6 fosfato
GR	glutathione redutase
GSH	glutathione reduzida
GSH-px	glutathione peroxidase
GSSG	glutathione oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
Hb	hemoglobina
Hb A	hemoglobina normal
Hbini	hemoglobina inicial
Hbmem	hemoglobina ligada à membrana
Hb S	hemoglobina falciforme
Hbsob	hemoglobina sobrenadante
HO•	radical hidroxil
LDL	lipoproteína de baixa densidade

MetaHb	metahemoglobina
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NO	óxido nítrico
$O_2^-$	ânion superóxido
$O_2^{\sim}$	radical ânion superóxido
OxiHb	oxihemoglobina
$R^\bullet$	radical livre
SOD	superóxido dismutase
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
t-BO $^\bullet$	radical alcóxil
t-BOO $^\bullet$	radical peróxil
t-BOOH	hidroperóxido de t-butila
TCA	ácido tricloroacético

## Resumo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são constantemente formadas em células aeróbicas, particularmente nas mitocôndrias de células aeróbicas e nos eritrócitos. Estas EROs, em condições normais, são removidas por um eficiente sistema de detoxificação celular composto principalmente pelas enzimas antioxidantes, glutathiona, vitaminas e microelementos. Entretanto, quando a produção de EROs sobrepõem a capacidade do sistema antioxidante, reações deletérias podem ocorrer caracterizando a condição conhecida como estresse oxidativo. Em algumas patologias, tais como anemia falciforme, talassemia e deficiência em glicose-6-fostato desidrogenase, o estresse oxidativo é ainda maior. A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia genética caracterizada pelo aumento da geração de ERO, liberação anormal de ferro da Hb e atividade diminuída do sistema antioxidante gerando elevado estresse oxidativo. Diversas terapias têm sido utilizadas no intuito de minimizar os danos oxidativos sofridos por estes indivíduos portadores desta patologia, como a administração de ácido ascórbico e vitamina E. Neste trabalho o efeito de flavonóides, nos processos oxidativos do sangue de indivíduos portadores de anemia falciforme foi investigado. Os flavonóides são compostos amplamente distribuídos na natureza e por estarem presentes em grande quantidade na dieta humana podem ser ingeridos naturalmente; sua atividade antioxidante, antiosteoporótica, anticancerígena, antiinflamatória e antiviral têm sido bem descrita. O efeito dos flavonóides (quercetina e rutina) foi estudado nos processos de oxidação de Hb, ligação de Hb à membrana celular, peroxidação lipídica da membrana eritrocitária e formação de grupos carbonil de proteínas no sangue de

indivíduos normais e portadores de anemia falciforme. Em geral, o nível de danos oxidativos encontrados no sangue de indivíduos falcêmicos foi maior do que no sangue de indivíduos normais, diferindo apenas nos experimentos de oxidação de Hb, nos quais os resultados foram semelhantes para ambas as Hb, este fato talvez se deva a presença de grande quantidade de Hb A, proveniente da transfusão, no sangue destes pacientes. A quercetina mostrou maior efeito antioxidante em todos os experimentos. A rutina comportou-se como pró-oxidante na oxidação da Hb quando utilizada em concentrações inferiores a 150  $\mu$ M, mostrando um efeito protetor acima desta concentração. Com base nos resultados obtidos, pode-se especificar que os flavonóides, principalmente a quercetina, apresentam um efeito benéfico na proteção contra os danos oxidativos do sangue de indivíduos portadores de anemia falciforme.

## **Abstract**

Oxygen reactive species (ROS) are constantly formed in aerobic cells, particularly in the mitochondria and erythrocytes. These ROS, under normal conditions, are removed by an efficient antioxidant system composed by antioxidant enzymes, glutathione, vitamins and microelements. However, when the ROS production is higher than the antioxidant system capacity, pathological reactions can occur characterizing the oxidative stress condition. In some pathologies, such as sickle cell anaemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, the oxidative stress is increased. The sickle cell anaemia is a genetic disease characterized by an increase of ROS generation, abnormal iron release and lower antioxidant activity. Several therapies have been used in order to decrease the oxidative damages of these patients, such as the ascorbic acid and vitamin E administration. Thus, it was interesting to investigate the effect of natural antioxidant compounds, the flavonoids, in oxidative processes in the blood of sickle cell anaemia individuals and to compare the results with of normal individuals. The flavonoids are compounds widely distributed in the nature and normally consumed by humans since they are present in great amount in the human diet; their antioxidant, antiosteoporotic, antitumor, antiinflammatory and antiviral activities have been described. The effect of flavonoids (quercetin and rutin) was studied in the process of Hb oxidation, binding of Hb to cellular membrane, lipid peroxidation of erythrocyte membrane and protein carbonyl groups formation in the blood of sickle anaemia and normal individuals. In general, the oxidative damage levels found in the blood of

sickle individuals were higher than that found in the blood of normal individuals, differing only in the experiments of Hb oxidation. In this case, the results were similar to both Hb, perhaps because of great amount of Hb A in the blood of sickle patients. The quercetin showed higher antioxidant effect in all experiments. The rutin behaved as pro-oxidant in the Hb oxidation, when rutin is used in concentration lower than 150  $\mu$ M, however it showed protective effect in higher concentrations. Supported by these results, we can suggest beneficial effects of flavonoids, mainly of quercetin, in the protection against oxidative damage of sickle anaemia individuals blood.

## **Introdução**

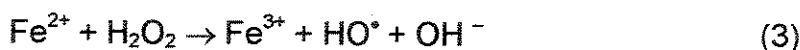
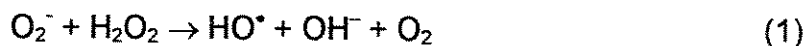
### **1. Eritrócitos como alvo de espécies radicalares**

Radicais livres de oxigênio são continuamente produzidos pelos tecidos aeróbicos. Um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos de defesa antioxidantes da célula pode gerar excesso de radicais que promoverão estresse oxidativo (Formica & Regelson, 1995).

Os eritrócitos são particularmente suscetíveis à ação destes radicais, por possuírem membrana rica em ácidos graxos poliinsaturados, encontrarem-se constantemente sob alta tensão de oxigênio e possuírem hemoglobina (Hb) que contém ferro em sua estrutura (Clemens & Waller, 1987).

A Hb, a principal proteína eritrocitária, é formada por quatro cadeias polipeptídicas; a oxigenação da molécula ocorre nos quatro átomos de  $\text{Fe}^{+2}$  dos grupos porfirínicos (grupo heme). Durante a liberação do oxigênio da oxihemoglobina (oxiHb), uma pequena porcentagem dos átomos de ferro se oxida para o estado férrico e ocorre liberação de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (Wever et al, 1973). Diariamente cerca de 3% da oxiHb é convertida a metahemoglobina (metaHb) gerando  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . A metaHb é reduzida novamente à oxiHb pela metaHb redutase constituindo um ciclo que produz  $\text{O}_2^{\cdot-}$  continuamente. Qualquer situação que aumente o “turnover” deste ciclo, aumenta também a produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Carrel et al, 1975).

O ânion superóxido pode combinar-se com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que também é produzido em todas as células aeróbicas, para formar o radical hidroxil ( $HO^\bullet$ ) de acordo com a reação 1. Certos metais de transição, especialmente o ferro, também catalizam a formação de  $HO^\bullet$ , na presença do ânion superóxido, de acordo com as equações 2 e 3. O  $O_2^-$  reduz o  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  (reação 2) que subsequentemente decompõe o  $H_2O_2$  para formar  $HO^\bullet$



O radical hidroxil é um potente oxidante e pode causar danos a biomoléculas, como DNA e proteínas, inativar enzimas e dar início ao processo de peroxidação lipídica. Neste caso, a peroxidação lipídica gerada pelo radical hidroxil, só ocorre nas proximidades da membrana, uma vez que o radical possui um tempo de vida médio bastante curto e seu efeito à distância é extremamente pequeno, como sugerido por Clemens & Waller (1987). A destruição das células vermelhas por mecanismo oxidativo é geralmente aceito como sendo uma consequência da oxidação da Hb, seguido pela desnaturação da metaHb a hemicromo e a subsequente ligação do hemicromo desnaturado à membrana do eritrócito, dando então, alterações no citoesqueleto e peroxidação lipídica que levam à lise celular (Waugh et al, 1986).

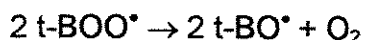
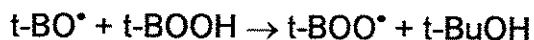
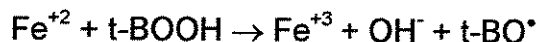
A desnaturação da Hb deve, portanto, iniciar os danos oxidativos dos componentes do citoesqueleto da membrana (Chiu et al, 1996) e diversos estudos



sugeriram que EROs poderiam estar envolvidos no fenômeno oxidativo da célula vermelha (Trotta & Sullivan, 1982; Rice-Evans et al, 1985).

Os ácidos graxos poliinsaturados da membrana são suscetíveis ao ataque de radicais oxidantes com a formação de hidroperóxidos lipídicos (Van der Zee et al, 1989). Estes últimos, eventualmente, se decompõem a uma variedade de subprodutos incluindo o malondialdeído, que fornece uma medida da suscetibilidade dos lipídios da membrana à peroxidação (Stocks and Dormandy, 1971). Os peróxidos são formados em diversos processos biológicos e podem iniciar uma série de reações deletérias que levam à morte prematura da célula (Van den Berg et al., 1992).

Os eritrócitos tratados por hidroperóxido de t-butila (t-BOOH) têm sido usados como modelo para estudar os efeitos dos hidroperóxidos de lipídios gerados endogenamente (Trotta et al, 1983). De acordo com Van der Zee e colaboradores, (1989), a reação da Hb com t-BOOH leva à formação dos radicais alcóxil (t-BO<sup>•</sup>) e o peróxil (t-BOO<sup>•</sup>) responsáveis pela iniciação e propagação da peroxidação lipídica, segundo as reações:



EROs também podem estar envolvidas nos processos de oxidação da estrutura da proteína ocasionando a formação de grupos carbonil, fragmentação da cadeia polipeptídica e ligações cruzadas, estas últimas normalmente associadas à perda da

atividade e função da proteína (Dean et al, 1997). Em geral, a maioria das proteínas são suscetíveis às modificações oxidativas, entretanto, sob condições fisiológicas, os resíduos de prolina, histidina, lisina e arginina são os mais propensos a sofrerem oxidação (Fagan et al, 1999).

A produção de grupos carbonil tem sido descrita como sendo um dos primeiros eventos da oxidação da estrutura de proteína podendo ser encontrada em vários processos fisiológicos e patológicos, tais como envelhecimento, mal de Alzheimer, artrite e doenças pulmonares (Brown & Kelly., 1994). Os grupos carbonil podem ser formados após a interação da proteína com as EROs levando à formação de um peptídeo no qual o aminoácido N-terminal fica bloqueado com o grupo carbonil; em alguns casos, este grupo é introduzido na proteína pela reação com aldeídos produzidos durante os processos de peroxidação lipídica da membrana da célula, ou ainda gerado pelas reações de glicação e glicooxidação de proteínas (Berlett & Stadtman, 1997).

Elevados níveis de proteína oxidada e consequente formação de grupos carbonil estão presentes em animais e culturas de células que foram expostos à várias condições de estresse oxidativo. Assim, após situações como hipóxia, isquemia-reperfusão e exercícios físicos intensos pode-se encontrar nas células, um aumento considerável nos níveis de grupos carbonil (Schuessler & Schilling, 1984).

Diversos mecanismos podem estar relacionados a formação dos grupos carbonil e envolvem a geração direta de radicais peroxil, ou a decomposição de um hidroperóxido formado. Os hidroperóxidos são formados pelo ataque do radical  $\cdot\text{OH}$  aos aminoácidos, formando inicialmente um radical centrado no carbono, o qual,

subsequentemente, reage com oxigênio ( $O_2$ ) e forma o radical peroxil; reações posteriores com doadores de hidrogênio transformam o peroxil em hidroperóxidos (Fu et al, 1998). O hidroperóxido formado ou o peroxil podem resultar em carbonil através de uma sequência de reações. Deste modo, a quantificação dos grupos carbonil em proteínas tem sido utilizada como uma espécie de marcador de danos oxidativos nas proteínas.

Os eritrócitos conseguem prevenir estes danos oxidativos graças a presença de defesas antioxidantes que são constituídas por enzimas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e catalase) e moléculas não enzimáticas que incluem glutathione,  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e ácido úrico, que geralmente interrompem a propagação das reações radicalares autocatalíticas (Cadenas, 1989).

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloproteína que dismuta ânion superóxido  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Fridovich, 1975). O  $H_2O_2$  formado por esta ou por outras vias é removido pela catalase (CAT) ou pela glutathione peroxidase (GSH-px). A catalase catalisa a decomposição do  $H_2O_2$  à água e oxigênio. A glutathione peroxidase reduz o  $H_2O_2$  utilizando a glutathione reduzida (GSH) que é oxidada (GSSG). A GSSG é então reconvertida à sua forma reduzida, as custas do NADPH, por ação da glutathione redutase (GR) (Freeman & Crapo, 1982).

Assim, redutores tais como os grupos tióis intracelulares (GSH, por exemplo) contribuem para a redução de  $H_2O_2$ , peróxido de lipídios e outras espécies oxidantes, protegendo as células vermelhas do sangue contra os danos oxidativos.

## 2- Espécies reativas e anemia falciforme

Algumas doenças apresentam eritrócitos mais predispostos aos ataques das espécies radicalares por produzirem maior quantidade de EROs (Chiu et al, 1982); como por exemplo as hemoglobinopatias tais como as talassemias, anemia falciforme e outras.

A anemia falciforme é uma doença genética onde ocorre uma mutação no gene que codifica a cadeia  $\beta$  da Hb, resultando numa substituição do amino ácido ácido glutâmico pela valina na posição 6 das cadeias  $\beta$  da Hb, dando origem a uma Hb mutante que recebe o nome de Hb S (Ingram, 1956). Indivíduos que possuem o gene SS apresentam maior índice de mortalidade que a população normal. A sintomatologia da doença inclui dores sistêmicas, oclusão vascular, necrose tecidual e, as vezes, perda de membros. Os heterozigotos carregam um gene para a doença e um gene para a Hb normal, apresentando o genótipo AS, cuja doença é conhecida como traço falcêmico e o paciente possui as manifestações clínicas geralmente, mais brandas (Shaeffer et al, 1968).

O gene para a anemia falciforme é amplamente distribuído na África (norte, equatorial e central), no Caribe, no Brasil, na América Central, sul da Itália, Turquia, Israel e Índia. A presença do gene em todos estes países tem uma origem comum, este gene foi encontrado originariamente na África e está intimamente correlacionado com a incidência do *Plasmodium falciparum*, o transmissor da malária (Allison, 1964). Quando a Hb S é desoxigenada torna-se insolúvel e forma feixes de fibras tubulares devido a polimerização da proteína. Esses agregados fibrosos são responsáveis pela deformação dos glóbulos vermelhos. As cadeias  $\beta$  da Hb exibem

baixa afinidade pela cadeia  $\alpha$  facilitando a sua dissociação (Shaeffer, 1980). A substituição de um resíduo de ácido glutâmico por valina faz com que os duas valinas nas posições 1 e 6 de cada cadeia  $\beta$  formem uma associação hidrofóbica na superfície da molécula, levando a Hb S a assumir uma conformação que se enfileira de tal maneira que o eritrócito adquire a forma de foice (Noguchi et al, 1989; Adachi & Asakura, 1994). O fenômeno de falcização diminui a capacidade das células vermelhas do sangue passarem eficientemente através dos vasos da microcirculação (Kaul et al, 1989). Isto pode resultar em oclusão do vaso, decréscimo da sobrevivência dos eritrócitos e em isquemias associadas à sintomatologia da doença (Embury, 1986).

Neste tipo de patologia é conhecido que os processos oxidativos estão aumentados; a Hb S é mais suscetível à oxidação que a Hb A (Asakura et al, 1974). A metaHb S é ainda mais instável e perde seus grupos heme mais facilmente que a metaHb A (Hebbel & Eaton, 1989). Adicionalmente, a geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil pela Hb S é cerca de duas vezes maior quando comparado com a Hb A (Hebbel et al, 1988, Hebbel, 1991). A membrana dos eritrócitos falciformes manifestam atividade de Fenton aumentada (Hebbel, 1992) uma vez que o eritrócito possui maior quantidade de ferro livre e/ ou associado à membrana, provenientes da perda dos grupos heme da Hb (Sheng et al, 1998), que pode reagir com as espécies reativas ( $O_2^-$  e  $H_2O_2$ ), cuja geração ocorre de maneira exacerbada.

A auto-oxidação elevada da Hb S pode ser explicada em parte, pelo aspecto citosólico das membranas dos eritrócitos falciformes que se mostram com maior

quantidade substancial de ferro molecular (Kurros & Hebbel, 1988). Este ferro pode participar de reações de oxido-redução transformando a oxiHb solúvel em metaHb (Shalev & Hebbel, 1996). O acúmulo anormal de ferro molecular nas células falciformes também pode ser responsável por defeitos estruturais e funcionais dos eritrócitos, como aumento da atividade de co-transporte K:Cl (Brugnara et al, 1986), aumento da suscetibilidade à deformação (Sugihara & Hebbel, 1992) e ligação do hemicromo à proteína da membrana banda 3 (Vaugh et al, 1986). A ligação hemicromo à proteína banda 3 é particularmente importante pois leva ao acúmulo de imunoglobulinas que promovem a fagocitose destas células pelos macrófagos (Mohandas & Hebbel, 1994).

Eritrócitos falciformes são também mais suscetíveis aos danos peroxidativos e as atividades de algumas enzimas antioxidantes importantes, como glutathione peroxidase e catalase são menores que em células normais (Hebbel, 1992). O nível de GSH, nas células falciformes também encontra-se diminuído em cerca de 50% quando comparado ao de hemácias normais (Tatum & Chow, 1996).

Outros estudos sugerem que o nível de ácido ascórbico é reduzido em pacientes com anemia falciforme (Essien, 1995 e Muskiet et al, 1991), entretanto nos experimentos de Tatum & Chow, (1996) e Chui e colaboradores, (1990) nenhuma diferença foi encontrada. As discrepâncias entre os estudos podem ser devidas às diferenças nas ingestão da vitamina C pelos diferentes pacientes (Aslan et al, 2000)

## **2.1 - Terapias para a anemia falciforme baseadas nos mecanismos oxidativos**

As investigações e o entendimento de alguns dos processos oxidativos que ocorrem na anemia falciforme levaram à descoberta de novas terapias para minimizar os efeitos deletérios da doença.

A hidroxiuréia, a qual é amplamente utilizada nestes pacientes, apresenta benefícios para as funções vasculares. As possíveis explicações para estes benefícios estão relacionadas ao aumento da proporção de hemoglobinas fetais que reduziria a polimerização das hemoglobinas falcizadas (Charache et al, 1995).

A arginina é um outro exemplo de substância utilizada nas terapias dos pacientes portadores de anemia falciforme. Enwonwu & Turner, (1990) observaram que estes pacientes tinham uma redução significativa na concentração de arginina no plasma e urina. Não existem relatos dos efeitos da administração deste aminoácido nos pacientes com anemia falciforme, mas em indivíduos saudáveis, a arginina aumenta a circulação sanguínea cerebral, diminui a agregação plaquetária, aumentando a fluidez de sangue (Gugliana et al, 1997).

Drogas que agem diminuindo a concentração de homocisteína também são indicadas no tratamento da anemia falciforme. Dentre estas drogas podemos citar o ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>. A hiperhomocisteinemia tem sido associada à trombooses arteriais (Clarke et al, 1991) e os pacientes com anemia falciforme tem elevada concentração de homocisteína no plasma, que provém de uma deficiência de folato e vitamina B<sub>12</sub> (Houston et al, 1997).

No hospital das clínicas da UNICAMP, a terapia administrada a estes pacientes consta da utilização de ácido fólico e/ou antibiótico, antiinflamatórios e analgésicos, além de transfusões de sangue periódicas.

A produção elevada de espécies radicalares nestes pacientes e o sistema antioxidante reduzido faz com que o uso de antioxidantes seja uma terapia de grande importância. Neste sentido, o estudo de Natta & Machlin, (1980) utilizando uma suplementação de vitamina E acompanhada de ácido ascórbico, zinco e óleo de soja, por um período de oito meses, reduziu em 37,5% o número de células falcizadas irreversivelmente.

### **3 - Flavonóides como drogas protetoras ou promotoras da oxidação**

Flavonóides, ou bioflavonóides são um grupo de aproximadamente 4000 compostos polifenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal (Havsteen, 1983). Desta maneira, representam um constituinte muito freqüente na dieta humana. São encontrados em bebidas como vinhos, chás, café, cerveja, e em alimentos como chocolates, maçãs e cebola. Acredita-se que a ingestão diária varie de 23 mg a 1g de flavonóides ( Peterson & Drwyer, 1998).

A família dos flavonóides compreende membros das classes das flavonas, isoflavonas, flavonol, protocianidinas e 2,3-dihidroderivados das flavonas, chamados de flavanonas, os quais podem ser interconvertidos (Skibola & Smith, 2000). Flavanonas podem sofrer uma série de transformações afetando o anel C heterocíclico, dando origem a outros membros da família dos flavonóides, incluindo antocianinas e catequinas (Cao et al, 1997)



Nas plantas, são responsáveis pela coloração das flores, ajudando assim a polinização e também auxiliando no crescimento, desenvolvimento e defesa (Cody et al, 1986). Estão envolvidos na defesa contra radiações ultravioleta, fotossensibilização, transferência de energia, fotossíntese, determinação do sexo, regulação hormonal, dentre outras (Zaat et al, 1987).

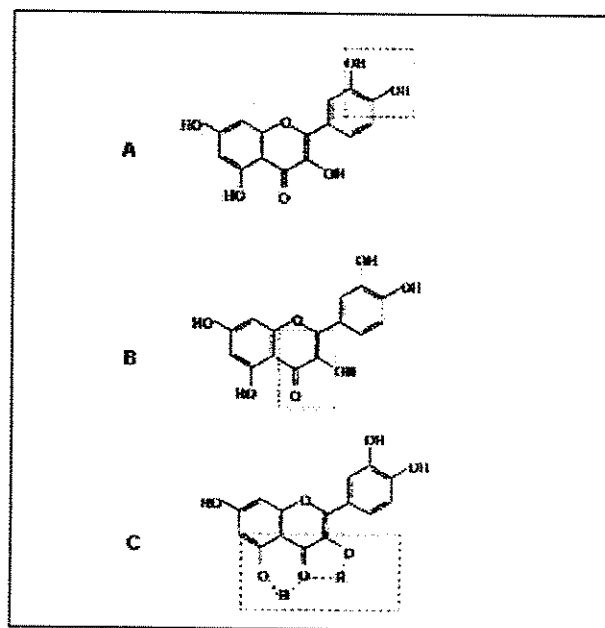
Em humanos, os flavonóides exibem muitos efeitos biológicos, tais como proteção da integridade vascular (Beretz & Cazenave, 1988), propriedades antihepatotóxicas (Eaton-Evan, 1994), antitumorais (Bracke et al, 1988), inibição de enzimas como a xantina oxidase (Sies et al, 1995), proteção contra úlceras estomacais (Nagao et al, 1999), efeito antiespasmódico (Capasso et al, 1991), e atividades antivirais e anti-inflamatórias (Chu et al, 1992). Dentre suas funções, podemos citar ainda, a sua propriedade antiosteoporótica; estudos têm demonstrado que flavonóides podem prevenir a osteoporose, reduzir dores e aumentar a atividade física dos pacientes (Di Carlo et al, 1999) sendo famosos pela sua atividade antioxidante (Afanas'ev et al, 1995).

Tem sido demonstrado que a ingestão adequada de vegetais e frutas ricos em flavonóides, principalmente quercetina, diminui a taxa de mortalidade relacionada à doenças cardiovasculares e coronarianas (Hertog et al, 1997). Estes efeitos parecem estar relacionados à atividade antioxidante dos flavonóides, desde que estes podem prevenir a oxidação das LDL e diminuir a formação das placas (Hollman & Katan, 1997). Estas, quando oxidadas, são aterogênicas e consideradas como o intermediário crucial na formação de placas de ateroma (Beretz & Cazenave, 1988).

Os flavonóides têm a capacidade de interagir com óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ), o qual é mediador de vários sistemas biológicos (Moncada et al., 1991). São conhecidos como seqüestradores de radicais livres de oxigênio e estudos recentes, sugerem que eles são potentes seqüestradores de radicais livres de óxido nítrico; estes dados aumentam a importância dos flavonóides como droga terapêutica (Forstermann et al, 1988).

A atividade antioxidante dos flavonóides depende, basicamente, da capacidade de atuar como quelante de metais e de seqüestrar espécies radicalares (Wu et al, 1996). Algumas características estruturais do flavonóide permitem o desempenho eficiente destas funções, tais como:

- a) a estrutura catecol no anel B, é alvo para radicais;
- b) a dupla ligação 2,3 em conjugação com uma ligação 4-oxo do anel C, é responsável pela delocalização do elétron do anel B, impedindo sua forma radicalar;
- c) a presença de grupos hidroxila nas posições 3,5 do anel A potencializa sua atividade sequestradora de radicais (Croft, 1998).



Esquema 1 – Estrutura do Flavonóide

A abstração do hidrogênio destas hidroxilas acontecem segundo a reação abaixo (Korkina et al, 1997):



Os flavonóides podem também inibir os processos de peroxidação lipídica da membrana das células. Diversos estudos têm sido realizados no intuito de se evidenciar este efeito dos flavonóides. Nos experimentos de Torel e colaboradores, (1986), os flavonóides inibiram a auto-oxidação do ácido linolêico. A proteção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade também foi observada (Sorata et al, 1984). Mangiapance e colaboradores, (1992) e Maridonneau-Parini e colaboradores, (1986) também conseguiram observar diminuição da lise e peroxidação em eritrócitos humanos.

A atividade antioxidante destes compostos também se deve a ação quelante de metais, tais como  $Fe^{+2}$  e  $Cu^{+}$ . Estes metais podem estar envolvidos em reações do tipo Fenton e de Haber – Weiss (Thompson & Williams, 1976).

Em contraste com a atividade antioxidante, alguns estudos têm mostrado que os flavonóides podem se comportar como pró-oxidante. Nos ensaios de Cao e colaboradores, (1997) foram observados que alguns flavonóides demonstram atividade antioxidante contra radicais livres, mas outros se comportam como pró-oxidantes quando na presença de um metal e que a atividade antioxidante ou pró-oxidante depende da estrutura do flavonóide. Estes autores sugeriram que os efeitos farmacológicos e biológicos destes compostos dependem de seu comportamento anti ou pró-oxidante.

Flavona ou flavanona, quando não possuem hidroxila e constituem a estrutura química básica do flavonóide, não apresenta atividade antioxidante ou pró-oxidante (Rice-Evan et al, 1996).

Em geral, quanto maior a quantidade de hidroxilas que o flavonóide possui, maior sua capacidade antioxidante, entretanto, a posição destas hidroxilas também é um fator importante. Observou-se que uma flavona com adição de uma hidroxila na posição 5 não apresenta atividade antioxidante, entretanto, o composto com a hidroxila na posição 6 se comporta como um potente antioxidante (Cao et al, 1997).

Flavonóides como a quercetina que possuem 5 hidroxilas estão agrupados entre os antioxidantes mais eficientes (Cao et al, 1997).

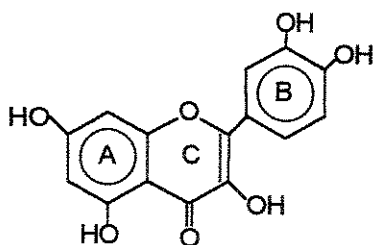
A quercetina, um flavonóide da classe dos flavonóis, é o flavonóide predominante na dieta humana e estima-se que a ingestão diária varie de 4 a 68 mg (Skibola & Smith, 2000). Pode ser encontrado em cebolas, maçãs, vinho tinto e chás verde e preto (Croft, 1998). Além da sua capacidade antioxidante, a quercetina também apresenta propriedade antiviral, anti-inflamatória, antiproliferativa e antimicrobiótica (Kawaii et al, 1999)

A alta atividade antioxidante da quercetina se deve a habilidade de impedir os processos radiculares nas células por 3 diferentes mecanismos:

- 1) Pela sua ação sequestradora de  $O_2^{\cdot -}$  (Hu et al, 1995)
- 2) Pela reação com radicais peroxil, inibindo assim a peroxidação lipídica (Jovanovic et al, 1994)
- 3) Pela ação quelante de ferro, diminuindo a formação de  $^{\cdot}OH$  (Morel et al, 1993)

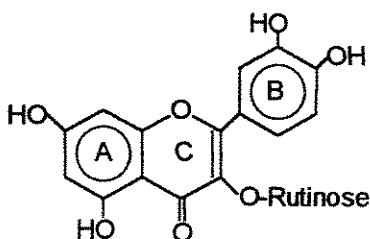
A estrutura química da quercetina prediz sua atividade antioxidante. Ela possui os 3 grupos estruturais determinantes para sua atividade antioxidante e ou sequestradora de radicais livres (Metodiewa et al, 1999)

Alguns trabalhos descrevem sua capacidade de doar átomo de hidrogênio para os radicais hidroxil, superóxido, peroxil e alcóxil (Rice-Evans et al, 1996; Saija et al, 1995)



Esquema 2: Estrutura da quercetina

Outro flavonóide importante é a rutina, que difere da quercetina por possuir uma molécula de açúcar (rutinose) na posição 3 do anel C. Por este motivo, algumas vezes recebe o nome de rutinosídeo de quercetina (Grinberg et al, 1994) (Figura 3). A presença da rutinose confere à molécula uma característica hidrofílica atrapalhando assim sua interação com as membranas celulares (Ferrali et al, 1997). Sua atividade antioxidante se deve ao fato de poder atuar como sequestradora de  $O_2^-$  e quelante de ferro (Grinberg et al., 1994).



Esquema 3: Estrutura da rutina

## **Objetivos**

Nas terapias antioxidantes atuais, vários compostos, como ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocopherol, são administrados aos indivíduos normais e portadores de anemia falciforme (Natta & Machlin, 1980). Entretanto, várias pesquisas têm demonstrado o papel antioxidante exercido pelos flavonóides na proteção contra os danos causados pelas EROs e outras espécies oxidantes provenientes do metabolismo celular (Afanas'ev et al, 1995; Croft, 1998). As características estruturais dos flavonóides os tornam poderosos sequestradores de radicais livres e/ou quelante de metais (Croft, 1988), características estas que, poderiam ser de grande relevância para o seu uso nas terapias anti-estresse oxidativo em indivíduos normais e sobretudo em indivíduos portadores de anemia falciforme, tentando assim, minimizar o quadro clínico destes pacientes.

Em geral, os indivíduos falcêmicos doadores de sangue para a presente investigação, recebiam transfusões sanguíneas a cada 4 a 6 meses e alguns pacientes eram medicados com ácido fólico e/ou antibiótico, antiinflamatório e analgésicos. Esses pacientes eram, portanto, doentes controlados e muitas vezes, o sangue possuía uma porcentagem razoável de Hb A, proveniente da transfusão. Apesar desta heterogeneidade de pacientes falciformes, o tratamento do sangue "in vitro" com os flavonóides poderia nos oferecer uma indicação dos benefícios conferidos por estes antioxidantes de origem vegetal que podem ser ingeridos naturalmente na dieta.

Assim, diversos experimentos foram realizados visando estudar os efeitos da quercetina e rutina em eritrócito, tanto de pacientes falcêmicos quanto de indivíduos

normais. O estudo com indivíduos normais também serviram de parâmetro para os estudos com eritrócitos falciformes.

Portanto, os objetivos foram:

1. Verificar a oxidação da Hb, peroxidação lipídica da membrana eritrocitária, ligação de Hb à membrana eritrocitária submetido ao estresse oxidativo pela ação do t-BOOH.
2. Determinar o nível de oxidação da proteína causada pelo t-BOOH, analisada pelo nível de formação de carbonil, tanto em solução de Hb quanto em suspensão de eritrócitos.
3. Estudar o efeito dos flavonóides sobre os itens 1 e 2.

### **3) MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1) Obtenção do material biológico:**

O sangue foi fornecido pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas/UNICAMP. O sangue coletado em heparina foi centrifugado para separação do plasma (descartado), em seguida, as células foram lavadas com 3 volumes de solução de NaCl (0,9%) gelado, por três vezes, e centrifugadas a 2500 g/5 min, desprezando-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4 (NaCl 0,9%), ou então hemolisadas com água destilada e centrifugada a 5000 g/10 minutos para a obtenção da solução de hemoglobina.

#### **2) Determinação da concentração de hemoglobina**

A concentração de hemoglobina foi medida segundo o método de Drabkin. Neste método uma alíquota de solução contendo hemoglobina é colocada em 2 mL de reagente de Drabkin (100mg cianeto de sódio + 300mg de ferricianeto de potássio em 1000 mL de água bidestilada), e após 5 min, faz-se a leitura em 540 nm. A concentração é calculada utilizando o coeficiente de extinção  $\varepsilon = 11,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Winterbourn, 1990).

#### **3) Preparação das soluções de flavonóides**

Os flavonóides foram dissolvidos em DMSO (Dimetilsulfóxido) e então diluídos em 1:2 com água destilada (solução estoque) (Afanas'ev et al, 1989).



A concentração final de DMSO no tubo de reação foi de 2% em todos os experimentos. Nesta concentração o DMSO não mostrou efeito significativo sobre a oxidação da Hb e peroxidação lipídica (dados não mostrados). As soluções de flavonóides foram preparadas imediatamente antes do uso.

#### **4) Determinação da oxidação da hemoglobina**

A oxidação da hemoglobina foi realizada com uma solução de hemolisado total (40 µM em heme) diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, na presença de hidroperóxido de t-butila (t-BOOH) com concentrações conhecidas.

A formação de metahemoglobina e hemicromo foi acompanhada em função do tempo (Torsoni et al, 1996), registrando-se as mudanças espectrais na faixa de 500-700nm, caracterizando-se assim, os diferentes produtos, a saber: 560 nm (hemicromo), 577 nm (oxihemoglobina) e 630 nm (metahemoglobina).

Durante todo o processo, a temperatura foi mantida à 37°C.

O mesmo procedimento foi realizado na presença e ausência dos flavonóides. Os cálculos, para se determinar a porcentagem de cada produto formado, foram realizados segundo o método descrito por Winterbourn (1990), utilizando as fórmulas descritas abaixo:

$$[\text{Oxihemoglobina}] = 119A_{577} - 394A_{630} - 894A_{560}$$

$$[\text{Metahemoglobina}] = 28A_{577} + 307A_{630} - 55A_{560}$$

$$[\text{Hemicromo}] = -133A_{577} - 114A_{630} + 233A_{560}$$

A finalidade deste experimento foi determinar a ação dos flavonóides na proteção da hemoglobina contra os sistemas oxidantes, através da diminuição da oxidação do ferro heme.

### **5) Determinação da peroxidação lipídica da membrana da célula:**

Na determinação da peroxidação lipídica, utilizou-se o método descrito por Stocks & Dormandy (1971), modificado, que fornece a quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), resultante da peroxidação. O princípio deste ensaio está na reação dos produtos da peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico, formando um produto colorido (rosa), chamado de TBARS, que pode ser monitorado espectrofotometricamente em 532 nm.

À 1,2 mL de suspensão de eritrócitos contendo 0,5 mM de Hb, foi adicionado diferentes concentrações de t-BOOH e incubados por 30 minutos, à 37°C.

A reação foi paralisada pela adição de 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) 25% e levou-se à centrifugação por 1 minuto. À 1ml do sobrenadante foi adicionado 1 ml de ácido tiobarbitúrico 1% em NaOH 0,05M. Esta solução foi aquecida a (100°C), por 15 minutos, onde se verificou a formação do produto colorido. A formação do complexo colorido foi acompanhado em 532 nm após o resfriamento das amostras em gelo. Para o cálculo da concentração de TBARS foi utilizado o coeficiente de extinção =  $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , sendo os resultados expressos em nmoles TBARS/g Hb.

### **6) Determinação da ligação da hemoglobina à membrana**

A ligação da hemoglobina á membrana eritrocitária foi induzida pela incubação de uma suspensão de eritrócitos com concentração de Hb à 50  $\mu\text{M}$ , chamada de Hb inicial (Hbini), com 0,6 mM de t-BOOH durante 15 minutos á 37°C na presença e ausência dos flavonóides. Após a incubação, as células foram centrifugadas, lavadas

com PBS, lisadas com água destilada em um volume final de 2 ml e centrifugada novamente.

A concentração de Hb foi determinada no sobrenadante (Hbsob) e a concentração de Hb ligada à membrana (Hbmem) foi calculada usando a expressão:

$$[\text{Hb mem}] = [\text{Hb ini}] - [\text{Hb sob}]$$

## **7) Determinação do conteúdo de grupos carbonil de proteína**

O número de grupos carbonil de proteína pode ser quantificado espectrofotometricamente utilizando 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) seguindo-se o método de Fagan et al, (1999). Os grupos carbonil reagem com DNPH para formar 2,4 dinitrofenilhidrazona e a quantidade de hidrazona formada é quantificada espectrofotometricamente

Soluções de Hb (0,4 mM) contendo 2 mg de proteína diluída em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 foram incubadas na ausência ou presença de 0,6 mM de oxidante (t-BOOH) e de 0,07 mM dos antioxidantes (flavonóides) por 15 minutos à 37°C. À 2 mg de proteína foi adicionado 10 volumes de HCl : acetona (3:100) (v/v) gelado e a mistura foi centrifugada.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado novamente com 5 volumes de HCl : acetona (3:100). A função desta etapa é a de retirar os cromóforos (heme).

O precipitado foi lavado com 5 volumes de TCA 10%. O precipitado resultante foi ressuspenso com 0,5 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e 0,5 mL de DNPH 10

mM (em HCl 2M). Esta mistura permaneceu no escuro à temperatura ambiente e foi agitada a cada 5 minutos durante 25 minutos.

Depois do tempo de incubação, 0,5 mL de TCA 30% foi adicionado, as amostras agitadas e colocadas no gelo durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com TCA 20%, após esta lavagem, o precipitado passou por 3 sucessivas lavagens com etanol-etilacetato (1:1) (v/v) para retirar o excesso de DNPH que não reagiu com as amostras. O "pellet" foi então, dissolvido em guanidina HCl 6M, pH 2,3.

A absorbância foi determinada entre 200 a 500 nm e os cálculos do conteúdo de grupos carbonil foram feitos utilizando o  $\epsilon = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 280 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com os eritrócitos ressuspensos em PBS 0,1 M, pH 7,4 incubados na ausência ou presença de 1 mM de t-BOOH e de 70  $\mu\text{M}$  de flavonóides à 37°C durante 30 minutos.

## **8) Análise Estatística**

Os dados foram analisados por one-way ANOVA com teste posterior de Bonferroni.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## **4) RESULTADOS**

### **4.1) Oxidação da hemoglobina**

A oxidação da hemoglobina A e S foi promovida utilizando-se o t-BOOH. As Figuras 1A e 1B mostram o efeito das concentrações crescentes deste oxidante nos ensaios realizados com Hb A e S, respectivamente. De acordo com estas figuras, podemos observar que a formação de metaHb e hemicromo foi dependente da concentração de t-BOOH utilizada. Com 0,2 mM de t-BOOH, aproximadamente 50% da oxihemoglobina havia sido oxidada e com concentração de 0,6 mM de oxidante pudemos observar quase 100% de oxidação. Não houve diferença significativa entre Hb A e Hb S.

Para analisar o efeito dos flavonóides, estudos foram realizados utilizando 0,2 mM de t-BOOH na presença de diferentes concentrações de quercetina ou rutina. O efeito destes flavonóides foi similar em hemoglobina normal e falciforme. A quercetina comportou-se como antioxidante, onde na concentração de 0,07 mM, este flavonóide mostrou um sensível efeito protetor tanto para Hb A (Figura 2A) como para Hb S (Figura 2B).

A rutina, comportou - se como pró - oxidante em concentrações inferiores à 0,150 mM (Figura 3A). Resultados semelhantes foram encontrados nos experimentos com Hb S (Figura 3B).

Com o objetivo de comparar o efeito dos flavonóides sobre a oxidação da Hb A e S com os de alguns antioxidantes cujo mecanismos de ação são estabelecidos, ensaios utilizando glutathione (GSH), manitol, ácido ascórbico, difenilamina e

deferoxamina na concentração de 0,07 mM foram realizados. Os resultados mostraram que o ácido ascórbico foi o mais eficiente antioxidante seguido pela quercetina, GSH e deferoxamina (Figura 4A). O manitol praticamente não mostrou efeito, enquanto que difenilamina e rutina se comportaram como pró – oxidantes (Figura 4A). Entretanto, a combinação dos flavonóides com GSH ou ácido ascórbico potencializou o efeito antioxidante da quercetina e tornou a rutina, antioxidante. Nenhum dos antioxidantes utilizados mostrou efeito diferenciado com relação ao tipo de Hb estudada (Figuras 4A e 4B).

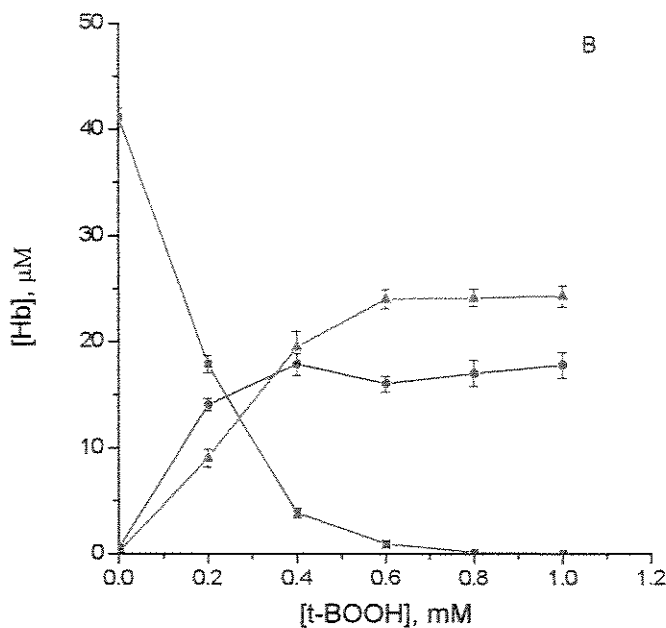
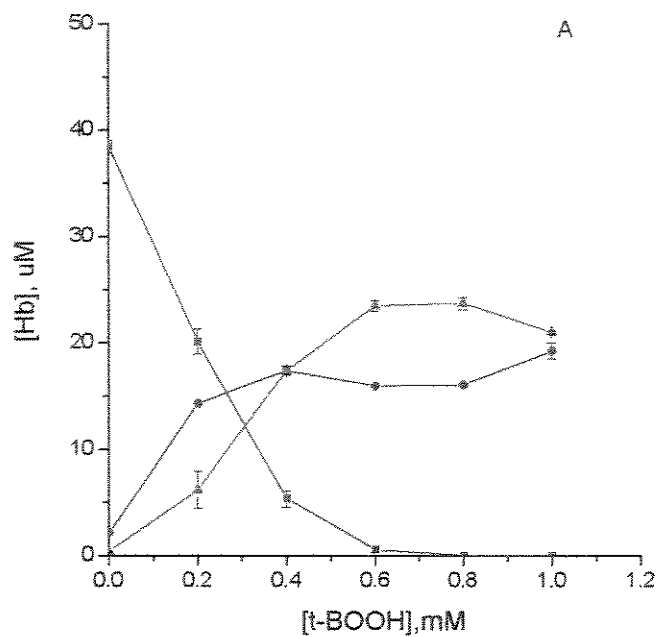


Figura 01 - Efeito da concentração de t-BOOH na oxidação da solução de Hb A (A) e Hb S (B) livres de membrana. Os níveis de OxiHb (■), metaHb (●) e hemicromo (▲) foram determinados após exposição de uma solução de Hb (40  $\mu$ M em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) ao t-BOOH por 15 min/37°C. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações.

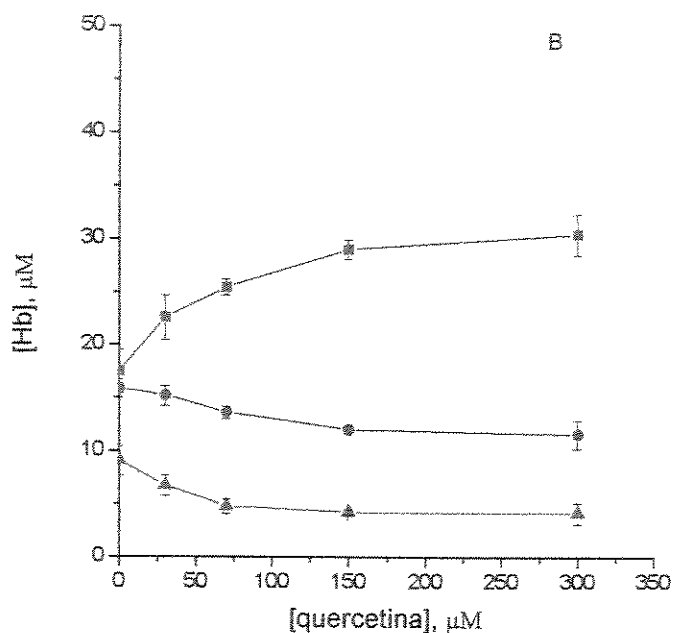
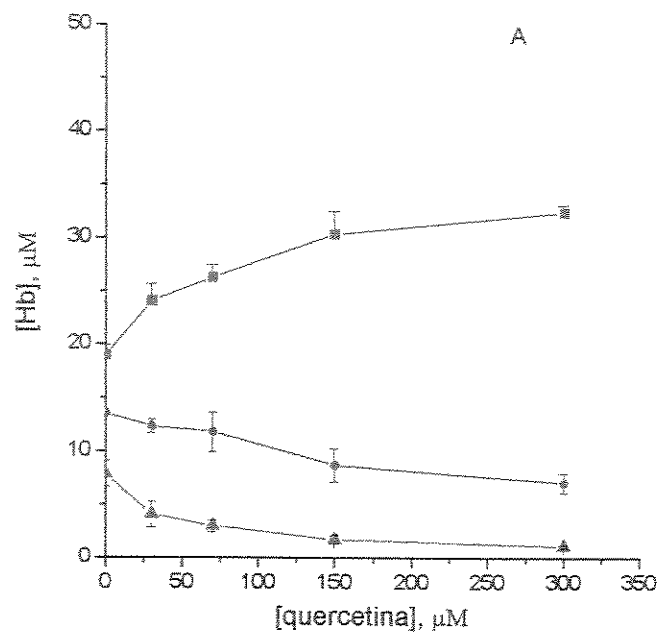


Fig. 02 - Efeito da concentração de quercetina na oxidação da solução de Hb A (A) e Hb S (B) livres de membranas. Os níveis de oxiHb (■), metaHb (●) e hemicromo (▲) foram determinados após exposição de uma solução de Hb (40  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) à 200  $\mu\text{M}$  de t-BOOH e diferentes concentrações de quercetina por 15 min/37°C. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações.



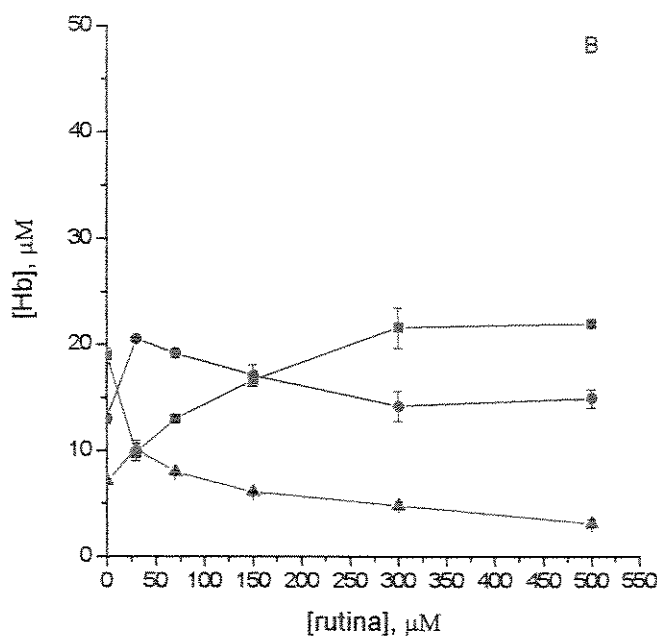
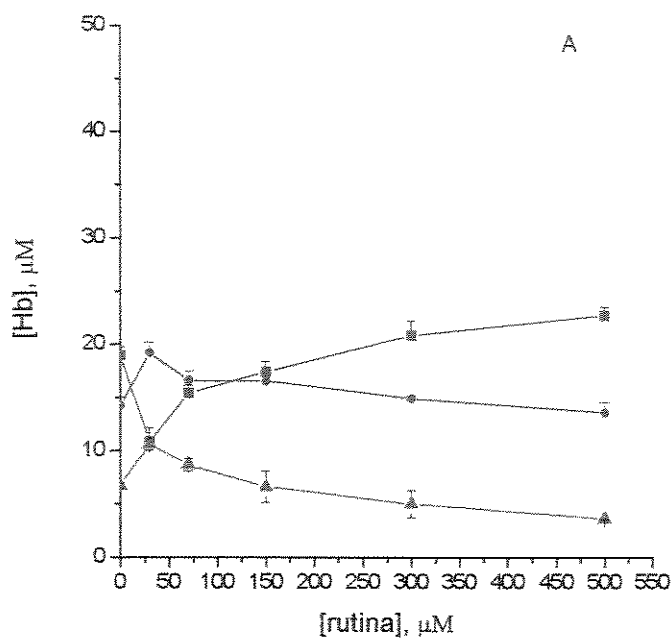


Fig. 03 - Efeito da concentração de rutina na oxidação da solução de Hb A (A) e Hb S (B) livres de membranas. Os níveis de oxiHb (■), metaHb (●) e hemicromo (▲) foram determinadas após exposição de uma solução de Hb (40  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) à 200  $\mu\text{M}$  de t-BOOH e diferentes concentrações de rutina por 15 min/37°C. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações.

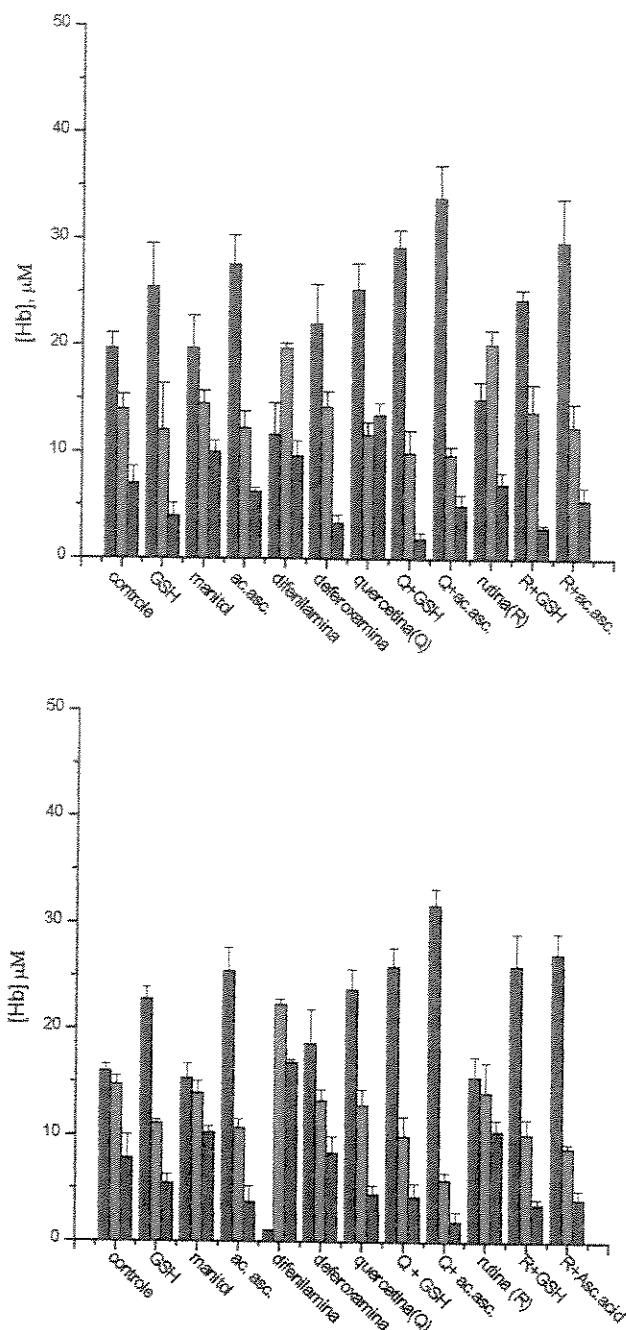


Fig. 04 - Efeito de alguns antioxidantes na oxidação da Hb A (A) e Hb S (B) livres de membranas. Os níveis de OxiHb (■), metaHb (▒) e hemicromo (□) foram determinados após exposição de uma solução de Hb (40  $\mu$ M em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) à 200  $\mu$ M de t-BOOH e de 70  $\mu$ M de antioxidantes por 15 min/37°C. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações.

## **4.2) Ligação da hemoglobina à membrana eritrocitária**

A ligação da hemoglobina à membrana é um processo posterior a oxidação da hemoglobina. Agentes oxidantes como o t-BOOH, promovem a oxidação do ferro heme da Hb resultando na formação das formas oxidadas da Hb (metaHb e hemicromo). O hemicromo liga-se com alta afinidade à proteína de membrana, especialmente, a proteína banda 3. Esta interação forma um complexo que pode trazer prejuízos à célula como a lise e morte celular. Desta maneira, os ensaios que quantificaram a ligação da Hb à membrana corroboraram os experimentos de oxidação da Hb.

A Figura 5A mostra o efeito da concentração de t-BOOH na ligação da Hb A à membrana de eritrócitos normais. Nesta figura observa-se que o aumento da concentração do oxidante resulta em um aumento da ligação da Hb à membrana da célula. Com 0,6 mM de t-BOOH aproximadamente 70% da Hb da solução se encontrava ligada à membrana eritrocitária. Estes resultados também são mostrados na Figura 6, onde os níveis de oxiHb, metaHb e hemicromo da fração solúvel desta Hb A, após exposição ao t-BOOH, estão representados.

Aspecto similar da curva de ligação da Hb à membrana foi obtido nos experimentos com células falciformes (Figura 5B). Entretanto, com as células falciformes, a quantidade de Hb ligada à membrana foi cerca de 10% maior em todas as concentrações de t-BOOH, inclusive na ausência do oxidante. Assim, nos eritrócitos dos indivíduos normais, a concentração da Hb ligada à membrana passou de 0  $\mu$ M, na ausência de t-BOOH, para aproximadamente 40  $\mu$ M na presença de 1,0

mM de t-BOOH, enquanto que nas células falciformes, a concentração da Hb ligada à membrana passou de 5  $\mu$ M para 45  $\mu$ M, respectivamente.

Com o objetivo de avaliar o efeito dos flavonóides na ligação da Hb à membrana, ensaios foram realizados com diferentes concentrações de quercetina e rutina na presença de 0,6 mM de t-BOOH. Estes experimentos foram realizados com eritrócitos normais e falciformes.

A Figura 7A mostra que a quercetina protegeu sensivelmente a ligação da Hb A à membrana, diminuindo a concentração da Hb ligada de aproximadamente 34  $\mu$ M na ausência de quercetina para aproximadamente 13  $\mu$ M na presença de 50  $\mu$ M do flavonóide. Entretanto, a rutina não apresentou efeito significativo nas mesmas condições. Comportamentos similares foram observados com Hb S (Figura 7B).

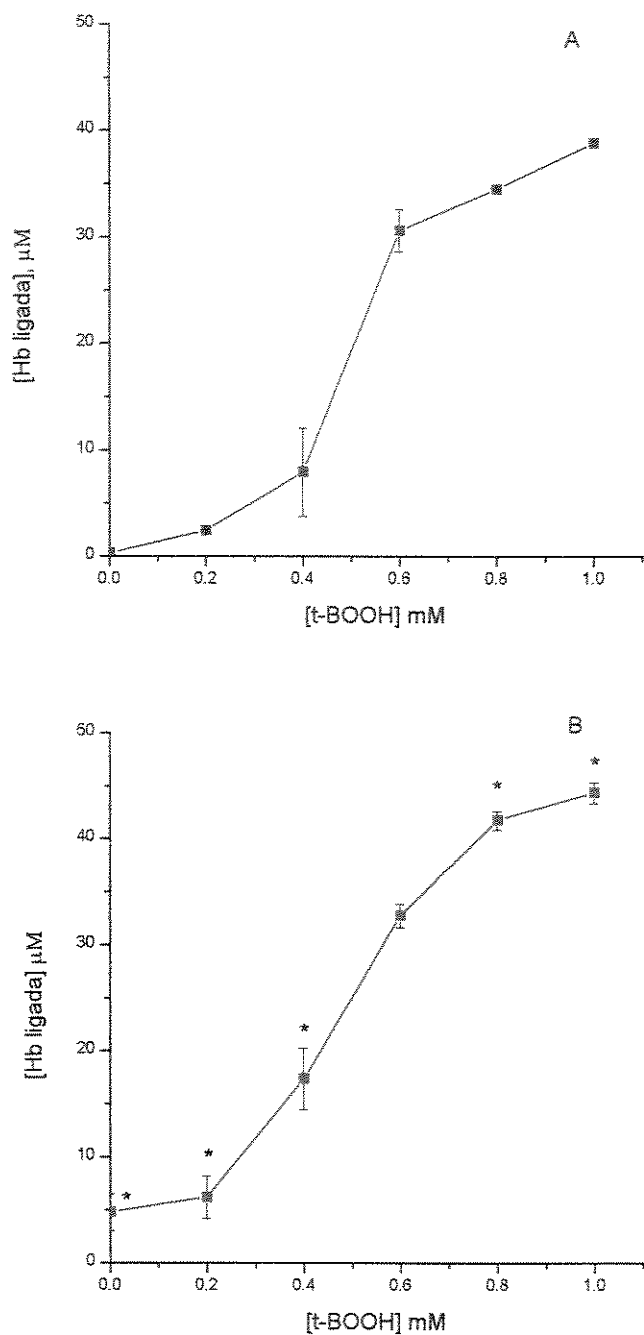


Fig. 05 - Efeito da concentração de t-BOOH sobre a ligação de Hb à membrana de eritrócitos normais (A) e falciformes (B). Uma suspensão de eritrócitos contendo 40  $\mu$ M de Hb em tampão fosfato salino (tampão fosfato 0,1 M + NaCl 0,9 %, pH 7,4) foi incubada por 15 min/37°C com diferentes concentrações de oxidante. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações. \* $p < 0,05$  quando comparado aos eritrócitos normais.

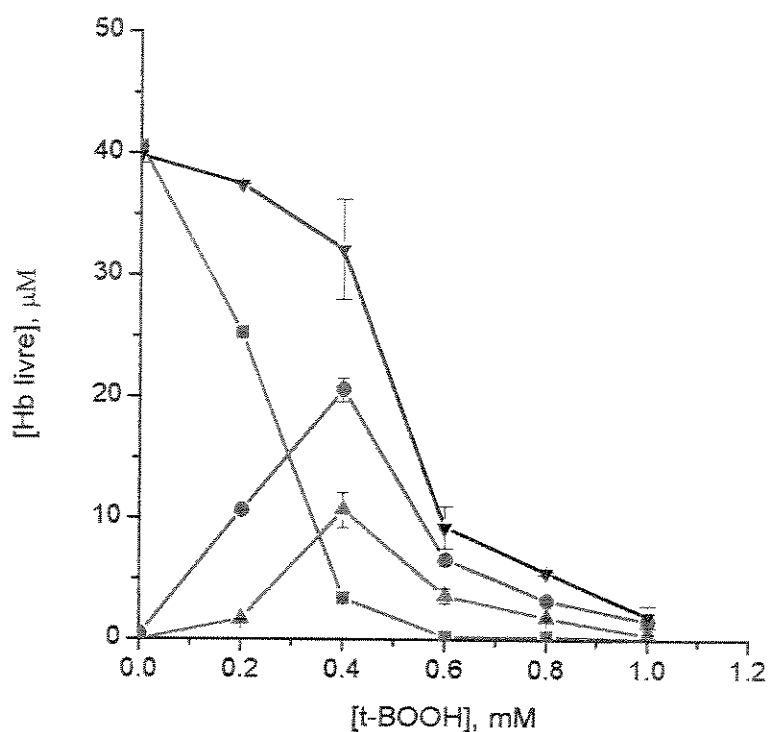


Fig. 06- Efeito da concentração de t-BOOH na fração solúvel de Hb de uma suspensão de eritrócitos normais. A suspensão de eritrócitos contendo 40  $\mu\text{M}$  de Hb em tampão fosfato salino (0,1 M de tampão fosfato + 0,9 % NaCl, pH 7,4) foi incubada por 15 min/37°C. Os níveis de oxiHb (■), metaHb (●) e hemicromo (▲) foram determinadas na fração solúvel. A Hb livre total (▼) foi obtida somando-se as concentrações de oxiHb, metaHb e hemicromo. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações.

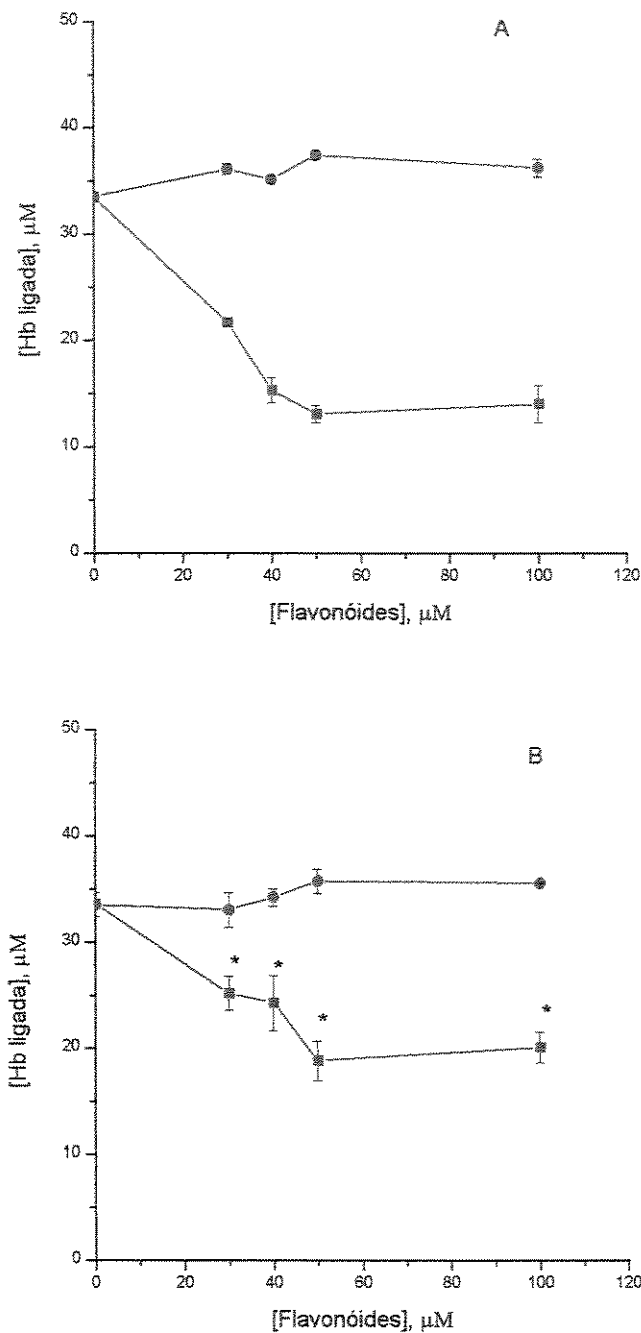


Fig. 07 - Efeito da concentração dos flavonóides quercetina (■) e rutina (●) na ligação de Hb à membrana de eritrócitos normais (A) e falciformes (B). Uma suspensão de células contendo 40  $\mu\text{M}$  de Hb em tampão fosfato salino 0,1 M, pH 7,4, foi incubada por 15 min/37°C com 200  $\mu\text{M}$  de t-BOOH na presença de quercetina e rutina. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações. \* $p < 0,05$  quando comparado aos eritrócitos normais.

### 3.3) Peroxidação lipídica da membrana eritrocitária

A membrana eritrocitária é rica em ácidos graxos poliinsaturados (Clemens & Waller, 1987), o que torna a célula mais suscetível ao processo de peroxidação lipídica.

Para induzir os processos de peroxidação lipídica, foi utilizado t-BOOH; este oxidante produziu significativo efeito na peroxidação lipídica.

As Figuras 8A e 8B mostram os efeitos das diferentes concentrações do t-BOOH na peroxidação lipídica de eritrócitos normais e falciformes respectivamente. A quantidade de TBARS formado (produto da peroxidação lipídica) aumentou com o acréscimo da concentração do oxidante. Estes ensaios nos permitiram determinar que na concentração de 0,6 mM de t-BOOH há efeito significativo na peroxidação lipídica. A membrana das células falciformes foi ligeiramente mais suscetível à peroxidação do que as células normais (Figura 8B).

Os danos sobre a membrana induzidos pelo oxidante, tanto de eritrócitos normais quanto falciformes, foram sensivelmente inibidos pela quercetina e rutina. Em suspensões de células normais incubadas com 0,6 mM de t-BOOH e diferentes concentrações de quercetina, os níveis de TBARS foram diminuídos em cerca de 35 nmoles/g Hb na presença de 30  $\mu$ M quercetina (Figura 9A). O efeito da quercetina foi qualitativamente similar com eritrócitos falciformes (Fig.9B). Contudo, nos eritrócitos falciformes os níveis de TBARS diminuíram em cerca de 45,2 nmoles/g Hb, demonstrando maior efeito dos flavonóides em células falciformes.

Nos experimentos realizados em presença de rutina o maior efeito protetor foi encontrado na concentração de 70  $\mu$ M deste flavonóide. Entretanto, o efeito da



rutina foi menor que o da quercetina. As Figuras 10A e 10B mostram o efeito da rutina em células normais e falciformes, respectivamente.

O comportamento antioxidante da quercetina e rutina sobre a peroxidação lipídica foram também comparados com o de outros antioxidantes conhecidos (glutathione, ácido ascórbico, manitol, difenilamina, desferoxamina e morin) nas mesmas concentrações de 70  $\mu$ M. A quercetina e rutina foram também incubadas com ácido ascórbico na concentração de 70  $\mu$ M de cada composto (Figs 11A e 11B).

De acordo com a Figura 11B, a peroxidação lipídica medida em eritrócitos falciformes, em presença de 0,6 mM de t-BOOH, induziu a formação de TBARS de maneira significativa com 103,41 nmoles TBARS/g Hb. A presença de quercetina, diminuiu significativamente a concentração de TBARS para 45,10 nmoles de TBARS/g Hb; na presença da rutina a inibição dos danos peroxidativos foi menor, observando-se a formação de 92,63 ( $\pm$  10,58) nmoles de TBARS/g Hb. Esta proteção foi semelhante à conferida pela tiouréia, 93,76 nmoles de TBARS/g Hb. O ácido ascórbico e difenilamina mostraram proteção semelhante com 83,32 e 84,47 nmoles de TBARS/g Hb respectivamente; a glutathione e o manitol não mostraram efeito protetor. Quando a quercetina foi incubada com ácido ascórbico, sua atividade antioxidante foi potencializada, produzindo apenas 32,18 nmoles TBARS/g Hb. Da mesma forma, a associação da rutina com ácido ascórbico também teve sua atividade antioxidante aumentada passando de 92,63 (na presença somente de rutina) para 53,84 nmoles TBARS/g Hb .

Experimentos nas mesmas condições foram realizados com sangue normal. Os danos sobre a membrana também foram sensivelmente diminuídos após incubação com a quercetina, porém menores que os observados com eritrócitos falciformes. O comportamento dos diferentes antioxidantes utilizados foram bastante semelhantes aos encontrados com sangue de indivíduos portadores de anemia falciforme (Fig.11A), com exceção do GSH que mostrou efeito antioxidante com eritrócitos normais. Outra observação é a maior concentração de TBARS produzidos pela hemácia falciforme, do que pelas hemácias normais, na ausência de antioxidante: 103,4 e 88,14 nmoles de TBARS/g Hb, respectivamente, mostrando uma maior suscetibilidade das hemácias falciformes ao oxidante.

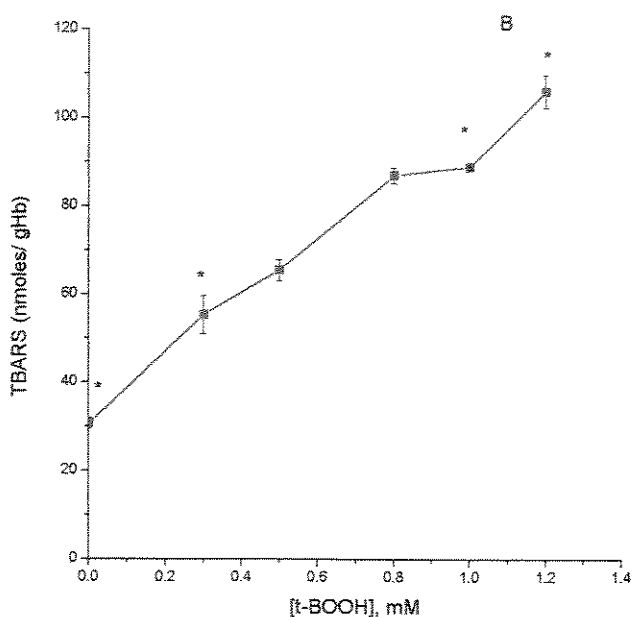
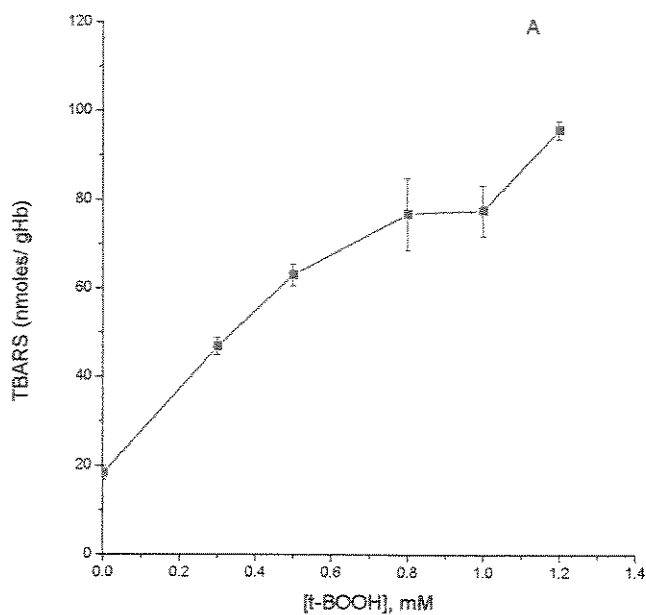


Fig. 08 - Peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos normais (A) e falciformes (B). A peroxidação lipídica foi induzida incubando-se uma suspensão de eritrócitos contendo 500  $\mu$ M de Hb em tampão fosfato salino 0,1M, pH 7,4, com t-BOOH (0,2 - 1,2 mM) por 30 min/37°C. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações. \* $p < 0,05$  quando comparado aos eritrócitos normais.

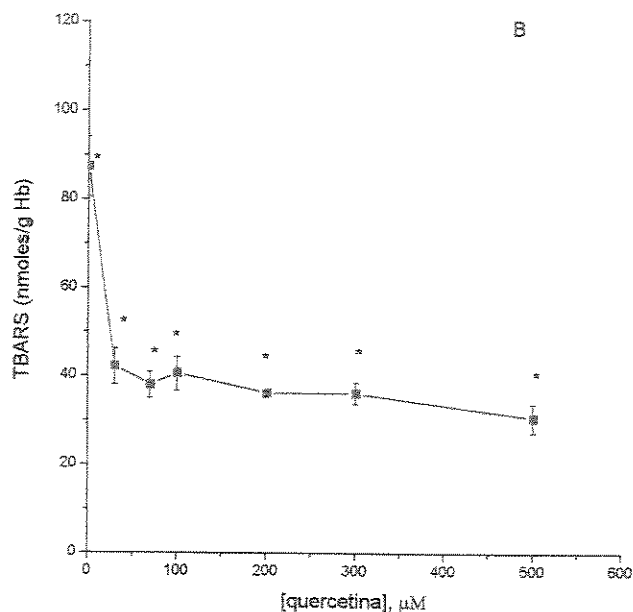
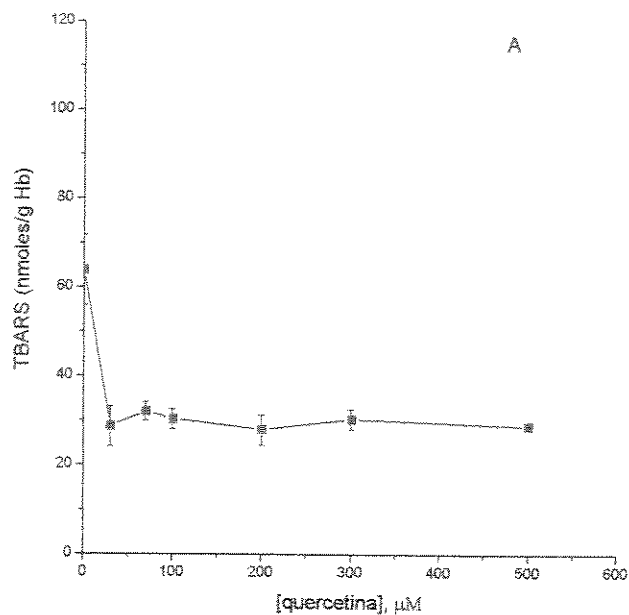


Fig. 09 - Efeito da concentração de quercetina na peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos normais (A) e falciformes (B). A peroxidação lipídica foi induzida incubando-se uma suspensão de eritrócitos contendo 500  $\mu\text{M}$  de Hb em tampão fosfato salino 0,1M, pH 7,4, com 600  $\mu\text{M}$  de t-BOOH por 30 min/37°C, na presença de quercetina (25 - 500  $\mu\text{M}$ ). Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações. \* $p < 0,05$  quando comparado aos eritrócitos normais.

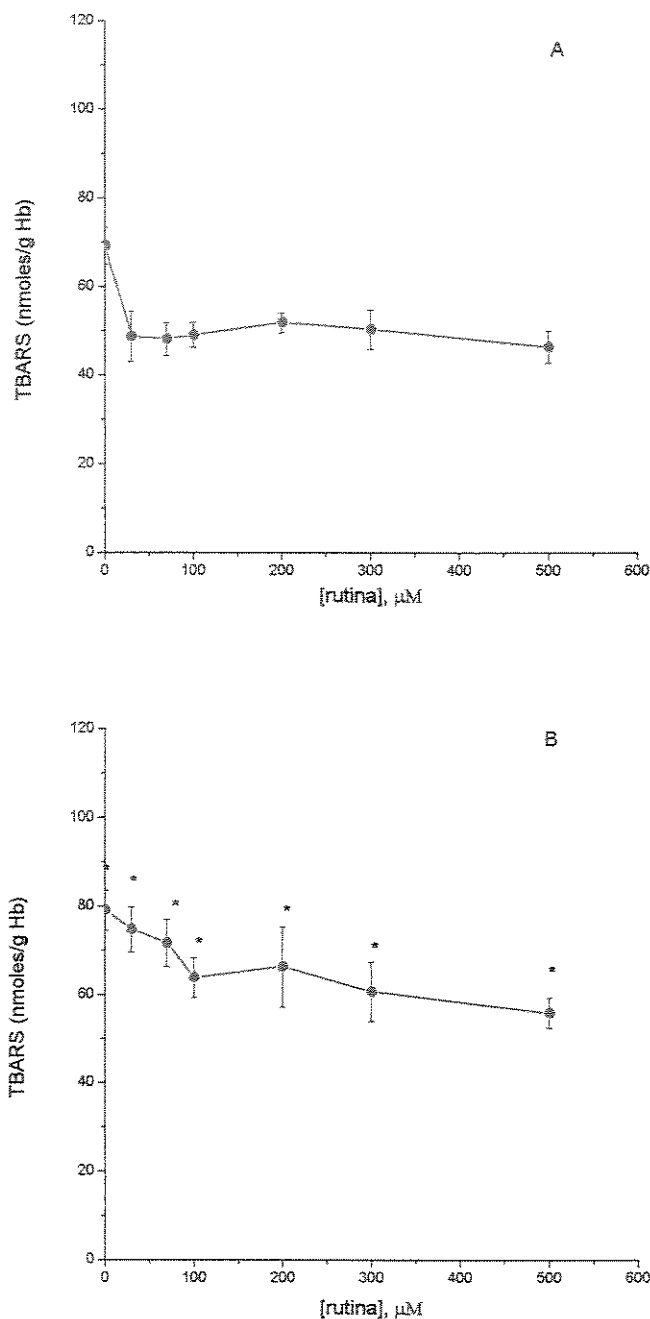


Fig. 10 - Efeito da concentração de rutina na peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos normais (A) e falciformes (B). A peroxidação lipídica foi induzida incubando-se uma suspensão de eritrócitos contendo 500  $\mu\text{M}$  de Hb em tampão fosfato salino 0,1M, pH 7,4, com 600  $\mu\text{M}$  de t-BOOH por 30 min/37°C, na presença de rutina (25 - 500  $\mu\text{M}$ ). Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações. \* $p < 0,05$  quando comparado aos eritrócitos normais.

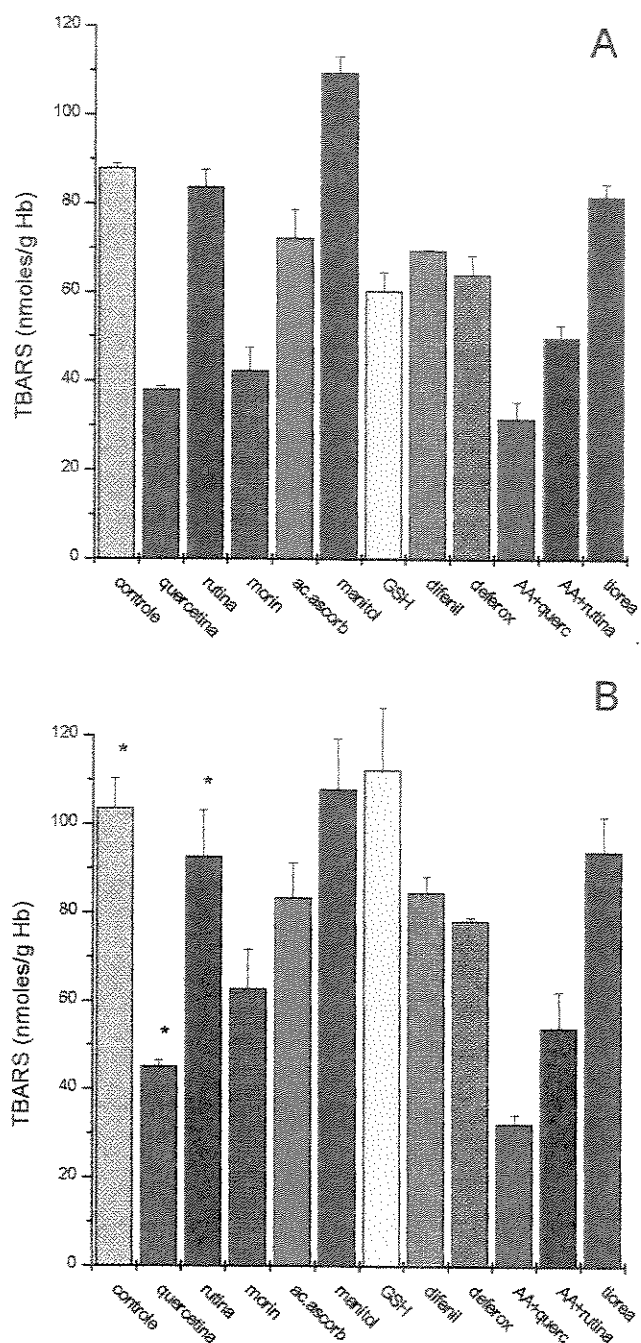


Fig. 11 - Efeito de alguns antioxidantes na peroxidação lipídica da membrana de eritrócitos normais (A) e falciformes (B). A peroxidação lipídica foi induzida incubando-se uma suspensão de eritrócitos contendo 500  $\mu$ M de Hb em tampão fosfato salino 0,1M, pH 7,4, com 600  $\mu$ M de t-BOOH na presença de 70  $\mu$ M de antioxidantes por 30 min/37°C. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações. \* $p < 0,05$  quando comparado aos eritrócitos normais.

### **3.4) Determinação do conteúdo de grupos carbonil de proteína**

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio podem provocar alterações oxidativas nas proteínas e levar a vários danos. Dentre as alterações oxidativas podemos citar as fragmentações das cadeias polipeptídicas, ligação proteína-proteína e as modificações dos resíduos de amino ácidos formando os derivados de carbonil. Assim, a determinação do conteúdo de grupos carbonil em proteínas pode fornecer dados úteis para se quantificar os danos oxidativos de proteínas.

A quantidade de grupos carbonil foi determinada na solução de Hb e nos eritrócitos de indivíduos normais e portadores de anemia falciforme, em ausência e presença de antioxidantes (quercetina, rutina, morin e ácido ascórbico).

A Figura 12A mostra a quantidade de grupos carbonil determinada em 0,4 mM de Hb A na presença ou ausência de 0,2 mM de t-BOOH e 70  $\mu$ M de antioxidantes (quercetina, rutina, morin ou ácido ascórbico). Nestes experimentos podemos observar a formação de 1,8 nmoles de carbonil/ mg Hb nos ensaios que continham apenas 0,4 mM de Hb (controle); quando 0,2 mM de t-BOOH foi adicionado ao meio da reação, a quantidade de grupos carbonil aumentou para 6,55 nmoles de carbonil/ mg Hb. A adição de 70 $\mu$ M de flavonóides neste meio de reação não diminuiu os níveis de grupos carbonil. A adição de ácido ascórbico, contudo, diminuiu discretamente os níveis de carbonil passando de 6,55 nmoles de carbonil/ mg Hb nos experimentos com t-BOOH para 5,66 nmoles de carbonil/ mg Hb quando na presença de t-BOOH e ácido ascórbico.

Entretanto, observou-se maior quantidade de grupos carbonil formados em Hb falciformes em todas as condições estudadas (Figura 12 B). No experimento controle (0,4 mM de Hb), houve um acréscimo de 31,1% de grupos carbonil na Hb S em relação à Hb A (2,36 nmoles de carbonil/ mg Hb para Hb S e 1,8 nmoles de carbonil/ mg Hb para Hb A). Na presença de 0,2 mM de t-BOOH, a formação de grupos carbonil foi ainda maior, aumentando cerca de 42,7% em relação a Hb A (9,02 e 6,55 nmoles de carbonil/ mg Hb respectivamente). Do mesmo modo que a Hb A, a adição de 70  $\mu$ M dos flavonóides (quercetina, rutina ou morin) não alterou os valores de carbonil. Somente o ácido ascórbico mostrou proteção, mesmo que discreta, contra a formação de carbonil, diminuindo de 9,02 nmoles de carbonil/ mg Hb (Hb + t-BOOH) para 6,61 nmoles de carbonil/ mg Hb após a adição de 70  $\mu$ M deste composto.

A Figura 13A mostra os resultados encontrados nos ensaios realizados com eritrócitos de indivíduos normais. Neste caso, a quantidade de grupos carbonil determinada no experimento controle (0,5 mM de Hb) foi de 2,04 nmoles de carbonil/ mg Hb, após a adição de 0,6 mM de t-BOOH, a quantidade de carbonil aumentou para 10,43 nmoles de carbonil/ mg Hb. Experimentos com 70  $\mu$ M dos antioxidantes (quercetina, rutina, morin ou ácido ascórbico) e 0,6 mM de t-BOOH também foram realizados, entretanto, nenhum dos flavonóides mostrou efeito antioxidante, somente o ácido ascórbico mostrou leve efeito protetor contra a formação de carbonil, diminuindo de 10,43 nmoles de carbonil/ mg Hb para 8,77 nmoles de carbonil/ mg Hb.



Na Figura 13B podemos observar os níveis de grupos carbonil em células falciformes. As condições experimentais foram as mesmas utilizadas nos ensaios com eritrócitos normais, entretanto o nível de oxidação e consequente formação de grupos carbonil foi superior ao encontrado nas células normais. O experimento realizado com eritrócitos falciformes na ausência do oxidante mostrou 2,79 nmoles de carbonil/ mg Hb. Após a adição de 0,6 mM de t-BOOH, a quantidade de carbonil formado foi de 15,27 nmoles de carbonil/ mg Hb. Os antioxidantes utilizados não mostraram efeito protetor.

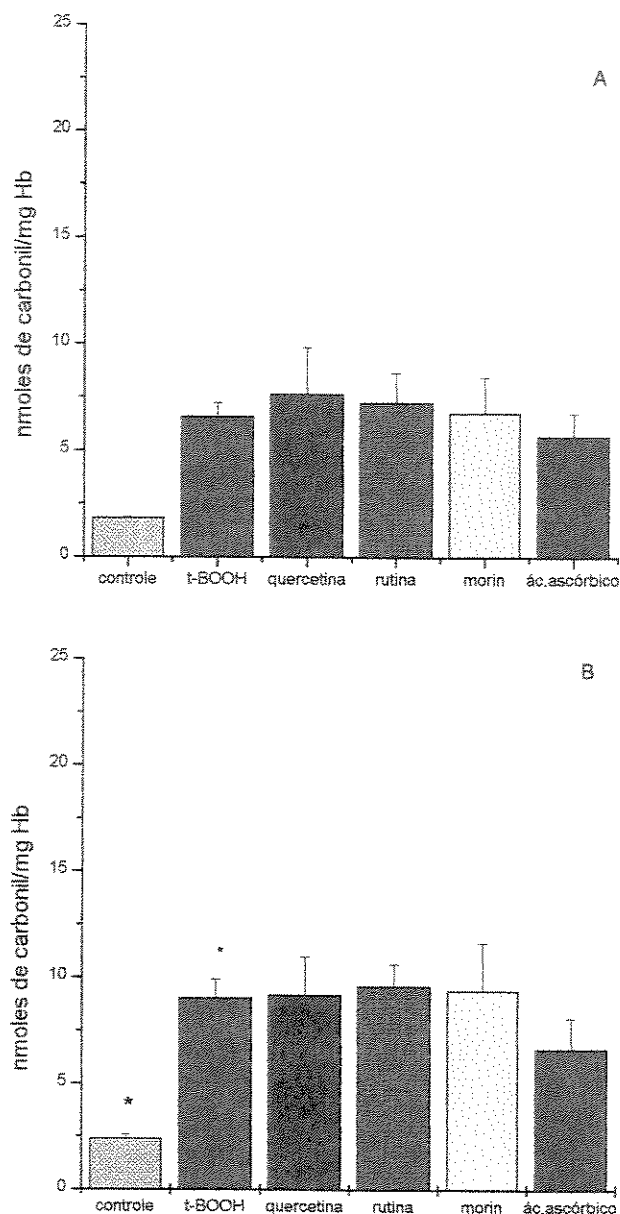


Fig. 12- Efeito do t-BOOH sobre os grupos carbonil de proteínas em soluções de Hb A (A) e Hb S (B) na ausência ou presença de antioxidante. Os grupos carbonil foram determinados incubando-se 400  $\mu$ M de solução de Hb na ausência ou presença de 200  $\mu$ M de t-BOOH e na presença de 200  $\mu$ M t-BOOH + 70  $\mu$ M de flavonóides ou ácido ascórbico, por 15 min/37°C. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações. \* $p < 0,05$ , quando comparada a Hb A.

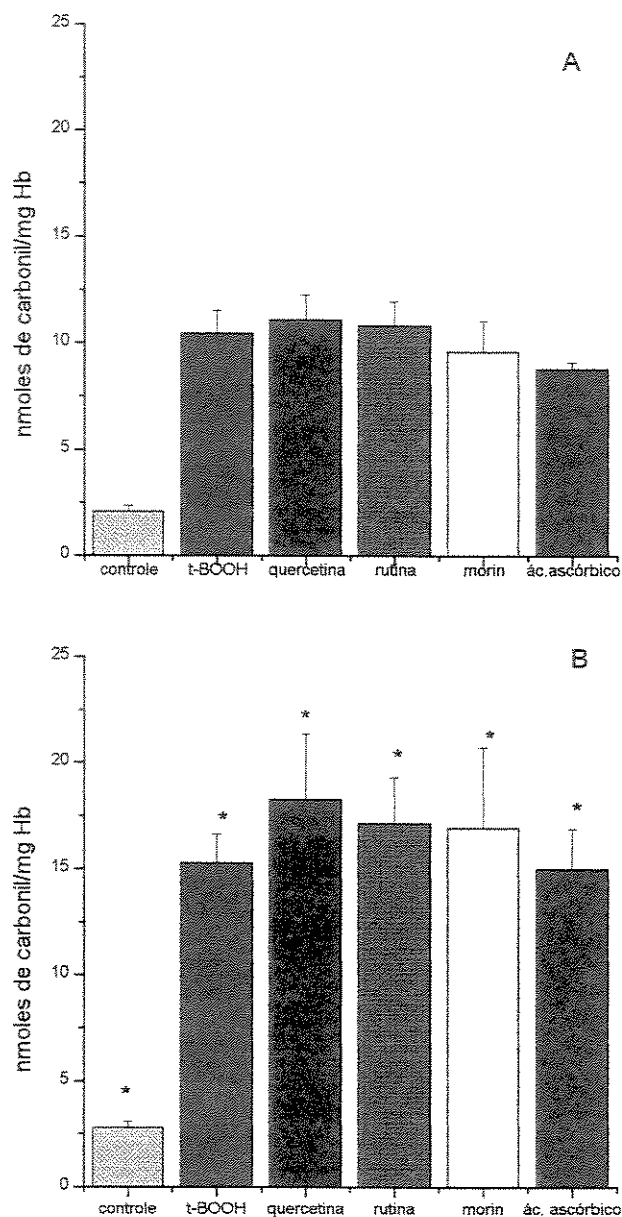


Fig. 13- Efeito do t-BOOH sobre os grupos carbonil de proteínas em suspensão de eritrócitos normais (A) e falciformes (B) na ausência ou presença de antioxidante. Os grupos carbonil foram determinados incubando-se 500  $\mu$ M de Hb na ausência ou presença de 600  $\mu$ M de t-BOOH e na presença de 600  $\mu$ M t-BOOH + 70  $\mu$ M de flavonóides ou ácido ascórbico, por 30 min/37°C. Os resultados representam a média de triplicatas de pelo menos 3 preparações. \* $p < 0,05$ , quando comparado aos eritrócitos normais.

## 5) DISCUSSÃO

Os eritrócitos, por possuírem a hemoglobina como carreadora de oxigênio, estão constantemente sob condições de estresse oxidativo (Zavodnik et al, 1998), sendo por este motivo considerado um bom modelo para se estudar o estresse oxidativo.

A anemia falciforme é uma doença amplamente estudada e sabe-se que a hemoglobina mutante (Hb S) pode sofrer uma acelerada autooxidação durante incubação *in vitro*, promovendo acúmulo de ferro e geração anormal de espécies reativas de oxigênio (Sheng et al, 1998). Assim, por estas células apresentarem maior suscetibilidade aos processos oxidativos, os eritrócitos e a hemoglobina de indivíduos portadores de anemia falciforme foram escolhidos para a presente investigação. Os mesmos experimentos foram realizados com eritrócitos de indivíduos normais que também serviram de parâmetro na investigação das células falciformes.

Para induzir a formação das espécies radicalares e a oxidação de proteínas e lipídios da membrana utilizamos o agente oxidante t-BOOH. A geração de hidroperóxidos *in vivo* tem sido conhecida como um mecanismo importante de citotoxicidade em várias patologias humanas. Desta forma, o t-BOOH torna-se uma droga relevante para simular a ação de hidroperóxidos gerados fisiologicamente.

Nos últimos anos, compostos antioxidantes como os flavonóides têm despertado interesse da área científica por possuírem propriedades terapêuticas contra uma grande variedade de patologias, principalmente aquelas que têm como principal causa, a ação de espécies oxidantes. Mas até o momento, o mecanismo

de ação dos flavonóides não está totalmente esclarecido, sendo, entretanto, conhecidas suas propriedades sequestradora de radicais livres e quelante de metais de transição (Van Acker et al,1995). Os flavonóides também podem atuar como pró-oxidante gerando radicais livres e inibindo enzimas chave do metabolismo (Skibola & Smith, 2000).

Na presente investigação, foram estudados os efeitos dos flavonóides quercetina e rutina na oxidação da Hb, em solução e em eritrócitos intactos, induzida por t-BOOH. A exposição dos eritrócitos ao t-BOOH causou peroxidação lipídica, oxidação da Hb, bem como potencializou a ligação de Hb à membrana e a formação de grupos carbonil em proteínas. Os mesmos estudos foram realizados com solução de Hb e eritrócitos de portadores de anemia falciforme. Note-se que as designações de eritrócitos e Hb falciforme foram aplicadas aos materiais biológicos provenientes de doentes portadores de anemia falciforme (HbS), tratados e mantidos sob controle.

As Figuras 1A e 1B mostram, respectivamente, a oxidação da hemoglobina de indivíduos normais e portadores de anemia falciforme por diferentes concentrações de t-BOOH. O nível de oxidação da Hb A e Hb S foi similar para todas as concentrações de t-BOOH utilizadas. Na presença de 0,2 mM de t-BOOH, 50% das Hbs estavam oxidadas (cerca de 17% de metaHb e 6% de hemicromo para Hb A e 14% de metaHb e 9% de hemicromo para Hb S). Estes resultados sugerem que a substituição apresentada pela Hb S (glu-val) não produziu aumento da suscetibilidade da Hb à oxidação, embora os dados da literatura apontem a Hb S como mais suscetível aos processos oxidativos quando comparada à Hb A por

produzirem cerca de duas vezes mais ERO que as células normais (Hebbel et al, 1982 e Hebbel et al, 1988). As diferenças encontradas nos nossos estudos em relação aos relatos da literatura, poderiam ser explicadas pelo fato da solução de Hb utilizada nos nossos experimentos ser proveniente de eritrócitos de pacientes portadores de anemia falciforme que eram tratados e inclusive recebiam frequentes transfusões de sangue, apresentando assim uma certa concentração de Hb A.

Como pode ser observado nas Figuras 2A e 2B, a quercetina mostrou ação antioxidante prevenindo a oxidação da Hb significativamente com concentrações acima de 70  $\mu$ M, tanto nas células normais quanto nas falciformes. Por outro lado, as Figuras 3A e 3B mostram que a rutina foi antioxidante em concentrações superiores a 0,150 mM e pró-oxidante em concentrações inferiores, nas duas Hb estudadas. O comportamento diferente destes dois flavonóides deve-se provavelmente, às suas estruturas. A rutina difere da quercetina por possuir uma substituição da hidroxila da posição 3 do anel C por um rutinosídeo. Neste caso, a adição do rutinosídeo altera a hidrofobicidade da molécula e facilita a interação do flavonóide com a superfície hidrofílica da Hb (Ferrali et al, 1997). Contudo, esta alteração atrapalha a propriedade quelante de ferro, fator que diminui consideravelmente a atividade antioxidante deste flavonóide (Ferrali et al, 1997).

A oxidação da Hb está intimamente relacionada à sua ligação à membrana eritrocitária. Durante os processos oxidativos, o primeiro estágio de oxidação da oxiHb produz a metaHb, ocorrendo neste caso, a oxidação do ferro heme ( $\text{Fe}^2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ ). Oxidações adicionais podem desestabilizar a estrutura das globinas e converte-las em hemicromo (Winterbourn 1990). O hemicromo formado pode

precipitar-se ou ligar-se à membrana da célula, formando os corpos de Heinz. Vários estudos têm demonstrado que o hemicromo se associa fortemente com a proteína transmembrana, proteína banda 3 (Waugh et al., 1986). Esta interação pode ser responsável pela lise celular (Minetti et al., 1993)

Com base nos nossos resultados (Figs. 5A e 5B), pudemos constatar (tanto no experimento com eritrócitos normais quanto com os falciformes) que a ligação da Hb à membrana foi proporcional ao aumento da oxidação da Hb e conseqüente formação de hemicromo, conforme sugerido por Waugh et al., (1986). Portanto, a ligação de Hb à membrana induzida por t-BOOH foi dependente da concentração do oxidante (Figs. 5A e 5B). Em concentrações inferiores à 0,4 mM de oxidante, houve pouca ligação de Hb à membrana, entretanto em concentrações maiores, a ligação aumentou consideravelmente, produzindo uma curva sigmoideal indicando que a ligação da Hb à membrana celular é cooperativa. Neste mesmo experimento foi possível observar que o nível de Hb solúvel diminuiu, sugerindo que ela estava se ligando à membrana eritrocitária e precipitando. A concentração de oxiHb no sobrenadante diminuiu com o aumento da concentração do oxidante, enquanto que a concentração de metaHb e hemicromo aumentaram até 0,4 mM de t-BOOH e então diminuíram atingindo valores próximos de zero com concentração de 1 mM de t-BOOH. A uma concentração de 0,6 mM de t-BOOH, somente 3,6  $\mu$ M de hemicromo e 6,6  $\mu$ M de metaHb estavam presentes na solução (Fig. 6). Estas observações demonstraram que a maior parte da Hb tinha se oxidado e precipitado como hemicromo ligado à membrana (Cesquini et al, 2001).

A ligação de Hb à membrana foi ainda maior nos eritrócitos falciformes; Nas células falciformes a face citoplasmática da membrana apresenta maior concentração de ferro, cerca de 3 vezes (ferro livre ou ligado ao heme) do que as células normais (Browne et al., 1998), além disto, as células falciformes geram espontaneamente excessiva quantidade de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxil (Hebbel et al., 1982) que podem aumentar a ligação de Hb à membrana. Esta ligação é um evento importante para a célula, já que a formação de hemicromo e sua ligação à proteína de membrana (proteína banda 3), torna a célula alvo para os macrófagos levando a sua remoção via eritrofagocitose (Mohandas & Hebbel, 1994).

No intuito de se observar o comportamento dos flavonóides na proteção da formação de hemicromo e conseqüente ligação de Hb à membrana, experimentos foram realizados na presença de quercetina ou rutina e 0,2 mM de t-BOOH. Nestes experimentos observamos que a quercetina diminui significativamente a ligação da Hb à membrana, entretanto, a rutina não mostrou nenhum efeito antioxidante (Figs. 7A e 7B).

A quercetina além da propriedade de atravessar facilmente a membrana eritrocitária (Saija et al, 1995), pelas sua características estruturais (catechol no anel B, dupla 2,3 em conjunção com a 4 oxo no anel C, as hidroxilas adicionais nas posições 3 e 5 do anel A e hidroxila na posição 3 seguida da carbonil na posição 4 do anel C), possui ação sequestradora de radicais livres e/ou quelante de metais que contribuem para seu potencial antioxidante (Metodiewa et al, 1999), corroborando os nossos resultados.



A rutina, embora apresente as mesmas características estruturais que a quercetina no que diz respeito aos anéis A e B, não possui a hidroxila livre na posição 3 do anel C. Esta substituição é responsável pela menor hidrofobicidade da molécula e o flavonóide possui maior dificuldade em atravessar a membrana. Além disto, a adição do açúcar atrapalha sua propriedade quelante de ferro e/ ou hemina provenientes da oxidação da Hb; esta propriedade se deve a hidroxila 5 no anel A associada a carbonil 4 do anel C e hidroxilas 3 e 4 do anel B presente neste flavonóide. Entretanto, o principal requisito para uma eficiente ação quelante é a presença da hidroxila 3 junto à carbonil 4 no anel C (Paganga et al, 1997), que na rutina se encontra substituída pelo açúcar. Consequentemente, a Hb continuaria suscetível aos danos promovidos principalmente pelos íons ferro e/ou hemina.

A Hb parece ser o alvo principal dos agentes oxidante tais como os peróxidos, durante os danos oxidativos no eritrócito (Van der Zee et al, 1989). Os eventos oxidativos da membrana celular parecem ser eventos secundários causados pelos radicais produzidos pela oxidação da Hb que ocorre depois da oxidação do GSH (Van der Zee et al, 1989 e Skaper et al, 1997).

Em nossos estudos, a presença de t-BOOH em uma suspensão de eritrócitos promoveu peroxidação lipídica em células normais e células falciformes (Figuras 8A e 8B). Nestes experimentos observamos que as células falciformes são mais suscetíveis ao t-BOOH produzindo cerca de 26 % mais TBARS do que as células normais.

É conhecido que as células falciformes apresentam maior tendência aos processos peroxidativos por apresentarem elevada quantidade de ferro livre ou

ligado à estruturas da membrana (Sheng et al, 1998). Associados a este fato, a instabilidade da Hb S e a atividade diminuída de algumas enzimas antioxidantes (catalase e glutathione peroxidase) resultam na geração de grande quantidade de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Hebbel, 1992), espécies estas que, na presença de ferro, catalizam a formação de  $^*OH$  através da reação de Fenton (Hebbel et al, 1982). O  $^*OH$  sendo gerado em grande quantidade na proximidade da membrana dos eritrócitos falciformes pode levar às reações de abstração de um hidrogênio da cadeia de ácidos graxos e iniciar o processo de peroxidação lipídica (Halliwell and Gutteridge, 1989).

A peroxidação lipídica foi parcialmente inibida pela adição de quercetina tanto nas células normais quanto nas falciformes. (Figs 9A e 9B). A proteção pela quercetina foi também mais eficiente nas células falciformes diminuindo a concentração de TBARS em 56 % contra 40 % em células normais. Contudo, o efeito da rutina foi bastante discreto (Figs. 10A e 10B). A diferença observada entre o efeito da quercetina e rutina podem também ser atribuído à presença da rutinose na rutina. Este flavonóide por ser mais hidrofílico tem seu efeito sobre a membrana diminuído, resultando na pouca atividade observada. Procurando entender os mecanismos de ação da quercetina e rutina contra a oxidação da Hb e peroxidação lipídica, alguns compostos cujo mecanismo de ação já são estabelecidos foram utilizados (Figs. 4A, 4B e 11A e 11B). A tiourea, um sequestrador de  $^*OH$  que é frequentemente utilizado em experimentos *in vitro* (Halliwell, 1978) teve pequeno efeito contra a peroxidação lipídica, semelhante ao da rutina. Porém a utilização da tiourea não é muito indicada pois ela reage com ácido tiobarbitúrico usado no

método para a quantificação da peroxidação lipídica e poderia levar a conclusões errôneas (Davies and Goldberg, 1987; Jain, 1989).

O manitol, conhecido como sequestrador de  $^{\bullet}\text{OH}$ , também não mostrou efeito na oxidação da Hb e peroxidação lipídica, sugerindo que este radical não participa diretamente nos eventos oxidativos do eritrócito. Entretanto, é difícil interpretar este resultado negativo uma vez que a inibição de reações de certas espécies de vida curta é difícil, mesmo quando os antioxidantes aquosos penetram nas membranas celulares (Dorfman & Adams, 1973). Difenilamina, cujo efeito é atribuído ao papel sequestrador de radical alcóxil (Thornalley et al, 1983) inibiu a peroxidação lipídica, corroborando os dados de Van der Zee et al,(1989). A difenilamina, por outro lado, mostrou uma ação pró-oxidante sobre a Hb, sendo maior na Hb falciforme do que na Hb normal. Esta ação pró-oxidante deve-se, talvez, à formação do radical difenilamina gerado pela reação entre a difenilamina e t-BOOH (Van der Zee et al, 1989).

A desferoxamina, um importante quelante de ferro (Halliwell and Gutteridge, 1989) mostrou efeito considerável na proteção das células contra a oxidação da Hb e peroxidação lipídica, sugerindo o envolvimento deste metal de transição sobre o processo oxidativo da Hb e membrana. O ferro é bastante tóxico pois catalisa a formação de radicais, que podem interagir com as membranas e constituintes citoplasmáticos.

A glutathione e os grupos tióis de proteína desempenham papéis multiprotetores, tais como detoxificação dos EROs, metais pesados, xenobióticos e estabilizam a estrutura das proteínas através da formação das pontes dissulfeto

(Schoneich, 1995). A adição de GSH no meio da reação, protegeu a Hb e os lipídios da membrana dos eritrócitos contra a oxidação induzida pelo t-BOOH (Figs. 10A e 10B e 11A e 11B). Sendo capaz de ligar-se ao ferro (Stern, 1985), a GSH pode desempenhar a sua ação antioxidante por esta via ou pela sua capacidade de doar íons hidrogênio ou metabolizar o t-BOOH através da atividade da glutathione peroxidase. A GSH pode também evitar as interações dos metabólitos reativos com a Hb e tais interações podem representar importantes mecanismos de liberação do ferro (Ferrari et al., 1992). Surpreendentemente, a GSH não protegeu os eritrócitos falciformes contra a lipoperoxidação. Ao contrário, ela agiu como pró-oxidante, aumentando a concentração do TBARS. Este efeito deve-se, possivelmente, à baixa concentração do reagente no meio da reação, uma vez que a GSH pode ser oxidada pelos radicais livres (cuja produção é exacerbada nas células falciformes) formando espécie com alto potencial oxidante, o GSSG. Além disto, a conversão de GSSG para sua forma reduzida é prejudicada, uma vez que a atividade da glutathione redutase se encontra diminuída nestas células (Hebbel, 1992).

Comparando-se o efeito de cada um desses antioxidantes com o da quercetina e rutina e conhecendo-se o mecanismo de ação destes antioxidantes, pudemos sugerir as vias de atuação dos flavonóides estudados.

A quercetina, um dos compostos que apresentou maior efeito antioxidante, possui um caráter hidrofóbico que permite sua interação eficiente com os constituintes de membrana possibilitando assim seu acesso à Hb. Uma vez em contato com a Hb, a quercetina poderia atuar como sequestradora de ERO e/ou quelante de ferro, visto que a sua estrutura favorece estas funções (Ferrali et al.,

1997). A ação antioxidante é ainda mais importante para as células falciformes pois a concentração de ferro livre e de ERO é maior que em células normais (Hebbel, 1992), eventos estes que associados poderiam aumentar a peroxidação dos lipídios da membrana e oxidação da Hb.

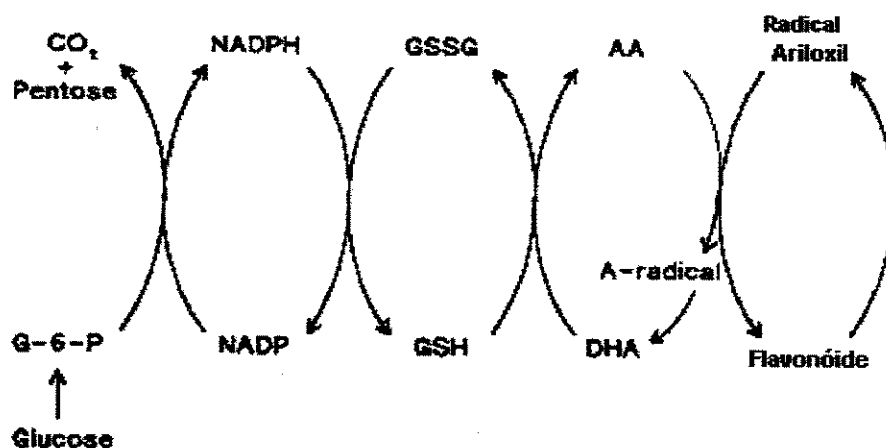
A característica hidrofílica conferida pelo rutinosídeo na posição 3 do anel C da rutina atrapalha a interação deste flavonóide com os lipídios da membrana eritrocitária, e portanto dificulta sua interação com a Hb (Saija et al., 1995), e consequentemente diminui o efeito antioxidante deste flavonóide.

O ácido ascórbico (AA) e a glutathione são as mais notáveis substâncias redutoras ativas presentes nos tecidos vivos (Winkler et al, 1994). Em nossos experimentos o ácido ascórbico mostrou-se como eficiente protetor da Hb (Figuras 4A e 4B) e dos lipídios da membrana contra a oxidação (Figuras 11A e 11B). A combinação do ácido ascórbico com os flavonóides aumentou o efeito protetor tanto do AA quanto dos flavonóides. A atividade cooperativa ou sinérgica entre a quercetina ou rutina e AA pode resultar da redução do flavonóide oxidado (quinona) ou do radical ariloxil pelo AA e regeneração do flavonóide intacto (Skaper et al., 1997). Tem sido reportado que a quercetina pode cooperar com o ascorbato para proteger as células vermelhas do sangue contra a lise induzida pela fotoreação na presença de hematoporfirina (Sorata et al, 1984, 1988).

A rutina que apresentou efeito pró-oxidante na oxidação da Hb, reverteu esse efeito na presença de ácido ascórbico, cuja combinação teve ação antioxidante (Figuras 4A e 4B).

Baseado nos conhecimentos descritos, podemos sugerir a seguinte sequência de reações de oxi-redução acopladas que levariam ao efeito antioxidante da atividade combinada do flavonóide e AA, nos eritrócitos.

Esquema 4: Reações celulares de oxi-redução. Netas reações cíclicas são observadas, a glutathiona (GSH), o ácido ascórbico (AA) e o flavonóide. As formas oxidadas destes compostos são, glutathiona oxidada (GSSG), ácido dehidroascórbico (DHA) e radical ariloxil. A redução do GSSG requer NADPH como cofator, o qual é produzido pelo metabolismo celular da glicose.



No eritrócito, o flavonóide seria oxidado pelos radicais livres, peróxido de hidrogênio e/ou íons ferro provenientes da oxidação da Hb, produzindo radical ariloxil ou a quinona (Metodiewa et al, 1999) do flavonóide. Estes últimos seriam reduzidos regenerando o flavonóide, às custas do potencial redutor do AA que se oxidaria a DHA. A regeneração a AA seria mediado pela GSH (Meister, 1992) que promoveria um aumento da concentração de GSSG o qual pode ser revertido à

GSH por uma reação catalizada pela glutathione redutase na presença de NADPH proveniente da via das pentoses. Winkler et al., (1994) reportaram a importância da GSH na redução do DHA a AA e o papel da via das pentoses na manutenção deste ciclo. Desta forma, o NADPH parece desempenhar um papel crucial na regeneração do AA. O AA regenerado poderia, participar novamente da redução das formas oxidadas dos flavonóides (radical ariloxil ou a quinona do flavonóide), recuperando o efeito destes compostos e reiniciando o ciclo redox.

Além da oxidação da Hb e dos lipídios da membrana, os processos oxidativos podem causar danos na estrutura da proteína. Estes danos têm sido relacionados a inativação oxidativa de enzimas chaves do metabolismo associadas com envelhecimento e condições patológicas como doenças inflamatórias, aterosclerose, distúrbios neurológicos e carcinogênese (Sies, 1995). A interação das EROs com as proteínas resulta em fragmentação da cadeia polipeptídica, formação de ligação proteína-proteína e modificação de resíduos de aminoácidos, particularmente arginina, lisina e prolina, e podem produzir grupos carbonil (Fagan et al., 1999), os quais podem ser quantificados pela reação com 2,4-dinitrophenilhidrazina (Halliwell & Gutteridge, 1999). Assim, a quantificação destes grupos é um indicativo importante da geração de espécies radiculares e de seus possíveis danos sobre estrutura proteica. Neste sentido, os danos que as ERO poderiam promover na solução da Hb e nos eritrócitos de indivíduos normais e portadores de anemia falciforme foram determinadas através da quantificação dos grupos carbonil nestes sistemas expostos a situações de stress oxidativo. A quantidade de grupos carbonil encontrada na Hb e eritrócitos falciformes foi maior do que a da Hb e eritrócitos

normais. Estes resultados sugerem que o eritrócito de indivíduos falciformes está sujeito a um nível basal de exposição a ERO maior do que de indivíduos normais, indicando mais uma vez a maior geração de espécies radicalares e menor atividade de enzimas antioxidantes nesta patologia (Hebbel et al, 1988, Hebbel, 1991) (Figuras 12A e 12B).

A adição de t-BOOH nas soluções de Hb A e S e nos eritrócitos normais e falciformes aumentou consideravelmente a quantidade de grupos carbonil formada, sugerindo a participação deste composto na oxidação das cadeias laterais das proteína (Figuras 13A e 13B). O t-BOOH é conhecido por participar de reações de oxidação de proteínas e lipídios de membrana (Trotta et al, 1983) e estas reações levam a geração de radicais alcóxil e peróxil (Van de Zee et al, 1989); radicais estes que poderiam estar envolvidos na oxidação dos aminoácidos. O radical alcóxil pode abstrair um átomo de hidrogênio dos resíduos de aminoácidos formando o radical centrado no carbono (Berlett & Stadtman, 1997), o qual reage rapidamente com  $O_2$  dando origem ao radical peróxil, que pode originar o grupo carbonil diretamente ou reagir com um doador de hidrogênio e transformar-se em um hidroperóxido lipídico que pode se decompor e formar grupos carbonil (Fu et al, 1998). A formação de grupos carbonil após adição de t-BOOH é ainda maior na Hb S e nos eritrócitos falciformes. Este fato se deve a maior quantidade de ERO e de ferro livre ou ligado as estruturas da membrana (Sheng et al, 1998) que através de reação com t-BOOH levaria a formação de maior quantidade de alcóxil e conseqüentemente, de carbonil.



Em relação aos antioxidantes utilizados, o ácido ascórbico e os flavonóides não protegeram contra a formação destes grupos, conforme mostram as Figuras 12A, 12B, 13A e 13B

## 6) **CONCLUSÕES**

- Não foram observadas diferenças entre o nível de oxidação da Hb A e Hb S induzida por t-BOOH, tanto na ausência quanto na presença dos flavonóides.
- A quercetina comportou-se como antioxidante em todas as concentrações utilizadas, ao passo que a rutina mostrou-se pró oxidante em concentrações inferiores a 150  $\mu$ M.
- A utilização conjunta de ácido ascórbico ou GSH com quercetina potencializou sua atividade antioxidante e quando usados na presença de rutina, transformou sua atividade pró-oxidante em antioxidante, inclusive em concentrações inferiores a 150  $\mu$ M.
- A ligação de Hb à membrana eritrocitária foi maior em células falciformes quando comparada às células normais, este fato foi observado tanto na ausência quanto na presença de t-BOOH e dos flavonóides.
- A quercetina protegeu sensivelmente a ligação da Hb à membrana, entretanto a rutina não mostrou qualquer efeito.
- A peroxidação lipídica da membrana dos eritrócitos falciformes induzida por t-BOOH foi maior do que a encontrada em membrana de eritrócitos normais. Este resultado se repetiu na presença dos flavonóides.
- Tanto a quercetina quanto a rutina diminuíram a formação de TBARS, apresentando a quercetina um efeito antioxidante maior quando comparado ao da rutina.

- A quantidade de grupos carbonil determinada na solução de Hb S e nos eritrócitos falciformes foi maior do que a encontrada na Hb A e nas células normais em todas as condições estudadas.
- Nenhum antioxidante utilizado mostrou diminuição da formação de grupos carbonil nestes ensaios.
- Com base nestes resultados, podemos concluir que os flavonóides tiveram maior efeito protetor nos processos oxidativos do sangue de indivíduos portadores de anemia falciforme do que de indivíduos normais, podendo assim, sugerir a flavonóide - terapia a fim de minimizar os danos sofridos por estes indivíduos e portanto, melhorar suas qualidades de vida.

## 7) Referências Bibliográficas

Adachi, K. & Asakura, T. Sick cell hemoglobin instability. In **Embury, S. H.; Heibel, R. P.; Mohandas, N. & Steinberg, M. H. (eds): Sick Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice**. New York, NY, Raven, 1994, p 99.

Afanas'ev, I. B.; Dorozhko, A. I.; Brodskii, A. V.; Kostyuk, V. A. & Potapovitch, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, 38, p. 1763-1769, 1989

Afanas'ev, I. B.; Ostrachovich, E. A.; Abramova, N. E. & Korkina, L. G. Different antioxidant activities of bioflavonoid rutin in normal and iron-overloading rats. **Biochem. Pharmacol.**, 50, p. 627-637, 1995.

Allison, A. C. Polymorphism and natural selection in human populations. **Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology**, 29, p.137-149, 1964.

Asakura, T.; Oshnishi, T.; Friedman, S. & Schwartz, E. Abnormal precipitation of oxyhemoglobin S by mechanical shaking. **Proc. Nat. Acad. Science (USA)**, 71, p. 1594-1598, 1974.

Aslan, M.; Thornley, D. & Freeman, B. A. Reactive species in sickle cell disease. **Am. NY Acad. Sci.**, 899, p. 375-391, 2000.

Beretz, A. & Cazenave, J. P. Plant flavonoids in biology and medicine II. In **Progress in Clinical and Biological Research**. Cody, V.; Middleton, E. & Harbone, J.B (Eds), 1988. p. 187-200.

Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. Protein oxidation in aging disease, and oxidation stress. **The Journal of Biol. Chem.**, 272(33), p. 20313-20316, 1997.

Bracke, M. E.; De Pestel, G.; Castronovo, V.; Vyncke, B.; Foidart, J. M.; Vakaet L. C. A. & Marcel, M. M. Plant flavonoids in biology and medicine II. Progress in Clinical and Biological Research. In **Cody, V.; Middleton, E. & Liss, J.B.**, New York, 1988. p. 498-512.

Brown R. F. & Kelly, F. J. Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. **Pediatr Res.**, 36(4), p. 487-93, 1994.

Browne, P.; Shalev, O & Hebbel, R. P. The molecular pathobiology of cell membrane iron: The sickle red cell as a model. **Free Rad. Biol. Med.**, 24(6), p. 1040-1048, 1998.

Brugnara, C.; Bunn, H.F. & Tosteson, D. C. Regulation of erythrocyte cation and water content in sickle cell anemia. **Science**, 232, p. 388, 1986.

Cadenas, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann. Rev. Biochem.**, 58, p. 79-110, 1989.

Cao, G.; Sofic, E. & Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure -activity relationships. **Free Rad. Biol. Med.**, 22(5), p. 749-760, 1997.

Capasso, A.; Pinto, A.; Sorrentino, R. & Capasso, J. Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contractions of guinea pig isolated ileum. **J. Ethnopharmacology**, 34, p. 279-281, 1991.

Carrel, W. R.; Winterbourn, C. C. & Rachmilewitz, E. A. Activated oxygen and haemolysis. **Br. J. Haematol.**, 30, p. 259-264, 1975.

Cesquini, M.; Tenor, A.C.; Torsoni, M.A.; Stoppa, G.R.; Pereira, A.L. & Ogo, S.H. Quercetin Diminishes the binding of hemoglobin to the red blood cell membrane. **J. Anti-Aging Med.**, 4(1), p. 57-65, 2001.

Charache, S.; Terrin, M. L.; Moore, R. D.; Dover, G.J.; Barton, F. B.; Eckert, S. V.; McMahon, R. P. & Bonds, D. R. Effect of hidroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **New Eng. J. Med.**, 332, p. 1317-1322, 1995.

Chiu, D.; Vichinsky E.; Yee, M.; Kleman, K. & Lubin, B. Peroxidation, vitamin E, and sickle-cell anemia. **Ann. N Y Acad. Sci.**, 393, p. 323-35, 1982.

Chiu, D.; Vinchinsky, E.; Ho, S. L.; Liu, T. & Lubin, B. H. Vitamin C deficiency in patients with sickle cell anemia. **American Journal Ped. Haematol. Oncol.**, 12, p. 262-267, 1990.

Chiu, D. T.; Van der Berg, J.; Kuypers, F. A.; Hung, I. J.; Wei, J. S. & Liu, T. Z. Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of heme release. **Free Rad. Biol. Med.**, 21, p. 89-95, 1996.

Chu, S. S.; Hsieh, Y. S. & Lin, J. Y. Inhibitory effect of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. **J. Nat. Prod.**, 55, p. 179-183, 1992.

Clarke, R.; Daly, L.; Robinson, K.; Naughten, E.; Cahalane, S.; Fowler, B. & Graham, I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. **N. Engl. J. Med.**, 324, p. 1149-1155, 1991.

Clemens, M. R. & Waller, H. D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chem. Phys. Lip.**, 45, p. 251-268, 1987.

Cody, V.; Middleton, E. & Harborne, J. B. Plant flavonoids in biology and medicine. Biochemical, Pharmacological and Structural-Activity Relationship. New York , Liss. Inc, 1986. p. 211-222.

Croft, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Ann. NY. Acad. Sci.**, 854, p. 435-442, 1998.

Davies, K. J. A. & Goldberg, A. L. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, 262, p. 8220-8226, 1987.

Dean, R. T.; Shanlin, F.; Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.**, 324, p. 1-18, 1997.

Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A. & Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences.**, 65(4), p. 337-353, 1999.

Dorfman, L. & Adams, M. Reactivity of the hydroxyl radicals in aqueous solutions. **National Stand. Ref. Service, National Bureau of Standards.**, 46, p. 565-578, 1973.

Eaton-Evan, J. The properties of flavonoids. **Br. J. Biomed. Sci.**, 51, p. 458-370, 1994.

Embury, S. H. The clinical pathophysiology of sickle cell disease. **Ann Reviews in Medicine.**, 37, p. 361-376, 1986.

Enwonwu, C. O & Turner, E. Nitrogen metabolism in sickle cell anemia: free amino acids in plasma and urine. **Am. J. Med, Sci.**, 300, p. 366-371, 1990.

Essien, E. U. Plasma levels of retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol in sickle cell anaemia. **Central African J. Med.**, 41, p. 48-50, 1995.

Fagan, J. M.; Slecicka, B. G. & Sohar, I. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. **The inter. J. Biochem. Cell Biol.**, 31, p. 751-757, 1999.

Ferrali, M.; Signorini, C.; Caciotti, B.; Sugherini, L.; Ciccoli, L., Giachetti, D. & Comporti, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **Febs Lett.**, 416, p. 123-129, 1997.

Ferrari, R.; Ceconi, C.; Curello, S.; Cargnoni, A.; De Giuli, F. & Visioli, ° Occurrence of oxidative stress during myocardial reperfusion. **Mol. Cell. Biochem.**, 111(1-2), p. 61-69, 1992.

Formica, J. V. & Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chem. Toxicol.**, 33 (12), p. 1061-108, 1995.

Forstermann, U.; Alheid, U.; Frolich, J. C. & Mulsch, A. Mechanisms of action of lipoxygenase and cytochrome P-450-mono-oxygenase inhibitors in blocking endothelium-dependent vasodilatation. **Br. J. Pharmacol.**, 93, p. 569-578, 1988.

Freeman, B. A. & Crapo, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, 47, p. 412-425, 1982.

Fridovich, I. Superoxide dismutase. **Annu. Ver. Biochem.**, 44, p. 174-157, 1975.

Fu, S.; Davies, M. J. & Dean, R. T. Molecular aspects of free radical damage to proteins. In **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, 1998. 3 ed, p. 30-55.



Grinberg, L. N.; Rachmilewitz, E. A. & Newman, H. Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. **Biochem. Pharmacol.**, 48, p. 643-649, 1994.

Gugliana, D.; Marfella, R.; Verrazzo, G.; Acampora, R.; Coppola, L.; Cozzolin, D. & D'Onofrio, F. The vascular effects of L-arginine in humans. **J. Clin. Invest.**, 99, p. 433-438, 1997.

Halliwell, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates – is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems. **FEBS Lett.**, 92, p. 321-328, 1978.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. Iron toxicity and oxygen radicals. **Baillieres Clin Haematol.**, 2(2), p. 195-256, 1989.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Detection of free radicals and other reactive species. In **Free radicals in biology and Medicine**, , Oxford University Press, 1999. 3ed, p. 245-265.

Havsteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, 32, p. 1141-1148, 1983.

Hebbel, R. P.; Eaton, J. W.; Balasingam, M. & Steinberg, M. H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **J. Clin. Invest.**, 70, p. 1253-1259, 1982.

Hebbel, R. P.; Morgan, W. T.; Eaton, J. W. & Heldlund, B. E. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proc. Nat. Acad. Science (USA)**, 85, p. 237-241, 1988.

Hebbel, R. P. & Eaton, J. W. Pathobiology of heme interaction with the erythrocyte membrane. **Seminars in Hematology**, 26, p. 136-149, 1989.

Hebbel, R. P. Beyond hemoglobin polymerization: The red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. **Blood**, 77, p. 214-217, 1991.

Hebbel, R. P. Endothelial adhesivity of sickle red blood cells. **J. Lab. Clin. Med.**, 120(4), p. 503-4, 1992.

Hertog, M. G. L.; Sweetman, P. M.; Fehily, A. M.; Elwood, P. C. & Kromhout. D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in Welsh population of men: the Caerphilly study. **Am. J. Clin. Nutr.**, 65, p. 1489-1494, 1997.

Hollman, P. C. & Katan, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed. Pharmacother.**, 51, p. 305-310, 1997.

Houston, P. E.; Rana, S.; Sekhasaria, S.; Perli, E.; Kim, K.S. & Castro, O L. Homocysteine in sickle cell disease: Relation stroke. **Am. J. Med.**, 103, p. 192-196, 1997.

Hu, J. P.; Calomme, M.; Lasure, A.; De Bruyne, T.; Pieters, L.; Vlietinck, A. & Vanden Berghe, D. A. Structure-activity relationships of flavonoids with superoxide scavenging ability. **Biol. Trace. Elem. Res.**, 47, p. 327-331, 1995.

Jain, S. K. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. **J. Biol. Chem.**, 264, p. 21340-21345, 1989.

Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Tosic, M.; Marjanovic, B. & Simic, M. G. Flavonoids as antioxidant. **J. Am. Chem. Soc.**, 116, p. 4846-4853, 1994.

Kaul, D. K.; Fabry, M. E. & Nagel, R. L. Erythrocytes and vascular factors influencing the the microcirculatory behavior of blood in sickle cell anemia. **Ann. NY Acad. Science.**, 565, p. 316-326, 1989.

Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K. & Yano, M. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines. **Biosc. Biotech. Biochem.**, 63 (5), p. 896-899, 1999.

Korkina, L. G. & Afanas'ev, I. B. Antioxidant and Chelating Properties of Flavonoids. **Advances in Pharmacol.**, 18, p. 151-163, 1997.

Kurros, S. A. & Hebbel, R. P. Nonheme iron in sickle erythrocyte membranes: Association with phospholipids and potencial role in lipid peroxidation. **Blood**, 72, p. 1278-1284, 1988.

Maridonneau-Parini, I.; Braquet, P. & Garay, R. P. Heterogenous effect of flavonoids on  $K^+$  loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radicals in human red blood cells. **Pharm. Res. Commun.**, 18, p. 61-73, 1986.

Meister, A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. **Biochem. Pharmacol.**, 44(10), p. 1905-1915, 1992.

Metodiowa, D.; Jaiswal, A. K.; Cenas, N.; Dickançaitė, E. & Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. **Free Rad. Biol. Med.**, 26, p. 107-116, 1999.

Minetti, M.; Mallozi, C.; Scorza, G.; Scott, M. D.; Kuypers, F. A. & Lubin, B. H. Role of oxygen and carbon radicals in hemoglobin oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, 302(1), p. 233-44, 1993.

Moncada, S.; Palmer, R. M. J. & Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Ver.**, 43, p. 109-142, 1991.

Mohandas, N. & Hebbel, R. P. Pathogenesis of hemolytic anemia in Embury, S. H.; Hebbel, R. P.; Mohandas, N. & Steinberg, M.H. (eds): **Sickle Cell**

**Disease: Basic principles and clinical practice.** New York, Raven Press, 1994, p 327.

Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P. & Cillard, J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem. Pharmacol.**, 45, p. 13-19, 1993.

Muskiet, F. A.; Muskiet, F. D.; Meiborg, G. & Schermer, J. B. Supplementation of patients with homozygous sickle cell disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, 54, p. 736-744, 1991.

Nagao A.; Seki, M. & Kobayashi, H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, 63 (10), p. 1787-1790, 1999.

Natta, C. & Machlin, L. A decrease in irreversibly sickled erythrocytes in sickle cell anemia patients given vitamin E. **Am. J. Clin. Nutr.**, 33, p. 968-971, 1980.

Noguchi, C. T.; Rodgers, G. P. & Schechter, A. N. Intracellular polymerization: Disease severity and therapeutic predictions. **Ann. NY Acad. Science.**, 565, p. 75-81, 1989.

Paganga, G.; Al-Hashim, H.; Khodr, H.; Scott, B.C; Aruoma, O. I.; Hider, R. C.; Halliwell, B. & Rice-Evans, C. A. Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. **Redox. Report.**, 2, p. 359-364, 1997.

Peterson, J. & Drwyer, J. Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. **J. Am. Diet. Assoc.** 8(6), p. 677-682, 1998.

Rice-Evans, C.; Baysan, E.; Pashby, D. P. & Hochstein, P. t-butyl hydroperoxide-induced perturbations of human erythrocytes as a model for oxidant stress. **Biochem. Biophys. Acta.**, 815, p. 426-432, 1985.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. & Papanga, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, 20, p. 933-956, 1996.

Saija, A.; Scalese, M.; Lanza, M.; Marzullo, D.; Bonina, F. & Castelli, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Rad. Biol. Med.**, 19, p. 481-486, 1995.

Shaeffer, K.; Lofton, J. A.; Powell, S.C.; Osbourne, H. H. & Foster, L.H. Occurrence of copper in sickling erythrocytes. **Procc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 128, p. 734-737, 1968.

Shaeffer, J. R. Evidence for a difference in affinities of human hemoglobin beta A and beta S chains for alpha chains. **J Biol Chem.**, 255(6), p. 2322-2324, 1980.

Schuessler, H. & Schilling, K. Oxygen effect in the radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. **Int. J. Radiat. Biol.**, 45, p. 267-281, 1984.

Shalev, O & Hebbel, R. P. Extremely high avidity association of Fe (III) with the sickle red cell membrane. **Blood**, 88(1), p. 349-352, 1996.

Sheng, K.; Shariff, M. & Hebbel, R. P. Comparative Oxidation of Hemoglobins A and S. **Blood**, 91 (9), p. 3467-3470, 1998.

Schoneich, C. Kinetics of thiol reactions. **Methods Enzymol.**, 251, p. 45-55, 1995.

Sies, M. H.; Lecler, J.; Canivenc-Lavier, M. C.; Rat, P. & Suschetet, M. Heterogenous effects of natural flavonoids on monoxygenase activities in human rat liver microsomes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 130, p. 73-78, 1995.

Skaper, S. D.; Fabris, M.; Ferrari, V.; Carbone, M. D. & Leon, A. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. **Free Rad. Biol. Med.**, 22, p. 669-678, 1997.

Skibola, C. F. & Smith, M. T. Potential health impact of excess flavonoid intake. **Free Rad. Biol. Med.**, 29, p. 375-384, 2000.

Sorata, Y.; Takahama, U. & Kimura, M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. **Biochem. Biophys. Acta.**, 799, p. 313-317, 1984.

Sorata Y, Takahama U, Kimura M. Cooperation of quercetin with ascorbate in the protection of photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. **Photochem Photobiol.** 48(2), p. 195-9, 1988.

Stern, A. Red cell oxidative damage. In **Oxidative Stress**. Sies, H., Ed.; Academic Press, 1985. p. 331-349.

Stocks, J. & Dormandy, T. L. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. **Br. J. Haematol.**, 20, p. 95-111, 1971.

Sugihara, T. & Hebbel, R. P. Detection, characterization and bioavailability of membrane-associated iron in the intact sickle red cell. **J. Clin. Invest.**, 90, p. 2327-2342, 1992.

Tatum, V. L. & Chow, C. K. Status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. **Free Rad. Res.**, 25, p. 133-139, 1996.

Thompson, M.; Williams, C. R. & Elliot, G. E. Stability of flavonoid complexes of cooper (II) and flavonoid antioxidant activity. **Anal. Clin. Acta.**, 85(2), p. 375-381, 1976.

Thornalley, R. J.; Trotta, R. J. & Stern, A. Free radical involvement in the oxidative phenomena induced by tert-butyl hydroperoxide in erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta.**, 759, p. 16-22, 1983.

Torel, J.; Cillard, J. & Cillard, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, 25, p. 383-387, 1986.

Torsoni, M. A.; Viana, R. I.; Barros, B. F.; Stoppa, G. R.; Cesquini, M. & Ogo, S. H. Effect of thiol reagents on functional properties and heme oxidation of hemoglobin from *G. carbonaria*. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, 40, p. 355-364, 1996.

Trotta, R. J.; Sullivan, S. G. & Stern, A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. Effects of the hexose monophosphate shunt by glutathione and ascorbate. **Biochem. J.**, 204, p. 405-415, 1982.

Trotta, R. J.; Sullivan, S. G. & Stern, A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. The relative roles of heme-dependent and glutathione-dependent decomposition of tert-butyl hydroperoxide and membrane lipid hydroperoxides in lipid-peroxidation and hemolysis. **Biochem. J.**, 212, p. 759-772, 1983.

Van Acker, S.A.; Tromp, M. N.; Haenen, G. R.; Vab der Viggh, W. J. & Best, A. Flavonoids as scavenger of nitric oxide radical. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 214(3), p. 755-759, 1995.

Van Den Berg, J. M.; Den Kamp, J. F.; Lubin, B. H.; Roelofsen, B. & Kuypers A. Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells. **Free Rad. Biol. Med.**, 12, p. 487-498, 1992.

Van der Zee, J.; Van Steveninck, J.; Koster, J. F. & Dubbelman, T. M. A. R. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals. **Biochim. Biophys. Acta.**, 980, p. 175-180, 1989.

Waugh, S. M.; Willardson, B. M.; Kannan, R.; Labotka, R. J. Low, P. S. Heinz bodies induce clustering of band 3, glycophorin, and ankyrin in sickle cell erythrocytes. **J. Clin. Invest.**, 78, p. 1155-1160, 1986.

Wever, S. M.; Oudega, B. & van Gelder, B. F. Generation of superoxide radicals during the autoxidation of mammalian oxyhemoglobin. **Biochim. Biophys. Acta.** 302, p. 475-478, 1973.

Winterbourn, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Methods Enzymol.**, 186, p. 265-272, 1990.

Winkler, B. S.; Orselli, S. M. & Rex, T. S. The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. **Free Rad. Biol. Med.**, 17(4), p. 333-349, 1994.

Wu, J. X.; Yu, E. R. & Wang, B. Y. Experimental study on cellular electrophysiology of *Viscum coloratum* flavonoid in treating tachyarrhythmias. **Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.**, 14(7), p. 421-423, 1996.

Zaat, S. A.; Wijffelman, C. A.; Spaink, H. P.; Van Brussel, A. A.; Okker, R. J. & Lugtenberg, B. J. G. Flavonoids induce *Rhizobium leguminosarum* to produce nodDABC gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. **J. Bacteriol.**, 169, p. 198-204, 1987.



Zavodnik, L. B.; Zavodnik, I. B.; Niekurzak, A.; Szosland, K. & Bryszewska, M. Activation of red blood cell glutathione peroxidase and morphological transformation of erythrocytes under the action of tert-butyl hydroperoxide. **Bioch. Mol. Bio. Intern.**, 44(3), p. 577-588, 1998.

## ANEXO I

### COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS

1. CESQUINI, M.; TORSONI, M. & OGO, S.H. **Quercetin may act as antioxidant and prooxidant.** XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambu (MG) de 19 a 22 de maio de 2001.
2. CESQUINI, M.; TENOR, A. C.; TORSONI, M. & OGO, S.H. **Effect of flavonoids on oxidative stress of sickle cell: Binding of Hb to membrane, lipid peroxidation and oxidation.** XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambu (MG) de 27 a 30 de maio de 2000.
3. CESQUINI, M.; STOPPA, G. R.; TENOR, A. C.; TORSONI, M. & OGO, S.H. **Quercetin diminishes the human Hb oxidation induced by t-BOOH and its binding to RBC membrane.** XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambu (MG) de 27 a 30 de maio de 2000.
4. CESQUINI, M.; TORSONI, M. A. PEREIRA, A.L. & OGO, S.H. **Effect of flavonoids on Hb oxidation and lipid peroxidation of sickle cells.** XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambu (MG) de 22 a 25 de maio de 1999.
5. TENOR, A. C.; CESQUINI, M.; TORSONI, M. A. PEREIRA, A.L. & OGO, S.H. **Quercetin can diminish the binding of oxidized Hb to human RBC membrane.** XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambu (MG) de 22 a 25 de maio de 1999.
6. CESQUINI, M.; TORSONI, M. A. PEREIRA, A.L. & OGO, S.H. **Effect of flavonoids on Hb oxidation of sickle erythrocytes.** XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambu (MG) de 23 a 26 de maio de 1998.
7. BARROS, B.F.; CESQUINI, M.; PEREIRA, A.L.; TORSONI, M.A. & OGO, S.H. **Antioxidant properties of flavonoid morin against oxidative damage.** XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), realizada em Caxambu (MG) de 03 a 06 de maio de 1997.

## **ANEXO II – TRABALHOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO**

## Quercetin Diminishes the Binding of Hemoglobin to the Red Blood Cell Membrane

M. CESQUINI,<sup>1</sup> A.C. TENOR,<sup>1</sup> M.A. TORSONI,<sup>2</sup> G.R. STOPPA,<sup>1</sup> A.L. PEREIRA,<sup>1</sup>  
and S.H. OGO<sup>1</sup>

### ABSTRACT

Hemoglobin (Hb) oxidation leads to the formation of hemichrome, which binds to the membrane and causes red blood cell removal by the reticuloendothelial system. In the present investigation, the effect of flavonoids on Hb oxidation and their binding to red blood cell (RBC) membranes were studied using *tert*-butyl hydroperoxide (*tert*-BOOH) to promote oxidative stress. The intrinsic antioxidant activity of RBC was able to prevent the binding of Hb to the membrane at *tert*-BOOH concentrations up to 0.4 mM. At higher concentrations, a brown pellet was observed and represented the appearance of membrane-bound oxidized Hb. Oxidations performed in membrane-free Hb solutions with an identical oxidative system showed less Hb oxidation. These observations suggest that erythrocyte membrane lipid peroxidation enhances the oxidative damage of Hb, increasing its binding to membranes. Quercetin partially protected Hb against oxidation by *tert*-BOOH and reduced the levels of the membrane bound hemichrome. Lipid peroxidation was also significantly suppressed by quercetin. Rutin and morin had little effect in preventing Hb binding to RBC membranes, indicating the importance of structure in the antioxidant properties of flavonoids. In the absence of oxidant, the peroxidation of erythrocyte membrane and isotonic hemolysis were protected by quercetin. These results suggest that quercetin displays a beneficial role on aging of RBC.

### INTRODUCTION

THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL characteristics of the erythrocyte membrane are maintained by the binding of spectrin to a second cytoskeletal protein, ankyrin, which in turn interacts with the cytosolic pole of band 3.<sup>1-4</sup> The cytoplasmic domain of band 3 has a high-affinity binding site for Hb, especially for hemichrome.<sup>5-7</sup> The destruction of senescent RBC involves Hb denaturation and the subsequent formation of hemichrome. The latter binds to a high affinity binding site on band 3

dimers, which then aggregate to form the senescence antigen on the cell surface. The binding of IgG to this antigen serves as the signal for RBC removal by the reticuloendothelial system.<sup>8</sup> The cross-linking of band 3 by hemichrome can also account for the enhanced fragility of the membrane leading to isotonic hemolysis *in vivo*.<sup>7</sup> Since the lipid component has little or no capacity to influence cell rigidity, the nondeformability must be caused, at least in part, by a less flexible protein reticulum supporting the lipid bilayer. Thus, the precipitation of Hb rather than lipid peroxidation

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Braz Cubas, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

is believed to be the major cause of cell fragility which accompanies Heinz body formation.<sup>9</sup>

The complexation of Hb with the membrane, a natural phenomenon of cell aging, is positively correlated with increasing cell density and decreasing cell deformability,<sup>10,11</sup> and occurs most frequently in red blood cells (RBCs) carrying genetically unstable Hbs.

The binding of Hb to the RBC membrane can be studied by inducing Hb oxidation with phenylhydrazine and its derivatives,<sup>9,12,13</sup> *tert*-butyl hydroperoxide (*tert*-BOOH)<sup>14,15</sup> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>10</sup> Since metHb does not highly bind to the RBC membrane,<sup>7</sup> compounds that prevent the formation of hemichrome may prevent damage to the RBC membrane. In this report, we examined the antioxidant effect of flavonoids on Hb and membrane lipids. Flavonoids are phenolic compounds found in many vegetables. They are ingested by humans and animals from their natural diet in various amounts. Flavonoids exert multiple biological effects, preventing a wide variety of diseases, such as inflammation, atherosclerosis, certain forms of cancer, and even aging, which may result, at least in part, from their antioxidant activity.<sup>16–20</sup> These compounds may delay oxidant injury and cell death by scavenging free radicals, protecting against lipid peroxidation, and chelating metal ions, thereby terminating the free radical chain reaction.<sup>21–27</sup> Among flavonoids, quercetin is the major representative of the flavonol subclass. *In vitro*, quercetin is a strong antioxidant with alkoxyl and peroxy radical scavenging activity.<sup>26–29</sup>

The main objectives of the current study were to investigate the influence of oxidized Hb on Heinz body formation and to assess the ability of flavonoids (quercetin, rutin, and morin) to prevent the binding of Hb to human RBC membranes. The relationship between the effect of flavonoids on Hb oxidation, the lipid peroxidation of membranes, and the binding of hemichrome to the RBC membrane is discussed.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Rutin, morin, quercetin, *tert*-butyl hydroperoxide (*tert*-BOOH), and dimethyl sulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

### Preparation of Hb

Blood samples provided by the university hospital (Hospital das Clinicas) blood bank were collected into EDTA-treated tubes. Plasma, platelets, and the buffy coat were removed by consecutive centrifugations and washing in cold NaCl (0.9% wt/vol). The resulting RBCs were suspended in PBS (135 mM NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Hemolysates were obtained by lysing RBC with distilled water (1:10), followed by centrifugation to remove cellular debris. The concentration of Hb was determined by the Drabkin method.<sup>30</sup>

### Preparation of flavonoid solutions

Solutions of flavonoids were prepared immediately before use. The flavonoids were first dissolved in 50% DMSO and then diluted to a final DMSO concentration of 2% in the reaction tube. At this concentration, DMSO had no appreciable effect on Hb oxidation and Hb binding to RBC membranes.

### Oxidation of Hb by chemical agents

For Hb oxidation, 200  $\mu$ M of *tert*-BOOH was added to 40  $\mu$ M of hemolysate (in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4) in the absence or presence of flavonoids. The extent of Hb oxidation was measured after a 15-min incubation at 37°C using a Hitachi U-2000 spectrophotometer. The relative proportions of oxyHb, metHb, and hemichrome were calculated using the equations described by Winterbourn.<sup>30</sup>

$$[\text{OxyHb}] = 119A_{577} - 39A_{630} - 89A_{630}$$

$$[\text{MetHb}] = 28A_{577} + 307A_{630} - 55A_{560}$$

$$[\text{Hemi}] = -133A_{577} - 114A_{630} + 233A_{560}$$

### Incubation of RBC suspension with oxidants

The binding of Hb to membranes was induced by incubating the RBC suspension at a Hb concentration of 50  $\mu$ M (Hb<sub>ini</sub>). In these experiments, the incubation was done in PBS for 15 min at 37°C in the absence or presence of *tert*-BOOH at a final concentration of 0.6 mM. After incubation, the cells were centrifuged, washed twice with PBS, lysed with distilled water in a final volume of 2 ml and centrifuged to remove

## QUERCETIN DIMINISHES Hb BINDING TO RBC MEMBRANE

cellular debris. The Hb concentration was determined in the supernatant ( $Hb_{sup}$ ) and the concentration of Hb bound to membranes ( $Hb_{mem}$ ) was calculated using the following expression:

$$[Hb_{mem}] = [Hb_{ini}] - [Hb_{sup}]$$

The exposure of membrane-free Hb to 0.6 mM *tert*-BOOH did not lead to precipitation.

### Lipid peroxidation

The lipid peroxidation of erythrocyte membrane was assessed as described by Stocks and Dormandy.<sup>31</sup> The experiments were carried out with a suspension of human erythrocytes containing 1 mM of Hb, in the absence or presence of flavonoids and *tert*-BOOH (1 mM). After 30 min at 37°C, 0.5 ml of 25% TCA was added to 1 ml of suspension and the mixture was centrifuged at 1,100g for 5 min. To 1 ml of the resulting supernatant, 1 ml of 1% thiobarbituric acid (TBA) in 0.05 M NaOH was added followed by boiling for 15 min. The formation of TBA-reactive substances (TBARS) was used as a measure of lipid peroxidation. The TBARS concentration was determined using an  $\epsilon$  of 516  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  at 532 nm.

### Isotonic hemolysis

Erythrocytes suspended in PBS (10% hematocrit) were incubated at 37°C for 43 h in a Dubnoff shaking apparatus, in the absence and presence of 70  $\mu\text{M}$  quercetin. Aliquots were withdrawn at appropriate time intervals, centrifuged, and assayed for hemoglobin in the supernatant. The hemoglobin concentration was determined spectrophotometrically at 540 nm.

### Statistical analysis

All experiments were done at least three times on three subjects, and the data were analyzed by one-way ANOVA.

## RESULTS AND DISCUSSION

The effects of quercetin on Hb oxidation and the binding of Hb to RBC membranes were investigated using *tert*-BOOH to promote oxidative stress. Snyder et al.<sup>10</sup> reported that RBC exposure to peroxide results in signs of accel-

erated cell senescence, including the generation of Hb-membrane complexes, increased membrane rigidity, and enhanced recognition by monocytes. *In vivo*, oxidized Hb derivatives can bind to the RBC membrane leading to lysis. An important event in hemolysis is the oxidative process initiated by free Hb.<sup>32</sup> The brown pellet, known as Heinz bodies, is formed by the interaction of irreversible hemichromes with the cell membrane, thereby altering the properties of the latter and contributing to hemolysis and premature RBC death.<sup>33,34</sup> In our experiments *in vitro*, the exposure of RBC to the oxidizing agent *tert*-BOOH did not cause apparent cell lysis, as shown by the colorless supernatant ( $A_{540} = 0.01$ ). The brown pellet, separated by centrifugation after cell lysis, indicated the presence of membrane-bound Hb derivatives. This phenomenon was first described by Trotta et al.<sup>14</sup> in studies of RBC incubated with *tert*-BOOH; no significant hemolysis was observed by these authors.

The *tert*-BOOH-induced binding of Hb to the erythrocyte membrane was concentration-dependent (Fig. 1). At concentrations lower than

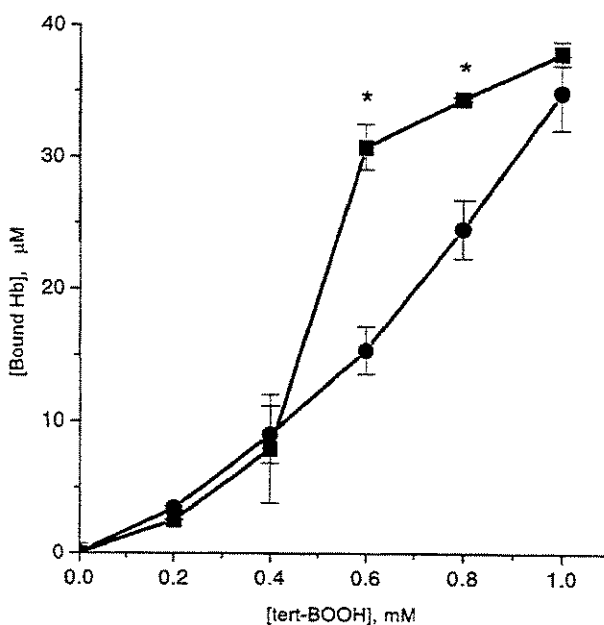


FIG. 1. Effect of oxidant concentration on Hb binding to human RBC membranes. The RBC suspension (40  $\mu\text{M}$  Hb) in PBS (0.1 M phosphate buffer + 0.9% NaCl, pH 7.4) was incubated for 15 min at 37°C with different concentrations of oxidant in the absence (■) and presence (●) of 100  $\mu\text{M}$  quercetin. The experimental conditions were as described in Materials and Methods. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments on three subjects. \* $p < 0.01$  compared to the absence of quercetin.

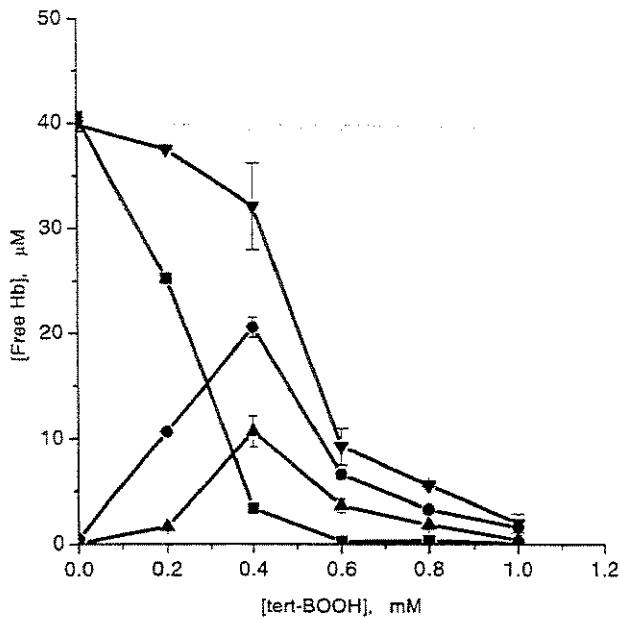


FIG. 2. Effect of *tert*-BOOH concentration on the soluble fraction of Hb from an RBC suspension (40  $\mu$ M Hb) in PBS (0.1 M phosphate buffer + 0.9% NaCl, pH 7.4). The RBC suspension was incubated for 15 min at 37°C with different concentrations of oxidant and the oxyHb (■), methHb (●), and hemichrome (▲) levels were determined in the soluble fraction. The total free Hb (▼) was obtained by summing the oxyHb, methHb, and hemichrome concentrations. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments on three subjects.

0.4 mM oxidant, there was little binding of Hb to the cell membrane. At higher concentrations, however, the amount of brown pellet increased quickly, yielding a sigmoidal curve, indicating that the binding of Hb to the cell membrane was cooperative. The level of soluble Hb, and hence concentration of Hb, was almost unchanged up to 0.4 mM *tert*-BOOH (Fig. 2). At higher concentrations of oxidant, the Hb level in the soluble fraction decreased, indicating the withdrawal of protein from the solution through binding to membrane that was subsequently precipitated.

The level of oxyHb in the supernatant decreased with oxidant concentration, whereas that of methHb and hemichrome increased up to 0.4 mM *tert*-BOOH and then dropped to almost zero at 1 mM *tert*-BOOH. The hemichrome formed was subsequently bound to the RBC membrane. At a concentration of 0.6 mM *tert*-BOOH, only 3.6  $\mu$ M of hemichrome and 6.6  $\mu$ M of methHb were present in the solution (Fig. 2). These observations showed that most of the

Hb was oxidized to hemichrome and precipitated as hemichrome-bound membrane.

To check for the formation of insoluble Hb in the membrane-free Hb solution after exposure to *tert*-BOOH, the oxidation of Hb by different concentrations of *tert*-BOOH was examined (Fig. 3). No insoluble Hb was detected, indicating that the precipitate in Fig. 1 consisted of membrane-bound Hb only. Figure 3 also shows that oxyHb behaved similarly to that in Fig. 2. The methHb and hemichrome levels, however, increased with *tert*-BOOH concentrations up to 0.4 mM and 0.6 mM, respectively, and then, remained constant. At a *tert*-BOOH concentration of 0.6 mM, about 15.9  $\mu$ M of methHb and about 23.5  $\mu$ M of hemichrome was present in the solution. These results indicated that under identical conditions hemoglobin in membrane-free solutions oxidized less than Hb in intact erythrocytes. They also suggest that oxidative damage to the membrane enhances damage to Hb, possibly through the formation of lipid hydroperoxides and their reactive intermediates. Such lipid peroxidation products may enhance the oxidation of Hb to hemichrome and amplify the binding of Hb to membranes, thus

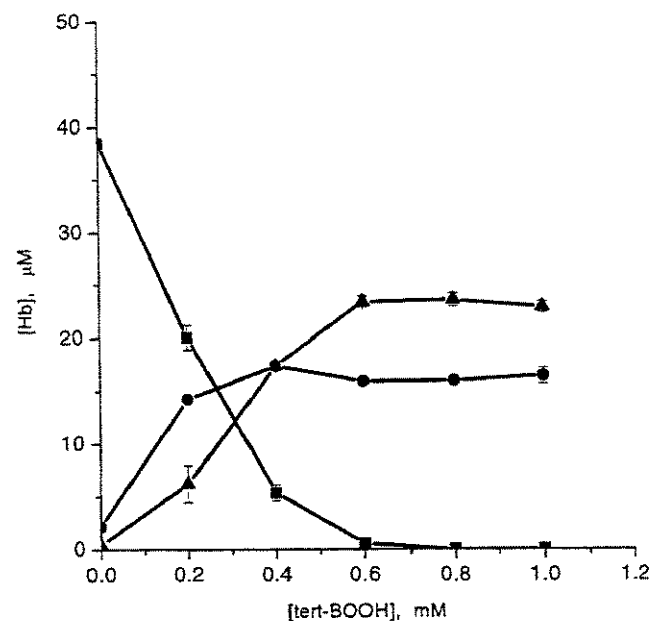


FIG. 3. Effect of oxidant concentration on membrane-free Hb solutions. OxyHb (■), methHb (●), and hemichrome (▲) levels were determined after exposing an Hb solution (40  $\mu$ M) to *tert*-BOOH for 15 min at 37°C. The experimental conditions were as described in Materials and Methods. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments on three subjects.

explaining the sigmoidal aspect of the curve in the absence of quercetin (Fig. 1).

Many authors have suggested that Hb is the main target for oxidant agents such as *tert*-BOOH during oxidative damage to RBC. The oxidative events in the RBC membrane appear to be a secondary event caused by radicals produced by Hb oxidation, which occurs following the oxidation of GSH.<sup>15,35,36</sup>

To prevent oxidation, normal RBC uses defenses such as antioxidant molecules or antioxidant enzymes. In addition to these endogenous protective systems, compounds such as ascorbic acid and vitamin E in individuals with sickle cell anemia can prevent oxidative injury.<sup>35,37</sup> Among the natural antioxidants, flavonoids have recently gained interest because of their broad spectrum of pharmacological activity.

Flavonoids are strong scavengers of oxygen radical and are also good metal chelators,<sup>21-27</sup> which form inert complexes that cannot participate in the conversion of peroxide radicals and hydrogen peroxide into hydroxyl radicals. Flavonoids are also effective in preventing lipid peroxidation and oxidative damage in cells.<sup>23,25,29,36</sup> For these reasons, we examined the role of the flavonoids quercetin, rutin, and morin as antioxidants and as inhibitors of Hb binding to membranes.

Quercetin, a pentahydroxyflavone which easily penetrates cells,<sup>38</sup> delayed the binding of Hb to membranes induced by *tert*-BOOH, in a

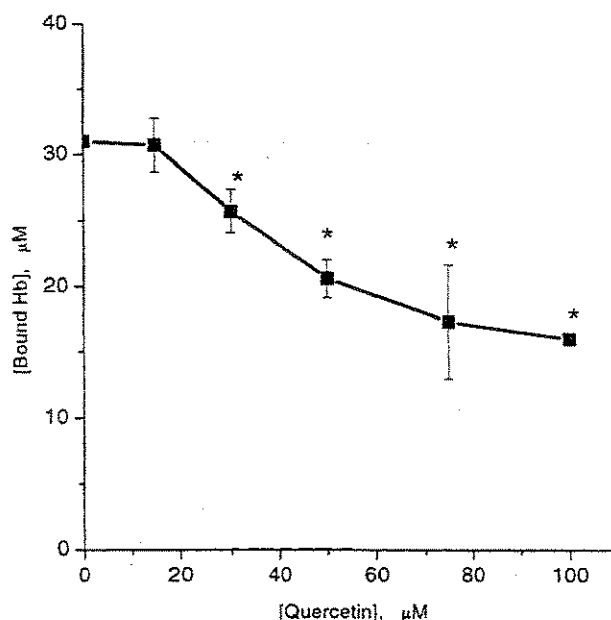


FIG. 4. Effect of quercetin concentration on Hb binding to human RBC membranes incubated with *tert*-BOOH. The RBC suspension (40 μM Hb) in PBS (0.1 M phosphate buffer + 0.9% NaCl, pH 7.4) was incubated for 15 min at 37°C with 0.6 mM *tert*-BOOH in the presence of different concentrations of quercetin. The experimental conditions were as described in Materials and Methods. The points are the means ± SD of three experiments on three subjects. \**p* < 0.01 compared to the absence of flavonoid.

concentration-dependent manner (Fig. 4). This effect of quercetin was a consequence of its capacity to protect Hb against oxidation to metHb and hemichrome in membrane-free Hb solutions (Table 1). This finding was confirmed by

TABLE 1. INFLUENCE OF FLAVONOIDS ON MEMBRANE-FREE Hb OXIDATION BY 0.2 mM *tert*-BOOH

Flavonoid (μM)	[OxyHb] μM	[MetHb] μM	[Hemichrome] μM
Quercetin			
0	12.3 ± 0.9	15.8 ± 0.6	11.1 ± 0.9
15	16.2 ± 2.2*	15.2 ± 0.5	9.0 ± 2.2
50 μM	20.4 ± 1.9**	15.0 ± 0.7	5.3 ± 0.6
100 μM	26.7 ± 0.8**	16.6 ± 0.8	0
Rutin			
0	17.2 ± 0.8	14.2 ± 0.5	7.4 ± 0.2
15 μM	13.7 ± 1.9*	18.5 ± 0.9	7.9 ± 1.3
50 μM	11.5 ± 3.2**	20.6 ± 1.4	8.2 ± 1.6
100 μM	15.3 ± 0.4	18.3 ± 0.1	6.3 ± 0.3
Morin			
0	17.8 ± 1.9	14.3 ± 1.2	7.0 ± 0.9
15	7.0 ± 2.1**	20.0 ± 1.8	12.7 ± 3.6
50 μM	2.0 ± 0.6**	25.5 ± 0.2	12.2 ± 0.7
100 μM	0.8 ± 0.1**	27.0 ± 1.0	11.4 ± 1.0

Samples containing 40 μM Hb, flavonoids, and 0.2 mM *tert*-BOOH were incubated for 15 min at 37°C. Each point represents the mean ± SD of three experiments on three subjects. \**p* < 0.05 and \*\**p* < 0.01 compared with the absence of flavonoid. The data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Duncan test.



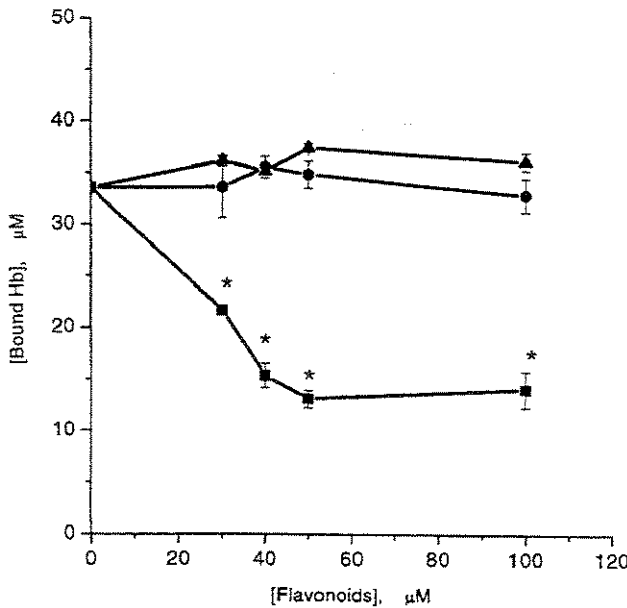


FIG. 5. Effect of different flavonoids on Hb binding to human RBC membranes incubated with *tert*-BOOH. The RBC suspension (50  $\mu$ M Hb) in 0.1 M phosphate buffer + 0.9% NaCl, pH 7.4 was incubated with 0.6 mM *tert*-BOOH for 15 min at 37°C in the presence of different concentrations of the flavonoids morin (●), rutin (▲), and quercetin (■). Each point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments on three subjects. \* $p$  < 0.01 compared to the absence of flavonoid.

experiments done in the presence of rutin or morin which showed a small effect on the hemichrome formation induced by *tert*-BOOH (Table 1). Consequently, these flavonoids showed little ability to prevent the binding of Hb to RBC membranes (Fig. 5). The ability of flavonoids to diminish the formation of hemichrome was apparently very important for preventing the binding of Hb to the RBC membrane since the latter has a high-affinity binding site for this form of oxidized Hb.<sup>7</sup> This observation demonstrated the importance of the oxidative step on the binding of Hb to membranes. The antioxidant capacity of quercetin could be ascribed to the concomitant activities of scavenging radicals and chelating iron from the breakdown of oxidized Hb as proposed by Afanas'ev et al.<sup>27</sup> and Boyer et al.<sup>39</sup>

During the oxidation of Hb in RBC, there is a concomitant production of reactive oxygen species that may reach the membrane to cause oxidative stress and lipid membrane peroxidation. As described by Laughton et al.<sup>24</sup> and Decharneaux et al.,<sup>25</sup> quercetin may protect against lipid peroxidation demonstrated by its ability to reduce the formation of TBA-reactive

products (Fig. 6). According to Van der Zee et al.,<sup>15</sup> the reaction of hydroperoxides with heme-containing proteins yields peroxy (*t*-BOO $\cdot$ ) and alkoxy (*t*-BO $\cdot$ ) radicals, the latter is involved on initiation of the lipid peroxidation. Quercetin acts by scavenging alkoxy and peroxy radicals, thereby preventing the lipid peroxidation.<sup>40,41</sup>

Although the oxidation of lipid component has little or no effect on cell rigidity, oxidation of the polyunsaturated fatty acid side chains of membrane lipids can generate many potentially cytotoxic products<sup>42</sup> and can also exacerbate the free radical-mediated destruction of proteins and unsaturated lipids. Lipid peroxidation, therefore, has many deleterious effects on membrane structure and function which can contribute to premature cell death.<sup>35</sup> As described above, lipid peroxidation may enhance the oxidative process of Hb in erythrocytes and contribute to further binding of Hb to the membrane.

The experiments performed in the absence of *tert*-BOOH, demonstrated that quercetin was able to protect against peroxidation of erythrocyte membrane decreasing the TBA-reactive products by 32% (Fig. 7). Protective effect of

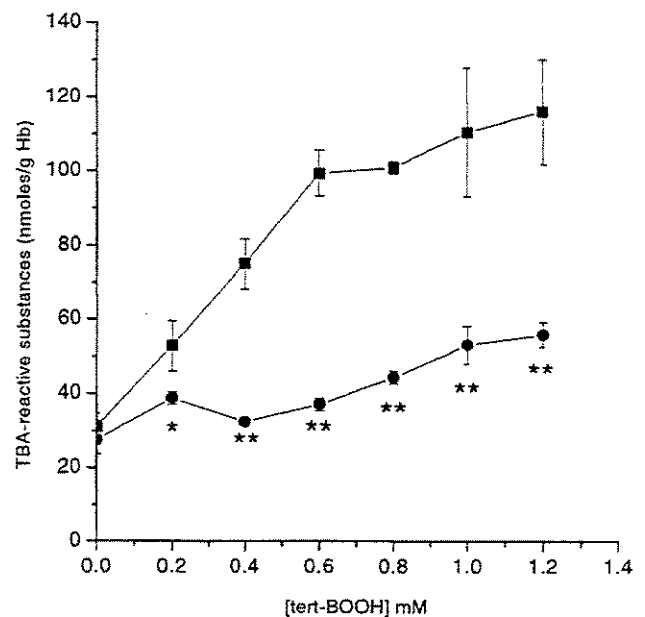


FIG. 6. Lipid peroxidation in RBC in the absence (■) and presence (●) of 70  $\mu$ M quercetin. Lipid peroxidation was induced by incubating a suspension of RBC in PBS (containing 0.5 mM Hb) with *tert*-BOOH (0.2–1.2 mM) for 30 min at 37°C. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments three subjects. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01 compared to the absence of flavonoid.

# QUERCETIN DIMINISHES Hb BINDING TO RBC MEMBRANE

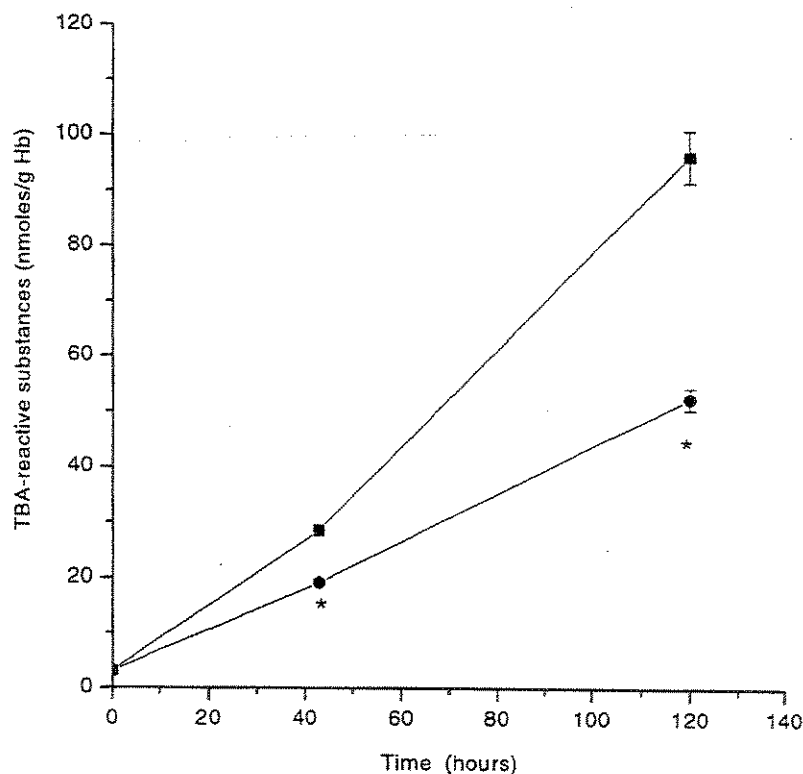


FIG. 7. Lipid peroxidation in RBC in the absence (■) and presence (●) of 70  $\mu$ M quercetin. Lipid peroxidation was followed by incubating a suspension of RBC in PBS (containing 0.5 mM Hb) for 120 h at 37°C. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments on three subjects. \* $p$  < 0.01 compared to the absence of flavonoid.

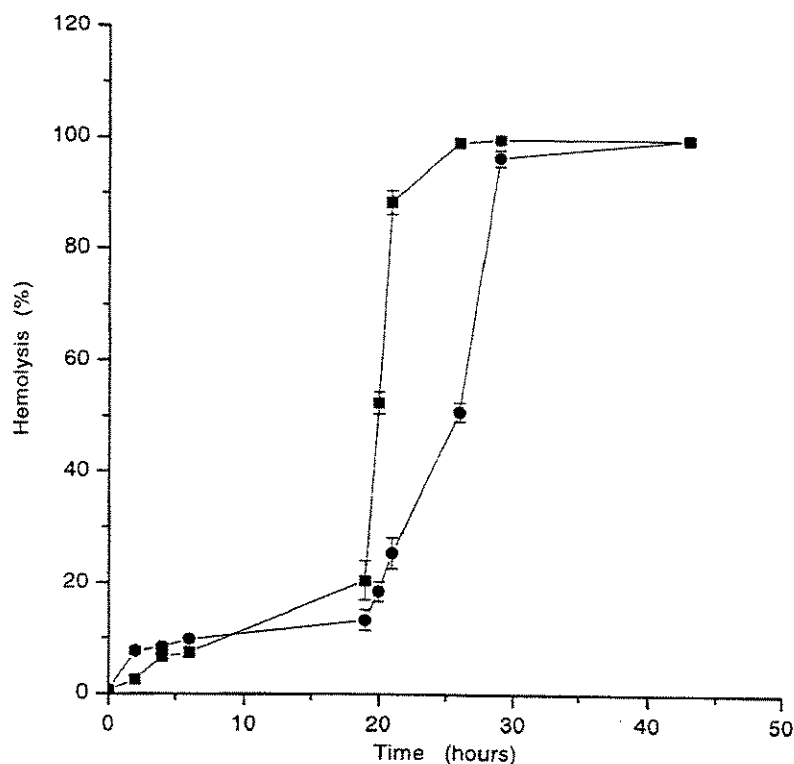


FIG. 8. Protective effect of quercetin on isotonic hemolysis. Erythrocytes suspended in PBS (1% hematocrit) were incubated at 37°C for 45 h in a Dubnoff shaking apparatus, in the absence (■) and presence (●) of 70  $\mu$ M quercetin. Aliquots were withdrawn at appropriate time intervals, centrifuged, and assayed for hemoglobin in the supernatant. The hemoglobin concentration was determined spectrophotometrically at 540 nm. Each point represents the mean  $\pm$  SD of three experiments on three subjects.

quercetin was also observed on isotonic hemolysis which increased the time of hemolysis (50%) from 20 h of incubation at 37°C in the absence of quercetin to 26 h in the presence of the flavonoid (Fig. 8). These results suggest that quercetin may display a beneficial effect on aging of RBC.

The antioxidant capacity of flavonoids appears to be determined by their structural characteristics.<sup>21,23</sup> The *o*-dihydroxy (catechol) structure in the B ring, the 2,3-double-bond in conjunction with the 4-oxo-group and the presence of 3-, 5-, and 7-hydroxyl groups in their structures are important for the antioxidant potential of flavonoids. Quercetin fills these structural requirements,<sup>38</sup> whereas morin devoid of the first structure and rutin contains a 3-hydroxy group blocked with rutinose. The antioxidant activity of flavonoids also depends on their accessibility to the cells.<sup>38,43</sup> Although rutin, reportedly protects against Hb oxidation,<sup>44</sup> in our experimental conditions this compound showed a slight peroxidant action (Table 1) and was relatively ineffective in preventing Hb binding to the membrane. The presence of rutinose probably also prevents the access of rutin to the lipid membrane and hence its entrance into the RBC.

In conclusion, exposing erythrocytes to *tert*-BOOH *in vitro* leads to (1) intracellular damage in the form of Hb oxidation and membrane-bound hemichrome production, both of which are partially, but not totally prevented by quercetin, and (2) lipid peroxidation induced by *tert*-BOOH is significantly suppressed by quercetin. The results reported here have important implications for the beneficial effects of quercetin, which is absorbed and eliminated slowly throughout the day.<sup>45</sup> Thus quercetin could increase the antioxidant capacity of blood plasma and prevent the premature aging and death of cells following oxidative stress.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Stephen Hyslop (Departamento de Farmacologia, FCM, UNICAMP) for revising the English of the text. This research was supported by a grant from CNPq (520184/96-3) and FAPESP (96/8976-0). A.L.P.

and M.A.T. were supported by FAPESP studentships 96/08980-7 and 96/08987-1, respectively.

## REFERENCES

1. Luna EJ, Kidd GH, Branton D. Identification by peptide analysis of the spectrin-binding protein in human erythrocytes. *J Biol Chem* 1979;254:2526-2532.
2. Hargreaves W, Giedd KN, Verkleij A, et al. Reassociation of ankyrin with band 3 in erythrocyte membranes and in lipid vesicles. *J Biol Chem* 1980;255:11965-11972.
3. Bennett V, Stenbuck PJ. The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membrane. *Nature* 1979;280:468-473.
4. Bennett V, Stenbuck PJ. Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1980;255:6424-6432.
5. Shaklai N, Yguerabide J, Ranney HM. Classification and localization of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane. *Biochemistry* 1977;16:5585-5592.
6. Salhany JM, Cordes KA, Gaines ED. Light-scattering measurements of hemoglobin binding to the erythrocyte membrane. Evidence for transmembrane effects related to a disulfonic stilbene binding to band 3. *Biochemistry* 1980;19:1447-1454.
7. Waugh SM, Low PS. Hemichrome binding to band 3: nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1985;24:34-39.
8. Kiefer CR, Trainor JF, McKenney JB, et al. Hemoglobin-spectrin complexes: interference with spectrin tetramer assembly as a mechanism for compartmentalization of band 1 and band 2 complexes. *Blood* 1995;86:366-371.
9. Bates D, Winterbourn CC. Haemoglobin denaturation, lipid peroxidation and haemolysis in phenylhydrazine-induced anaemia. *Biochim Biophys Acta* 1984;798:84-87.
10. Snyder LM, Fortier NL, Trainor J, et al. Effect of hydrogen peroxide exposure on normal human erythrocyte deformability, morphology, surface characteristics, and spectrin-hemoglobin cross-linking. *J Clin Invest* 1985;76:1971-1977.
11. Fortier N, Snyder LM, Garver F, et al. The relationship between *in vivo* generated hemoglobin skeletal protein complex and increased red cell membrane rigidity. *Blood* 1988;71:1427-1431.
12. Itano HA, Hirota K, Vedvick TS. Ligands and oxidants in ferrihemichrome formation and oxidative hemolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:2556-2560.
13. French JK, Winterbourn CC, Carrell RW. Mechanism of oxyhaemoglobin breakdown on reaction with acetylphenylhydrazine. *Biochem J* 1978;173:19-26.
14. Trotta RJ, Sullivan SG, Stern A. Lipid peroxidation and hemoglobin degradation in red blood cells ex-

- posed to *t*-butyl hydroperoxide. Dependence on glucose metabolism and hemoglobin status. *Biochim Biophys Acta* 1981;678:230-237.
15. Van der Zee J, Van Steveninck J, Koster JF, et al. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by *t*-butylhydroperoxide-derived radicals. *Biochim Biophys Acta* 1989;980:175-180.
16. Slater T. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
17. Pryor W. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 1986;48:657-667.
18. Yagi K. Lipid peroxidation and human diseases. *Chem Phys Lipids* 1987;45:337-351.
19. Hollman PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Bio-med Pharmacother* 1997;51:305-310.
20. Van Aker FAA, Schouten O, Haenen GRMM, et al. Flavonoids can replace  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett* 2000;473:145-148.
21. Bors W, Michel C, Saran M. Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol* 1994;234:420-429.
22. Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, et al. Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc* 1994;116:4846-4851.
23. Ratty AK, Das NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol* 1988;39:69-79.
24. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, et al. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclooxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991;42:1673-1681.
25. Dechameux T, Dubois F, Beauloye C, et al. Effect of various flavonoids on lysosomes subjected to an oxidative or an osmotic stress. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1243-1248.
26. Korkina LG, Afanas'ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol* 1997;38:151-163.
27. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1763-1769.
28. Saija A, Scalese M, Lanza M, et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med* 1995;19:481-486.
29. Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 1997;416:123-129.
30. Winterbourn CC. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol* 1990;186:265-272.
31. Stocks J, Normandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol* 1971;20:95-111.
32. Stern A. Red cell oxidative damage. In: Sies H, ed. *Oxidative stress* London: Academic Press, 1985:75-90.
33. Peisach J, Blumberg WE, Rachmilewitz EA. The demonstration of ferrihemichrome intermediates in Heinz body formation following the reduction of oxy-hemoglobin A by acetylphenylhydrazine. *Biochim Biophys Acta* 1975;393:404-418.
34. Minetti M, Mallozzi C, Scorza G, et al. Role of oxygen and carbon radicals in hemoglobin oxidation. *Arch Biochem Biophys* 1993;302:233-244.
35. Skaper SD, Fabris M, Ferrari V, et al. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radic Biol Med* 1997;22:669-678.
36. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationship. *Free Radic Biol Med* 1997;22:749-760.
37. Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest* 1982;70:1253-1259.
38. Saija A, Scalese M, Lanza M, et al. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med* 1995;19:481-486.
39. Boyer RF, Clark HM, La Roche AP. Reduction and release of ferritin iron by plant phenolics. *J Inorg Biochem* 1988;32:171-181.
40. Uri N. *Autoxidation and antioxidants*. London: Lundberg, 1961:133-169.
41. Erben-Russ M, Michel C, Bors W, et al. Absolute rate constant of alkoxyl radical reactions in aqueous solution. *J Phys Chem* 1987;91:2362-2365.
42. Jain SK, Hochstein P. Polymerization of membrane components in aging red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;92:247-254.
43. Barclay LRC, Locke SJ, MacNeil JM, et al. Autoxidation of micelles and model membranes—quantitative kinetic measurements can be made by using either water or lipid-soluble initiators with water-soluble or lipid-soluble chain-breaking antioxidants. *J Am Chem Soc* 1984;106:2479-2481.
44. Grinberg LN, Rachmilewitz EA, Newmark H. Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. *Biochem Pharmacol* 1994;48:643-649.
45. Hollman PCH, van der Gaag M, Mengelers MJB, et al. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 1996;21:703-707.

Address reprint requests to:

Dr. Marcio Alberto Torsoni

Departamento de Bioquímica

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas

CP 6109

13083-970, Campinas, SP, Brasil

E-mail: torsoni@yahoo.com

**The effect of rutin and morin on erythrocyte oxidative damage *in vitro***

**Ana L. Pereira, Maristela Cesquini, \*Márcio A. Torsoni and Satie H. Ogo**

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

\*Universidade Braz Cubas, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.

Address for correspondence: Satie Hatsushika Ogo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil. Tel. 55-19-3788 7572, Fax. 55-19-3289 3124.

E mail: [satieho@hotmail.com](mailto:satieho@hotmail.com)

Running title: The effect of rutin and morin on red blood cells.

**ABSTRACT** - Flavonoids are polyphenolic compounds with a wide range of biological activities. To investigate the antioxidant properties of the flavonoids rutin and morin on hemoglobin oxidation and membrane lipid peroxidation, erythrocytes were treated with tert-butyl hydroperoxide to stimulate oxidative stress. The rutin showed a greater protective effect against Hb oxidation than morin, perhaps because of the presence of a catechol moiety on the ring B. A protective action that was also observed with glutathione and deferoxamine, was apparently conducted by the scavenging of oxygen free radicals, the chelation of iron ions and/or hemein formed during Hb oxidation. Free radicals and metal ions may also be involved in lipid peroxidation in RBC since deferoxamine, glutathione and diphenylamine were able to reduce the oxidative damage. Despite its prooxidant action on Hb oxidation, morin offered greater protection against lipid peroxidation than rutin. The presence of rutinose in the rutin structure makes the flavonoid more hydrophilic, and reduces the interaction with membrane lipids compared to morin.

**KEY WORDS:** rutin, morin, hemoglobin, red blood cell, lipid peroxidation, oxygen free radical.

## INTRODUCTION

Flavonoids, a group of benzo- $\gamma$ -pyrone derivatives widely distributed in the plant kingdom, are frequently ingested by man and animals in their normal diet. Flavonoids exert multiple biological effects and protect against various conditions such as inflammation, atherosclerosis, and certain forms of cancer that involve free radical-mediated damage (Middleton and Kandaswami, 1992; Rice-Evans et al., 1996; Skaper et al., 1997; Korkina and Afanas'ev, 1997; Skibola and Smith, 2000). The involvement of oxidants in such diseases suggests a possible therapeutic use of antioxidants. Flavonoids have received increasing interest as antioxidants of potential therapeutic significance. Indeed, epidemiological studies, have shown that flavonoids may be important health-promoting compounds in plant-derived food (Rimm et al., 1996; Hertog et al., 1996; 1997). The structures of flavonoids vary considerably; and several attempts have been made to elucidate the structure-activity relationships of some of these compounds (Das, 1994). Three structural groups are known to contribute to the free radical scavenging and/or antioxidative potential of flavonoids: (i) the 3',4'-dihydroxy catechol structure in the B ring, (ii) the 2,3 double bond in conjunction with 4-oxo group in the C ring, (iii) the 3 hydroxy group in combination with 2,3-double bond in the C ring (Bors et al., 1990). Another possible antioxidant mechanism for flavonoids is via metal chelating by both hydroxyl (in C<sub>3</sub>) and the carbonyl (in C<sub>4</sub>) which prevent free radical formation (Afanas'ev et al., 1989; Morel et al., 1993; Ferrali et al., 1997). Although there is general agreement that flavonoids possess excellent iron chelating and radical scavenging properties, there is still much discussion regarding their relative contribution in protecting against diseases and on the importance of structure-activity relationship in this antioxidant activity.

In contrast to the beneficial effects, some flavonoids have been also found to be mutagenic in vitro (Sahu and Gray, 1993; 1994; Rahman et al., 1992; Skibola and Smith, 2000). These harmful effects result from the prooxidant rather than antioxidant action of the related flavonoids (Hodnick et al., 1994; Sahu and Gray, 1993; 1994; Rahman et al., 1992; Hanasaki et al., 1994).

In this report we describe the antioxidant and pro-oxidant actions of rutin and morin on human Hb and on RBC membrane lipid and also examine the importance of flavonoid structure in tert-butyl hydroperoxide (tert-BOOH)-stimulated oxidation. RBC is an excellent model for these studies since its membrane is particularly susceptible to oxidant attack as a result of the high polyunsaturated fatty acid and the Hb iron is a potential powerful promoter of oxidative processes.



## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Rutin, morin, tert-BOOH, dimethylsulfoxide (DMSO), glutathione and deferoxamine were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Thiourea, mannitol, diphenylamine, 2-thiobarbituric acid and trichloroacetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

### Preparation of RBC and Hb

Blood samples provided by the Hospital das Clínicas (UNICAMP) were collected in tubes containing EDTA. Plasma, platelets and the buffy coat were removed by centrifugation at 500 g for 5 min. For the preparation of RBC, the pellet was washed three times with cold NaCl (0.9%) and suspended in 100 mM saline-phosphate buffer, pH 7.4. For the preparation of Hb, the RBC was lysed in distilled water and the hemolysate then centrifuged for 5 min at 5000 g to remove cell membranes. In both cases, concentration of Hb was determined by the Drabkin method (Winterbourn, 1990).

### Preparation of flavonoid solutions

Solutions of rutin and morin were prepared immediately before use. The flavonoids were first dissolved in 50% DMSO and then diluted to give a final DMSO concentration of 2% in the reaction tube. At this concentration, DMSO had no appreciable effect on Hb oxidation and lipid peroxidation. The control experiments were done in the presence of 2% DMSO.

### Oxidation of Hb by tert-BOOH

To promote Hb oxidation, 0.2 mM of tert-BOOH was added to a 40  $\mu$ M solution of oxyHb (in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4) in the absence or presence of rutin or morin. The extent of Hb oxidation was measured in a Hitachi U-2000 spectrophotometer, after 15 min at

37°C. The relative proportion of oxyHb, metHb and hemichrome was calculated using the equations described by Winterbourn (1990).

#### **Effect of pretreating rutin and morin with tert-BOOH on Hb oxidation**

OxyHb (40  $\mu$ M) was added to 0.5 mM rutin or morin pre-incubated with 0.2 mM tert-BOOH for 5 min at 37°C. The Hb oxidation was measured after 15 min of reaction.

#### **Lipid peroxidation**

Tert-BOOH (final concentration, 1 mM) was added to a RBC suspension (final concentration, 0.5 mM Hb) in the absence or presence of rutin and morin. After a 30 min incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding 25% trichloroacetic acid and the mixture centrifuged for 2-3 min at 5000 g. One milliliter of 1% thiobarbituric acid (TBA) in 50 mM NaOH was added to 1 ml of the supernatant and boiled for 15 min and immediately cooled on ice. The level of TBA reactive products (TBARS) was measured in a Hitachi U-2000 spectrophotometer at 532 nm (Stocks and Dormandy, 1971). When the effect of flavonoids was tested, RBC were pre-incubated with different concentrations of rutin or morin for 5 min before the addition of the tert-BOOH.

**Statistics analysis:** The results are expressed as the median and quartile intervals. Significance was assessed using the Kruskal-Wallis Test and the difference between groups was evaluated with a distribution-free multiple comparisons method.

## RESULTS

### Effect of morin and rutin on tert-BOOH-induced Hb oxidation

Tert-BOOH caused considerable Hb oxidation that was inhibited by rutin (Fig. 1A). At a concentration of 0.6 mM, rutin inhibited about 23% of the Hb oxidation. The yield of metHb and hemichrome in the presence of rutin decreased by about 13% and 11%, respectively.

Morin had a pro-oxidant effect at concentrations up to 1.0 mM, with a maximum effect at 0.1 mM. At this concentration, oxyHb decreased significantly ( $p < 0.01$ ) from 50% to 10%; simultaneously, the metHb and hemichrome concentrations reached maximum levels of 70% and 20%, respectively. At concentrations above 0.1 mM, the pro-oxidant effect of morin decreased; oxyHb recovered its initial level of 50% at 1.0 mM morin (Fig. 1B).

The influence of some antioxidants on Hb oxidation by tert-BOOH was investigated to compare their effects with those of rutin and morin (Table 1). Glutathione, deferoxamine, thiourea and rutin exerted a protective action on Hb oxidation induced by tert-BOOH. Diphenylamine, which protects against the lipid peroxidation induced by tert-BOOH by scavenging the tert-BO<sup>•</sup> radical (Van der Zee et al., 1989), had no effect on Hb oxidation, nor did mannitol.

### Hb oxidation by rutin or morin pretreated with tert-BOOH

Pretreating rutin with tert-BOOH reduced this flavonoids' protective effect on Hb oxidation. Figure 2 shows that incubating Hb with tert-BOOH decreased the oxyHb level to 32% after 15 min of reaction. The addition of rutin to the reaction medium increased the level of oxyHb to 47%. However, pre-incubating rutin with tert-BOOH before the addition of Hb enhanced oxidation and the oxyHb level decreased to 33%. The pro-oxidant effect was greater when morin was pre-incubated with the oxidant, and the level of oxyHb decreased from 23% (without pre-incubation) to about 9% (after pre-incubation with tert-BOOH).

## DISCUSSION

In recent years, flavonoids have gained considerable interest because of their potential pharmacological activity in a large variety of diseases, most of which produce injury through free radicals formation (Havsteen, 1983; Brandi, 1992; Middleton and Kandaswami, 1992).

In the present study, the ability of rutin and morin in preventing Hb oxidation and peroxidation of RBC membrane lipid was examined following tert-BOOH-stimulated oxidative stress.

In agreement with previous reports (Trotta et al., 1982; Rice-Evans et al., 1985), the presence of tert-BOOH lead to the formation of metHb and hemichrome in Hb solution. Exposure of intact RBC to tert-BOOH also caused lipid peroxidation and the binding of Hb to membranes (Chiu et al., 1996; Cesquini et al., 2001). Oxidative phenomena induced by tert-BOOH in erythrocytes are mediated by free radicals such as tert-BO<sup>•</sup> and tert-BOO<sup>•</sup> (Trotta et al., 1982, 1983; Thornalley et al., 1983). Flavonoids in the reaction medium may protect proteins and membrane lipids against oxidative damage by tert-BOOH by scavenging tert-BOOH-derived radicals, by interacting directly with tert-BOOH, or by chelating metal ions.

As shown in the figure 1 rutin was more effective than morin in preventing Hb oxidation. The presence of a catechol group in ring B of rutin is essential for antioxidant and free radical scavenging activity (Cotelle et al, 1996). However, the OH at position 3 in rutin is blocked with a rutinoside group. Although the antioxidant activity of rutin may be affected by this substitution, the hydrophilic rutinoside group probably facilitates the interaction of the flavonoid with the hydrophilic surface of Hb to inhibit the protein oxidation. On the other hand, the chelating capacity of rutin is impaired since the hydroxyl group in C<sub>3</sub> is not accessible to bind iron ions, thus interfering on its antioxidant property. Morin did not protect Hb against tert-BOOH induced oxidation, but behaved as a pro-oxidant at low concentrations (Fig. 1B).

assessed since this compound reacts directly with the thiobarbituric acid used to determine lipid peroxidation, and gives erroneous results (Davies and Goldberg, 1987; Jain, 1989).

Mannitol and DMSO (used to dissolve the flavonoids) failed to diminish Hb oxidation and lipid peroxidation (Table I). This finding argues against direct damage to RBC by  $\cdot\text{OH}$  radicals but the difficulty in interpreting this negative result is that the reactions of certain short-lived species are difficult to inhibit, even when aqueous antioxidants penetrate the cell membranes (Dorfman and Adams, 1973).

Diphenylamine, a powerful scavenger of alkoxyl but not of peroxy radicals (Bors et al., 1981; Stern, 1985) strongly inhibited lipid peroxidation (Table I), in agreement with the findings of Kalyanaraman et al., (1983) and Van der Zee et al., (1985, 1989). Trotta et al., (1983) reported that alkoxyl radicals are capable of extracting allylic hydrogen from unsaturated fatty acids of phospholipids, thereby initiating lipid peroxidation. The oxidation of Hb was not prevented by diphenylamine (Table I), perhaps because alkoxyl radicals are not major oxidants of Hb.

Glutathione and protein thiols have multiple protective roles in cells (Schoneich, 1995). The addition of GSH to the reaction media protected Hb and RBC membrane lipids against oxidation by tert-BOOH (Table I). GSH may play the antioxidant activity on RBC through its ability to bind to hemin via the iron moiety (Stern, 1985), or by its ability to donate hydrogen ions or metabolize tert-BOOH via glutathione peroxidase. GSH may also prevent the interaction of reactive metabolites with Hb and such interactions may represent important mechanisms of iron release (Ferrali et al., 1992). GSH provided greater protection than rutin, perhaps because of its various antioxidant mechanisms.

Deferoxamine, a powerful  $\text{Fe}^{3+}$  and hemin chelating agent (Chiu et al., 1996), showed a lower protective action than GSH, and only partially suppressed Hb oxidation and lipid peroxidation (Table I). The toxicity of iron arises from its ability to catalyze the formation of

oxygen-derived free radical species that can interact with cell membranes and cytoplasmic constituents. Such interactions can modify the functional integrity of cells and their membranes and also generate toxic products that can alter various cellular functions.

The experiment described here have shown the importance of free radicals and metal ions in tert-BOOH-induced oxidative damage in Hb and RBC membrane lipids. Additionally, the mechanisms of protection by flavonoids against Hb oxidation and lipid peroxidation appear to involve the free radical scavenging and metal ion chelation.

Although morin had a pro-oxidant effect on Hb oxidation, it was very efficient in protecting against lipid oxidative damage induced in erythrocyte membrane by tert-BOOH. The antiperoxidative effect of morin was greater than for rutin (Fig. 2), possibly because of its hydrophobic nature which caused it to concentrate in cell membranes, as suggested by Kaneko et al. (1994) and Saija et al. (1995). The presence of hydroxyl group in C<sub>3</sub> and carbonyl group in C<sub>4</sub> allowed morin to bind iron ions, contributing to this antioxidant action. In contrast, the greater solubility of rutin in aqueous environments (attributable to the covalently bonded disaccharide), enable it to interact with Hb in cell free solution.

The involvement of several factors in the antioxidant activity of flavonoids complicates the evaluation of the observed effects. Nevertheless, preliminary studies in this laboratory has shown that the administration of rutin in rats prevents oxidative processes such as the oxidation of non-protein and Hb thiol groups and the formation of TBARS by phenylhydrazine.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from FAPESP (96/8976-0). A.L.P. and M.A.T. were supported by FAPESP studentships 96/08980-7 and 96/08987-1, respectively. The authors are grateful to Hospital das Clínicas (UNICAMP) for donation of blood.

## LITERATURE CITED

- Afanas'ev, I. B.; Dorozhko, A. I.; Brodskii, A. V.; Kostyuk, V. A.; Potapovitch, A. I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, 38, 1763-1769.
- Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 343-355.
- Bors, W.; Michel, C.; Saran, M. Generation and reactivities of various types of oxygen radical. *Clin. Res. Proc.* **1981**, 17, 13-18 Suppl. S.
- Brandi, M. L. Flavonoids: biochemical effects and therapeutic applications. *Bone Mineral* **1992**, 19, S3-S14.
- Cederbaum, A. I.; Dicker, E.; Rubin, E.; Cohen, G. Effect of thiourea on microsomal oxidation of alcohols and associated microsomal functions. *Biochemistry* **1979**, 18, 1187-1191.
- Cesquini, M.; Tenor, A. C.; Torsoni, M. A.; Stoppa, G. R.; Pereira, A. L.; Ogo, S. H. Quercetin diminishes the binding of hemoglobin to the red blood cell membrane. *J. Anti-Aging Med.* **2001**, 4(1), 57-65.
- Chiu, D. T.; Van der Berg, J.; Kuypers, F. A.; Hung, I. J.; Wei, J. S.; Liu, T. Z. Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of heme release. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 21, 89-95.
- Cotelle, N.; Bernier, J.; Catteau, J.; Pommery, J.; Wallet, J.; Gaydou, E. M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 20, 35-43.
- Das, D. K. Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterization. *Methods Enzymol.* **1994**, 234, 410-420.



Davies, K. J. A.; Goldberg, A. L. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 82200-82226.

Dorfman, L. M.; Adams, G. E. *Reactivity of the hydroxyl radical in aqueous solutions.*

National Standards References Service, National Bureau of Standards, N° 46, 1973.

Ferrali, M.; Signorini, C.; Ciccoli, L.; Comporti, M. Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochem. J.* **1992**, 285, 295-301.

Ferrali, M.; Signorini, C.; Caciotti, B.; Sugherini, L.; Ciccoli, L.; Giachetti, D.; Comporti, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *Febs Lett.* **1997**, 416, 123-129.

Gad, S. C.; Weil, C. S. In *Statistics for Toxicologists-Principles and Methods of Toxicology*; A. Wallace Hayes, Ed.; Raven Press, New York, 1999.

Halliwell, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates – is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems. *FEBS Lett.* **1978**, 92, 321-328.

Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **1994**, 16, 845-850.

Havsteen, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* **1983**, 32, 1141-1148.

Hertog, M. G. L.; Hollman, P. C. H. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1996**, 50, 63-71.

Hertog, M. G. L.; Sweetman, P. M.; Fehily, A. M.; Elwood, P. C.; Kromhout, D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in Welsh population of men: the Caerphilly study. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, 65, 1489-1494.

Hodnick, W. F.; Duval, D. L.; Pardini, R. S. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 573-580.

Jain, S. K. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21340-21345.

Kalyanaraman, B.; Mottley, C.; Mason, R. P. A direct electron-spin resonance and spin-trapping investigation on peroxy free-radical formation by hematin hydroperoxide systems. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 3855-3858.

Kaneko, T.; Kaiji, K.; Matsuo, M. Protection of linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity by phenolic antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.* **1994**, *16*, 405-409.

Korkina, L.; Afanas'ev, I. B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *38*, 151-163.

Metodiewa, D.; Jaiswal, A. K.; Cenas, N.; Dickanaité, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *26*, 107-116.

Middleton, E.; Kandaswami, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1167-1179.

Moorhouse, C. P.; Halliwell, B.; Grootveld, M.; Gutteridge, J. M. C. Cobalt (II) ion as a promoter of hydroxyl radical and possible crypto-hydroxyl radical formation under physiological conditions – differential effects of hydroxyl radical scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *843*, 261-268.

Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P. Cillard, J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *45*, 13-19.

Stern, A. Red cell oxidative damage. In *Oxidative Stress*; Sies, H., Ed.; Academic Press, London; 1985; pp 331-349.

Stocks, J.; Dormandy, T. L. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br. J. Haematol.* **1971**, 20, 95-111.

Thornalley, R. J.; Trotta, R. J.; Stern, A. Free radical involvement in the oxidative phenomena induced by tert-butyl hydroperoxide in erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 759, 16-22.

Trotta, R. J.; Sullivan, S. G.; Stern, A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. Effects of the hexose monophosphate shunt by glutathione and ascorbate. *Biochem. J.* **1982**, 204, 405-415.

Trotta, R. J.; Sullivan, S. G.; Stern, A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. The relative roles of heme-dependent and glutathione-dependent decomposition of tert-butyl hydroperoxide and membrane lipid hydroperoxides in lipid-peroxidation and hemolysis. *Biochem. J.* **1983**, 212, 759-772.

Van der Zee, J.; Dubbelman, T. M. A. R.; van Steveninck, J. Peroxide-induced membrane damage in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 818, 38-44.

Van der Zee, J.; Van Steveninck, J.; Koster, J. F.; Dubbelman, T. M. A. R. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 980, 175-180.

Winterbourn, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 265-272.

**Table 1.** Protection by antioxidants against the oxidation of Hb (40  $\mu$ M) by 200  $\mu$ M t-BOOH and the lipid peroxidation of RBC membranes (0.5 mM Hb) by 1 mM t-BOOH.

Antioxidant	%OxyHb	nmoles TBARS/g Hb
	<i>Tert-BOOH</i> 0.2 mM (median/QI)	<i>tert-BOOH</i> 1 mM (median/QI)
Control <sup>#</sup>	49 (47-50)	50 (40-62)
Rutin (2 mM)	67 (66-68)*	20 (15-26)*
Morin (2 mM)	37 (30-37)	7.8 (6-11)*
Deferoxamine (2mM)	78 (77-79)*	35 (27-43)*
Mannitol (2 mM)	51 (51-51)	59 (49-67)
Thiourea (2 mM)	67 (67-68)*	ND
Glutathione (2 mM)	86 (85-87)*	21 (19-22)*
Diphenylamine (0.5 mM)	47 (46-48)	18 (15-22)*

The values are the median (quartile interval) of 4-5 experiments. The results were analyzed by Kruskal-Wallis Nonparametric ANOVA Test and we have determined whether there were significant differences among these groups ( $p < 0.05$ ). A distribution-free multiple comparison *post hoc* test was used to determine where the differences lay (Gad & Weil, 1999).

<sup>#</sup> No antioxidant.

\*  $p < 0.05$ , compared to the control.

## LEGENDS

Fig. 1) Effect of rutin (A) and morin (B) on hemoglobin oxidation by tert-BOOH. Hb (40  $\mu$ M) was incubated with tert-BOOH (0.2 mM) for 15 min at 37°C. The flavonoids were added immediately before the oxidant. ( $\square$ ) oxyHb, ( $\circ$ ) metHb and ( $\Delta$ ) hemichrome were calculated as described by Winterbourn (1990). Each point represents the mean  $\pm$  SD of triplicate determination in three preparations. \*\* $p < 0.01$ , compared to the absence of flavonoid.

Fig. 2) Effect of pre-incubating rutin and morin with tert-BOOH on subsequent hemoglobin oxidation. (A) without flavonoid, (B) rutin, (C) rutin pretreated with tert-BOOH, (D) morin, (E) morin pretreated with tert-BOOH. 0.5 mM flavonoid was pre-incubated with 0.3 mM tert-BOOH for 5 min at 37°C. After the addition of 40  $\mu$ M Hb, the mixture was incubated for a further 15 min at 37°C. OxyHb was calculated as described by Winterbourn (1990). The columns are the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations of three preparations. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , compared to the absence of flavonoid.

Fig. 3. Lipid peroxidation induced by t-BOOH in RBC membranes. The cell suspension (containing 0.5 mM Hb) was incubated with 1 mM tert-BOOH for 30 min at 37°C and the malondialdehyde (MDA) concentration was measured at 532 nm. Rutin ( $\square$ ) and morin ( $\circ$ ) were incubated with the RBC for 5 min before the addition of oxidant. Each point represents the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations of three preparations. \*\* $p < 0.01$ , compared to the absence of flavonoid.

Fig.01

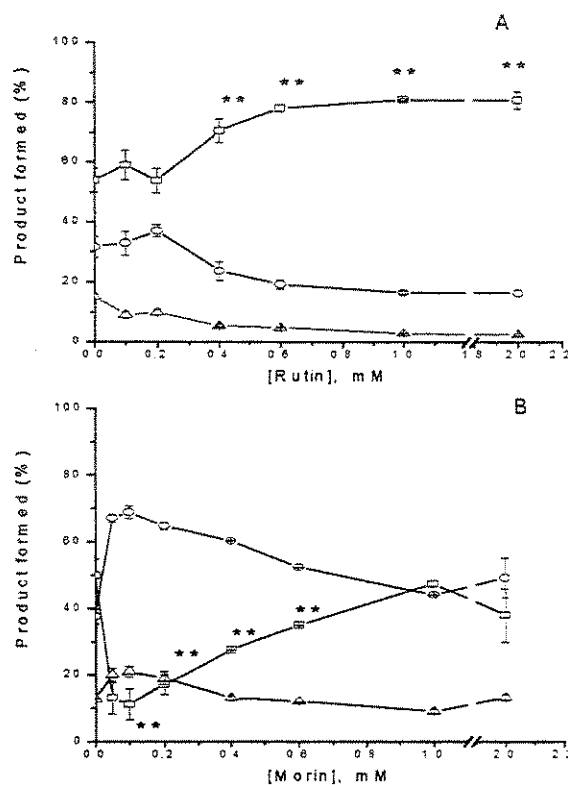


Fig. 03

