

SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE EM HEMOLISADO DE HEMÁCIAS.

Durante os mecanismos normais de produção de energia, os organismos aeróbios usam comoceptor final de elétrons a molécula de oxigênio (O_2), que recebe 4 elétrons e se reduz a H_2O . Mesmo em condições fisiológicas, cerca de 5% do O_2 consumido é reduzido parcialmente pela adição de 1 elétron, produzindo o radical ânion superóxido (O_2^-). Este, pode levar à formação de potentes oxidantes, que coletivamente são chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROS). Como as biomoléculas são bastante reduzidas, o aumento na produção de EROS pode aumentar o nível de oxidação celular. A literatura relata a ocorrência de produtos da oxidação de lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, promovida pelos EROS. Situações em que há um aumento no consumo de oxigênio ou ativação de oxidases tais como exercício físico, processos de isquemia/reperfusão e inflamação, levam ao aumento da produção de EROS. Como forma de defesa, durante a evolução, os organismos desenvolveram mecanismos para neutralizar essas espécies, o chamado sistema de defesa antioxidante. Este sistema de defesa é constituído, principalmente, pelas enzimas que detoxicam O_2^- (família SOD), H_2O_2 (catalase) e peróxidos orgânicos (glutaciona peroxidase). Além destas enzimas, existem ainda os compostos antioxidantes que ao reagirem com os EROS produzem compostos mais estáveis que podem ser excretados. Entre esses compostos merecem destaque as vitaminas E, C e A, os carotenóides os flavonóides. O desbalanço entre a produção de EROS e a atividade do sistema antioxidante caracteriza uma situação de estresse oxidativo, que tem sido relacionada a vários processos patológicos como câncer, arteriosclerose, hipertensão, processos inflamatórios e toxicidade de drogas como etanol, tetracloreto de carbono paraquat, pentaclorofenol, bromoetano, bromobenzeno, aloxanas, difenóis e quinonas. Por outro lado, a produção de EROS também está relacionada com a adaptação do indivíduo ao meio porque estimula fatores de transcrição que aumentam a síntese protéica. Assim, por exemplo, o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ativa fatores de transcrição que levam ao aumento na síntese das enzimas superóxido dismutase dependente de manganês (SOD-Mn), glutaciona S-transferase, eritropoetina e outras, relacionadas com o aumento do sistema de defesa antioxidante e com a recuperação de possíveis lesões (Kretz Remy and Arrigo in: Molecular Biology of Free Radicals in Human Diseases Aruoma & Halliwell eds., 1988) . A ação positiva dos radicais livres é ainda relacionada com a defesa do organismo porque os macrófagos digerem os patógenos bombardeando-os com EROS (Halliwell & Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, ed. Oxford, 1999).

No exercício físico a produção de EROS parece estar relacionada tanto a processos adaptativos, para melhoria da performance, quanto ao estabelecimento de processos de fadiga que tem como consequência a diminuição da performance (Venditti & Di Meo. *Int. J. Sports Med*, 18(1997)497). Este papel duplo dos EROS torna atraente a possibilidade de monitoramento do estresse oxidativo em atletas de alto nível pois seu controle pode fazer a diferença para a vitória, já que a diferença de performance entre os competidores é mínima e os treinamentos são realizados sempre muito perto do limite, o que leva a um aumento na produção de EROS (Davies, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107(1982)1198).

A literatura mostra que o processo adaptativo induzido pelo treinamento físico leva ao aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante, principalmente a glutathione peroxidase (GPx), para responder a uma maior concentração de EROS induzida pelo aumento do consumo de O₂ (Sen, C.K., *J. Appl. Physiol.* 79 (1995)675). Esta enzima reduz H₂O₂ e hidroperóxidos lipídicos a H₂O ou álcoois, substâncias não tóxicas, usando como agente redutor a glutathione reduzida (GSH) que se oxida a um dímero de glutathione oxidada (GSSG). Como a GPx tem alta afinidade por hidroperóxidos é considerada a enzima mais importante na detoxicação da célula nas situações em que a produção de EROS é baixa. É fundamental para as células manterem uma razão GSH/GSSG alta para estarem preparadas para qualquer aumento na produção de EROS. A enzima glutathione reductase (GR) participa do ciclo redox da glutathione, reduzindo a GSSG a 2 moléculas de GSH, às custas da oxidação do NADPH. Esta enzima é ativada quando há necessidade de uma reposição rápida de GSH e sua monitoração espelha o funcionamento do sistema da glutathione. Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa, mostram que a enzima GR é bastante sensível a protocolos de treinamento, sendo, portanto, um bom marcador do processo adaptativo induzido pelo exercício (Smolka et al, *Am.J.Physiol.*(2000) 279).

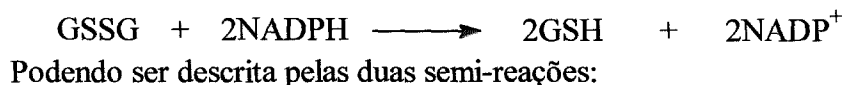
Dentro deste contexto, é muito importante o desenvolvimento de novas metodologias para determinar parâmetros de estresse oxidativo de maneira rápida, precisa e com equipamentos que possam ser utilizados no campo. Os sensores amperométricos apresentam-se como uma ferramenta ideal para o monitoramento destes parâmetros em campo, porque permitem metodologias simples, pequena quantidade de amostra, respostas rápidas e equipamentos pequenos, que não demandam uma grande fonte de energia. O sensor amperométrico para dosagem da atividade da enzima GR apresenta-se como um instrumento útil para monitorar atividades e tratamentos que levem a situações de estresse oxidativo, em atletas ou pacientes, de forma eficiente e rápida. Destaque ainda para o baixo custo, já que

neste sensor usa-se apenas 7 μL de meio de reação, ao passo que no espectrofotômetro se usaria, no mínimo, 1 mL. O volume de amostra também é muito menor, já que para preparar 3 μL de hemolisado de hemácias pode se usar uma gota de sangue, retirada do dedo ou do lóbulo da orelha do sujeito. Isto permite que a análise seja feita “in situ”, garantindo diagnósticos mais rápidos e fidedignos, permitindo uma intervenção mais rápida visando neutralizar os efeitos do estresse.

O uso deste sensor, permite a intervenção rápida da equipe técnica, durante o treinamento de atletas. Caso a atividade da GR em um atleta caia, pode-se prescrever um treinamento mais leve e aeróbio para fortalecer o sistema antioxidante. A recuperação também pode ser acompanhada pelo aumento na atividade desta mesma enzima no plasma. Após a recuperação do sistema antioxidante, o atleta poderá então aumentar a carga de treino, na certeza de que seu sistema de defesa antioxidante está preparado para isso. Hoje este tipo de exame pode ser feito em laboratórios bastante específicos, sendo portanto caro e de acesso restrito, mesmo nos grandes centros desportivos.

Para as outras situações descritas como: processos inflamatórios, câncer, AIDS, etc. onde a monitoração do estresse oxidativo é um importante dado para diagnosticar e avaliar a evolução do tratamento, a utilização deste biossensor, permite de forma rápida e precisa prática e econômica o acompanhamento preciso da recuperação.

O método descrito neste projeto, baseia-se no princípio de que a reação catalisada pela enzima glutationa redutase é uma reação de oxido redução:



A voltam utilizada permite a monitoração da formação destas duas espécies: GSH e NADPH.

O sistema apresentado neste processo foi desenvolvido utilizando-se dois eletrodos de platina ligados a um amperímetro, conforme demonstrado na Figura 1. Os eletrodos, são imobilizados entre duas placas de teflon, sendo que a placa de cima possui um orifício, que ao sistema ser montado dá origem a uma cavidade onde vai ocorrer a reação. Sobre os eletrodos é colocada uma membrana hidrofóbica (PVDF, 0,45 μm – Millipore) sobre a qual é

depositado o meio de reação e a amostra, nos momentos adequados, conforme descrito abaixo. Coloca-se 7 μL do meio de reação e após 3 minutos de estabilização, adiciona-se 3 μL da amostra e acompanha-se a variação da corrente aplicando uma diferença de potencial entre os eletrodos de platina de -300 mV durante 3 minutos registrando-se a corrente (nA) antes e após a adição da amostra. Desse valor é descontado o valor da variação da corrente quando se adicionou, nas mesmas condições somente 3 μL do tampão no qual está dissolvida a enzima ou as amostras de hemolisado (branco).

As amostras para fazer a curva padrão apresentada na figura 1 foram preparadas dissolvendo-se quantidade adequadas da enzima pura em tampão fosfato 0,2 M com EDTA 1 mM, pH 7,4.

A amostra de hemolisado de hemácias foi preparada com sangue total hemolisado (1:1 com água) diluído 20 vezes com tampão fosfato 0,2 M/EDTA 1 mM pH 7,4.

O meio de reação é constituído de tampão fosfato 0,2M /EDTA 1 mM, pH 7,4, DTNB 3 mM, NADPH 2 mM, e GSSG 20 mM (Smith et al, Anal.Biochem175 (1988) 408).

Nas condições aqui apresentadas, usando-se uma diferença de potencial de -300 mV, o aumento da corrente observado, pode ser relacionado à oxidação do NADPH. A adição de DTNB serviu para tornar a reação mais estável, retirando o produto da reação a GSH.

A Figura 2 mostra que o sensor é sensível na faixa de atividade da GR que varia de 0,025 a 0,40 UI/mL, $r = 0,9989$ e $p < 0,0001$. A tabela 1 mostra que para amostras de hemolisado de hemácias, não houve diferenças significativas (desvio relativo $< 10\%$) quando os valores obtidos pelo biossensor são comparados com os obtidos no método espectrofotométrico descrito por Smith et al (Anal. Biochem. 175 (1988) 408).

Estes dados mostram que o biossensor apresentou sensibilidade comparada ao método clássico, com a vantagem de poder ser utilizado fora do laboratório, "in situ", permitindo um diagnóstico rápido, preciso e barato e assim tornando possível sua utilização por profissionais da saúde e do esporte para monitoramento de estresse oxidativo em atletas e pacientes.

Tabela 1

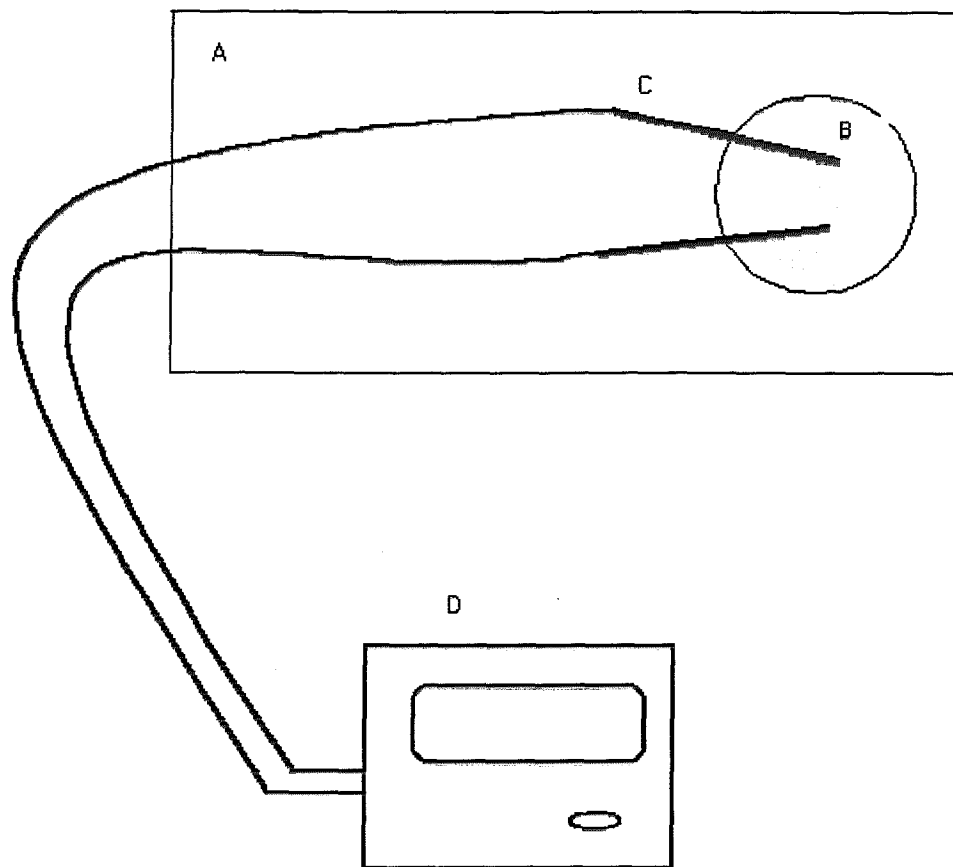
Amostras Homogenato de hemácias	GR (UI/mL)		Desvio relativo (%)***
	Método espectrofotométrico*	Método amperométrico**	
1	0,102 ± 0,004	0,096 ± 0,02	5,6
2	0,120 ± 0,006	0,109 ± 0,04	9,7
3	0,138 ± 0,01	0,137 ± 0,04	-0,1
4	0,132 ± 0,01	0,126 ± 0,03	4,2
5	0,114 ± 0,02	0,122 ± 0,05	-6,8
6	0,106 ± 0,04	0,104 ± 0,02	2,1
7	0,152 ± 0,02	0,146 ± 0,02	3,8
8	0,176 ± 0,04	0,169 ± 0,05	4,0

* Utilizando o método descrito por Smith et al, Anal.Biochem. 175 (1988) 408

** Utilizando o sensor descrito neste processo.

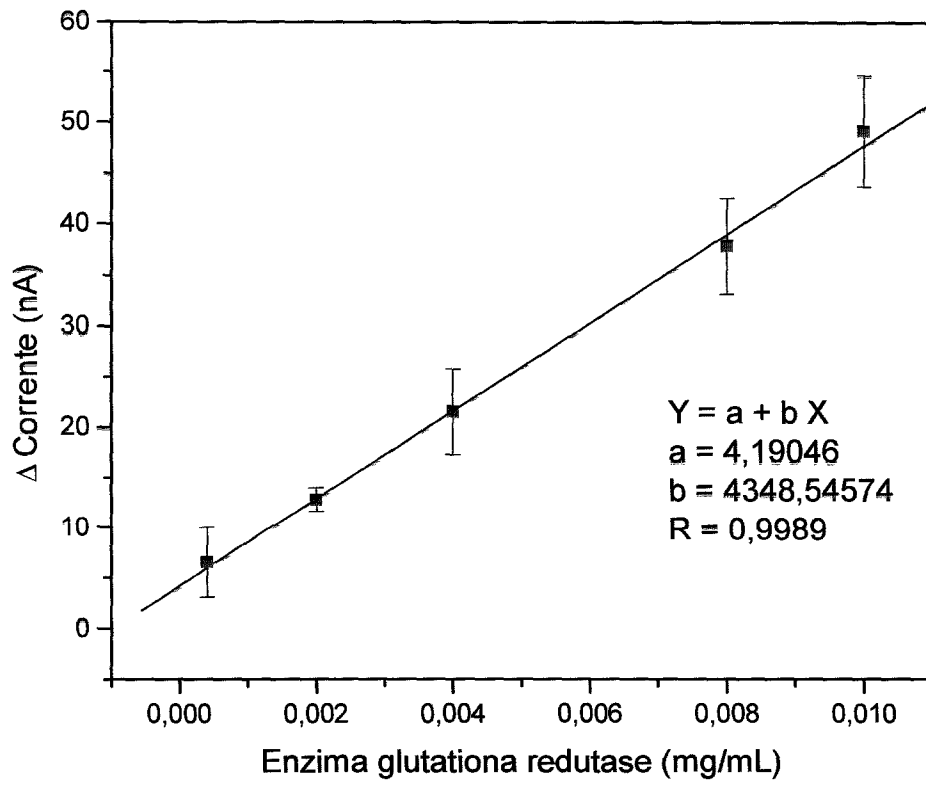
*** Desvio percentual dos dados do método amperométrico utilizando o método

5 espectrofotométrico como referência.



- A – Placas de teflon
- B - Membrana hidrofóbica
- C - Eletrodos de platina
- D - Amperímetro

Figura 1.

**Figura 2**

REIVINDICAÇÕES

1. “SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE EM HEMOLISADO DE HEMÁCIAS”

caraterizado pela construção de um sistema amperométrico, capaz de determinar e quantificar a atividade da enzima glutaciona redutase.

2. “SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE EM HEMOLISADO DE HEMÁCIAS”

caraterizado por usar o sensor amperométrico para análise da atividade da enzima glutaciona redutase em amostras de hemolisado de hemácias e correlacionar os resultados com variações no nível de estresse oxidativo de indivíduos expostos a estresse por patologias ou pelo treinamento físico.

3. “SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE EM HEMOLISADO DE HEMÁCIAS”

caraterizado por usar o sensor amperométrico para análise de estresse oxidativo em indivíduos.

RESUMO

SENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE EM HEMOLISADO DE HEMÁCIAS.

5 Este processo descreve o desenvolvimento de um sistema amperométrico para dosagem da atividade da enzima glutatona redutase em hemolisado de hemácias.

O substrato da enzima (GSSG), sua coenzima (NADPH) e um oxidante da glutatona reduzida (DTNB), diluídos em tampão fosfato/EDTA foram depositados em cima de uma membrana lipofílica disposta sobre 2 eletrodos de platina. A amperagem foi monitorada durante 3 minutos após a adição da amostra. A aplicabilidade deste sistema foi avaliada em 10 amostras de hemolisado de hemácias e sua eficiência foi comparada com o método espectrofotométrico de dosagem da atividade da enzima. As vantagens deste novo método são a rapidez e confiabilidade do resultado e a facilidade de ser usado fora do laboratório, permitindo seu uso por profissionais do esporte e da medicina na avaliação de estresse oxidativo.