

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

BRUNA STEFANIA CARVALHO DOS SANTOS

IMPACTO DA TERAPIA COM A HIDROXIUREIA E DOS HAPLÓTIPOS  
NO PERFIL OXIDATIVO NA ANEMIA FALCIFORME

FORTALEZA

2011

BRUNA STEFANIA CARVALHO DOS SANTOS

**IMPACTO DA TERAPIA COM A HIDROXIURÉIA E DOS HAPLÓTIPOS  
NO PERFIL OXIDATIVO NA ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

FORTALEZA  
2011

S234i Santos, Bruna Stefania Carvalho dos  
Impacto da terapia com hidroxiuréia e dos haplótipos no  
perfil oxidativo na anemia falciforme./ Bruna Stefania  
Carvalho dos Santos. – Fortaleza, 2011.  
94f.: il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Romélia Pinheiro Gonçalves  
Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade  
Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-  
Graduação em Patologia.

1. Anemia falciforme 2. Estresse oxidativo 3. Hidroxiuréia  
4. Haplótipos I. Gonçalves, Romélia Pinheiro (Orient.) II.  
Título.

CDD: 616.1527

BRUNA STEFANIA CARVALHO DOS SANTOS

**IMPACTO DA TERAPIA COM A HIDROXIURÉIA E DOS HAPLÓTIPOS NO PERFIL  
OXIDATIVO NA ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Curso de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dra. Daniela Maria Ribeiro  
Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP

---

Profa. Dra. Margarida Maria Lima Pompeu  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Ao meu filho Heitor,  
a maior dádiva que Deus colocou em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Essa pesquisa não é mérito de uma pessoa, mas sim do trabalho conjunto de muitos profissionais, que juntos, foram essenciais na construção dessa conquista. Assim, agradeço a todos e com especial carinho:

Agradeço a Deus, em todo tempo e a qualquer hora ao meu lado;

À minha Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, que me orientou nessa jornada, sempre mostrando os melhores caminhos a serem seguidos. Obrigada pela compreensão, carinho, força e amizade. Sem ela nada disso seria possível;

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Patologia, pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento desse projeto;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia, que serão sempre lembrados pelos valorosos ensinamentos;

Aos amigos e companheiros mestrandos da pós-graduação em Patologia, que participaram desse importante momento em minha vida;

Aos funcionários do setor de coleta do Hemoce, pela disponibilidade e auxílio na coleta das amostras;

Aos professores e funcionários do Curso de Farmácia da UFC, que direta ou indiretamente contribuíram na realização desse projeto;

Ao Prof. Dr. Hemerson Iury Magalhães. Obrigada pela inestimável colaboração, sincera disponibilidade e pelos valorosos conselhos;

À Dra. Rosangela Pinheiro Gonçalves. Obrigada pelas sugestões e ensinamentos ao longo do projeto;

Às professoras, Iêda Pereira e Alcínia Braga, aos servidores, Francisca e Eduardo, e a todos os estagiários e monitores do Laboratório de Hematologia. Obrigada pela amizade e colaboração;

Aos meus queridos amigos Lilianne, Darcielle, Geane, Michelle, Carlivânia e Paulo. Um grupo unido pelo amor à Ciência, pelo companheirismo e pela amizade sincera. Obrigada pelo apoio e paciência com o meu “estresse”. Estarão sempre em meu coração;

À minha grande amiga e “anjo-da-guarda” Maritza, do início ao fim sempre ao meu lado, e aos amigos Luana e Thiago. Obrigada pelo incentivo, carinho e amizade, tornando esses anos mais fáceis;

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo amor incondicional e por me ensinarem a importância de cultivar os valores da honestidade, respeito e amor ao próximo;

Ao meu marido Nilson, por ser o primeiro e principal incentivador nessa minha caminhada;

Ao meu filho Heitor. Obrigada, por nos momentos mais difíceis, com seu sorriso encher a minha vida de alegria e entusiasmo;

Aos pacientes com anemia falciforme que consentiram na participação desse trabalho. A vocês o meu sincero respeito e gratidão.

“ Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão,  
perder com classe  
e vencer com ousadia...  
Pois o triunfo pertence a quem se atreve.”

(Charles Chaplin)

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma das alterações genéticas mais comuns em nosso país. Os haplótipos da  $\beta^s$ -globina estão associados com a heterogeneidade clínica apresentada pela doença. Os portadores de AF são submetidos a elevados níveis de estresse oxidativo. A hidroxiureia (HU) tem sido utilizada no tratamento por sua ação de elevar os níveis de hemoglobina fetal e ação antioxidant. O estudo teve como objetivo investigar o impacto do uso da HU e dos haplótipos no perfil oxidativo nos pacientes com AF. Foram analisadas amostras de 64 pacientes acompanhados no Hospital Universitário Walter Cantídio - HUWC e do grupo controle de 20 indivíduos sem hemoglobinopatias. Os pacientes foram estratificados em grupos: uso de HU  $> 1$  ano, uso de HU  $\leq 1$  ano e sem uso de HU (SHU). A confirmação do diagnóstico e a análise dos haplótipos foram realizadas através de estudo molecular. As dosagens do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), malonaldeído (MDA), glutationa peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), glutationas total (GSSG+GSH), oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) e da relação GSSG/GSH (glutationas oxidada/reduzida) foram realizadas por espectrofotometria. Os níveis médios de  $\text{NO}_2^-$ , e MDA mostraram-se mais elevados no grupo SHU, sendo significante apenas para o MDA ( $p < 0,05$ ). O grupo SHU apresentou atividade média das enzimas CAT ( $p = 0,031$ ) e GSH-Px ( $p = 0,036$ ) inferiores aos demais grupos e maior relação GSSG/GSH ( $p < 0,05$ ). A avaliação do estresse oxidativo em relação aos haplótipos demonstrou que na população sem uso de HU os níveis de  $\text{NO}_2^-$  e de MDA foram semelhantes entre os grupos, com um aumento não significante da GSH-Px no grupo Bantu/n em relação ao Benin/n e do índice GSSG/GSH no grupo Benin/n em relação ao Bantu/n. Na população em uso de HU verificou-se um aumento não significante dos níveis de  $\text{NO}_2^-$  no grupo Bantu/n em relação ao Benin/n com resultados semelhantes de MDA entre os grupos e um aumento significante da GSH-Px ( $p < 0,03$ ) no grupo Benin/n em relação ao Bantu/n. Os resultados da CAT foram semelhantes entre os grupos. A relação GSSG/GSH foi maior, porém não significante no grupo Bantu/n em relação ao Benin/n. Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que os pacientes com AF apresentam um estado hiperoxidativo com níveis elevados dos produtos do estresse oxidativo e diminuídos do perfil antioxidant. e que a hidroxiureia teve um impacto sobre o perfil oxidativo. No entanto, em relação ao impacto dos haplótipos no estresse oxidativo, estudos posteriores com uma maior amostragem devem ser recomendados para confirmar nossos resultados, considerando que o grupo de pacientes não tratados com HU foi menor que o grupo de pacientes em uso de HU, o que pode ter interferido na análise estatística dos resultados.

**Palavras-chaves:** Anemia falciforme. Estresse oxidativo. Hidroxiureia. Haplótipos.

## ABSTRACT

The sickle cell anemia is one of the most common genetic disorders in our country. The  $\beta$ -globin haplotypes are associated with the clinical heterogeneity of the disease. Individuals with sickle cell disease are subjected to high levels of oxidative stress. Hydroxyurea (HU) has been used as treatment and it increases the levels of fetal hemoglobin having an action antioxidant. The study aimed to investigate the impact of the use of HU and haplotypes in the oxidative status in patients with sickle cell anemia. Samples from 64 patients treated at the University Hospital Walter Cantídio - HUWC and the control group of 20 individuals without hemoglobinopathies. Patients were stratified into groups: the first one using  $HU > 1$  year, the second using  $HU \leq 1$  year and the third using of HU (SHU). Confirmation of the diagnosis and analysis of haplotypes were performed by molecular study. The measurements of nitrite ( $NO_2^-$ ), malonaldehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), glutathione total (GSSG+GSH), oxidized (GSSG) and reduced (GSH) and the ratio GSSG/GSH (glutathione oxidized/reduced) were performed by spectrophotometry. Mean levels of  $NO_2^-$  and MDA were shown to be higher in SHU group, being significant only for MDA ( $p < 0,05$ ). The assessment of oxidative stress in relation to haplotypes showed that the population without the use of HU levels of  $NO_2^-$  and MDA were similar between groups, with an insignificant increase of GSH-Px in the Bantu/n compared with Benin/n and index GSSG/GSH in the Benin/n compared with Bantu/n. In the population using the HU there was a nonsignificant increase in the levels of  $NO_2^-$  in the Bantu/n compared with Benin/n with similar results between groups of MDA and a significant increase in GSH-Px ( $p < 0,03$ ) in the Benin/n compared with Bantu/n. The results of CAT were similar between groups. The ratio of GSSG/GSH was higher but not significant in the Bantu/n compared to Benin/n. The results of this study support the hypothesis that patients with the sickle cell anemia have a state hiperoxidativo products with high levels of oxidative stress and decreased antioxidant status and that of hydroxyurea had an impact on oxidative stress. However, regarding the impact of the haplotypes in oxidative stress, further studies with a larger sample should be recommended to confirm our results, considering that the group of patients not treated with HU was lower than the group of patients using HU, the which may have interfered in the statistical analysis of results.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Oxidative stress. Hydroxyurea. Haplotypes.

## LISTA DE FIGURAS

1. Representação da estrutura da molécula de hemoglobina .....	17
2. Estrutura dos grupamentos gênicos ( <i>cluster</i> ) dos genes das cadeias $\alpha$ e $\beta$ nos cromossomos 11 e 16 e a produção das proteínas globínicas humanas.....	19
3. Fisiopatologia da anemia falciforme.....	24
4. Haplótipos $\beta^S$ . Representação do <i>cluster</i> do gene da $\beta$ -globina com identificação dos polimorfismos de acordo com os sítios de clivagem pelas endonucleases de restrição.....	29
5. Produção de óxido nítrico (NO) catalisada pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina.....	33
6. Reações do óxido nítrico (NO) com a molécula de hemoglobina.....	34
7. Etapas da peroxidação lipídica .....	35
8. Reações de Fenton e Haber-Weiss .....	37
9. Principais vias de defesa antioxidante envolvidas no metabolismo de radicais livres em eritrócitos humanos normais.....	39
10. Ciclo da glutationa. Conversão de glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutationa peroxidase (GSH-Px) e glutationa oxidase (GO) e glutationa redutase (GR) .....	41
11. Mecanismos de ação das enzimas antioxidantes nos eritrócitos falciformes .....	44
12. Produção de óxido nítrico (NO) pela hidroxiuréia.....	46
13. Representação esquemática do delineamento do estudo .....	51

## **LISTA DE GRÁFICOS E QUADROS**

Gráfico 1. Distribuição da idade dos pacientes por grupo .....	61
Gráfico 2. Distribuição dos pacientes em relação ao sexo .....	62
Gráfico 3. Distribuição dos pacientes em relação à etnia .....	62
Gráfico 4. Valores médios de HbF entre os grupos estudados .....	64
Gráfico 5. Valores médios de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> nos grupos estudados .....	65
Gráfico 6. Valores médios de MDA nos grupos estudados.....	65
Gráfico 7. Níveis médios da atividade enzimática da CAT em relação aos grupos estudados .....	66
Gráfico 8. Níveis médios da atividade enzimática da GSH-Px em relação aos grupos estudados .....	67
Gráfico 9. Concentrações média da glutationa nos grupos estudados .....	68
Quadro 1. Sequência dos oligonucleotídeos e enzimas utilizadas para a detecção dos haplótipos da anemia falciforme; regiões dos sítios polimórficos; tamanho dos fragmentos gerados antes e após clivagem .....	54
Quadro 2. Padrão de polimorfismos para cada haplótipo .....	58

## **LISTA DE TABELAS**

1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos pacientes com anemia falciforme .....	63
2. Distribuição dos haplótipos na população estudada.....	69
3. Distribuição dos haplótipos na população estudada em relação ao uso ou não de HU.....	70
4. Valores médios e desvio padrão do perfil oxidativo nos haplótipos dos pacientes sem tratamento (SHU) e em tratamento com a HU.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Anemia falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
CAT	Catalase
CO	Monóxido de carbono
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMT	Dose máxima tolerada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	Ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzóico
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
EDTA	Etileno-diamino-tetracético
ERC	Espécies reativas do carbono
ERCl	Espécies reativas do cloro
ERS	Espécies reativas do enxofre
ERNs	Espécies reativas do nitrogênio
EROs	Espécies reativas do oxigênio
Fe <sup>+2</sup>	Ferro ferroso
Fe <sup>+3</sup>	Ferro férlico
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GO	Glutationa oxidase
GR	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidada
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A (hemoglobina normal)
HbA <sub>2</sub>	Hemoglobina A <sub>2</sub>
HbC	Hemoglobina C
HbF	Hemoglobina fetal

HbS	Hemoglobina S
HbAS	Heterozigose da hemoglobina S
HbSC	Heterozigose para hemoglobina S e C
HbS/ $\beta^+$ talassemia	Heterozigose para hemoglobina S e $\beta$ -talassemia
HbSS	Homozigose para HbS
HClO	Ácido hipocloroso
HU	Hidroxiuréia
LCR	<i>Locus control region</i>
MDA	Malonaldeído
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Óxido nitroso
NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato
NEED	Cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio <i>singlet</i>
OH	Radical hidroxila
ONOO	Peroxinitrito
PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase
PCR-RFLP	PCR para polimorfismo dos fragmentos de restrição
QTL	<i>Quantitative trait loci</i>
RO	Radical alcoxila
ROO	Radical peroxila
SOD	Superóxido dismutase
STA	Síndrome torácica aguda
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
VCAM-1	Molécula de adesão vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	17
<b>1.1</b>	<b>Hemoglobina humana.....</b>	17
<b>1.2</b>	<b>Hemoglobinopatias hereditárias .....</b>	19
<b>1.3</b>	<b>Anemia falciforme .....</b>	20
1.3.1	Dados epidemiológicos.....	20
1.3.2	Alteração molecular dos eritrócitos com HbS .....	21
1.3.3	Mecanismos envolvidos na fisiopatologia na anemia falciforme .....	23
1.3.4	Principais manifestações clínicas na anemia falciforme.....	25
1.3.5	Os haplótipos na anemia falciforme .....	28
<b>1.4</b>	<b>Hemoglobina fetal .....</b>	30
<b>1.5</b>	<b>Radicais livres.....</b>	31
1.5.1	Óxido nítrico .....	33
1.5.2	Peroxidação lipídica .....	35
<b>1.6</b>	<b>Estresse oxidativo nos eritrócitos normais .....</b>	36
<b>1.7</b>	<b>Defesas antioxidantes do eritrócito normal .....</b>	38
<b>1.8</b>	<b>O estresse oxidativo na anemia falciforme.....</b>	42
<b>1.9</b>	<b>Hidroxiuréia.....</b>	44
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	48
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	48
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	48
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	49
<b>3.1</b>	<b>Casuística .....</b>	49
3.1.1	Grupo de estudo .....	49
3.1.2	Grupo controle .....	50
<b>3.2</b>	<b>Local do estudo .....</b>	50
<b>3.3</b>	<b>Aspectos éticos .....</b>	50
<b>3.4</b>	<b>Métodos .....</b>	51
3.4.1	Amostras clínicas .....	51
3.4.2	Análise hematológica .....	52
3.4.3	Eletroforese em pH alcalino em fitas de acetato de celulose.....	52
3.4.4	Análises moleculares .....	53

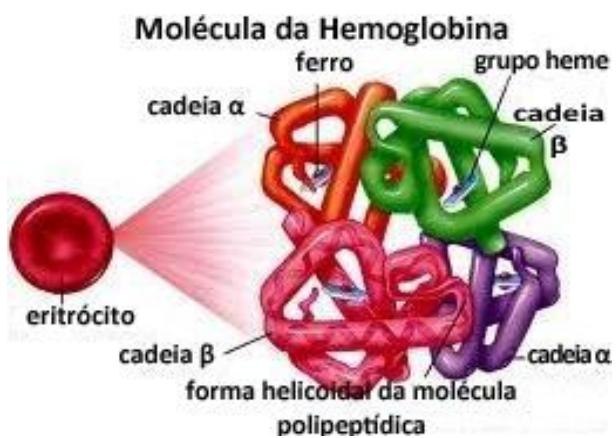
3.4.5	Análise do perfil oxidativo .....	58
<b>3.5</b>	<b>Avaliação do perfil oxidativo em relação aos haplótipos na AF.....</b>	<b>60</b>
<b>3.6</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Características da amostragem.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>Características hematológicas dos pacientes estudados de acordo com o tratamento.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3</b>	<b>Níveis médios de HbF em relação ao tratamento com hidroxiuréia .....</b>	<b>63</b>
<b>4.4</b>	<b>Comparações dos parâmetros oxidativos entre os indivíduos estudados .....</b>	<b>64</b>
4.4.1	Níveis médios de NO <sub>2</sub> e MDA entre os grupos estudados .....	64
4.4.2	Níveis médios da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px) entre os grupos .....	66
4.4.3	Concentrações média de glutationa entre os grupos estudados .....	67
4.4.4	Estudo do perfil oxidativo em relação aos haplótipos nos pacientes com anemia falciforme .....	69
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>		<b>78</b>
<b>APÊNDICE .....</b>		<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Hemoglobina humana

A hemoglobina (Hb) é uma proteína presente no interior dos eritrócitos e tem como principal função transportar o oxigênio ( $O_2$ ) dos pulmões para os tecidos, mas também, especificamente, interagir com outros três gases, o dióxido de carbono ( $CO_2$ ), o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO), que desempenham importantes funções biológicas (MARENKO-ROWE, 2006; SCHECHTER, 2008).

A molécula de hemoglobina apresenta-se como uma estrutura tetramérica composta por um conjunto de quatro cadeias ou subunidades polipeptídicas simétricas, dispostas em pares, denominadas de globinas. As combinações entre as diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nos eritrócitos. As cadeias globínicas se agrupam, normalmente, em pares, de acordo com o tipo de hemoglobina, sendo um par denominado cadeias tipo alfa ( $\alpha$ - alfa,  $\zeta$ - zeta) e outro par cadeias tipo beta ( $\beta$ -beta,  $\delta$ -delta,  $\gamma$ -gama,  $\epsilon$ -épsilon). As cadeias polipeptídicas da hemoglobina, predominante no adulto, são de dois tipos, cadeias alfa ( $\alpha$ ), que possuem uma seqüência de 141 aminoácidos, e cadeias beta ( $\beta$ ), de 146 aminoácidos, ambas similares em comprimento, mas diferindo na seqüência de aminoácidos (Figura 1). As propriedades funcionais da hemoglobina são determinadas, principalmente, pelas características dos aminoácidos presentes em suas cadeias globínicas (WEATHERALL; PROVAN, 2000; MARENKO-ROWE, 2006; SCHECHTER, 2008).



**Figura 1** - Representação da estrutura da molécula de hemoglobina.

Fonte: adaptado de MADER, 1997.

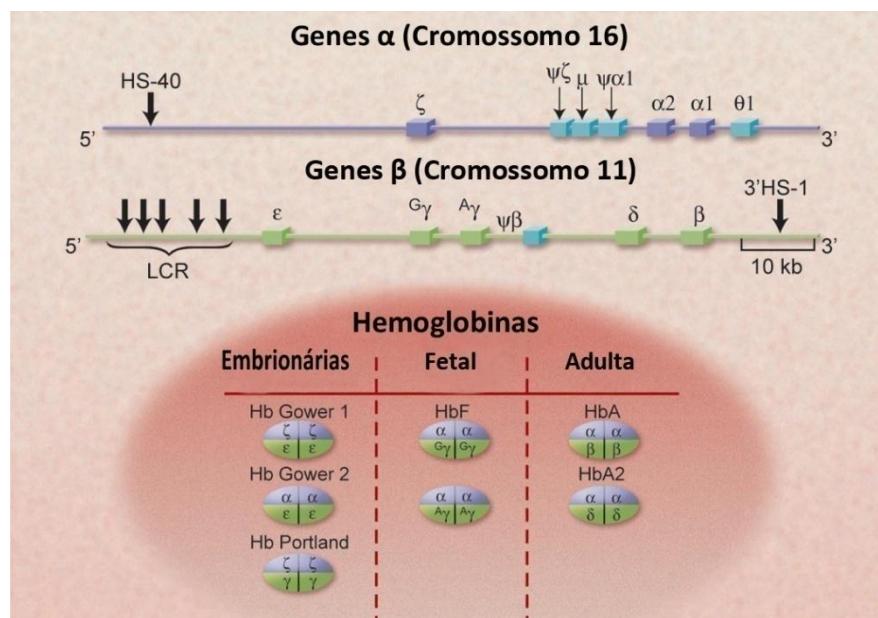
As hemoglobinas são constituídas através da interação das cadeias polipeptídicas do tipo  $\alpha$  e  $\beta$  a um núcleo central, formado por um grupo prostético heme (ferro-protoporfirina IX), através de ligações não-covalentes. Os quatro átomos de ferro, presentes em cada núcleo central, estão na forma de íons de ferro ferroso ( $Fe^{+2}$ ) e encontram-se protegidos estruturalmente do contato com o meio aquoso. Cada íon  $Fe^{+2}$  dispõe-se unido a um átomo de nitrogênio e a um átomo de molécula gasosa na posição oposta. A ligação reversível destas moléculas aos átomos de  $Fe^{+2}$  e o arranjo espacial das cadeias globínicas determinam a afinidade, solubilidade e estabilidade das moléculas dos gases ( $O_2$ , CO e NO), permitindo o transporte destes pela hemoglobina (WEATHERALL; PROVAN, 2000; MARENGO-ROWE, 2006; SCHECHTER, 2008).

Os genes que codificam a síntese de cada uma das cadeias globínicas estão organizados em complexos multigênicos denominados de grupamentos gênicos (*cluster*). O grupamento gênico  $\alpha$  localiza-se na região telomérica no braço curto do cromossomo 16, com aproximadamente 30 kb, sendo composto pelos genes  $\alpha$  (genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), que codificam as cadeias globínicas  $\alpha$ , um gene para a cadeia polipeptídica embrionária  $\zeta^2$ , pelos pseudogenes  $\alpha$  ( $\psi\alpha_1$  e  $\psi\alpha_2$ ) e  $\zeta$  ( $\psi\zeta_1$ ) e por um gene de função indeterminada  $\Theta$  (teta) (16p 13.3) (WEATHERALL; PROVAN, 2000; SONATI; COSTA, 2008). A expressão do gene da  $\alpha$ -globina parece ser controlada por uma região na posição 5' do DNA, denominada de sítio hipersensível 40 (HS-40), que promove a transcrição de fatores eritróides específicos ligados ao gene  $\alpha$  (HIGGS *et al.*, 2005; SCHECHTER, 2008).

O grupamento gênico  $\beta$ , de aproximadamente 70 kb, encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 11, e inclui os genes que codificam para as cadeias  $\beta$ , genes para cadeias  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ( $\gamma^A$  e  $\gamma^G$ ) e pseudogene  $\beta$  ( $\psi\beta$ ) (11p 15.5) (WEATHERALL; PROVAN, 2000; ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000; STEINBERG, 2005). A expressão gênica do grupamento  $\beta$  é regulada por uma região localizada na posição 5' deste, denominada região controladora do *locus* (*locus control region* - LCR), possuindo 5 sítios hipersensíveis à clivagem pela DNase I (OGEDEGBE, 2007) e é essencial para a expressão de todos os genes do complexo (THEIN, 2005).

A molécula de hemoglobina é produzida em estágios específicos durante o desenvolvimento humano, levando à produção de vários tipos de hemoglobinas, incluindo as hemoglobinas embrionárias, a hemoglobina fetal (HbF), a hemoglobina A (HbA) e a hemoglobina A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>) (HARJU, McQUENN; PETERSON, 2002; OGEDEGBE, 2007). Durante o período embrionário os genes  $\zeta$  e  $\epsilon$  são, inicialmente, expressos no saco vitelínico,

na região para-áortica e, posteriormente, no fígado, resultando na produção das hemoglobinas embrionárias Gower I ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) e Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ). Aproximadamente após a 12º semana gestacional, ocorre a supressão destes genes pela expressão de 2 genes  $\alpha$  e 2 genes  $\gamma$ , induzindo a produção de HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Durante o período fetal, a HbF é sintetizada no fígado e baço. Por volta do 7º mês de vida intra-uterina, a medula óssea assume o comando da produção celular. Após o nascimento, as cadeias  $\gamma$  são gradualmente substituídas pelas cadeias  $\beta$  e  $\delta$  dando lugar as HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) e A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ). Seis meses após o nascimento, predomina a HbA, tornando-se mais de 95% do total da Hb celular, enquanto que os níveis de HbA<sub>2</sub> correspondem de 3-5% e HbF de 0-2% (WEATHERALL; CLEGG, 2001; TORRES; BONINI-DOMINGOS, 2005; SONATI; COSTA, 2008) (Figura 2).



**Figura 2** - Estrutura dos群amentos gênicos (*cluster*) dos genes das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  nos cromossomos 11 e 16 e a produção das proteínas globínicas humanas.  
LCR: região controladora do *locus*.

Fonte: SCHECHTER, 2008.

## 1.2 Hemoglobinopatias hereditárias

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações que afetam os genes da porção globínica da molécula de hemoglobina, com ampla distribuição mundial. Essas alterações, em sua maioria, são representadas por mutações

pontuais em um único nucleotídeo, podendo, ainda, serem originadas por microinserções ou microdeleções, deleções ou *crossing over* desiguais entre cromátides parentais (BERTHOLO, MOREIRA, 2006; SONATI; COSTA, 2008).

Mutações nos genes das globinas podem levar à produção de hemoglobinas estruturalmente alteradas, a maioria ocasionada por simples substituições de bases no DNA, com a correspondente troca de aminoácidos na proteína. Embora maior parte das alterações ocorra em cadeias  $\beta$ , alterações de cadeias  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são também relativamente comuns (KIMURA *et al.*, 2008).

As hemoglobinopatias podem ser classificadas em Hb variantes ou anômalas, resultantes de alterações estruturais, geralmente originadas por substituições simples, pequenas inserções ou deleções de bases que afetam regiões codificantes dos genes, dando origem à substituição de aminoácidos na cadeia da proteína. As talassemias resultam de alterações na síntese, onde um ou mais tipos de cadeias da globina são parcial ou completamente suprimidas e, menos freqüentemente, podem ocorrer combinações destes dois fenótipos (WEATHERALL; PROVAN, 2000; SONATI; COSTA, 2008).

As hemoglobinopatias estão entre as doenças monogênicas mais comuns, com mais de 1.000 alelos mutantes diferentes identificados por testes moleculares (OLD, 2003). No Brasil as hemoglobinopatias constituem um problema de saúde pública (GUIMARÃES; COELHO, 2010). Na população brasileira podemos observar, mais comumente, alterações representadas pelas hemoglobinas S (HbS) e C (HbC), ambas de origem africana, mostrando a intensa participação do negro na composição populacional brasileira. As talassemias são mais freqüentes em regiões que tiveram maior participação da colonização italiana, enquanto que hemoglobinas variantes raras como, D, J, I, N, e G, são encontradas em diferentes localidades do Brasil (ORLANDO *et al.*, 2000).

### 1.3 Anemia Falciforme

#### 1.3.1 Dados epidemiológicos

O gene da HbS apresenta uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado em grande parte da África, Oriente Médio, Índia e em algumas regiões do Mediterrâneo (OGEDEGBE, 2007). A maior prevalência ocorre na África tropical e entre a

população negra de países que participaram do tráfico de escravos (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005). Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial seja acometida por hemoglobinopatias representadas, na sua maioria, pelas talassemias e pela doença falciforme (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A anemia falciforme (AF) afeta milhões de pessoas no mundo ocorrendo, aproximadamente, em 1 a cada 500 nascimentos de afro-americanos e em 1 a cada 1.000-4.000 nascimentos de hispano-americanos (GONÇALVES *et al.*, 2003). Estima-se que 80.000 americanos tenham a doença, e cerca de 9% dos afro-americanos apresentem o traço falciforme (OGEDEGBE, 2002).

A HbS foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos africanos. No Brasil se distribuiu heterogeneamente, sendo mais freqüente onde a proporção de antepassados africanos da população é maior (RAMALHO; GIRALDI; MAGNA, 2008), ocorrendo principalmente na região nordeste do país e nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Nessas regiões, observa-se o surgimento de um novo caso de doença falciforme para cada 1.000 nascimentos (LOBO *et al.*, 2003).

A AF é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil, onde se estima a ocorrência de, aproximadamente, 25.000 a 30.000 casos de indivíduos portadores da forma homozigótica (HbSS) da HbS, sendo predominantemente observada entre os afro-descendentes (CANÇADO; JESUS, 2007), acometendo de 0,1% a 0,3% da população negra brasileira com tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população, devido ao alto grau de miscigenação em nosso país (DI NUZZO; FONSECA, 2004).

### 1.3.2 Alteração molecular dos eritrócitos com HbS

A AF foi descrita pela primeira vez em 1910, por Herrick que observou as manifestações clínicas e hematológicas da doença em um paciente anêmico indiano. Em 1945, Pauling e colaboradores (1949), determinaram que uma mutação pontual no gene que codifica a cadeia  $\beta$  da molécula de hemoglobina resultaria na hemoglobina da célula falciforme ou HbS. Esta hipótese foi validada em 1949, pela demonstração da migração diferencial de hemoglobina falciforme versus hemoglobina normal avaliadas por eletroforese (MARENKO-ROWE, 2006; FRENETTE; ATWEH, 2007).

A AF é uma doença hereditária homozigótica decorrente da mutação genética na cadeia  $\beta$ -globina, comportando-se clinicamente como uma doença multigênica e com grande variabilidade fenotípica (STEINBERG, 2005). A mutação pontual ocorre em uma base nitrogenada no sexto códon do gene da  $\beta$ -globina, levando à substituição do nucleotídeo adenina por timina (GAG→GTG), o que resulta na produção do aminoácido valina em lugar do ácido glutâmico. Essa substituição leva a modificações físico-químicas na molécula da hemoglobina e a redução da solubilidade da molécula de deoxihemoglobina, fazendo com que os eritrócitos assumam uma forma irregular (WAGENER *et al.*, 2001; GONÇALVES *et al.*, 2003; STUART; NAGEL, 2004).

O termo doenças falciformes denomina um grupo de doenças genéticas autossômicas recessivas, relacionadas ao gene da  $\beta$ -globina, caracterizadas pela presença da HbS associada a outra alteração da Hb. Indivíduos acometidos por duas cópias do gene da HbS (HbSS) são ditos homozigotos e apresentam, principalmente, em sua circulação a HbS, sendo esta condição denominada de anemia falciforme (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000). Embora a forma homozigótica seja a mais comum e grave destas doenças, existem também os heterozigotos compostos, em que os indivíduos apresentam uma molécula de HbS e uma outra alteração da Hb, estrutural ou talassêmica, resultando em combinações de HbS com beta ou alfa talassemia, hemoglobina C, hemoglobina D ou outras hemoglobinas, com características clínicas distintas (MARENKO-ROWE, 2006). Todos os indivíduos homozigotos ou heterozigotos compostos da HbS apresentam manifestações clínicas, com exceção dos heterozigotos da HbS (AS) que são, via de regra, assintomáticos. Nas doenças falciformes os sintomas geralmente aparecem após os primeiros 6 meses de vida. O quadro mais grave se apresenta em indivíduos HbSS, seguidos por S $\beta^0$ -talassemia, com baixos níveis de HbF, enquanto os quadros mais leves são aqueles que apresentam níveis elevados da HbF. Os indivíduos com HbSC e HbS/ $\beta^+$ -talassemia tendem a apresentar um curso benigno da doença (WEATHERALL; PROVAN, 2000; ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000).

Indivíduos heterozigotos da HbS são denominados portadores de traço falciforme (HbAS). São em geral assintomáticos, sem propensão a complicações vaso-oclusivas. A importância do traço falciforme está relacionada com as suas implicações no aconselhamento genético (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000; LONERGAN; CLINE; ABBONDANZO, 2001).

O genótipo é um importante fator de risco para a gravidade da doença. Os genótipos que possuem maior produção de HbF, que dificultam a polimerização e a

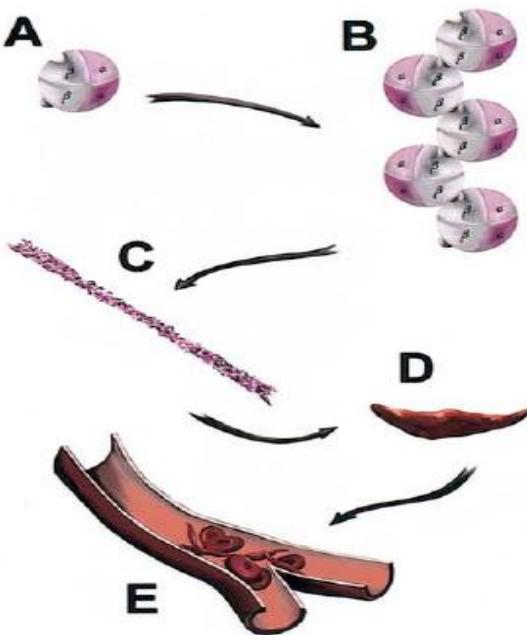
falcização, apresentam menor gravidade e intensidade das manifestações clínicas (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000).

Além do genótipo e dos níveis de HbF, outros fatores funcionam como moduladores da gravidade clínica da doença, como os haplótipos do *cluster* do gene da  $\beta$ -globina e a co-expressão de  $\alpha$ -talassemia (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000; OGEDEGBE, 2007).

### 1.3.3 Mecanismos envolvidos na fisiopatologia na anemia falciforme

A molécula de hemoglobina normal apresenta uma estrutura molecular tridimensional, em que a estabilidade do tetrâmero da hemoglobina depende do posicionamento molecular interno dos aminoácidos não-polares e da estabilidade da extensa área de contato entre as cadeias  $\alpha_1\beta_1$ . Na maioria das hemoglobinas instáveis uma ou mais dessas propriedades encontram-se alteradas (MARENKO-ROWE, 2006).

A produção do aminoácido valina em substituição ao ácido glutâmico produz uma região de contato hidrofóbica entre a valina da HbS e o aminoácido de outra molécula da HbS (VEKILOV, 2007). Essa mudança de carga gera alterações na superfície molecular quando em desoxigenação, fazendo com que a cadeia de HbS apresente uma maior propensão de se ligar à outras cadeias de HbS, resultando em uma unidade estrutural retorcida composta por duas moléculas de hemoglobina ligadas entre si. Esse processo é denominado de polimerização. O resultado é a formação de uma estrutura, relativamente rígida, no interior dos eritrócitos, constituída por moléculas de hemoglobinas polimerizadas, levando à formação de feixes de fibras de polímeros, denominados de “corpos tactóides”, que formam uma rede em gel. Estes feixes de fibras se projetam dentro da membrana plasmática gerando projeções espiculadas, alterando a conformação dos eritrócitos, que assumem uma forma típica em “foice” (Figura 3) (LONERGAN; CLINE; ABBONDANZO, 2001; LEW; BOOKCHIN, 2005; WILSON; FORSYTH; WHITESIDE, 2009).



**Figura 3** - Fisiopatologia da anemia falciforme. **Figura A** - molécula de hemoglobina composta por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ -falciforme. **Figura B** - cadeias  $\beta$ -falciforme se unemumas às outras formando uma cadeia de moléculas de hemoglobina. **Figura C** - moléculas de hemoglobina se ligam entre si, criando uma estrutura polímérica de grande porte. **Figura D** - o eritrócito é distorcido por rígidos feixes de polímeros em seu interior, resultando em uma forma eritrocitária alongada em “foice”. **Figura E** - eritrócitos falciformes obstruem os vasos da microcirculação.

Fonte: LONERGAN; CLINE; ABBONDANZO, 2001

A polimerização da HbS desoxigenada é o principal evento, indispensável, na patogênese molecular da AF. É um processo contínuo que depende de numerosas variáveis como, concentração da HbS intra-eritrocitária, grau e velocidade de desoxigenação celular, pH, composição da hemoglobina intracelular (como a HbF, que pode inibir a polimerização), temperatura, pressão e força iônica (LONERGAN; CLINE; ABBONDANZO, 2001; STUART; NAGEL, 2004).

Além das evidentes mudanças provenientes da formação de polímeros de hemoglobina intracelular, a polimerização pode ter um impacto direto sobre a membrana plasmática, deformando a membrana dos eritrócitos, causando a perda maciça de cátions. Dentre as alterações de membrana, destacam-se a exposição extracelular dos epítopos de proteínas e glicolipídios, normalmente encontrados no interior da célula (como espectrina-actina, fosfatidilserina), a redução de glicoproteínas, geração de radicais livres e aceleração da apoptose, decorrente do aumento de cálcio intracelular pela falência da bomba de

$\text{Ca}^{2+}$ /ATPase na membrana eritrocitária. Essas alterações e o aumento da expressão de moléculas de adesão nos eritrócitos em estresse podem explicar a maior aderência dos eritrócitos falciformes ao endotélio vascular (LANG *et al.*, 2002; YASIN *et al.*, 2003; REN *et al.*, 2006; FRENETTE; ATWEH, 2007; MARTINS *et al.*, 2009).

A perda da maleabilidade celular e o aumento da viscosidade sanguínea levam a um processo obstrutivo, denominado de crise vaso-occlusiva, decorrente da obstrução microvascular em um ou mais locais, provocando dor e inflamação local. Esse evento se caracteriza pela presença de diversas etapas e pela natureza heterocelular e multifatorial envolvida, principalmente, pela interação das células em “foice” entre si e ao endotélio vascular. Crises vaso-occlusivas recorrentes levam aos processos de isquemia e reperfusão e danos à célula endotelial vascular, com consequente liberação do fator de von Willebrand, agregação plaquetária, liberação de citocinas e recrutamento, para estes locais, de granulócitos, macrófagos e células T, levando a uma resposta inflamatória contínua, que é propagada através da elevação dos níveis de citocinas inflamatórias, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e por estresse oxidativo. A obstrução e a inflamação, por sua vez, causam mais hipóxia e acidose e, consequentemente, mais falcização, resultando em ciclo vicioso da AF (PLATT, 2000; STUART; NAGEL, 2004; BOYTON, 2008; VERDUZCO; NATHAN, 2009; CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009; CONRAN; COSTA, 2009).

As consequências fisiopatológicas da falcização assumem duas vertentes: obstrução de pequenos vasos por células falciformes, eventos vaso-occlusivos, que podem ser extremamente dolorosos, e anemia hemolítica, devido à reduzida meia-vida das células falciformes (WILSON; FORSYTH; WHITESIDE, 2009). A seqüência de eventos, polimerização - deformação celular - vasoclusão – crises falciformes, onde a polimerização é o principal evento patogênico, determina um cenário contínuo e determinante na evolução das manifestações clínicas da doença (VEKILOV, 2007).

#### 1.3.4 Principais manifestações clínicas na anemia falciforme

Apesar do fato de todos os indivíduos com AF apresentarem a mesma mutação no DNA, a gravidade das manifestações clínicas e hematológicas é extremamente variável,

podendo se apresentar como uma doença grave ou uma condição com sintomatologia leve (INATI *et al.*, 2003).

O fenótipo clínico da AF é muito variável podendo ser influenciado por fatores adquiridos e hereditários. Entre os fatores adquiridos mais relevantes estão os fatores sociais e econômicos, como, por exemplo, a qualidade e o acesso à assistência médica, condições de trabalho, qualidade de moradia e higiene, alimentação, educação e doenças infecciosas associadas. Já os fatores genéticos são influenciados por três características: variações nos níveis de HbF, o tipo de haplótipo associado ao gene da HbS e a co-existência de alfa-talassemia (MOUSSINHO-RIBEIRO *et al.*, 2003; ZAGO, PINTO; 2007; GUIMARAES; COELHO, 2010).

A evolução das doenças falciformes é marcada por um amplo espectro de complicações clínicas, que atingem a maioria dos órgãos. Entre as manifestações clínicas mais freqüentes da doença estão: anemia, úlcera de perna, crises aplásticas, seqüestro esplênico, crises álgicas, síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral (AVC), alterações pulmonares e oculares, priapismo, retard no crescimento e desenvolvimento, suscetibilidade aumentada a infecções e alterações em vários órgãos (WEATHERALL; PROVAN, 2000; STUART; NAGEL, 2004; KUTLAR, 2005; ZAGO; PINTO, 2007).

A principal causa da anemia nesses pacientes é a menor sobrevida das hemácias, caracterizando-se com uma anemia hemolítica. A falcização fenômeno característico da AF, além de causar anemia hemolítica crônica, ainda é responsável pela obstrução de vasos sanguíneos, com conseqüentes crises de dor, infarto e necrose de diversos órgãos, como ossos e articulações, baço, pulmões e rins. No entanto, além da hemólise, outros fatores podem contribuir para a gênese da anemia ou agravá-la, como a carência de folato, a insuficiência renal, as crises aplásticas e a esplenomegalia (MOUSSINHO-RIBEIRO *et al.*, 2003; ZAGO, PINTO; 2007).

O baço tem um papel singular nas doenças falciformes. O característico fluxo lento e tortuoso da sua microcirculação, o torna bastante suscetível à congestão e polimerização eritrocitária. Na maioria dos pacientes falciformes os numerosos infartos progridem ao longo do tempo, levando à fibrose e ao desaparecimento anatômico do órgão (auto-esplenectomia funcional) e, em alguns casos, embora presente, o baço apresenta perda da sua função (asplenia funcional) (LONERGAN, CLINE; ABBONDANZO, 2001; ZAGO; PINTO 2007).

A dor no paciente falciforme pode ser um sintoma agudo ou crônico. No quadro agudo, a dor está associada à isquemia tecidual aguda causada pela vaso-oclusão. Neste

quadro o controle rápido da dor é essencial para interromper o processo vaso-occlusivo. (ZAGO, PINTO; 2007).

O pulmão é o principal órgão envolvido na AF. As lesões variam de processos agudos, tais como pneumonia e STA, a eventos crônicos, como fibrose pulmonar. A STA é um termo utilizado para descrever uma doença pulmonar aguda de origem mista que envolve, na maioria dos casos, a combinação de processos vaso-occlusivos e infecções. É caracterizada pelo comprometimento pulmonar e por uma combinação de fatores, tais como, febre, dor no peito e comprometimento pulmonar (LONERGAN, CLINE; ABBONDANZO, 2001; ZAGO; PINTO, 2007).

Das várias consequências graves na anemia falciforme, o AVC agudo e a isquemia cerebral crônica estão entre as principais causas de incapacitação entre os pacientes falciformes. Cerca de 25% dos pacientes com AF apresentarão pelo menos uma complicação neurológica durante a sua vida, dessas 11% ocorrem antes dos 20 anos, aumentando para 24% até a idade de 45 anos. O risco de AVC é maior durante a primeira década de vida, sendo mais significativo entre as idades de 2 a 5 anos (VERDUZCO; NATHAN, 2009).

As complicações ósseas na AF incluem, o infarto ósseo e a osteomielite, ambos causados pelo congestionamento celular na medula que ocorre na maioria dos indivíduos falciformes. Outra complicação óssea é a dactilite (síndrome de mão-pé), que se apresenta como um processo de necrose e inflamação da medula óssea das extremidades dos membros, freqüente nos dois primeiros anos de vida, desaparecendo com o crescimento, quando a medula óssea dessa região é substituída por medula gordurosa (LONERGAN, CLINE; ABBONDANZO, 2001; ZAGO; PINTO, 2007).

O priapismo na AF apresenta-se como uma ereção persistente, geralmente dolorosa, sem estímulo sexual, que acomete de 30% a 45% dos indivíduos do sexo masculino com AF. Episódios repetitivos de priapismo podem resultar em fibrose peniana e impotência. A presença dos episódios podem estar relacionados ao baixo fluxo venoso, hipóxia, acidose, estase e isquemia tecidual (LONERGAN, CLINE; ABBONDANZO, 2001; DRISS *et al.*, 2009).

A expectativa de vida em pacientes com anemia falciforme está aumentando, mas é ainda muito baixa quando comparada com a da população em geral. Pacientes com HbSS apresentam expectativa média de vida de 42 e 48 anos, nos sexos masculino e feminino, respectivamente (SCHNOG *et al.*, 2004). Atualmente, a mortalidade nesta faixa etária vem apresentando decréscimo, provavelmente, resultado de programas de triagem neonatal

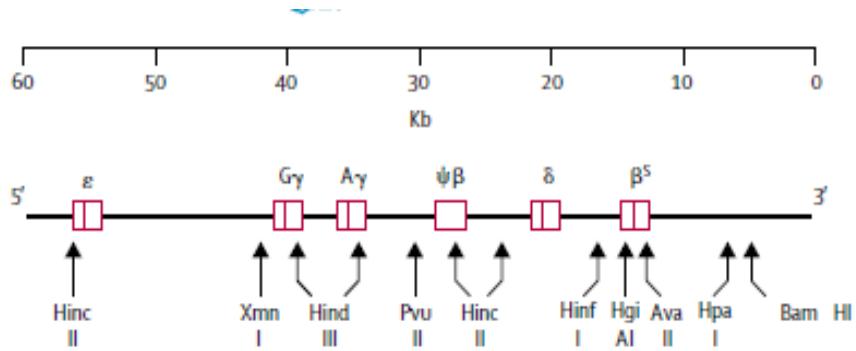
(diagnóstico precoce), ampliação do acompanhamento médico e tratamento profilático na prevenção de infecções (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000).

### 1.3.5 Os haplótipos na anemia falciforme

O grupamento gênico da  $\beta$ -globina foi o primeiro segmento de DNA nuclear amplamente estudado para a análise das relações evolutivas entre as populações humanas (MOUSSINHO-RIBEIRO *et al.*, 2003). Essa região apresenta uma série de numerosos polimorfismos (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000).

A análise do grupamento gênico da  $\beta$ -globina, que ocorre através de enzimas ou endonucleases de restrição capazes de quebrar ligações entre bases nitrogenadas específicas, demonstrou que o segmento cromossômico entre os genes  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\beta^s$ , pode conter diferentes seqüências de polimorfismos ou haplótipos. (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000). Essas variantes polimórficas estão concentradas em regiões conservadas, ricas em fatores de transcrição e sítios de ligação para a expressão do *cluster*  $\beta^s$ , servindo como marcador genético e de prognóstico da doença (OGEDEGBE, 2007).

Os haplótipos representam uma combinação de polimorfismos observados em um cromossomo particular e são específicos para determinadas populações ou grupos étnicos, sendo utilizados no estudo da origem e evolução das populações humanas (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000). Os haplótipos do *cluster*  $\beta^s$  são determinados através da análise do polimorfismo em sítios de restrição, que diferenciam os cinco principais haplótipos por meio das endonucleases de restrição:  $\epsilon$ /HindII,  $^G\gamma$ /HindIII,  $^A\gamma$ /HindIII,  $3'\psi\beta$ /HindII e  $\beta$ /AvaII (RAHGOZAR *et al.*, 2000; OGEDEGBE, 2007) (Figura 4).



**Figura 4** - Haplótipos  $\beta^s$ . Representação do *cluster* do gene da  $\beta$ -globina com identificação dos polimorfismos de acordo com os sítios de clivagem pelas endonucleases de restrição.

Fonte: Adaptado de STUART; NAGEL, 2004.

Os haplótipos da  $\beta^s$ -globina são nomeados conforme regiões geográficas específicas da África e Oriente Médio, onde eles se originam e predominam (ZAGO *et al.*, 2001). O haplótipo Senegal, originário no Senegal, está associado com a forma mais benigna da doença, seguido pelo haplótipo Benin, originário da região centro-oeste da África, Nigéria, Gana e países do golfo do Benin. O Bantu ou República Centro Africana, encontrado na África Central, desenvolve a forma mais severa da doença. O Camarões é encontrado no Camarões, e o haplótipo asiático Árabe-indiano é encontrado na província da Arábia-Saudita e Norte da África. Os três haplótipos mais comuns nas Américas são o Senegal, Benin e Bantu (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000; OGEDEGBE, 2002; OGEDEGBE, 2007).

Os haplótipos da  $\beta^s$ -globina estão associados com a heterogeneidade clínica apresentada na AF, diferindo quanto à gravidade, freqüência e padrão dos sintomas clínicos. Essa diferenciação quanto à apresentação clínica da doença parece estar correlacionada com a variação da dosagem de hemoglobina e concentração de HbF (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000; STEINBERG, 2005). No entanto, mesmo entre os portadores desses polimorfismos, há uma diversidade de fatores outros, ainda não totalmente esclarecidos que contribuem para a variabilidade clínica observada (STEINBERG, 2005).

## 1.4 Hemoglobina fetal

A hemoglobina fetal (HbF) é o mais estudado modulador genético da AF e desempenha um importante efeito benéfico sobre a mesma, inibindo a polimerização da deoxihemoglobina S (STEINBERG, 2005). Esse efeito ocorre em razão da HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) e do híbrido assimétrico ( $\alpha_2\beta^s\gamma$ ), produzido por cadeias polipeptídicas das duas hemoglobinas, não serem incorporados ao polímero durante o processo de polimerização das moléculas de HbS, devido a presença do aminoácido alanina na posição 136 da cadeia  $\gamma$ , o que impede a sua interação hidrofóbica com a molécula HbS. Devido a esse potente efeito anti-falcização, o aumento da produção de HbF apresenta-se como uma grande meta terapêutica na AF (STUART; NAGEL, 2004; KUTLAR, 2005; OGEDEGBE, 2007; DRISS *et al.*, 2009).

A HbF é produzida através da hipometilação do gene promotor da  $\gamma$ -globina e está restrita a um pequeno contingente de eritrócitos, denominados de células F. Nos pacientes com AF, as células F contêm cerca de 20% de HbF e 80% de HbS, enquanto os outros eritrócitos contêm somente HbS. O número de células F de um indivíduo está sob controle genético, embora não se saiba se esse controle seja do tipo monogênico ou poligênico (NAOUM, 2000; FIGUEIREDO, 2007).

O aumento na concentração de HbF se apresenta como um importante modulador clínico no quadro das doenças falciformes e está associado a um curso menos grave das mesmas (ASHLEY-KOCH; YANG; OLNEY, 2000). Elevados níveis de HbF inibem a polimerização da HbS tornando-a capaz de transportar o oxigênio, minimizado muitas das complicações clínicas associadas com a AF, tais como acidente vascular cerebral e úlceras de membros inferiores (OGEDEGBE, 2007). Os níveis de HbF necessários para exercer uma função benéfica na AF são variáveis. A elevação da concentração de HbF de 5,4% para 39,8% reduz o risco de dactalite, crises álgicas, STA e seqüestro esplênico agudo. A presença de HbF de 10% ou mais parece estar associada com a menor incidência de úlceras crônicas de perna em crianças com AF (OGEDEGBE, 2002).

Diversos determinantes genéticos parecem contribuir para a heterogeneidade nos níveis de HbF, incluindo: os haplótipos do *cluster* do gene da  $\beta^s$ -globina e a sua associação com seus domínios de regulação, os elementos regulatórios em outros cromossomos, a hipometilação do gene  $\gamma$ , os fatores de transcrição e os genes moduladores da eritropoese (STEINBERG, 2005; DAVIES; GILMORE, 2003).

Outros elementos, também, parecem estar envolvidos na variabilidade dos níveis de HbF. Um deles seria a presença de *loci* produtores de células F, o QTL (*quantitative trait loci*) ligado ao cromossomo que estaria associado com o número de células F; até o momento, foram descritos três *loci*: QTL na posição 8q (interage com o polimorfismo -158C-T<sup>G</sup>γ) modula a HbF; QTL na posição Xp22 (associado ao número de células F na β-talassemia); QTL na posição 6q22.3-23.2 (apresenta a correlação mais evidente com os níveis de HbF). Outro elemento seria a presença de polimorfismos denominados SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), que têm sido associados com os níveis de HbF, sugerindo que estes podem agir, também, como elementos reguladores e moduladores de HbF (STEINBERG, 2005; FIGUEIREDO, 2007; DRISS *et al.*, 2009).

O objetivo principal na utilização da indução de HbF no tratamento da AF é que a mesma alcance níveis capazes de inibir ou retardar a polimerização da HbS. Muitas drogas atuam como agentes indutores da expressão de HbF como, hidroxiuréia, agentes demetiladores de DNA (5-azacitidina), fatores de crescimento hematopoético (eritropoetina), ácidos graxos de cadeia curta (butiratos e derivados) e os inibidores da histona deacetilase. Elas podem agir em uma ou mais vias, seja através da promoção da hipometilação do gene da γ-globina ou por produção de progenitores eritróides envolvidos na síntese de HbF através de seus efeitos citotóxicos (STEINBERG; BRUGNARA, 2003; BANK, 2006).

## 1.5 Radicais livres

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (VALKO *et al.*, 2007) Essa configuração faz dos radicais livres moléculas instáveis, com meia-vida muito curta e, quimicamente, muito reativas (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres podem atuar como indutores ou como produtos resultantes de reações de óxido-redução (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de espécies reativas do oxigênio (EROs) ou espécies reativas do nitrogênio (ERNs), respectivamente (VISIOLI; KEANEY;

HALLIWELL, 2000; PIETTA, 2000; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Existem ainda espécies reativas derivadas do enxofre (ERs), do cloro (ERCl) e do carbono (ERC). Os radicais derivados do oxigênio representam a mais importante classe de tais espécies geradas nos organismos (FINKEL; HOLBROOK, 2000; VALKO *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

As EROs estão compreendidas em dois grupos, os radicais e os não-radicais. O grupo radical, também conhecido como radical livre, é composto pelos radicais hidroxila ( $\text{OH}$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peroxila (ROO) e alcoxila (RO) e uma forma de oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ); os não-radicais são o oxigênio ( $\text{O}_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o ácido hipocloroso (HClO). Entre as ERNs incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos (ONOO) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A produção de EROs, de ERNs, entre outras espécies reativas, é observada em diversas condições fisiológicas, sendo produzidas, principalmente, na membrana celular, mas também, no citoplasma, mitocôndrias e núcleo. No organismo, encontram-se envolvidas em processos como a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso provoca efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios das membranas e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, danos às enzimas, carboidratos e moléculas de DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O organismo humano sofre ação constante das espécies reativas geradas durante os processos inflamatórios, por meio de alguma disfunção biológica ou proveniente da alimentação. Quando a produção dessas espécies ocorre de maneira exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (FINKEL; HOLBROOK, 2000; SCHAFER; BUETTNER, 2001; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). De acordo com Halliwell (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, previne ou retarda a oxidação do mesmo.

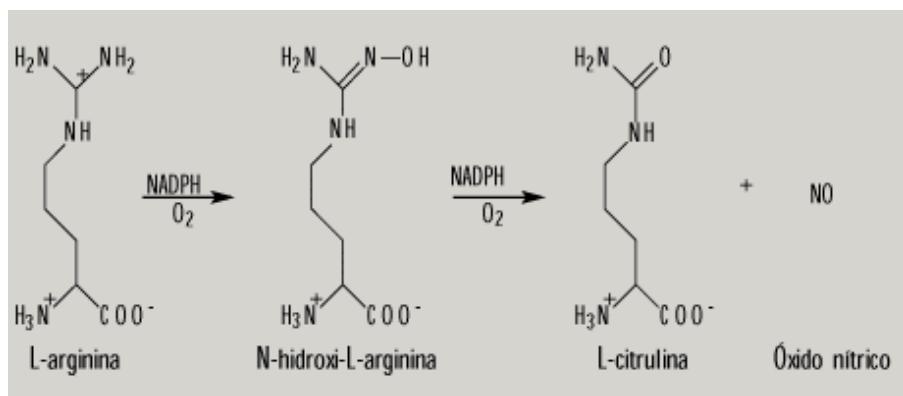
Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores (como as EROs) e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio no sistema pró-oxidante-antioxidante em favor do primeiro. Esse desequilíbrio pode conduzir, principalmente, a danos nas macromoléculas (tais como açúcares, DNA, proteínas e lipídios), inclusive podendo levar à quebra de cadeias de DNA; danos ao sistema de transporte de íons das membranas, às

enzimas e outras proteínas, e à indução da peroxidação lipídica nas membranas (AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; MASELLA *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007; CIMEN, 2008).

A intensidade e patogenicidade desse desequilíbrio vão depender das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade da reação com moléculas-alvo e da compartmentalização celular desses processos, em que fatores como solubilidade e difusibilidade são determinantes (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

### 1.5.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico ou monóxido de nitrogênio (NO) é uma combinação de dois dos mais abundantes gases da atmosfera. É um gás altamente solúvel, sintetizado em células endoteliais a partir do aminoácido L-arginina pela ação das isoformas da enzima NO sintase (NOS): óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS), NOS induzível (iNOS) e a isoforma mitocondrial (mtNOS) (Figura 5) (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; MACK; KATO, 2006; FERRARI; FRANÇA; HONORIO-FRANÇA, 2009).



**Figura 5** - Produção de óxido nítrico (NO) catalisada pela ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina.

Fonte: DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003.

É um radical que age em uma grande variedade de processos biológicos, regulando diversas funções como, tônus vasomotor, relaxamento muscular, neurotransmissão, resposta imune e inflamatória (potente antagonista da inflamação) e adesão plaquetária (HAN *et al.*, 2003; FIORETTO, 2003; GUNDUZK; OZTURKG; SOZMEN, 2004; CIMEN, 2008). O NO é conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (“*endothelium-derived relaxing factor*” - EDRF), sendo um potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial, sendo capaz de se difundir rapidamente entre e dentro das células (VASCONCELOS *et al.*, 2007; FERRARI; FRANÇA; HONORIO-FRANÇA, 2009). O NO também se apresenta como um importante gerador de radicais livres envolvidos na peroxidação de lipídeos, proteínas e outras biomoléculas (FERRARI; FRANÇA; HONORIO-FRANÇA, 2009).

A Hb desempenha um importante papel no controle do tônus vascular mediado pelo NO (CIMEN, 2008). Na circulação, os eritrócitos são os principais removedores de NO, devido à elevada concentração de Hb em seu interior. O NO é seqüestrado via reação com o grupo heme prostético da desoxihemoglobina, onde  $\text{Hb}(\text{Fe}^{+2})\text{O}_2$  converte NO a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), a partir da ligação da  $\text{Hb}(\text{Fe}^{+2})$  ao NO produzindo o complexo  $\text{Hb}(\text{Fe}^{+2})\text{-NO}$  (nitrosil-hemoglobina) (HAN *et al.*, 2003). O NO também pode reagir e converter a Hb oxigenada a metahemoglobina e  $\text{NO}_3^-$  (Figura 6) (HEROLD; EXNER; NAUSER, 2001). Han e colaboradores (2003), demonstraram que o consumo de NO pelos eritrócitos em condições de hipóxia pode ser regulada pela formação do complexo  $\text{HbFe}^{+2}\text{-NO}$ .

- $\text{Hb-O}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{Metemoglobina (metHb)} + \text{NO}_3^-$
- $\text{Hb} + \text{NO} \rightarrow \text{Nitrosil-hemoglobina (NO-Hb)}$
- $\text{NO-Hb} + \text{O}_2 \rightarrow \text{MetHb} + \text{NO}_3^-$

**Figura 6** - Reações do óxido nítrico (NO) com a molécula de hemoglobina.

Fonte: DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003.

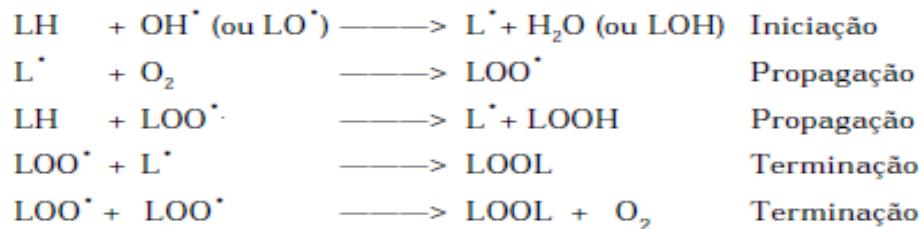
O NO desempenha uma ação antioxidante quando produzido pela eNOS, induzindo a produção da enzima SOD na camada muscular do vaso e no meio extracelular,

reduzindo o  $O_2^-$  disponível e, conseqüentemente, a produção de  $ONOO^-$ . O NO também induz a síntese da ferritina, que se liga a íons ferro livres e previne a geração de  $O_2^-$  (WOLIN, 2000; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

O NO apresenta um duplo efeito no organismo, dependendo da sua concentração. Quando em níveis elevados, age como oxidante, enquanto em concentração normal, apresenta efeitos benéficos em todo o organismo, especialmente no sistema circulatório (KATHERINE; NAIL-GRANGER, 2007; OLANIYI; ARINOLA, 2010).

### 1.5.2 Peroxidação lipídica

Todas as membranas celulares são especialmente vulneráveis à oxidação devida à sua alta concentração de ácidos graxos insaturados. Os danos aos lipídios, normalmente são chamados de peroxidação lipídica (KOHEN; NYSKA, 2002). A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 7).



**Figura 7** - Etapas da peroxidação lipídica.

Fonte: FERREIRA; MATSUBARA, 1997.

A fase de iniciação da peroxidação lipídica envolve o ataque dos metabólitos reativos de oxigênio capazes de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metíleno no lipídio. A fase de propagação permite que essa reação continue. Na última fase, ocorre a interação de um radical ( $L^\cdot$  ou  $LOO^\cdot$ ) com outro radical ou antioxidantes, até destruirem a si próprios. Uma única iniciação pode levar a uma reação em cadeia, resultando na peroxidação

de todas as membrana lipídicas insaturadas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOHEN; NYSKA, 2002).

O radical OH é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e mais importante da peroxidação lipídica. Embora o ferro também possa desempenhar um papel determinante na iniciação desse processo, sendo necessária, no meio, a presença em proporção igual de  $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$  para que o processo ocorra (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Os efeitos globais da peroxidação lipídica estão relacionados às alterações da membrana celular, resultando na diminuição da sua fluidez (o que facilita a troca de fosfolipídios entre as camadas da membrana), em alterações na permeabilidade, danos às proteínas da membrana, inativação de receptores, enzimas e canais iônicos com, consequente, liberação do conteúdo das organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e produção de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O malonaldeído (MDA) é uma molécula com alta reatividade e é um produto secundário da peroxidação lipídica das membranas, derivado da ruptura de ácidos graxos polinsaturados, como o ácido linoléico e o ácido araquidônico. Age nos fosfolipídios e nas proteínas das membranas eritrocitárias através de ligações cruzadas diminuindo a sobrevida dos eritrócitos. Atualmente, o MDA é considerado um candidato potencial como biomarcador geral do dano oxidativo no plasma sanguíneo (PETERSEN; DOORN, 2004; KADIISKA *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007; CIMEN, 2008).

## 1.6 Estresse oxidativo nos eritrócitos normais

Em consequência do seu papel fisiológico, como transportador de  $O_2$  e  $CO_2$ , os eritrócitos estão sob constante exposição as EROs e ao estresse oxidativo (AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; CIMEN, 2008). Espécies reativas de oxigênio como  $O_2^-$  e hidrogênio ( $H^+$ ) são, naturalmente, produzidas pelos eritrócitos (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). Os organismos aeróbios se protegem da toxicidade inerente ao oxigênio através de dois mecanismos principais: transporte do oxigênio por proteínas (hemoglobina) e pelo sistema de defesa antioxidante (CIMEN, 2008).

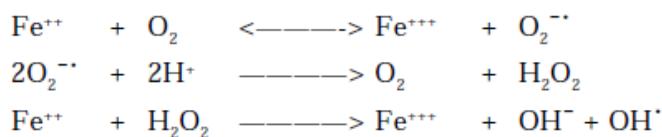
Vários fatores podem levar à geração de radicais livres como,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $HO$ , em eritrócitos. São conhecidas pelo menos duas fontes geradoras de  $O_2^-$  nos eritrócitos. A

primeira ocorre pela auto-oxidação da oxihemoglobina, levando à produção de metahemoglobina e  $O_2^-$ . A segunda ocorre no processo de oxidação do ferro  $Fe^{+3}$ . Estas espécies reativas são capazes de atacar a membrana eritrocitária, diretamente, causando alterações em sua estrutura protéica e lipídica (CIMEN, 2008).

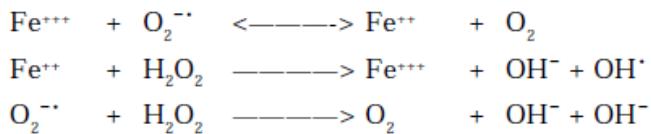
Os metais de transição podem participar na produção química de radicais livres convertendo oxidantes, relativamente estáveis, em poderosas espécies reativas (KOHEN; NYSKA, 2002). O ferro é o mais abundante, importante e essencial metal de transição presente em reações bioquímicas; sendo essencial na síntese da Hb e participando de um grande número de reações vitais de oxidação-redução e proliferação celular (CIMEN, 2008). Apresenta capacidade de se ligar ao oxigênio através do complexo heme-ferro, mantendo-se em estado reduzido. Se este mecanismo falhar, a Hb torna-se não-funcional, resultando na liberação do ferro da molécula de Hb e na produção de metahemoglobina. A forma livre do ferro é armazenada em macromoléculas agindo como catalisadora de processos de estresse oxidativo, causando danos em lipídios, proteínas e no DNA (COMPORTE *et al.*, 2002; CIMEN, 2008).

O papel dos metais na formação *in vitro* das espécies reativas é confirmado pelas reações de Fenton (reação do  $Fe^{2+}$  com o  $H_2O_2$  gerando OH) e de Haber-Weiss (Figura 8).

**Reação de Fenton:**



**Reação de Haber-Weiss:**



**Figura 8** - Reações de Fenton e Haber-Weiss.

Fonte: FERREIRA; MATSUBARA, 1997.

O  $H_2O_2$  é um produto intermediário gerado *in vivo* pela reação de dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ), por enzimas oxidases ou por  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Isoladamente é pouco reativo, no entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por

ser capaz de transpor, facilmente, as membranas celulares, principalmente, das camadas lipídicas, podendo reagir com a membrana eritrocitária e com as proteínas ligadas ao  $Fe^{2+}$ . O  $H_2O_2$  reage com  $O_2^-$ , íons férrico ou cúprico, produzindo o radical hidroxila (OH), o mais reativo das EROs. Apresenta capacidade de oxidar proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos (por exemplo, GSH) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; CIMEN, 2008).

A OH é considerada o mais reativo dos radicais, produzida no organismo, principalmente, por dois mecanismos: reação de  $H_2O_2$  com metais de transição (reação de Haber-Weiss, predominantemente intracelular e a reação de Fenton, mais importante extracelularmente) ou por exposição à radiação ionizante. O radical OH pode causar danos ao DNA, o RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e das mitocôndrias (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; KOHEN; NYSKA, 2002; AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004).

## 1.7 Defesas antioxidantes do eritrócito normal

Os eritrócitos estão constantemente expostos à EROs e, consequentemente, ao estresse oxidativo. Os mesmos funcionam como um antioxidante ideal, devido à sua capacidade antioxidante e à sua mobilidade, protegendo sua própria membrana e neutralizando as EROs da circulação (KENNETT; KUCHEL, 2005; CIMEN, 2008).

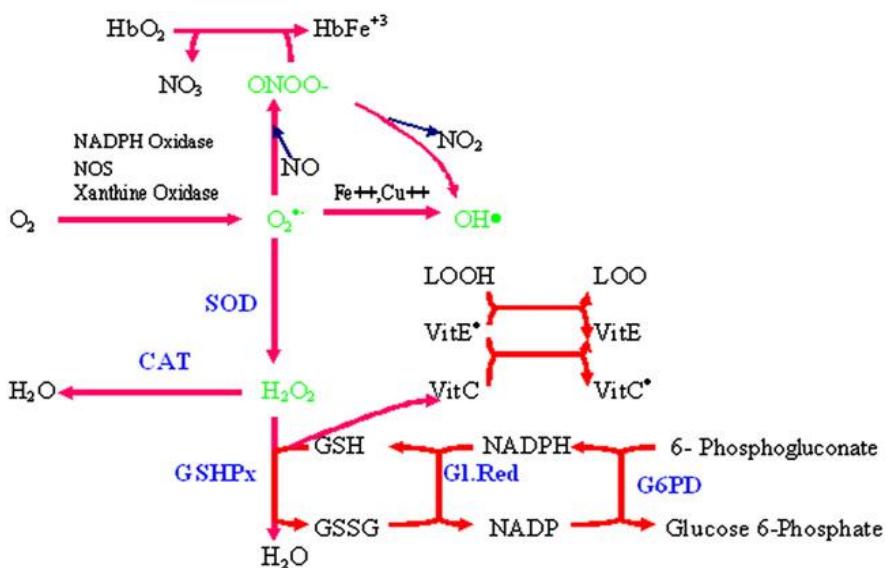
Os organismos aeróbios se utilizam de certos mecanismos para reduzir os níveis de  $O_2^-$ , ou impedir sua conversão à EROs (HALLIWELL, 2000), sendo os principais aqueles envolvidos na proteção, responsáveis por retirar e detoxificar as EROs bloqueando a produção dessas espécies ou seqüestrando os metais de transição (MASELLA *et al.*, 2005; CIMEN, 2008). Entre os diferentes mecanismos, o que envolve os antioxidantes é o mais importante, devido à grande variedade de substâncias que podem atuar como antioxidantes e pela capacidade de remoção direta dos pró-oxidantes, assegurando a proteção das moléculas biológicas (KOHEN; NISKA, 2002).

O sistema antioxidante sangüíneo é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  e  $O_2$ ; catalase (CAT), que atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$  e glutationa peroxidase (GSH-Px), que atua

sobre os peróxidos em geral, utilizando a glutationa como co-fator (VASCONCELOS *et al.*, 2007)

O sistema antioxidante não enzimático é dividido em dois grupos: os lipofílicos, sendo os principais, a vitamina E, carotenóides, ubiquinona e melatonina e os hidrossolúveis, destacando-se a vitamina C, glutationa (principal composto antioxidante intracelular), ácido úrico, ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina), transferrina (transporte do ferro) e haptoglobina (VASCONCELOS *et al.*, 2007; CIMEN, 2008).

O sistema antioxidante de defesa celular pode utilizar diversos mecanismos no desempenho de sua função: prevenção da formação de novas espécies de radicais livres e sua detoxificação antes que causem lesão (glutationa reduzida, SOD, CAT, GSH-Px e vitamina E). Outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída, principalmente, pelo ácido ascórbico, pela glutationa redutase (GR) e pela GSH-Px, entre outros (Figura 9) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BOGDANSKA; KORNETI; TODOROVA, 2003).



**Figura 9** - Principais vias de defesa antioxidante envolvidas no metabolismo de radicais livres em eritrócitos humanos normais.

Fonte: CIMEN, 2008.

A SOD é uma família de enzimas que contém íons de metal em sua composição; compreende a CuSOD (cobre), ZnSOD (zinco), MnSOD (manganês) e a SOD extracelular. Essas enzimas apresentam um importante papel antioxidante, catalisando a dismutação do superóxido gerado durante a auto-oxidação da hemoglobina, produzindo O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esse último removido por ação da CAT ou da GSH-Px (GUNDUZK; OZTURKG; SOZMEN, 2004; CIMEN, 2008).

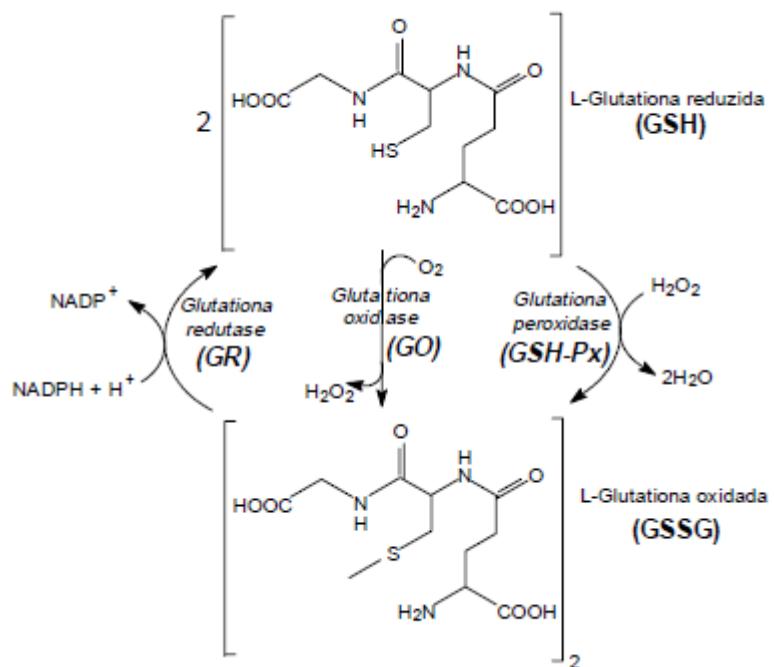
A CAT é uma hemeoproteína citoplasmática encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado. A enzima é composta de 4 subunidades de proteína, cada uma contendo íons férreico do grupo heme que sofrem interação após oxidação com a molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É a única enzima capaz de remover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em alta concentrações. O mecanismo de ação da CAT é semelhante ao da SOD, onde uma molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é reduzida a água e O<sub>2</sub> (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GUNDUZK; OZTURKG; SOZMEN, 2004; AL-OMAR; BEEDHAM; ALSARRA, 2004; CIMEN, 2008). Alguns estudos sobre a CAT e a SOD demonstraram que existem entre elas uma ação sinérgica, protegendo uma a outra (CIMEN, 2008).

Um importante sistema enzimático de defesa contra radicais livres envolve as glutationas peroxidases (GSH-Px) encontradas em muitos tecidos de origem animal. A família da GSH-Px integra o grupo das selenoproteínas, que apresentam em seu sítio ativo o selênio obtido através da alimentação (VASCONCELOS *et al.*, 2007; HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008). A atividade enzimática da GSH-Px é um dos meios pelos quais o organismo controla os níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares da autoxidação da Hb eritrócitária (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001; CIMEN, 2008). A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e peróxidos orgânicos aos seus correspondentes alcoóis à custa da conversão da glutationa reduzida à oxidada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A glutationa é um tripeptídeo (*L*-γ-glutamil-*L*-cisteinilglicina) existente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em importantes processos biológicos (ROVER JUNIOR *et al.*, 2001). Desempenha o papel de tampão redox, mantendo os resíduos cisteinila da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito no estado reduzido. É o mais abundante tiol celular não protéico e apresenta um importante papel antioxidante na proteção celular contra o estresse oxidativo, incluindo a detoxificação de uma variedade de xenobióticos eletrofílicos, remoção de EROs, como os peróxidos e hidroperóxidos orgânicos e na regeneração de vitaminas antioxidantes (CHEN *et al.*, 2000, VASCONCELOS *et al.*, 2007). Exerce funções essenciais na célula,

destacando sua função como cofator da família de enzimas GSH-Px, em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com consequente oxidação a GSSG. A falha em suas funções resulta na formação de metahemoglobina e consequente incapacidade do eritrócito em transportar oxigênio, além de causar alterações na forma eritrocitária, impedindo sua passagem em órgãos vitais (ALVES; MACEDO; KUBOTA, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Para que a atividade protetora da glutationa seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através de um ciclo catalítico. Nele podemos identificar a atividade de três grupos de enzimas: a glutationa oxidase (GO), a glutationa peroxidase (GSH-Px) e a glutationa redutase (GR). As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (Figura 10) (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008).



**Figura 10** - Ciclo da glutationa. Conversão de glutationa nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutationa peroxidase (GSH-Px), glutationa oxidase (GO) e glutationa redutase (GR).

Fonte: ROVER JUNIOR *et al.*, 2001.

Em situações em que o sistema de óxido-redução encontra-se íntegro, haverá recuperação da GSH, entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. Assim, a medida da razão GSSG/GSH pode ser utilizada no monitoramento do estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

## 1.8 O estresse oxidativo na anemia falciforme

A produção de EROs nas células falciformes é de causa multifatorial. Vários aspectos parecem contribuir para o estresse oxidativo dos eritrócitos falciformes, como a ação dos leucócitos e das células endoteliais, bem como a ativação das plaquetas. Os indivíduos com AF são submetidos a elevados níveis de estresse oxidativo, principalmente, durante as crises vaso-occlusivas e de STA (MACK; KATO, 2006; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). As células desses indivíduos produzem maiores quantidades de espécies oxidantes, além de apresentar o comprometimento dos mecanismos de defesa contra os radicais livres. O elevado estresse oxidativo apresentado pelos eritrócitos falciformes tem início com a peroxidação lipídica mediada pela senescência e termina com a lise dos eritrócitos falciformes, esses eritrócitos demonstram maior susceptibilidade à rigidez e instabilidade da membrana, com consequente produção de EROs (ASLAN; FREEMAN, 2002; MACK; KATO, 2006; WOOD; GRANGER, 2007).

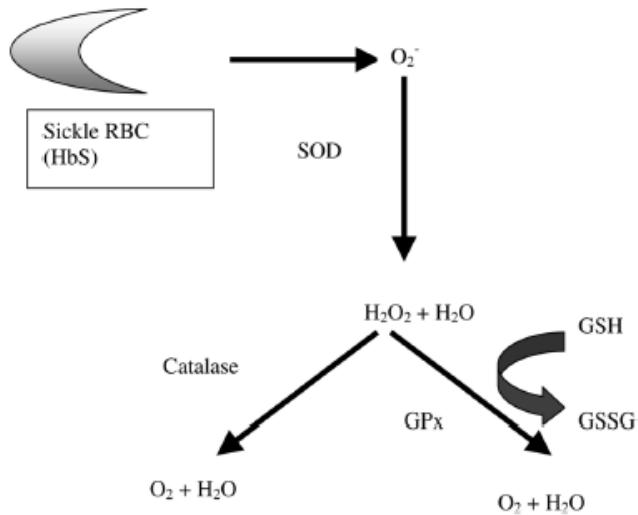
Os eritrócitos são as principais fontes de espécies reativas na AF. Hebbel e colaboradores (1988) demonstraram que a HbS apresenta uma maior capacidade de auto-oxidação em comparação com a HbA (Hb normal) na presença de oxigênio. Como a HbS se auto-oxida 1,7 vezes a mais que a HbA, os indivíduos com AF têm uma maior propensão para a produção de oxidantes (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000), implicado no aumento dos níveis de  $O_2^-$  e do radical OH. Uma vez que a hemoglobina está sujeita a danos oxidativos, ela desnatura e precipita aumentando ainda mais a sua susceptibilidade à auto-oxidação (KLINGS; FARBER, 2001). O estresse oxidativo nesses eritrócitos promove a liberação do ferro, que por sua vez, promove a oxidação de proteínas da membrana, resultando em consequentes anormalidades na membrana eritrocitária, contribuindo para hemólise prematura (COMPORTI *et al.*, 2002; CHAVES; LEONART; NASCIMENTO, 2008).

A hemólise contribui diretamente no processo de estresse oxidativo através da presença da hemoglobina plasmática livre e da arginase (relacionadas a deficiência de NO), do grupo heme, que quando liberado da hemoglobina é altamente oxidativo, do ferro hêmico livre, que produz  $O_2^-$  através da reação de Fenton (CIMEN, 2008).

O NO é um potente regulador do tônus vascular e, devido a sua interação com a hemoglobina, vasos e células sanguíneas, tem sido relacionado a vários efeitos na AF, sendo que a redução da sua biodisponibilidade é um componente crítico para o comprometimento da regulação do tônus vasomotor endotelial, na trombose e inflamação (ASLAN; FREEMAN, 2002; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Estudos recentes indicam que em torno de 50% dos pacientes com AF apresentam disfunção endotelial em consequência da diminuição da biodisponibilidade do NO endógeno, devido em grande parte à eliminação do mesmo pela hemoglobina plasmática (MACK; KATO, 2006).

Os principais mecanismos envolvidos no comprometimento da biodisponibilidade de NO parecem estar relacionados à diminuição plasmática da L-arginina, ao consumo de NO pela hemoglobina plasmática proveniente da hemólise intravascular e pelas EROs, que funcionam como removedoras de NO, retirando-os da circulação (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000; REITER *et al.*, 2002; MACK; KATO, 2006). Indivíduos com AF também podem apresentar redução das reservas de NO (MACK; KATO, 2006) e redução dos níveis plasmáticos de L-arginina (precursor de NO) nos eritrócitos falciformes, especialmente durante as crises vaso-occlusivas e na STA (MORRIS *et al.*, 2000; MACK; KATO, 2006).

Os eritrócitos falciformes apresentam deficiência em seu sistema enzimático antioxidante (Figura 11). A elevada produção de EROs leva ao maior consumo dos antioxidantes necessários no processo de detoxificação (KLINGS; FARBER, 2001; OKOCHI; OKPUZOR, 2005). Schacter e colaboradores (1988) e Gryglewski e colaboradores (1986) demonstraram que os níveis da atividade do SOD e da CAT encontram-se reduzidos nos eritrócitos falciformes; outros estudos também observaram uma redução na atividade de GSH-Px, além de uma redução de aproximadamente 50% nos níveis da glutationa nos eritrócitos falciformes quando comparada ao eritrócito normal. Esses resultados sugerem que indivíduos com AF apresentam uma redução na capacidade de remoção dos radicais livres, tornando-os mais suscetíveis ao dano oxidativo (KLINGS; FARBER, 2001).



**Figura 11** - Mecanismos de ação das enzimas antioxidantes nos eritrócitos falciformes. Hemoglobina S (HbS) sofre auto-oxidação, produzindo  $O_2^-$ , que é metabolizado a  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase (SOD).  $H_2O_2$  é então metabolizada em  $O_2$  e  $H_2O$  pelas enzimas catalase e GSH-Px. Deficiências em SOD, catalase e GSH-Px nos eritrócitos falciformes levam ao aumento da produção de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ .

Fonte: KLINGS; FARBER, 2001.

## 1.9 Hidroxiuréia

A hidroxiuréia (HU) é um antimetabólito citotóxico e citoredutor que atua na via da síntese de DNA inibindo a ribonucleotídeo redutase e vem sendo utilizada há muitos anos no tratamento de transtornos mieloproliferativos (ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2006; FRENETTE; ATWEH, 2007). A HU é a primeira droga que comprovadamente previne crises falciformes em indivíduos acometidos por essa doença (OGEDEGBE, 2002). Em 1998, seu uso foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* no tratamento de pacientes falciformes (BRAWLEY *et al.*, 2008); e uma revisão sistemática realizada por Lanzkron e colaboradores (2008), confirmou sua eficácia em pacientes adultos com doença falciforme.

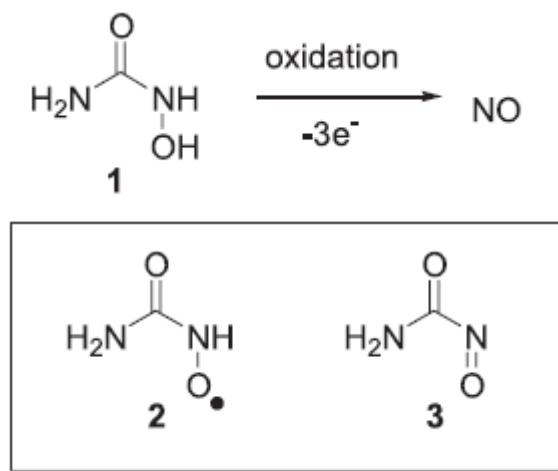
Embora permaneça incerto qual o exato mecanismo de ação da HU na AF, o tratamento com essa droga tem sido associado com significativas reduções na taxa anual de crises dolorosas, internações hospitalares, incidência de STA, priapismo, seqüestro esplênico e na redução em 50% na necessidade de transfusão sanguínea, assim como, na redução em 40% da mortalidade da doença (ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2006).

A HU age principalmente, aumentando a produção de HbF em eritrócitos que contém essa hemoglobina, alterando assim a cinética e a dinâmica de polimerização da HbS (GLADWIN *et al.*, 2002; CONRAN; COSTA, 2009) inibindo, consequentemente, o processo de falcização intracelular e a hemólise (WARE; AYGUN, 2009).

Outros possíveis mecanismos de indução da produção de HbF por esta droga seriam através da metabolização do NO relacionado ao aumento da expressão da guanilato ciclase, com consequente expressão do gene  $\gamma$ -globina (COKIC *et al.*, 2003; STEINBERG, 2005), inativação redox de um radical tirosil na ribonucleotídeo redutase, um efeito que pode ser mediada por NO e nitro-vasodilatores (GLADWIN *et al.*, 2002).

A resposta terapêutica favorável à HU é indicada, principalmente, através do aumento nos níveis de HbF em 5 a 15% e do aumento da hemoglobina total em cerca de 1 g/dL em 4 a 12 semanas após o início do tratamento (ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2006). A capacidade de elevar os níveis de HbF apresenta variações entre os pacientes, sugerindo que os benefícios da HU podem estar relacionados a outros mecanismos como: seu efeito citoredutor sobre os neutrófilos, aumento da hidratação celular e da maleabilidade das células em “foice” no sistema microvascular, redução da expressão de moléculas de adesão endoteliais, reticulocitopenia, aumento da eritropoetina e do fator de necrose tumoral alfa (DAVIES; GILMORE, 2003; ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2006; FRENETTE; ATWEH, 2007; FIGUEIREDO, 2007).

A HU parece, também, agir como uma fonte de NO, importante vasodilatador, desempenhando um importante papel na manutenção da pressão e fluxo sanguíneo normal. (HALSEY; ROBERTS, 2003; GLADWIN; SCHECHTER, 2001; GLADWIN *et al.*, 2002; KING, 2004). Evidências crescentes indicam a ocorrência da conversão *in vivo* de HU em NO na AF em indivíduos submetidos à terapia com a droga (KING, 2004). A HU é oxidada por grupos heme produzindo óxido nítrico *in vivo* (Figura 12). A liberação de NO pela HU induz a formação de HbF através da via guanilato ciclase solúvel, produzindo guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que induz a expressão da  $\gamma$ -globina (COKIC *et al.*, 2003) e o aumento da produção de NO seria responsável pela redução da expressão da molécula de adesão celular VCAM-1 em indivíduos em tratamento (DAVIES ; GILMORE, 2003). Outros efeitos da HU *in vivo* relacionados aos níveis de NO seriam o aumento da biodisponibilidade de NO, a diminuição do seqüestro do mesmo pela hemoglobina livre e a estimulação da expressão da NOS endotelial (CONRAN; COSTA, 2009).



**Figura 12** - Produção de óxido nítrico (NO) pela hidroxiureia. Oxidação química da hidroxiureia (1) à óxido nítrico (NO) e intermediários: radical nitróxido (2) e C-nitrosoformamida (3).

Fonte: KING, 2004.

A HU também demonstra capacidade de inibição do hidroperóxido terc-butil, responsável por induzir a produção de hidroperóxidos e peroxidação lipídica nos eritrócitos falciformes resultando na produção de espécies reativas (AGIL; SADRZADEH, 2000). A redução do estresse em eritrócitos falciformes pode ser uma ação terapêutica benéfica, uma vez que essas células podem também dar início a complicações vaso-occlusivas nos indivíduos falciformes (STEINBERG; BRUGNARA, 2003).

As principais indicações de uso da HU em anemia falciforme são: pacientes com três ou mais admissões hospitalares por crises vaso-occlusivas nos últimos 12 meses, adultos ou crianças com um ou mais episódios de STA nos últimos 24 meses e pacientes com disfunções orgânicas graves (HALSEY; ROBERTS, 2003; ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

A dose inicial preconizada é de 15mg/kg/dia, uma vez ao dia (CANÇADO *et al.*, 2009). A cada 12 semanas, esta dose deve ser aumentada em 5mg/kg/dia, na ausência de sinais de supressão medular. O objetivo final é atingir a dose máxima tolerada (DMT), maior dose que causa melhora na manifestação clínica sem mielossupressão, de no máximo 35mg/kg/dia (DAVIES; GILMORE, 2003; HALSEY; ROBERTS, 2003; ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

Uma monitorização cuidadosa é necessária durante o tratamento com HU, através da análise do hemograma a cada duas semanas, a fim de detectar sinais de supressão da medula óssea. A droga deve ser suspensa durante 1-2 semanas se forem observados sinais de desenvolvimento de mielotoxicidade (contagem de neutrófilos  $< 2.000/\text{mm}^3$ , hemoglobina  $< 4,5\text{g/dL}$ , plaquetas  $< 80.000/\text{mm}^3$  ou contagem absoluta de reticulócitos  $< 80.000/\text{mm}^3$ ) e, após a recuperação hematológica, a HU deve ser reiniciada em uma dose 2,5 mg/kg menor que a dose que o paciente utilizava quando apresentou as intercorrências (DAVIES; GILMORE, 2003; HALSEY; ROBERTS, 2003; ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2006, FIGUEIREDO, 2007; CANÇADO *et al.*, 2009).

A HU é considerada a melhor opção terapêutica, atualmente, disponível para obtenção da melhora clínica e hematológica nos pacientes com AF (SILVA; SHIMAUTI, 2006), porém são necessários ainda estudos capazes de esclarecer algumas questões, como: qual a dose ideal a ser utilizada, o potencial para identificar indivíduos que não respondem ao tratamento, a fim de evitar a exposição a uma droga potencialmente tóxica, qual o impacto do uso prolongado no organismo, na morbidade e na mortalidade, e a segurança na utilização do medicamento por crianças (HALSEY; ROBERTS, 2003).

O presente estudo pretende fornecer dados importantes relacionados à influência da HU e dos haplótipos no processo oxidativo em pacientes com AF, contribuindo para monitoramento do tratamento e prognóstico da doença, assim como melhor entendimento da fisiopatologia, visando à melhoria da qualidade de vida destes pacientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O estudo teve como objetivo principal investigar o impacto do uso da HU e dos haplótipos no perfil oxidativo dos pacientes com AF acompanhados no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza (CE), região nordeste do Brasil.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil hematológico dos pacientes com anemia falciforme;
- Determinar os haplótipos dos pacientes com anemia falciforme;
- Determinar os parâmetros do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e malonaldeído (MDA) nos grupos em estudo;
- Determinar o perfil antioxidante – catalase (CAT), glutationa peroxidase (GSH-Px), glutationa total (GSSG+GSH), glutationa oxidada (GSSG), glutationa reduzida (GSH) e o índice GSSG/ GSH nos grupos;
- Avaliar a relação dos níveis de  $\text{NO}_2^-$ , MDA e do perfil antioxidante com o uso da HU;
- Avaliar a relação dos níveis de  $\text{NO}_2^-$ , MDA e do perfil antioxidante com os haplótipos.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

##### 3.1.1 Grupo de estudo

O estudo foi do tipo transversal constituído por uma população de 64 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de anemia falciforme (HbSS), de ambos os sexos, acompanhados no ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). A população em estudo foi dividida em três grupos de acordo com o uso ou não de HU, o grupo SHU (pacientes com AF sem tratamento com HU) (n = 27), grupo HU ≤ 1 ano (pacientes com AF em uso de HU por um período menor ou igual a 1 ano) (n = 17) e grupo HU > 1 ano (pacientes em tratamento com HU há mais de 1 ano) (n = 20).

- **Critérios de inclusão:** Pacientes com diagnóstico de anemia falciforme através de eletroforese de hemoglobina, posteriormente confirmado por estudo molecular utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR), que estavam realizando ou não terapia medicamentosa com a HU na concentração de 20 a 30mg/kg/dia, por um período menor ou igual há um ano ou maior que um ano.
- **Critérios de exclusão:** Foram excluídos do estudo os indivíduos com anemia falciforme com sintomatologia febril, que faziam uso regular de bebida alcoólica, tabagistas, com história de terapia transfusional nos últimos três meses, em uso de quelante de ferro, vitamina E e/ou vitamina C e aqueles que se recusaram a participar do estudo não assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE – pág.92).

### 3.1.2 Grupo controle

O grupo controle foi constituído por 20 indivíduos adultos, com idade variando de 20 a 45 anos, selecionados aleatoriamente, de ambos os sexos, sem hemoglobinopatias (HbAA), confirmada por testes de eletroforese de hemoglobina. Fizeram parte deste grupo, indivíduos sadios, com ausência de comorbidades clínicas, afebris, não tabagistas e que não utilizavam suplementos vitamínicos (vitamina C e E).

### 3.2 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no ambulatório do Serviço de Hematologia do HUWC e no Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Departamento de Análises Clínicas do curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

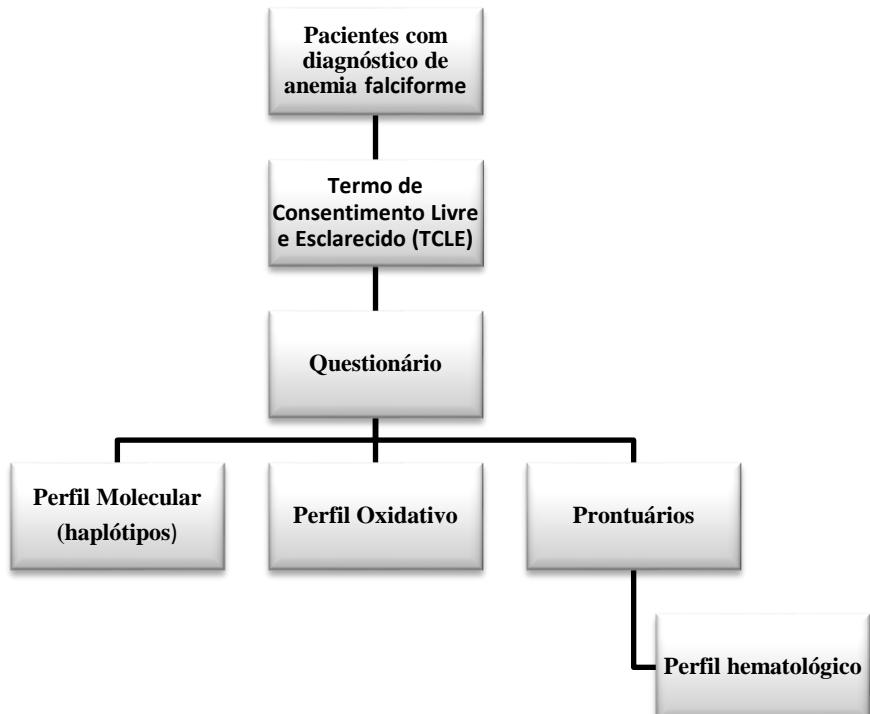
### 3.3 Aspectos éticos

O presente estudo obteve parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovado sob protocolo 128.11.09.

No momento anterior à coleta das amostras sanguíneas, foram fornecidas todas as informações sobre os objetivos e a justificativa da pesquisa a cada paciente e, aos que concordaram na participação no estudo, foi obtida a assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), com posterior aplicação do questionário, por integrantes do grupo de pesquisa, com todas as informações necessárias sobre o paciente e a doença (APÊNDICE-pág. 92).

### 3.4 Métodos

O delineamento do estudo está representado na figura abaixo.



**Figura 13-** Representação esquemática do delineamento do estudo.

#### 3.4.1 Amostras clínicas

- **Coleta e processamento das amostras**

As amostras foram coletadas seguindo os procedimentos padrão para coleta de amostras biológicas. Foram coletados 10mL de sangue venoso em dois tubos de coleta à vácuo, sendo: um tubo de 5ml contendo EDTA (etileno-diamino-tetracético), para a realização da extração do DNA genômico e das análises moleculares, e um segundo tubo de

5ml, contendo heparina, utilizado nas dosagens das enzimas antioxidantes (GSH-GPx, CAT e glutationa) e dos marcadores do perfil oxidativo (MDA e NO<sub>2</sub><sup>-</sup>).

As amostras coletadas foram encaminhadas para o Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

A amostra de sangue total com EDTA, necessária para extração e análise molecular foi armazenada sob refrigeração a -4°C, sendo processada dentro de um prazo máximo de 24 horas.

As amostras com o anticoagulante heparina foram centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm, sendo o plasma (sobrenadante) retirado e separado em alíquotas em triplicata, enumeradas e armazenadas para posterior análise.

O hemolisado eritrocitário foi obtido da amostra com anticoagulante heparina após os processos de remoção completa do plasma e da camada leucocitária por aspiração, de sucessivas lavagens com solução salina (NaCl 0,9%) e da hemólise por adição de água destilada (1:1). O hemolisado foi aliquotado em triplicata, identificado e armazenado. Ambas as amostras, plasma heparinizado e hemolisados eritrocitários, foram armazenadas sob refrigeração em freezer a -80°C até a análise, cerca de 2 meses após a coleta.

### 3.4.2 Análise hematológica

Os dados laboratoriais: contagem das hemácias (Hm), dosagem da hemoglobina (Hb), determinação do hematócrito (Ht), contagem global dos leucócitos e das plaquetas e a determinação da hemoglobina fetal (HbF) foram obtidos a partir de dados secundários de prontuários no período correspondente à análise do perfil oxidativo. Os exames foram realizados no Laboratório do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) utilizando as seguintes metodologias para o hemograma o contador modelo CELL DYN Ruby® – Abbott e para a dosagem da HbF, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### 3.4.3 Eletroforese em pH alcalino em fitas de acetato de celulose

Foi realizado a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino em fitas de acetato de celulose (MARENKO-ROWE, 1965) como teste de triagem e confirmatório para a exclusão

de hemoglobinopatias no grupo controle no Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

#### 3.4.4 Análises moleculares

- **Extração do DNA genômico**

O DNA foi isolado de leucócitos a partir de 200 $\mu$ l de sangue total venoso, utilizando o método modificado do kit de *extração de DNA em coluna Biopur®* (Biometrix Diagnóstica). Em um tubo de microcentrífuga (1,5 ml) foram adicionados 200 $\mu$ l da amostra de sangue total a 200 $\mu$ l de tampão A de lise e 20 $\mu$ l de proteinase K, agitados em vortex por 5 segundos. A amostra foi, então, incubada por 15 min a 56 $^{\circ}$ C em agitação contínua. Após a incubação, foram adicionados 400 $\mu$ l de tampão B6 de ligação com agitação em vortex. A amostra foi transferida para um tupo spin (coluna), acondicionada ao um tubo de reação de 2 ml, e incubada por 1 min. Após esse processo, a amostra foi centrifugada por 2 min a 13.000g, com posterior descarte do filtrado e transferência da coluna para um novo microtubo (2 ml). Foram adicionados à coluna, 500 $\mu$ l de tampão I de lavagem, realizou-se centrifugação por 1min a 13.000g e descarte do filtrado, seguido por adição de 800 $\mu$ l de tampão II de lavagem e centrifugação por 1 min a 13.000g. O filtrado foi descartado e realizou-se nova centrifugação por 6 min a 13.000g, para eliminar completamente o etanol. O tubo spin (coluna) foi disposto em um novo tubo de reação (1,5 ml), onde foram adicionados 50 $\mu$ l de tampão de eluição, previamente, aquecido a 56 $^{\circ}$ C e incubado à temperatura ambiente por 1min. Após centrifugação a 8.000g por 1 min, a coluna foi descartada e a amostra presente no tubo de reação foi armazenada para análises posteriores à -20 $^{\circ}$ C.

- **Protocolo para PCR-RFLP (Reação em Cadeia mediada pela Polimerase e análise do polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição).**

A reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) é a técnica que permite a amplificação de regiões do DNA *in vitro*, utilizando-se de uma reação enzimática catalisada pela DNA polimerase, cuja atividade depende de íons Mg<sup>+2</sup>. O processo ocorre em três etapas determinadas por oscilações de temperatura: a) desnaturação - separação da dupla fita do

DNA a ser amplificada; b) anelamento - ligação do “oligonucleotídeo” à sua região complementar; e c) extensão - adição dos nucleotídeos complementares à fita molde, pela polimerase, a partir dos fragmentos iniciadores (SAIKI *et al.*, 1985).

A análise dos haplótipos da mutação  $\beta^S$  foi realizada por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase e análise do polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP). A técnica utiliza enzimas de restrição para detecção de mutações e polimorfismos genéticos. As enzimas de restrição reconhecem sítios específicos na seqüência do DNA amplificada, que é clivada somente quando o sítio está presente, gerando fragmentos de vários tamanhos que são separados e analisados por eletroforese, sendo posteriormente detectados pela coloração com brometo de etídio ou outro corante fluorescente (CLARK; THEIN, 2004).

Foram analisados seis sítios polimórficos de restrição, seguindo a metodologia de Sutton, Bouhassira e Nagel (1989): 1. Xmnl  $5'\gamma^G$ , 2. Hind III  $\gamma^G$ , 3. Hind III  $\gamma^A$ , 4. Hinc II  $\psi\beta$ , 5. Hinc II  $3'\psi\beta$ , 6. Hinf I  $5'\beta$ . As informações sobre a sequência dos oligonucleotídeos, enzimas utilizadas para cada região, tamanho do fragmento após amplificação pela PCR e o tamanho dos fragmentos após clivagem com enzimas de restrição estão representadas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Sequência dos oligonucleotídeos e enzimas utilizadas para a detecção dos haplótipos da anemia falciforme; regiões dos sítios polimórficos; tamanho dos fragmentos gerados antes e após clivagem.

Oligonucleotídeos	Enzima	Região	Tamanho do fragmento	Fragments apóis clivagem
H0: 5'AACTGTTGCTTATAGGATTT 3' H1: 5'AGGAGCTTATTGATAACCTCAG 3'	Xmn I	$5'\gamma^G$	650pb	450pb+200pb
H2: 5'AAGTGTGGAGTGTGCACATGA 3' H3: 5'TGCTGCTAATGCTTCATTACAA 3'	HindIII	$\gamma^G$	780pb	430pb+340pb+10pb
H3: 5'TGCTGCTAATGCTTCATTACAA 3' H4: 5'TAAATGAGGAGCATGCACACAC 3'	Hind III	$\gamma^A$	760pb	400pb+360pb
H5: 5'GAACAGAAGTTGAGATAGAGA 3' H6: 5'ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT 3'	Hinc II	$\psi\beta$	701pb	360pb+340pb+1pb
H7: 5'TCTGCATTTGACTCTGTTAGC 3' H8: 5'GGACCTAACTGATATAACTA 3'	Hinc II	$3'\psi\beta$	590pb	470pb+120pb
H9: 5'CTACGCTGACCTCATAAATG 3' H10: 5'CTAATCTGCAAGAGTGTCT 3'	Hinf I	$5'\beta$	380pb	240pb+140pb

Fonte: SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989.

Todas as amostras dos pacientes foram analisadas para os seis sítios polimórficos. A composição das reações e condições de amplificação variaram com a região a ser amplificada e estão representadas nas tabelas abaixo:

<b>H0 e H1</b>	
Água destilada	11 $\mu$ L
PCR Master M	12,5 $\mu$ L
Oligonucleotídeo H0	0,25 $\mu$ L
Oligonucleotídeo H1	0,25 $\mu$ L
DNA genômico	1 $\mu$ L
Amplificação - 94°C	5 minutos
	35 ciclos - 45 segundos
Anelamento - 60°C	45 segundos
Extensão - 72°C	1 minuto e 30 segundos
	7 minutos

Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 $\mu$ L do mix da enzima Xmn I (3,3 $\mu$ L de água destilada; 0,2 $\mu$ L da enzima Xmn I; 1,5 $\mu$ L do tampão da enzima) a 10 $\mu$ L do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

<b>H2 e H3</b>	
Água destilada	18,5 $\mu$ L
PCR Master M	12,5 $\mu$ L
Oligonucleotídeo H2	0,5 $\mu$ L
Oligonucleotídeo H3	0,5 $\mu$ L
DNA genômico	1 $\mu$ L
Amplificação - 94°C	5 minutos
	35 ciclos - 30 segundos
Anelamento - 60°C	1 minuto
Extensão - 72°C	1 minuto
	7 minutos

Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 $\mu$ L do mix da enzima Hind III (3,3 $\mu$ L de água destilada; 0,2 $\mu$ L da enzima Hind III; 1,5 $\mu$ L do tampão da enzima) a 10  $\mu$ L do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

<b>H3 e H4</b>	
Água destilada	18,5µL
PCR Master M	12,5µL
Oligonucleotídeo H3	0,5µL
Oligonucleotídeo H4	0,5µL
DNA genômico	1µL
Amplificação - 94°C	5 minutos
	35 ciclos - 30 segundos
Anelamento - 60°C	1 minuto
Extensão - 72°C	1 minuto
	7 minutos

Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5µL do mix da enzima Hind III (3,3µL de água destilada; 0,5µL da enzima Hind III; 1,5µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

<b>H5 e H6</b>	
Água destilada	18,5µL
PCR Master M	12,5µL
Oligonucleotídeo H5	0,5µL
Oligonucleotídeo H6	0,5µL
DNA genômico	1µL
Amplificação - 94°C	5 minutos
	35 ciclos - 30 segundos
Anelamento - 60°C	1 minuto
Extensão - 72°C	1 minuto
	7 minutos

Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5µL do mix da enzima Hinc II (3,3µL de água destilada; 0,5 µL da enzima Hinc II; 1,5µL do tampão da enzima) a 10µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

<b>H7 e H8</b>	
Água destilada	10,5µL
PCR Master M	12,5µL
Oligonucleotídeo H7	0,5µL
Oligonucleotídeo H8	0,5µL
DNA genômico	1µL
Amplificação - 94°C	5 minutos

	35 ciclos - 30 segundos
Anelamento - 57°C	1 minuto
Extensão - 72°C	1 minuto
	7 minutos

Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5µL do mix da enzima Hinc II (3,3µL de água destilada; 0,2µL da enzima Hinc II; 1,5µL do tampão da enzima) a 10µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

<b>H9 e H10</b>	
Água destilada	10,5µL
PCR Master M	12,5µL
Oligonucleotídeo H9	0,5µL
Oligonucleotídeo H10	0,5µL
DNA genômico	1µL
Amplificação - 94°C	5 minutos
	35 ciclos - 45 segundos
Anelamento - 57°C	45 segundos
Extensão - 72°C	1 minuto e 30 segundos
	10 minutos

Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5µL do mix da enzima Hinf I (3,3µL de água destilada; 0,2µL da enzima Hinf I; 1,5µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

O PCR Master Mix utilizado nos protocolos foi da marca *Fermentas* (0,025 de Taq DNA Polimerase; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP) e as reações de amplificação foram desenvolvidas no termociclagor *GeneAmp PCR System 9600*.

Os resultados da amplificação foram verificados pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80V por 20 minutos, e visualizados em câmara de UV (ultravioleta) após coloração com brometo de etídio.

Os resultados da digestão enzimática foram verificados pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizados em câmara de UV (ultravioleta) após coloração com brometo de etídio.

Os resultados da digestão enzimática das amostras foram analisados de acordo com o padrão de polimorfismos para cada haplótipo que está representado no Quadro 2.

**Quadro 2-** Padrão de polimorfismos para cada haplótipo.

Região/ Enzima	$5'\gamma^G$	$\gamma^G$	$\gamma^A$	$\psi\beta$	$3'\psi\beta$	$5'\beta$
Haplótipo	Xmn I	HindIII	Hind III	Hinc II	Hinc II	Hinf I
Senegal	+	+	-	+	+	+
Benin	-	-	-	-	+	-
Bantu/ Bantu	-	+	-	-	-	-
Camarões	-	+	+	-	+	+
Índia-Arábia	+	+	-	+	+	-

Fonte: Adaptação de STUART; NAGEL, 2004.

### 3.4.5 Análise do perfil oxidativo

- **Protocolo para determinação da concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (GREEN *et al.*, 1982)**

Após o período de incubação, a concentração de  $\text{NO}_2^-$  foi determinada segundo o método de Green e colaboradores (1982), que se baseia em detectar a presença de  $\text{NO}_2^-$  em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea. O método baseia-se na adição de 100 $\mu\text{l}$  da amostra plasmática em 100 $\mu\text{L}$  do reativo de Griess (sulfanilamida 1%/cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina (NEED) 0,1%/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5%/água destilada, na proporção de 1:1:1:1) e a absorbância medida em leitor de microplacas em 540nm.

- **Protocolo para determinação da concentração de malonaldeído (MDA) (DRAPER; HADLEY, 1990)**

O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nessa reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiométricamente com uma molécula de MDA para formar um

cromóforo róseo, que tem absorbância máxima em solução ácida em 532nm a 535nm. A quantificação foi realizada por espectrofotometria de acordo com o protocolo empregado, que consiste na incubação de 150 $\mu$ L do plasma em banho-maria a 37 °C por 1h, seguido por adição de 200 $\mu$ L de ácido perclórico a 35%, para precipitar as proteínas. Em seguida, realizou-se centrifugação a 14.000 g por 10 min, sendo, após, foi adicionado ao sobrenadante, 100  $\mu$ L de uma solução de tiobarbiturato de sódio a 0,6%. A amostra permaneceu em banho-maria aquecido, entre 90°C - 100°C por 30 min. Após resfriada, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 560nm.

- **Protocolo para determinação da atividade enzimática da catalase (CAT) (AEBI, 1984)**

A atividade da catalase (CAT) nos eritrócitos foi determinada por método espectrofotométrico em ultravioleta a 240nm, baseado na monitorização da decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os valores brutos obtidos em  $\Delta$ a (delta/min) foram corrigidos por um fator de correção do decaimento da atividade por diluição do hemolisado, divididos pela absorvidade molar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm ( $\epsilon$  0,0394 L mmol<sup>-1</sup>1mm<sup>-1</sup>).

- **Determinação da atividade enzimática da glutationa peroxidase (GSH-Px)**

A medida da atividade da glutationa peroxidase (GSH-Px) nos eritrócitos foi determinada utilizando o kit *Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay®* (Sigma-Aldrich). O kit utiliza método de determinação indireta da enzima, baseado na reação de oxidação da glutationa reduzida (GSH) à glutationa oxidada (GSSG) catalisada por GSH-GPx, utilizando glutationa redutase (GR) e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fostato). A absorbância é medida por decréscimo a 340 nm, do NADPH durante a oxidação de NADPH a NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo).

- **Determinação das concentrações de glutationa:**

A determinação das concentrações da glutationa total, glutationa oxidada e glutationa reduzida foram realizadas utilizando o método empregado no kit *Total Glutathione Activity®* (Assay Designs, Inc.). O método baseia-se na capacidade da glutationa redutase reduzir a glutationa oxidada (GSSG) ao estado reduzido (GSH), onde o grupo sulfidrila da GSH reage com o DTNB (ácido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzóico, reagente Ellman) produzindo um ácido de cor amarela, 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), que é determinado espectrofotometricamente em absorbância a 405 - 414 nm. A taxa de produção de TNB é diretamente proporcional à concentração de glutationa na amostra. A medição da absorbância do TNB fornece uma estimativa precisa da glutationa na amostra.

### **3.5 Avaliação do perfil oxidativo em relação aos haplótipos na AF**

Os haplótipos dos pacientes com AF foram estratificados de acordo com Rusanova e colaboradores (2010) em dois grupos: Bantu/n (Bantu/Bantu, Bantu/Benin e Bantu/Atípico) e em Benin/n (Benin/Benin e Benin/Atípico).

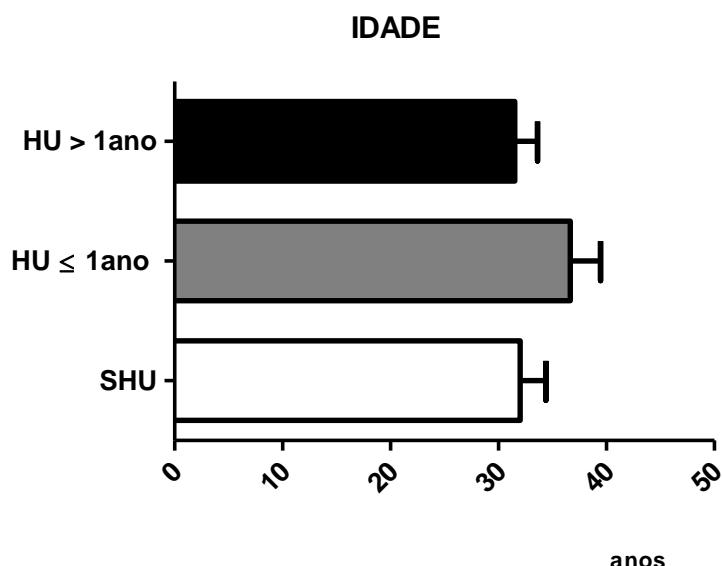
### **3.6 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism (versão 5.0). O teste para avaliação da distribuição normal das variáveis contínuas foi o Kolmogorov-Smirnov. O teste ANOVA foi utilizado para a comparação múltipla de médias entre os grupos estudados e o pós-teste Newman-Keuls para identificar quais grupos foram diferentes. O nível de significância estatística considerado para todas as análises foi  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características da amostragem

As idades dos pacientes variaram entre 18 e 68 anos, apresentando idade média de 36,65 anos no grupo  $HU \leq 1\text{ano}$  (faixa etária entre 22 a 61 anos), 32 anos no grupo  $HU > 1\text{ano}$  (faixa etária entre 18 a 55 anos) e idade média de 31,50 anos no grupo SHU (faixa etária entre 18 a 68 anos) (Gráfico 1). Não foi observada diferença significante entre os grupos em relação à idade ( $p = 0,32$ ).



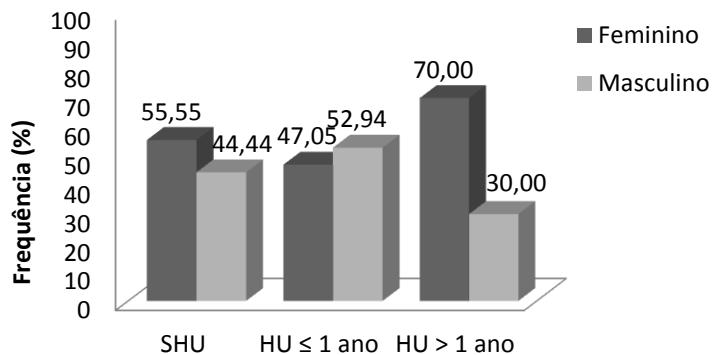
**Gráfico 1** – Distribuição da idade (anos) dos pacientes por grupo ( $n = 64$ ).

$HU > 1\text{ano}$  (pacientes em tratamento com HU há mais de 1 ano)

$HU \leq 1\text{ano}$  (pacientes com AF em uso de HU por um período menor ou igual a 1 ano)

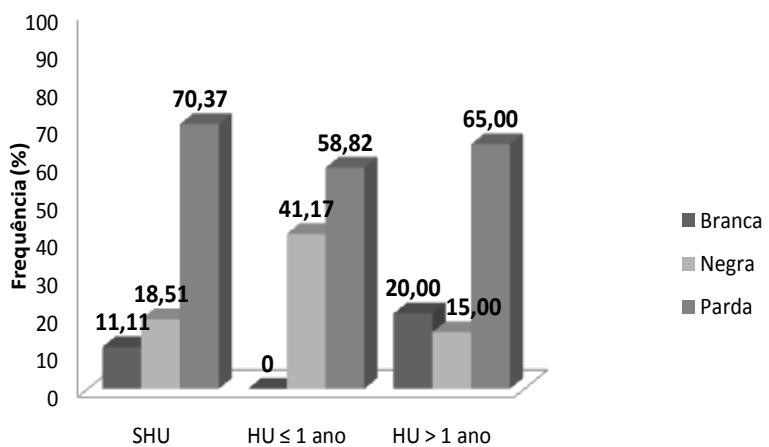
SHU (pacientes com AF sem tratamento com HU)

No gráfico 2, verificamos que em relação ao sexo houve o predomínio do gênero feminino nos grupos SHU (55,55%) e no grupo HU > 1 ano (70%), enquanto no grupo HU ≤ 1 ano predominou o gênero masculino (52,94%), não havendo diferença significante entre eles ( $p = 0,29$ ).



**Gráfico 2** – Distribuição dos pacientes em relação ao sexo (n = 64).

Em relação à etnia identificamos o predomínio da etnia parda em todos os três grupos, SHU (70,37%), HU ≤ 01 ano (58,82%) e HU > 01 ano (65%) (Gráfico 3) com diferença significante nos três grupos ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 3** – Distribuição dos pacientes em relação à etnia (n = 64).

#### 4.2 Características hematológicas dos pacientes estudados de acordo com o tratamento

Os valores hematológicos dos pacientes estudados estão representados na tabela 1. Foi observada diferença significante entre as variáveis do grupo HU > 1 ano, leucócitos ( $8.267 \pm 644,6$ ) e plaquetas ( $356.300 \pm 16.543$ ) quando comparado aos demais grupos. Outra diferença significante foi observada em relação ao número médio de Hm do grupo SHU ( $2,91 \pm 0,13$ ) em relação aos grupos em tratamento com HU. Não sendo observada diferença em relação à concentração de Hb e ao índice do Ht entre os grupos estudados (Tabela 1).

**Tabela 1** – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos pacientes com anemia falciforme.

	SHU (n=27)	HU ≤ 1 ano (n=17)	HU > 1 ano (n=20)	Valor de p
Hm (milhões/mm <sup>3</sup> )	<b>2,91 ± 0,13*</b>	$2,52 \pm 0,12$	$2,42 \pm 0,07$	0,006
Hb (g/dL)	$8,58 \pm 1,27$	$8,63 \pm 1,95$	$9,24 \pm 1,14$	NA
Ht (%)	$25,27 \pm 0,72$	$25,24 \pm 1,43$	$26,62 \pm 0,76$	NA
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	$11.650 \pm 977,2$	$11.207 \pm 1.120$	<b>8.267 ± 644,60*</b>	0,028
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	$444.038 \pm 26.702$	$406.375 \pm 28.699$	<b>356.300 ± 16.543*</b>	0,04

Os resultados estão expressos em valores da média  $\pm$  desvio-padrão.

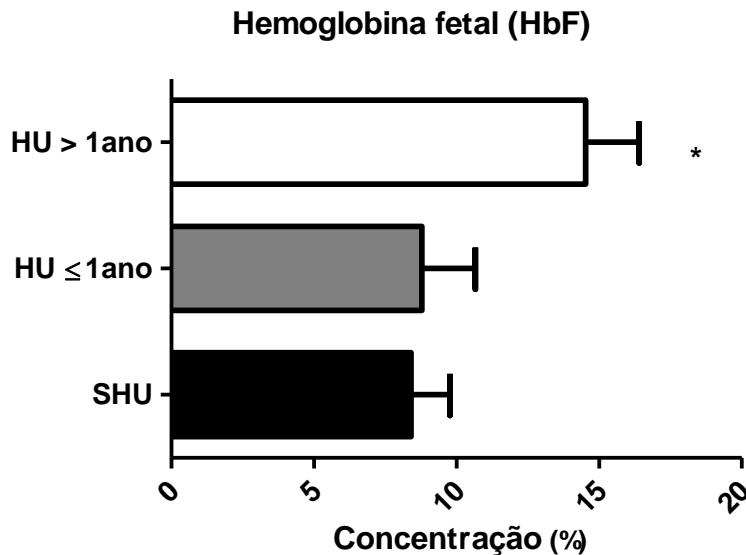
HbF: Hemoglobina fetal, Hm: hemácias, Hb: hemoglobina, Ht: hematócrito  
NA – Não aplicável, pois não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

\* estatisticamente significante.

#### 4.3 Níveis médios de HbF em relação ao tratamento com hidroxiuréia

Analizando o gráfico 4, podemos observar a presença de concentrações médias da HbF mais elevadas nos pacientes em tratamento com HU há mais de um ano (HU > 1 ano –  $14,53\% \pm 1,87$ ), seguido respectivamente pelos grupos HU ≤ 1 ano e SHU, que apresentou os

menores níveis de HbF. A comparação múltipla dos valores médios de HbF entre os grupos de pacientes com AF estudados demonstrou a ocorrência de diferença significante entre o grupo HU > 1 ano e os demais grupos ( $p = 0,021$ ).



**Gráfico 4** – Valores médios  $\pm$  desvio padrão de HbF entre os grupos estudados ( $n = 57^{**}$  ).

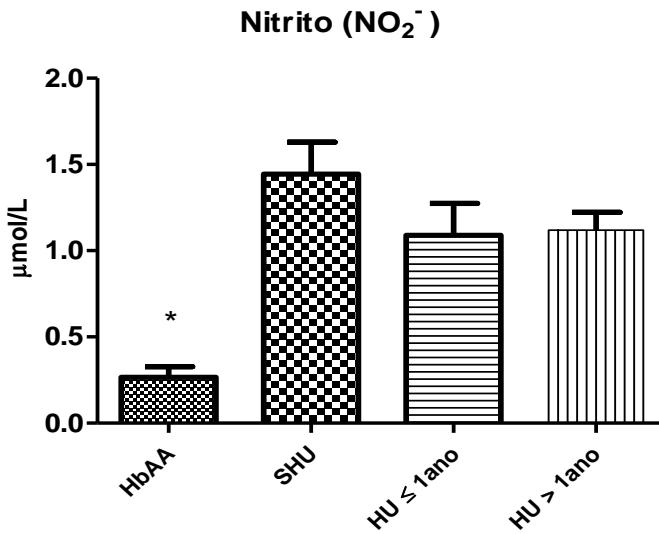
\* $p < 0,05$

\*\* Valores obtidos através dos prontuários dos pacientes que realizaram dosagem de HbF.

#### 4.4 Comparações dos parâmetros oxidativos entre os indivíduos estudados

##### 4.4.1 Níveis médios de $\text{NO}_2^-$ e MDA entre os grupos estudados

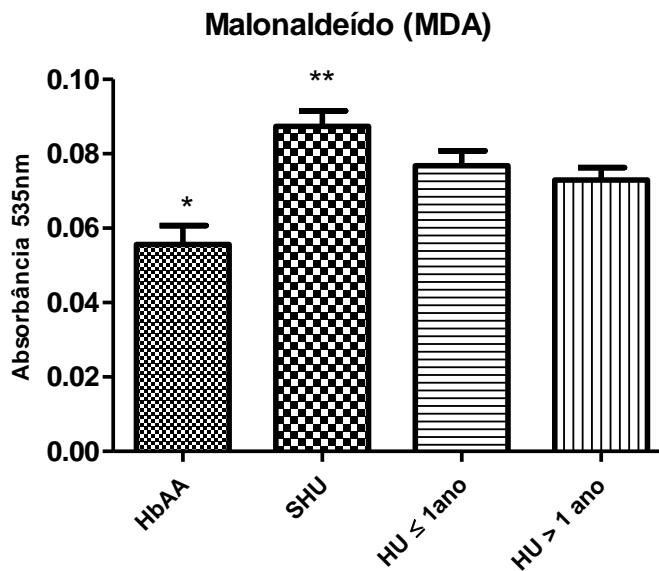
As relações das concentrações de  $\text{NO}_2^-$  e MDA entre os grupos podem ser avaliadas através dos gráficos abaixo:



**Gráfico 5** - Valores médios  $\pm$  desvio padrão de  $\text{NO}_2^-$  nos grupos estudados (n = 64).

HbAA: grupo controle.

\*p < 0,0001.



**Gráfico 6** - Valores médios  $\pm$  desvio padrão de MDA nos grupos estudados (n = 64).

HbAA: grupo controle.

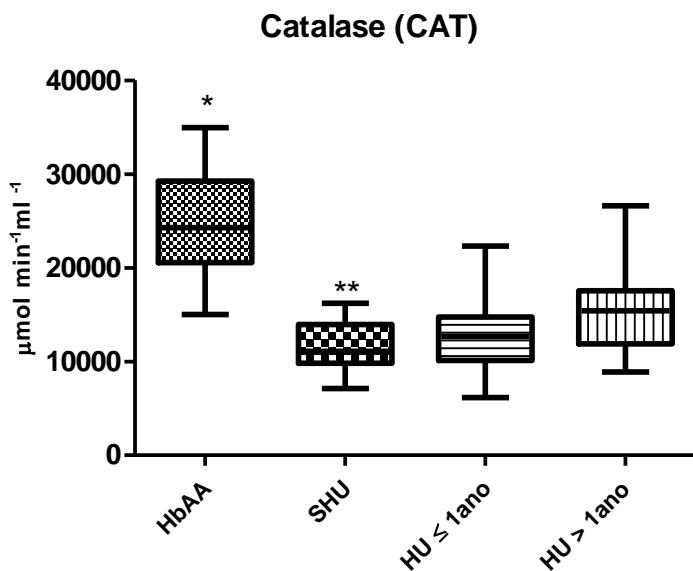
\*p < 0,0001; \*\* p < 0,05

Em relação à concentração média do  $\text{NO}_2^-$ , verificou-se significância nas concentrações do metabólito no grupo controle em relação aos demais grupos com AF. Foi observada maior concentração média de  $\text{NO}_2^-$  no grupo SHU ( $1,44 \pm 0,18$ ) quando comparada às médias obtidas nos grupos de pacientes em tratamento com  $\text{HU} \leq 1$  ano ( $1,09 \pm 0,18$ ) e  $\text{HU}$

> 1 ano ( $1,12 \pm 0,10$ ), porém não foi significante (Gráfico 5). No que se refere aos níveis de MDA, foi verificada diferença significante entre o grupo controle ( $0,05 \pm 0,005$ ) e os demais grupos. Também foi observada diferença significante entre a média de MDA nos pacientes com AF do grupo HU > 1 ano ( $0,07 \pm 0,003$ ) em relação ao grupo SHU ( $0,08 \pm 0,004$ ) (Gráfico 6).

#### 4.4.2 Níveis médios da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px) entre os grupos

Ao analisar os resultados referentes às enzimas antioxidantes, foi observado que o grupo controle apresentou maior atividade enzimática de CAT, demonstrando significância em relação aos demais grupos. Ao se comparar as médias da CAT entre os grupos com AF, verificou-se que o grupo SHU ( $11.728 \pm 491,60$ ) apresentou menor atividade enzimática e diferença significante em relação ao grupo HU > 1 ano ( $15.818 \pm 979,50$ ) ( $p = 0,036$ ) (Gráfico 7).

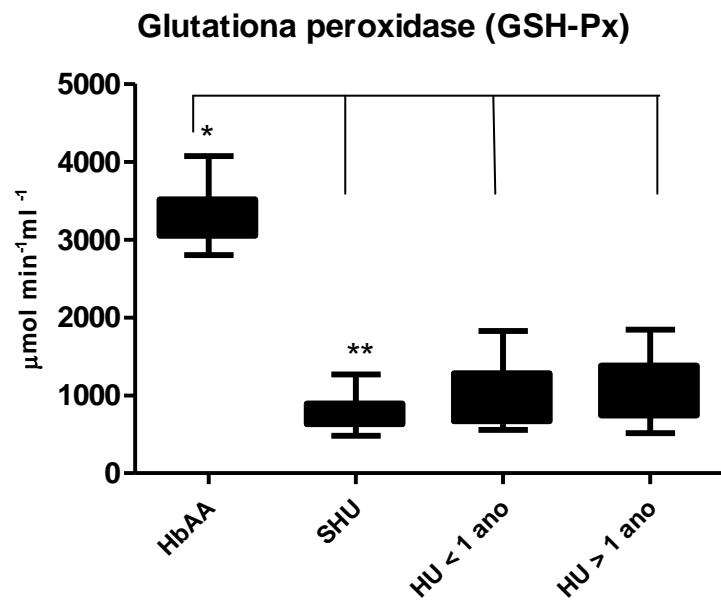


**Gráfico 7** – Níveis médios  $\pm$  desvio padrão da atividade enzimática da CAT em relação aos grupos estudados ( $n = 64$ ).

\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p = 0,036$ .

Quanto à concentração média da atividade da GSH-Px, o grupo controle apresentou atividade mais elevada do antioxidante, GSH-Px ( $3367,0 \pm 85,43$ ), apresentando

diferença significante quando comparada a média dos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Foi observada também, a atividade enzimática da GSH-Px nos grupos de pacientes com AF, onde se verificou que o grupo SHU, além de apresentar menor atividade média da enzima ( $777,0 \pm 44,83$ ), demonstrou diferença significante ( $p = 0,031$ ) em relação aos pacientes em tratamento,  $HU \leq 1$  ano ( $1023,0 \pm 89,02$ ) e  $HU > 1$  ano ( $1063,0 \pm 93,05$ ), com consequente aumento da atividade enzimática da GSH-Px após o uso da HU(Gráfico 8).



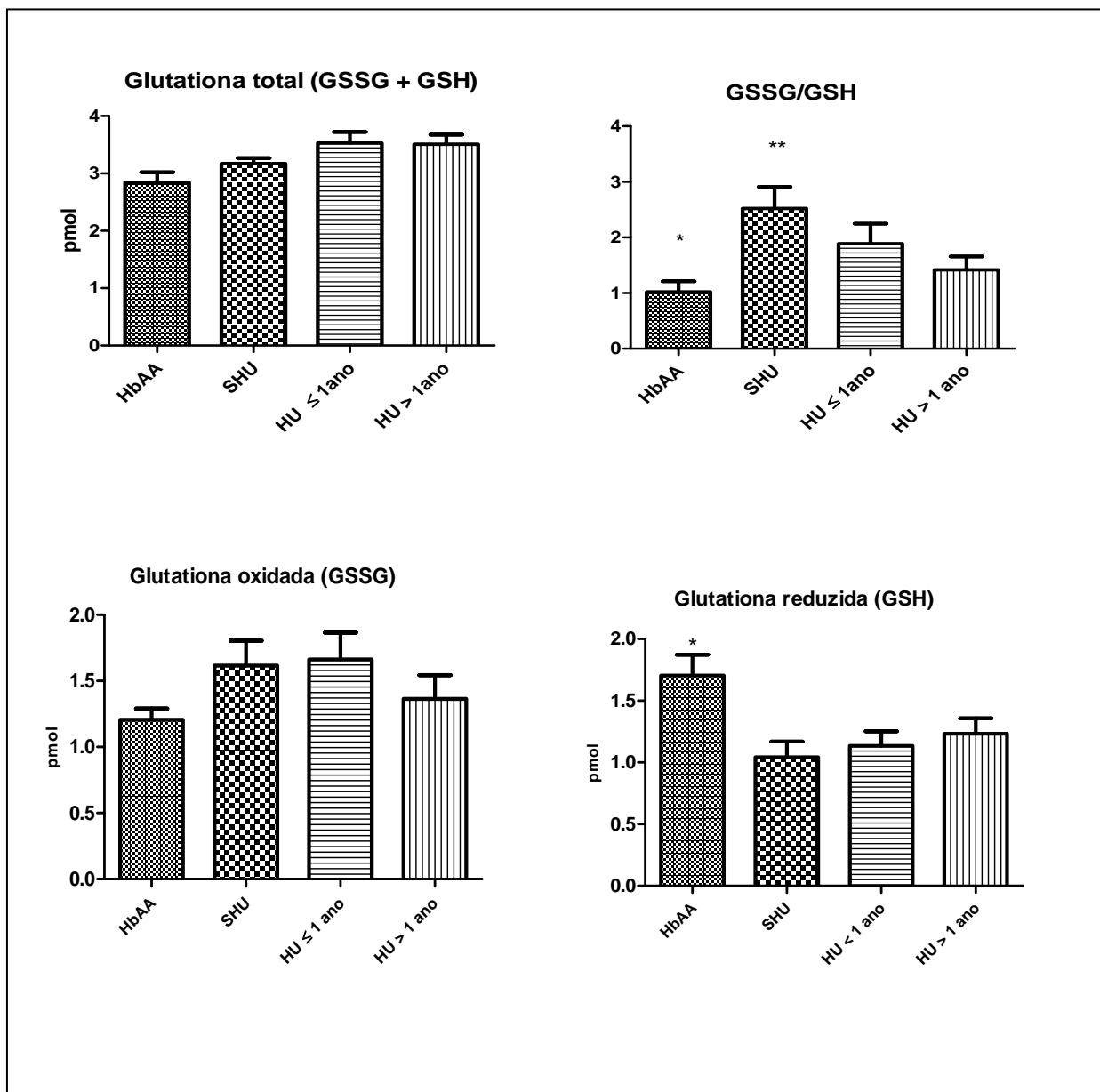
**Gráfico 8** – Níveis médios  $\pm$  desvio padrão da atividade enzimática da GSH-Px em relação aos grupos estudados ( $n = 64$ ).

\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,05$ .

#### 4.4.3 Concentrações média de glutationa entre os grupos estudados

Não houve diferença significante na comparação dos valores de glutationa total (GSSG + GSH) e GSSG entre os grupos. Em relação à GSH, foi possível verificar, com significância, a presença do aumento em sua concentração no grupo controle quando comparado aos demais grupos (Gráfico 9). Ao se analisar o índice GSSG/GSH, o grupo controle apresentou menores valores em relação aos demais grupos. Entre os pacientes com

AF, a relação GSSG/GSH foi maior nos pacientes SHU quando comparado ao grupo HU > 01 ano ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 9** – Concentrações média  $\pm$  desvio padrão da glutationa nos grupos estudados ( $n = 64$ ).

\*/\*\* $p < 0,05$

GSSG / GSH: relação GSSG (glutationa oxidada) / GSH: (glutationa reduzida).

#### 4.4.4 Estudo do perfil oxidativo em relação aos haplótipos, nos pacientes com anemia falciforme

A caracterização dos haplótipos do grupo estudado foi realizada em 41 pacientes, sendo os haplótipos estratificados em dois grupos (Bantu/n e Benin/n) de acordo com o uso ou não da HU, para a análise do estresse oxidativo.

Foram identificados no presente estudo a presença de cinco tipos de haplótipos: Bantu/Bantu 22 (53,65%), Bantu/Benin 11 (26,83%), Benin/Benin 4 (9,75%), Bantu/Atípico 2 (4,87%) e dois indivíduos Benin/Atípico (4,87%) (Tabela 2).

Na Tabela 3 verifica-se que do haplótipo Bantu/Bantu 6 (27,3%) se apresentam sem uso de HU e 16 (72,7%) em uso de HU. No haplótipo Bantu/Benin 3 (27,3%) se apresentam sem uso de HU e 8 (72,7%) em uso de HU. No haplótipo Benin/Benin 3 (75%) se apresentam sem uso de HU e um (25%) em uso de HU. Os haplótipos Bantu/Atípico e Benin/Atípico apresentaram cada um, um paciente sem uso e outro em uso de HU.

**Tabela 2** – Distribuição dos haplótipos na população estudada (n=41).

Haplótipo	n	%
Bantu/Bantu	22	53,65
Bantu/Benin	11	26,83
Benin/Benin	4	9,75
Bantu/Atípico	2	4,87
Benin/Atípico	2	4,87

**Tabela 3** – Distribuição dos haplótipos na população estudada em relação ao uso ou não de HU (n=41).

Haplótipo	SHU	Uso de HU	Nº de indivíduos (%)
<b>Bantu/Bantu</b>	6	16	22 (53,65%)
<b>Bantu/ Benin</b>	3	8	11 (26,83%)
<b>Benin/ Benin</b>	3	1	4 (9,75%)
<b>Bantu/ Atípico</b>	1	1	2 (4,87%)
<b>Benin/ Atípico</b>	1	1	2 (4,87%)
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>27</b>	<b>41</b>

HU: hidroxiuréia

SHU: sem uso de hidroxiuréia

Na avaliação da relação dos haplótipos com o estresse oxidativo em pacientes com AF sem uso de HU (SHU) foi verificando que os parâmetros do estresse oxidativo  $\text{NO}_2^-$  e MDA foram semelhantes entre os grupos de Bantu/n e Benin/n. Em relação ao perfil das enzimas antioxidantes observaram-se resultados semelhantes da CAT entre os grupos de haplótipos com um aumento não significante da GSH-Px no grupo Bantu/n em relação ao Benin/n. Já a relação GSSG/GSH se apresentou maior, porém não significante no grupo Benin/n em relação ao Bantu/n da (Tabela 4).

A análise da relação dos haplótipos com o estresse oxidativo em pacientes com AF em uso de HU verificou um aumento não significante nos níveis de  $\text{NO}_2^-$  no grupo de haplótipo Bantu/n em relação ao Benin/n e níveis de MDA semelhantes entre os grupos. Em relação ao perfil das enzimas antioxidantes verificou-se um aumento significante da GSH-Px ( $p<0,03$ ) no grupo Benin/n em relação Bantu/n e resultados semelhantes da CAT entre os grupos de haplótipos. Já a relação GSSG/GSH se apresentou maior, porém não significante no grupo Bantu/n em relação Benin/n (Tabela 4).

**Tabela 4** - Valores médios e desvio padrão do perfil oxidativo nos haplótipos dos pacientes sem tratamento (SHU) (n=14) e em tratamento com a HU (n=27).

SHU			Uso de HU			
	Bantu/n (n=10)	Benin/n (n=4)	Valor de p	Bantu/n (n=25)	Benin/n (n=02)	Valor de p
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu$ mol/L)	2,41 $\pm$ 0,64	2,62 $\pm$ 0,60	<b>0,60</b>	<b>2,49<math>\pm</math>0,26</b>	1,87 $\pm$ 0,36	0,52
MDA (absorbância 535nm)	0,18 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,009	<b>0,41</b>	0,14 $\pm$ 0,006	0,15 $\pm$ 0,03	0,73
CAT ( $\mu$ mol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	10.936 $\pm$ 791	11.787 $\pm$ 1.105	<b>0,56</b>	15.068 $\pm$ 1.026	13.164 $\pm$ 1.542	0,61
GSH-Px ( $\mu$ mol min <sup>-1</sup> ml <sup>-1</sup> )	<b>843,2 <math>\pm</math>74,38</b>	634 $\pm$ 68,66	<b>0,12</b>	967,20 $\pm$ 78,19	<b>1.615<math>\pm</math>210</b>	<b>0,03*</b>
GSSG/GSH	1,35 $\pm$ 0,38	<b>1,80<math>\pm</math>1,22</b>	<b>0,65</b>	<b>0,99<math>\pm</math>0,18</b>	0,53 $\pm$ 0,15	0,50

Valores médios  $\pm$  desvio padrão das dosagens dos parâmetros oxidativos.

Bantu/n: haplótipos Bantu/Bantu, Bantu/Benin e Bantu/Atípico

Benin/n: haplótipos Benin/Benin e Benin/Atípico

NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: nitrito

MDA: malonaldeído

CAT: catalase

GSH-Px: glutationa peroxidase

GSSG/GSH: relação glutationa oxidada/glutationa reduzida

## 5 DISCUSSÃO

A anemia falciforme é caracterizada por uma anemia hemolítica crônica com presença de freqüentes crises de vaso-oclusão de grau variado. A heterogeneidade clínica é atribuída a vários fatores dentre eles a concentração da HbF, haplótipos e a co-expresão com a alfa talassemia (ZAGO; PINTO, 2007; MOUSINHO-RIBEIRO *et al.*, 2003).

Um total de 64 pacientes foi analisado quanto ao impacto da HU no perfil oxidativo, sendo que desse total, em 41 pacientes foi verificado o impacto dos haplótipos também no perfil oxidativo. A amostra do presente estudo representa mais de 50% dos pacientes com AF em acompanhamento no ambulatório do HUWC/UFC.

A idade dos pacientes variou de 18 a 68 anos, com idade média de 33,08 anos, apresentando médias de 31,50 anos no grupo SHU, 36,65 anos no grupo  $HU \leq 1$  ano e 32 anos no grupo  $HU > 1$  ano, não havendo diferença significante entre eles, o que indica que a idade não está interferindo nos resultados encontrados. Os resultados demonstraram que em relação ao gênero houve predomínio do gênero feminino nos grupos SHU (55,55%) e  $HU > 1$  ano (70%), enquanto que o masculino foi predominante no grupo  $HU \leq 1$  ano (52,94%). Os resultados são similares aos encontrados em estudos anteriores realizados na mesma população (GALIZA *et al.*, 2005; SILVA; GONÇALVES; MARTINS, 2009).

Em relação à etnia observou-se maioria pertencente à etnia parda em todos os grupos. Dados do IBGE descrevem que a região nordeste possui a maior população de afro-descendentes quando somado o número de indivíduos negros e pardos (IBGE, 1996-2003). A notável miscigenação ocorrida no Brasil, assim como suas correntes imigratórias internas e externas, já dissociaram a HbS da cor da pele dos seus portadores, apesar dessa alteração genética continuar sendo um marcador étnico importante (RAMALHO; MAGNA; GIRALDI, 2006).

A análise das variáveis hematológicas dos pacientes no presente estudo, demonstrou uma diferença significante entre o grupo em uso da  $HU > 1$  ano em relação aos demais nos parâmetros, HbF, leucócitos e plaquetas, caracterizados pela redução na contagem de leucócitos ( $p = 0,028$ ) e plaquetas ( $p = 0,04$ ) e elevação nos níveis da HbF ( $p = 0,021$ ), sugerindo que o tratamento e o tempo de uso da HU influenciaram na normalização destas variáveis, apesar da ausência de resultados anteriores ao início do tratamento. Resultado semelhante foi obtido por Voskaridou e colaboradores (2010), que observaram uma redução nesses parâmetros em pacientes com AF, após seis meses de tratamento com

HU. Singh e colaboradores (2010) e Ballas e colaboradores. (2010) demonstraram níveis de HbF significantemente elevados após tratamento com a HU. Steinberg e colaboradores (1997) também associam o aumento da HbF à resposta ao tratamento com HU. Em um estudo realizado no Brasil, Borba e colaboradores (2003) observaram um aumento significativo nos níveis de HbF em pacientes com AF, após o início do tratamento com HU em relação aos pacientes que não realizaram terapêutica com essa droga.

A medida da concentração de HbF é um dos moduladores genéticos mais conhecidos e um importante modulador clínico na AF (GUALANDRO, 2009). Estudos têm demonstrado uma correlação inversa entre a concentração de HbF e a freqüência de crises dolorosas, STA (síndrome torácica aguda) e mortalidade (STEINBERG, 2005; FRENETTE; ATWEH, 2007). Em um estudo realizado no Ceará, Silva e colaboradores (2009) ressaltam a importância dos níveis de HbF na evolução clínica da AF, verificando menor número de crises vaso-occlusivas e menor prevalência de úlceras de perna em pacientes com anemia falciforme que apresentavam maior concentração de HbF. Em 2007, Fasola e colaboradores, avaliaram o benefício da HU na AF e verificaram que a mesma reduz os episódios de crises vaso-occlusivas e aumenta o tempo entre as crises, e sugeriram que os benefícios desta droga podem ser devido à sua habilidade em aumentar a geração de óxido nítrico na presença de peróxido de hidrogênio e da heme proteína, presentes na hemoglobina.

Os haplótipos do gene da  $\beta^s$ -globina têm um papel importante na determinação da gravidade da doença. O haplótipo Senegal, raro no Brasil, está associado a níveis elevados de HbF, em torno de 20%, enquanto o haplótipo Árabe-Indiana, que não ocorre no Brasil, apresenta os maiores níveis de HbF e corresponde à forma mais leve da doença, sendo oligossintomática ou assintomática (OGEDEGBE, 2002; ZAGO; PINTO, 2007). O haplótipo Bantu, de quadro clínico mais severo, está associado à maior incidência de danos a órgãos e à falência renal, apresentando os menores níveis de HbF (STEINBERG, 2005). Portadores do haplótipo Benin possuem níveis intermediários de HbF e, consequentemente, características clínicas intermediárias da doença (OGEDEGBE, 2002).

No presente estudo foram avaliados dois importantes marcadores de dano celular na AF que são  $\text{NO}_2^-$  (metabólito do NO) e MDA. Em relação ao  $\text{NO}_2^-$ , observou-se níveis elevados nos grupos de pacientes com AF em relação ao grupo controle. Esse resultado provavelmente se deve ao fato de que na anemia falciforme ocorra um aumento do consumo de NO, gerando aumento dos níveis dos seus metabólitos. Resultados semelhantes foram obtidos por Rusanova e colaboradores (2010) em crianças com AF sem uso de HU. Ao se analisar, no presente estudo, o perfil do  $\text{NO}_2^-$  em relação aos pacientes com AF, verificou-se

que o aumento foi à custa dos pacientes sem uso de HU. Esse fato pode ser atribuído ao provável efeito antioxidante da HU, ação que é dose dependente. A redução do NO biodisponível, e consequente aumento na produção de seus metabólitos, nos pacientes com AF é decorrente principalmente do aumento do seu consumo pelas EROs (ASLAN; FREEMAN, 2002). Dados da literatura (REES *et al.*, 1995; LOPEZ *et al.*, 2003) indicam que o aumento do  $\text{NO}_2^-$  é mais proeminente durante as crises de vaso-oclusão.

Os níveis plasmáticos de MDA, parâmetro que avalia o dano oxidativo na membrana celular, se apresentaram significantemente mais elevados nos pacientes com AF quando comparados com o controle. Resultado que reflete um aumento na produção de radicais livres na AF, consequentemente os mesmos estão sujeitos a hiperperoxidação. Resultados semelhantes foram obtidos por Titus e colaboradores (2004), Manfredini e colaboradores (2008), Hundekar e colaboradores (2010) e Shimauti e colaboradores (2010) que demonstraram a presença de níveis elevados de MDA em pacientes com AF não tratados com HU, quando comparados com o controle. Verificou-se, também, que houve diferença dentro do grupo de pacientes com AF, com taxas mais elevados de MDA no grupo SHU em relação ao HU > 1 ano, com diferença significante ( $p < 0,05$ ). Portanto, os resultados indicam que a peroxidação lipídica é mais evidente nos pacientes com AF sem uso de HU. Fato esse atribuído a um efeito protetor da HU sobre estes marcadores do estresse oxidativo.

Com relação aos parâmetros antioxidantes intracelulares, foi observado que a atividade média da enzima CAT e da GSH-Px apresentaram-se diminuídas nos pacientes com AF em relação ao grupo controle. Achado este atribuído ao fato dos eritrócitos dos pacientes com AF apresentarem deficiência em seu sistema antioxidante enzimático em decorrência do seu maior consumo nos processos de remoção das EROs que encontram-se elevadas (KLINGS; FARBER, 2001). Os resultados estão de acordo com os estudos de Das e Nair (1980) e Hundekar e colaboradores (2010) que observaram atividade da CAT e GSH-Px reduzida em pacientes adultos com AF. Resultados discordantes foram obtidos por Manfredini e colaboradores (2008) que demonstraram a presença de maiores concentrações de GSH-Px em pacientes adultos com AF em relação ao controle e por Rusanova e colaboradores (2010) que também observaram aumento da GSH-Px em um grupo de crianças com AF quando comparado ao de crianças saudáveis. Ao se estratificar o grupo de pacientes com AF quanto ao uso da HU verificou-se que a atividade das CAT e da GSH-Px foi maior no grupo com maior tempo de uso da medicação. Em estudo recente, Cho e colaboradores (2010) demonstraram um aumento da expressão em 91% de GSH-Px em pacientes com AF

após terapia com HU em relação aos pacientes não-tratados, demonstrando a ação antioxidante da HU.

A glutationa desempenha um importante papel de defesa intracelular contra as EROs e aos compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos (HUBER; ALMEIDA; FATIMA, 2008). No presente estudo, a concentração da glutationa total (GSSG + GSH) se apresentou elevada nos pacientes com AF em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Manfredini (2008) que demonstrou um aumento na concentração da glutationa total ao comparar os resultados dos pacientes com AF com os do controle. Já Morris e colaboradores (2008) observaram uma redução nos níveis da glutationa total em pacientes com AF em relação ao controle (indivíduos saudáveis).

Ao se analisar, no presente estudo os níveis da GSH, foram verificadas menores concentrações do antioxidante nos grupos de pacientes com AF em relação ao controle, com diferença significante ( $p<0,05$ ). Resultados semelhantes foram obtidos por Reid e colaboradores (2006) que observaram uma redução nos níveis da forma reduzida (GSH) em pacientes com AF, sugerindo que a diminuição desse importante antioxidante ocorra não devido a uma deficiência em sua síntese e sim ao aumento no seu consumo.

A relação da GSSG/GSH constitui o índice de maior acurácia na avaliação do estado antioxidante intracelular. Quanto mais elevado o índice maior o comprometimento na defesa antioxidante. Os resultados demonstram uma relação GSSG/GSH aumentada nos pacientes com AF em relação ao grupo controle. Foi observada, também, diferença dentro do grupo de pacientes com AF, com aumento da relação GSSG/GSH no grupo SHU em relação ao HU > 1 ano ( $p<0,05$ ). Resultados semelhantes foram obtidos por Rusanova e colaboradores (2010) em crianças com AF que apresentaram significante aumento nesse índice em relação ao controle saudável. Os resultados, portanto indicam a existência de um importante dano oxidativo nas células dos pacientes com AF.

A determinação dos haplótipos no presente estudo demonstrou o predomínio do haplótipo Bantu. Resultados semelhantes foram observados por Silva e colaboradores (2009) em um estudo realizado em pacientes adultos com AF, no mesmo serviço. Resultados discordantes foram obtidos por Galiza e colaboradores (2005) que verificaram o predomínio do haplótipo Benin também no mesmo serviço. No entanto deve-se ressaltar que a amostragem no presente estudo foi o dobro da utilizada pelo grupo de Galiza e colaboradores (2005).

A avaliação do estresse oxidativo em relação aos haplótipos nos pacientes em estudo demonstrou que na população sem uso de HU os níveis de  $\text{NO}_2^-$  e de MDA foram

semelhantes entre os grupos de haplótipos, com aumento não significante da atividade da enzima GSHPx no grupo de haplótipo Bantu/n e da relação GSSG/GSH no grupo Benin/n. Rusanova e colaboradores (2010) ao avaliar a interferência do genótipo no estresse oxidativo e no fenótipo em crianças com AF, sem uso de HU, obtiveram resultados semelhantes em todos os parâmetros ( $\text{NO}_2^-$ , MDA, GSH-Px e da relação GSSG/GSH) em relação aos grupos de haplótipos analisados. Portanto os nossos resultados foram semelhantes ao do grupo de acima citado.

Ao se avaliar o perfil do estresse oxidativo em relação aos haplótipos em uma população de pacientes em uso de HU verificou-se um aumento não significante dos níveis de  $\text{NO}_2^-$  no grupo Bantu/n em relação ao Benin/n com resultados semelhantes de MDA entre os grupos de haplótipos. Em relação ao perfil antioxidante verificamos um aumento significante da GSHPx ( $p<0,03$ ) no grupo Benin/n em relação ao Bantu/n e resultados semelhantes da CAT entre os grupos. Este achado se deve provavelmente ao fato do grupo Benin/n apresentar um quadro clínico mais moderado em relação ao Bantu/n. A relação GSSG/GSH foi maior, porém não significante no grupo Bantu/n em relação ao Benin/n. Resultado que reforça a hipótese de que o genótipo Bantu/n apresenta um fenótipo mais grave em relação aos demais haplótipos na AF, no entanto devemos considerar que o referido grupo se encontrava em tratamento com HU, medicamento que eleva os níveis de HbF e consequenteamente compromete a análise do estresse oxidativo.

Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que os pacientes com AF apresentam um estado hiperoxidativo com níveis elevados dos produtos do estresse oxidativo e diminuídos do perfil antioxidante e que a hidroxiuréia teve um impacto sobre o perfil oxidativo. No entanto, em relação ao impacto dos haplótipos no estresse oxidativo, estudos posteriores com uma maior amostragem devem ser recomendados para confirmar nossos resultados, considerando que o grupo de pacientes não tratados com HU foi menor que o grupo de pacientes em uso de HU, o que pode ter interferido na análise estatística dos resultados.

## 6. CONCLUSÕES

- Os resultados indicam que houve uma interferência da HU no perfil oxidativo, com diminuição dos parâmetros oxidativos ( $\text{NO}_2^-$  e MDA) e aumento das enzimas antioxidantes (CAT e GSH-Px). Efeito esse mais proeminente com o uso prolongado do medicamento;
- Foi observado que não houve relação dos haplótipos com o estresse oxidativo nos pacientes sem uso de HU. No entanto nos pacientes com uso de HU detectamos um aumento significante da GSH-Px no grupo de Benin/n em relação ao Bantu/n e da relação GSSG/GSH no grupo Bantu/n em relação ao Benin/n;
- Em relação ao índice GSSG/GSH foi observado um aumento significante nos pacientes com AF em relação ao controle, com uma diminuição da relação nos grupos em uso de HU;

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGIL, A.; SADRZADEH, S. M. Hydroxyurea protects erythrocytes against oxidative damage. **Redox. Rep.**, v. 5, p. 29-34, 2000.
- ALIYU, Z. Y.; TUMBLIN, A. R.; KATO, G. J. Current therapy of sickle cell disease. **Haematologica**, v. 90, p. 7-12, 2006.
- AL-OMAR, M. A.; BEEDHAM, C.; ALSARRA, I. A. Pathological roles of reactive oxygen species and their defense mechanisms: a review. **Saudi. Pharm. J.**, v. 12, p. 1-18, 2004.
- ALVES, A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. **Anal. Biochem.**, v. 323, p. 33-38, 2003.
- ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R. S. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: A HuGE Review. **Am. J. Epidemiol.**, v. 151, n. 9, p. 839-845, 2000.
- ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. **Immunol. Res.**, v. 26, n.1-3, p. 107-118, 2002.
- ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. A. Reactive especies in sickle cell disease. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 899, p. 375-391, 2000.
- BALLAS, S. K.; MCCARTHY, W. F.; GUO, N.; BRUGNARA, C.; KLING, G.; BAUSERMAN, R. L.; WACLAWIW, M. A. Early detection of response to hydroxyurea therapy in patients with sickle cell anemia. **Hemoglobin**, v. 34, n. 5, p. 424-429, 2010.
- BANK, A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood**, v. 107, p.435-443, 2006.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA, H. W. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 4, p. 245-251, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOYTON, R. The role of natural killer T cells in lung inflammation. **J. Pathol.**, v. 214, p. 276-282, 2008.

BOGDANSKA, J. J.; KORNETI, P.; TODOROVA, B. Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia. **Bratisl. Lek. Listy.**, v. 104, n. 3, p. 108-114, 2003.

BORBA, R.; LIMA, C. S. P.; GROTTO, H. Z. W. Reticulocyte parameters and hemoglobin F production in sickle cell disease patients undergoing hydroxyurea therapy. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 17, p. 66-72, 2003.

BRAWLEY, O. W.; CORNELIUS, L. J.; EDWARDS, L. R.; GAMBLE, V. N.; GREEN, B. L.; INTURRISI, C.; JAMES, A. H.; LARAQUE, D.; MENDEZ, M.; MONTOYA, C. J.; POLLOCK, B. H.; ROBINSON, L.; SCHOLNIK, A. P.; SCHORI, M. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 148, n. 12, p. 932-938, 2008.

CANÇADO, R. D.; LOBO, C.; ÂNGULO, I. L.; ARAÚJO, P. I. C.; JESUS, J. A. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, p. 361-366, 2009.

CANÇADO, R. D.; JESUS J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n.3, p. 204-206, 2007.

CHAVES, M. A. F.; LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**, v. 13, n. 3, p. 187-192, 2008.

CHEN, H. W.; CHIANG, M. T.; WANG, C. Y.; LII, C. K. Inibition of terc-butyl hydroperoxide-induced by  $\alpha$ -tocopherol and glutatione. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, n. 12, p. 1089-1096, 2000.

CHO, C-S.; KATO, G. J.; YANG, S. H.; BAE, S. W.; LEE, J. S.; GLADWIN, M. T.; RHEE, S. G. Hydroxyurea induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2010.

CIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, p. 1–11, 2008.

CLARK, B. E.; THEIN, S. L. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 26, n. 3, p. 159–176, 2004.

COKIC, V. P.; SMITH, R. D.; BELESLIN-COKIC, B. B.; NJOROGE, J. M.; MILLER, J. L.; GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 231–239, 2003.

COMPRTI, M.; SIGNORINI, C.; BUONOCORE, G.; CICCOLI, L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, n. 7, p. 568–576, 2002.

CONRAN, N.; COSTA, F. F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. **Clin. Biochem.**, v. 42, n. 18, p. 1824–1838, 2009.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, n. 1, p. 1–16, 2009.

DAS, S. K.; NAIR, R. C. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. **Br. J. Haematol.**, v. 44, p. 87–92, 1980.

DAVIES, S. C.; GILMORE, A. The role of hydroxyurea in the managemenet of sickle cell disease. **Blood Rev.**, v. 17, n. 2, p. 99-109, 2003.

DI NUZZO, D. V. P.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **J. Pediatr.**, v. 80, n. 5, p. 347-354, 2004.

DRAPE, H. H., HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v.186, p. 421-431, 1990.

DRISS, A.; ASARE, K. O.; HIBBERT, J. M.; GEE, B. E.; ADAMKIEWICZ, T. V.; STILES

J. K. Sickle cell disease in the post genomic era: A monogenic disease with a polygenic phenotype. **Genomics Insights**, v. 2, p. 23–48, 2009.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FASOLA, F.; ADEPAPO, K.; ANETOR, J.; KUTI, M. Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 99, n. 8, p. 891-894, 2007.

FERRARI, C. K. B.; FRANÇA, E. L.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Nitric oxide, health and disease. **J. Appl. Biomed.**, v. 7, p. 163-173, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Curr. Mol. Med.**, v. 8, n. 7, p. 609-619, 2008.

FIGUEIREDO, M. S. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 215-217, 2007.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FIORETTTO, J. R. Uso do óxido nítrico em pediatria. **J. Pediatr.**, v. 7, supl. 2, p. 177-186, 2003.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 4, p. 850–858, 2007.

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S.; VIEIRA, H. F.; VIEIRA, M. L. C.; FARIAS, D. A. B. Análise dos haplótipos do gene da  $\beta^S$ -globina no Ceará. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.41, n. 5, p.315-321, 2005.

GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N. Nitric oxide therapy in sickle cell disease. **Semin. Hematol.**, v. 38, p. 333–342, 2001.

GLADWIN, M. T.; SHELHAMER, J. H.; OGNIBENE, F. P.; PEASE-FYE, M. E.; NICHOLS, J. S.; LINK, B.; PATEL, D. B.; JANKOWSKI, M. A.; PANNELL, L. K.; SCHECHTER, A. N.; RODGERS, G. P. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 116, n. 2, p. 436-444, 2002.

GONÇALVES, M. S.; BOMFIM, G. C.; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I.; LYRA, I.; ZANETTE, I.; BOMFIM, G.; ADORNO, E. V.; ALBUQUERQUE, A. L.; PONTES, A.; DUPUIT, M. F.; FERNANDES, G. B.; REIS, M. G.  $\beta^S$ -Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 10, p. 1283-1288, 2003.

GREEN, L. C; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n.1, p.131-138, 1982.

GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelial derived relaxing actor. **Nature**, v. 320, p. 454-456, 1986.

GUALANDRO, S. F. M. A associação anemia falciforme e hemoglobina fetal. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, n.6, p.403-404, 2009.

GUIMARAES, C. T. L.; COELHO, G. O. A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1733-1740, 2010.

GUNDUZK, K.; OZTURKG, G.; SOZMEN, E. Y. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and plasma nitrite and nitrate levels in patients with Behcet disease and recurrent aphthous stomatitis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 29, n. 2, p. 176–179, 2004.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.

HALSEY, C.; ROBERTS, I. A. G. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 120, p. 177–186, 2003.

HAN, T. H.; QAMIRANI, E.; NELSON, A. G.; HYDUKE, D. R.; CAUDHURI, G.; KUO, L.; LIAO, J. C. Regulation of nitric oxide consumption by hypoxic red blood cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 21, p. 12504-12509, 2003.

HARJU, S.; McQUEEN, K. J.; PETERSON, K. R. Chromatin structure and control of  $\beta$ -like globin gene switching. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p. 683–700, 2002.

HEBBEL, R. P.; MORGAN, W. T.; EATON, J. W.; HEDLUND, B. E.; Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, n. 1, p. 237-241, 1988.

HEROLD, S.; EXNER, M.; NAUSER, T. Kinetic and mechanistic studies of the NO<sup>•</sup>-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. **Biochemistry**, v. 40, p. 11, p. 3385-3395, 2001.

HIGGS, D. R.; GARRICK, D.; ANGUITA, E.; DE GOBBI, M.; HUGHES, J.; MUERS, D.; VERNIMMEN, D.; LOWER, K.; LAW, M.; ARGENTARO, A.; DEVILLE, M. A.; GIBBONS, R. Understanding alpha-globin gene regulation: aiming to improve the management of thalassemia. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1054, p. 92-102, 2005.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUNDEKAR, P.; SURYAKAR, A.; KARNIK, A.; GHONE, R.; VASAIKAR, M. Antioxidant status and lipid peroxidation in sickle cell anaemia. **Biomed. Res.**, v. 21, n. 4, p. 461-464, 2010.

IBGE- Pesquisa nacional por amostra de domicílios - 1996-2003. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2003/default.htm>>. Acesso em: 23 jan 2011.

INATI, A.; TAHER, A.; BOU ALAWI, W.; KOUSSA, S.; KASPAR, H.; SHBAKLO, H.; ZALLOUA.; P.A. Beta-globin gene cluster haplotypes and HbF levels are not the only modulators of sickle cell disease in Lebanon. **Eur. J. Haematol.**, v. 70, p. 79-83, 2003.

KADIISKA, M. B.; GLADEN, B. C.; BAIRD, D. D.; GERMOLEC, D.; GRAHAM, L. B.; PARKER, C. E.; NYSKA, A.; WACHSMAN, J. T.; AMES, B. N.; BASU, S.; BROT, N.; FITZGERALD, G. A.; FLOYD, R. A.; GEORGE, M.; HEINECKE, J. W.; HATCH, G. E.; HENSLEY, K.; LAWSON, J. A.; MARNETT, L. J.; MORROW, J. D. Biomarkers of Oxidative Stress Study II: Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? **Free Radical Biol. Med.**, v. 38, p. 698-710, 2005.

KATHERINE, C.; NAIL-GRANGER, D. Sickle cell disease. Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin. Exp. Pharm. Phys.**, v. 34, p. 926-932, 2007.

KENNETT, E. C.; KUCHEL, P. W. Redox reactions and electron transfer across the red cell membrane. **IUBMB Life**, v. 55, n. 7, p. 375–85, 2005.

KIMURA, E. M.; OLIVEIRA, D. M.; JORGE, S. E. D. C.; ABREU, C. F.; ALBUQUERQUE, D. M.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F. Identificação e caracterização de variantes novas e raras da hemoglobina humana. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 4, p. 316-319, 2008.

KING, S. B. Nitric oxide production from hydroxyurea. **Free Radical Biol. Med.**, v. 37, n. 6, p. 737-744, 2004.

KLINGS, E. S.; FARBER, H. W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Respir. Res.**, v. 2, n. 5, p. 280–285, 2001.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KUTLAR, A. Sickle cell disease: A multigenic perspective of a single gene disorder. **Hematology**, v. 10, p. 92-99, 2005.

LANG, K.; ROLL, B.; MYSSINA, S.; SCHITTENHELM, M.; SCHEEL-WALTER, H-G.; KANZ, L.; FRITZ, J.; LANG, F.; HUBER, S.; WIEDER, T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Cell Physiol. Biochem.**, v. 12, p. 365-372, 2002.

LANZKRON, S.; STROUSE, J. J.; WILSON, R.; BEACH, M. C.; HAYWOOD, C.; PARK, H.; WITKOP, C.; BASS, E. B.; SEGAL, J. B. Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Ann. Intern. Med.**, v. 148, p. 939-955, 2008.

LEW, V. L.; BOOKCHIN, R. M. Ion transport pathology in the mechanism of sickle cell dehydration. **Phys. Rev.**, v. 85, n. 1, p. 179-200, 2005.

LOBO, C. L. C.; BUENO, L. M.; MOURA, P.; OGEDA, L. L.; CASTILHO, S.; CARVALHO, S. M. F. Triagem neonatal para hemoglobinopatias no Rio de Janeiro, Brasil.

**Rev. Panam. Salud Pública**, v. 13, p. 154-159, 2003.

LONERGAN, G. F.; CLINE, D. B.; ABBONDANZO, S. L. Sickle cell anaemia. **RadioGraphics**, v. 21, p. 971-994, 2001.

LOPEZ, B. L.; KRESHAK, A. A.; MORRIS, C. R.; DAVIS-MOON, L.; BALLAS, S. K.; MA, X. L. L-arginine levels are diminished in adult acute vaso-occlusive sickle cell crisis in the emergency department. **Br. J. Haematol.**, v. 120, n. 3, p. 532-534, 2003.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n. 6, p. 943-949, 2005.

MACK, A. K.; KATO, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 38, n. 8, p. 1237-1243, 2006.

MADER, S. S. **Inquiry into life**. 8. ed. New York: MacGraw-Hill, 1997.

MANFREDINI, V. **Perfil bioquímico e oxidativo em pacientes que apresentam anemia falciforme ou traço falciforme**. 2008. 178 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Centro de Biotecnologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L. L.; GRIEBELER, I. H.; SANTIN, A. P.; BRANDÃO, V. D. M.; WAGNER, S.; CASTRO, S. M; PERALBA, M. C. R.; BENFATO, M. S. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 100, n. 8, p. 897-902, 2008.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Pathol.**, v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.

\_\_\_\_\_. Structure-function relations of human hemoglobins. **Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)**, v. 19, n. 3, p. 239-245, 2006.

MARTINS, V. D; MANFREDINI, V.; PERALBA, M. C; BENFATO, M. S. Alpha-lipoic acid modifies oxidative stress parameters in sickle cell patients. **Clin Nutr.**, v. 28, n. 2, p. 192-197, 2009.

MASELLA, R.; BENEDETTO, R.; VARY, R., FILESI, C.; GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **J. Nutr. Biochem.**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MORRIS, C. R.; KUYPERS, F. A.; LARKIN, S.; VICHINSKY, E. P.; STYLES, L. A. Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 22, n. 6, p. 515–520, 2000.

MORRIS, C. R.; SUH, J. H.; HAGAR, W.; LARKIN, S.; BLAND, D. A.; STEINBERG, M. H.; VICHINSKY, E. P.; SHIGENAGA, M.; AMES, B.; KUYPERS, F. A.; KLINGS, E. S. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 402-410, 2008.

MOUSINHO-RIBEIRO, R. C.; PANTE-DE-SOUSA, G.; SANTOS, E. J. M.; GUERREIRO, J. F. Genetic relationships among native americans based on beta-globin gene cluster haplotype frequencies. **Genet. Mol. Biol.**, v. 26, n. 3, p. 229-234, 2003.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n. 1, p. 5-22, 2000.

OGEDEGBE, H. O. Sickle cell disease: an overview. **Nether. J. Med.**, v. 33, n. 9, p. 515-543, 2002.

\_\_\_\_\_.  $\beta$ -globin gene cluster haplotype analysis as a predictor of sickle cell disease severity. **Lab. Med.**, v. 38, n. 9, p. 563-568, 2007.

OKOCHI, V. I.; OKPUZOR, J. Micronutrients as therapeutic tools in the management of sickle cell diseases, malaria and diabetes. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 4, n.13, p. 1568-1579, 2005.

OLANIYI, J. A.; ARINOLA, O. G. Nitric oxide and trace metals in relation to haemoglobin F concentration in Nigerian sickle cell disease patients. **Turk. J. Med. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 109-113, 2010.

OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. **Blood Rev.**, v. 17, p. 43–53, 2003.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; SIQUEIRA, F. A. M.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, n.2, p. 111-121, 2000.

PAULING, L.; ITANO, H. A.; SINGER, S. J.; WELLS, I. C. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543–548, 1949.

PETERSEN, D. R.; DOORN, J. A. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. **Free Radic. Biol. Med.** v. 37, n. 7, p. 937-945, 2004.

PIETTA, P. Flavonoids and antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PLATT, O. S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 3, p. 337-338, 2000.

RAHGOZAR, S.; POORATHOLLAH, A. A.; MOAFI, A. R.; OLD, J. M.  $\beta^S$  gene in central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. **Am. J. Hematol.**, v. 65, p. 192-195, 2000.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; GIRALDI, T. A complexidade da mistura racial no Brasil: a hemoglobina S como marcador étnico nas suas populações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 1, p. 69-72, 2006.

RAMALHO, A. S.; GIRALDI, T.; MAGNA, L. A. Estudo genético-epidemiológico da hemoglobina S em uma população do Sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 2, p. 89-94, 2008.

REID, M.; BADALOO, A.; FORRESTER, T.; JAHOOR, F. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 291, p. 73-79, 2006.

REES, D. C.; CERVI, P.; GRIMWADE, P.; O'DRISCOLL, A.; HAMILTON, M.; PARKER, N. E.; PORTER, J. B. The metabolites of nitric oxide in sickle-cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 91, n. 4, p. 834-837, 1995.

REITER, C. D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J. E.; HOGG, N.; CANNON III, R. O.; SCHECHTER, A. N.; GLADWIN, M. T. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. **Nature Med.**, v. 8, n. 12, p. 1383-1389, 2002.

REN, H.; GHEBREMESKEL, K.; OKPALA, I.; UGOCHUKWU, C. C.; CRAWFORD, M.; IBEGBULAM, O. Abnormality of erythrocyte membrane n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in sickle cell haemoglobin C (HbSC) disease is not as remarkable as in sickle cell anaemia (HbSS). **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 74, n. 1, p. 1-6, 2006.

ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos

na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, v. 24, n.1, p. 112-119, 2001.

RUSANOVA, I.; ESCAMES, G.; COSSIO, G.; DE BORACE, R. G.; MORENO, B.; CHAHBOUNE, M.; LOPEZ, L. C.; DIEZ, T.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Oxidative stress status, clinical outcome, and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **Eur. J. Haematol.**, v. 85, n. 6, p. 529-537, 2010.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SCHACTER, L.; WARTH, J.A.; GORDON, E.M.; PRASAD, A.; KLEIN, B. L. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. **FASEB J.**, v. 2, p. 237-243, 1988.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, p. 1191-1212, 2001.

SCHECHTER, N. A. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, 2008.

SCHNOG, J. B.; DUITS, A. J.; MUSKIET, F. A. J.; TEN CATE, H.; ROJER, R. A.; BRANDJES, D. P. M. Sickle cell disease: a general overview. **Neth. J. Med.**, v. 62, n. 10, p. 364-374, 2004.

SHIMAUTI, E. L. T.; SILVA, D. G. H.; ALMEIDA, E. A.; ZAMARO, P. J. A.; BELINI JUNIOR, E.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 45, p. 297-301, 2010.

SILVA, L. B.; GONÇALVES, R. P.; MARTINS, M. F. Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, n. 6, p. 417-420, 2009.

SILVA, L. B.; GONCALVES, R. P.; RABENHORST, S. H. B. Análise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 2, p. 115-118, 2009.

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.

SINGH, H.; DULHANI, N.; KUMAR, B. N.; SINGH, P.; TIWARI, P. Effective control of sickle cell disease with hydroxyurea therapy. **Indian J. Pharmacol.**, v. 42, n. 1, p. 32–35, 2010.

SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. **J. Pediatr.**, v. 84, supl. 4, p. 40-51, 2008.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 129, p. 465–481, 2005.

STEINBERG, M. H.; BRUGNARA, C. Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 54, p. 89-112, 2003.

STEINBERG, M. H.; LU, Z-H.; BARTON, F. B.; TERRIN, M. L.; CHARACHE, S.; DOVER, G. J. Multicenter Study of Hydroxyurea: Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. **Blood**, v. 89, p. 1078-1088, 1997.

STUART, M.; NAGEL, R. Sickle cell disease. **Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343-1360, 2004.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E.E.; NAGEL, R.L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **Am. J. Hematol.**, v. 32, n. 1, p. 66-69, 1989.

THEIN, S. L. Genetic modifiers of beta-thalassemia. **Haematologica**, v. 90, n. 5, p. 649-660, 2005.

TITUS, J.; CHARI, S.; GUPTA, M.; PAREKH, N. Pro-oxidant and anti-oxidant status in patients of sickle cell anaemia. **Indian Journ. Clin. Bioch.**, v. 19, n. 2, p. 168-172, 2004.

TORRES, F. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinas humanas - hipótese malária ou efeito materno? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2005.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEKILOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? **Brit. J. Haematol.**, v. 139, n. 2, p. 173-1784, 2007.

VERDUZCO, L. A.; NATHAN, D. G. Sickle cell disease and stroke. **Blood**, v. 114, n. 25, p. 5117-5125, 2009.

VISIOLI, F.; KEANEY, JR. J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc. Res.**, v. 47, n. 3, p. 409, 2000.

VOSKARIDOU, E.; CHRISTOULAS, D.; BILALIS, A.; PLATA, E.; VARVAGIANNIS, K.; STAMATOPOULOS, G.; SINOPOULOU, K., BALASSOPOULOU, A.; LOUKOPOULOS, D.; TERPOS, E. The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). **Blood**, v. 115, n. 12, p. 2354-2363, 2010.

WARE, R. E.; AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **Hematology**, p. 62-69, 2009.

WAGENER, F. A.; ABRAHAM, N. G.; VAN KOOYK, Y.; DE WITTE, T.; FIGDOR, C. G. Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell and inflammation. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 22, p. 52-54, 2001.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull. World Health Organ.**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A. B. Red cells: inherited anaemias. **Lancet**, v. 355, p. 1169-1175, 2000.

WILSON, M.; FORSYTH, P.; WHITESIDE, J. Haemoglobinopathy and sickle cell disease. **Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain**, v. 10, n. 1, p. 24-28, 2009.

WOLIN, M. S. Interactions of Oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 1430-1442, 2000.

WOOD, K. C.; GRANGER, D. N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 34, n. 9, p. 9236-9320, 2007.

YASIN, Z.; WITTING, S.; PALASCAK, M. B.; JOINER, C. H.; RUCKNAGEL, D. L.; FRANCO, R. S. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 365-370, 2003.

ZAGO, M. A.; SILVA JR, W. A.; GUALANDRO, S.; YOKOMIZU, I. K.; ARAUJO, A. G.; TAVELA, M. H.; GERARD, N.; KRISHNAMOORTHY, R.; ELION, J. Rearrangements of the  $\beta$ -globin gene cluster in apparently typical  $\beta^S$  haplotypes. **Haematologica**, v. 86, p. 142-145, 2001.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

# APÊNDICE



---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E**  
**ENFERMAGEM (FFOE)**

---

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Prezado paciente,

As doenças falciformes são as alterações genéticas mais comuns em nosso país. A anemia falciforme é uma doença genética originada pela mutação pontual em uma base nitrogenada, causando uma alteração na estrutura da hemoglobina (proteína transportadora de oxigênio), fazendo com que as hemácias assumam uma forma irregular, forma de “foice”, as quais se tornam presas na microcirculação, causando danos a vários órgãos.

Este projeto de pesquisa, do qual você está sendo convidado a participar, trata-se de uma pesquisa intitulada **“Impacto da terapia com a hidroxiuréia e dos haplótipos no perfil oxidativo, na anemia falciforme”**, que tem como objetivo principal investigar o impacto do uso da hidroxiureia e dos haplótipos no perfil oxidativo nos pacientes com anemia falciforme.

Para o desenvolvimento deste estudo será necessário um grupo de portadores de anemia falciforme. É necessário que os participantes deste estudo com anemia falciforme coletem uma amostra de sangue (10 ml) que será realizado por profissional habilitado e com todas as técnicas adequadas.

A coleta de sangue será realizada no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará - HEMOCE, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo em dias em que os pacientes já estarão ali realizando outros exames, por conta do seu acompanhamento médico. Caso seja necessária a vinda do paciente exclusivamente para a participação em nossa pesquisa, os pesquisadores se responsabilizarão por seu transporte até o local da coleta.

Os riscos associados ao estudo são apenas os da coleta de sangue venoso, podendo haver o aparecimento de um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue

no local da coleta. Lembrando que todo material utilizado é descartável e estéril e os profissionais envolvidos são capacitados para tal função.

Os benefícios envolvidos são o de poder realizar um estudo que possibilite uma melhoria no prognóstico da anemia falciforme, além de possibilitar um melhor entendimento acerca desta doença.

Convido o(a) Sr(a) a participar da pesquisa, e em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, que reside na rua Pereira Valente, 640, Apto 701, bairro Meireles, Fortaleza,CE, fone: (0xx85)-33668264. Para tanto, necessitamos que o Senhor (a) autorize a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa é plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto(a) a nenhum risco, podendo desistir de participar a qualquer momento sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com o pesquisador.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado(a) do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, assim como dos desconfortos previstos e benefícios esperados. Certo e ciente dos detalhes acima descritos e por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifesto, por vontade própria, livre e consciente, o propósito de participar do presente estudo.

O(a) profissional \_\_\_\_\_ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de \_\_\_\_.

---

Assinatura do participante da pesquisa

---

Assinatura de quem obteve o termo

## QUESTIONÁRIO

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Pront.:\_\_\_\_\_

Nome completo: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) fem ( ) masc

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade onde mora: \_\_\_\_\_ Telefone: (\_\_\_\_)\_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_ Data de nasc: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Local de nasc: \_\_\_\_\_

Etnia: ( ) branco ( ) pardo ( ) negro

Estado Civil: ( ) solteiro ( ) casado ( ) outro

Escolaridade: ( ) Analfabeto/1º grau incompleto ( ) 1º grau ( ) 2º grau ( ) 3º grau

Renda familiar:

( ) 1 sal-mínimo ( ) 2-3 sal-mínimos ( ) mais de 3 sal-mínimos ( ) outros

Profissão atual: \_\_\_\_\_

1. História familiar conhecida de anemia falciforme? ( ) Sim ( ) Não

2. Medicinação em uso?

( ) Sim ( ) Não

Quais? \_\_\_\_\_

Vitaminas C e E? \_\_\_\_\_

Outras? \_\_\_\_\_

3. Faz tratamento com Hidroxiuréia?

( ) Sim ( ) Não

Há quanto tempo?

Dose:

Qual freqüência? ( ) 1X/dia ( ) 2X/dia ( ) outro

Qual(is) horário(s)?

4. Faz uso de bebida alcoólica? ( ) Sim ( ) Não

5. É fumante? ( ) Sim ( ) Não