



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**MARCO LEVI DA SILVA FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DANO NO DNA E BIOMARCADORES DE HEMÓLISE  
EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

**FORTALEZA**  
**2016**

MARCO LEVI DA SILVA FERREIRA

AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DANO NO DNA E BIOMARCADORES DE HEMÓLISE EM  
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à disciplina de Monografia II da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F442a Ferreira, Marco Levi da Silva.  
Avaliação do índice de dano no DNA e biomarcadores de hemólise em pacientes com anemia falciforme /  
Marco Levi da Silva Ferreira. – 2016.  
50 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia,  
Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.  
Coorientação: Prof. Pedro Aurio Maia Filho.

1. Anemia falciforme. 2. Hidroxiuréia. 3. Biomarcadores. 4. Hemólise. I. Título.

CDD 615

---

MARCO LEVI DA SILVA FERREIRA

AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DANO NO DNA E BIOMARCADORES DE HEMÓLISE EM  
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à disciplina de Monografia II da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes. (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Ms. Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Iêda Pereira de Souza  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Ferreira (*in memoriam*) e Paula.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida, família e amigos.

Aos meus pais, Ferreira e Paula, pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Aninha, Érika e JI Ferreira, pelo apoio, incentivo e por contribuições valiosas em momentos importantes.

A minha noiva, Sra. Carla Amaro, pela compreensão, apoio, incentivo e por estar sempre ao meu lado.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, por ter me acolhido em seu laboratório e ter me auxiliado sempre com orientações valiosas e determinantes.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iêda Pereira de Souza e a Ms. Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Agradeço a todos os professores do curso de farmácia da UFC, por proporcionarem conhecimentos para minha formação profissional e pessoal.

Aos meus colegas de laboratório: Tarcisio, Marilena, Marília, Maritza, Jamilly, Luana e em especial ao meu co-orientador Pedro Aurio, pelo apoio nas pesquisas e na elaboração deste trabalho.

Agradeço a Farmácia Ethicall, pelos momentos de aprendizado, pelo apoio na minha trajetória como estudante e pelo incentivo para que eu me tornasse um farmacêutico.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Um guerreiro sem espada, sem faca, foice ou facão, armado só de amor segurando um giz na mão, o livro é seu escudo, que lhe protege de tudo que possa lhe causar dor, por isso eu tenho dito, tenho fé e acredito, na força do professor.”.

Bráulio Bessa

## **RESUMO**

A Anemia Falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária causada por uma mutação pontual no gene da beta globina, gerando uma hemoglobina anormal denominada hemoglobina S (HbS), na forma homozigota. A doença é caracterizada por um processo hemolítico crônico, cursando com diminuição na concentração de hemoglobina total e aumento na contagem de reticulócitos e nos biomarcadores de hemólise. A hidroxiuréia (HU) é um medicamento utilizado no tratamento da doença por promover o aumento da concentração da hemoglobina fetal (HbF) e diminuição do processo hemolítico. O objetivo desse estudo foi avaliar o índice de dano (ID) no DNA e biomarcadores de hemólise em pacientes com AF. Participaram do estudo 36 pacientes de ambos os sexos com diagnóstico clínico e molecular de AF em acompanhamento no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza-Ceará. Um grupo controle foi constituído por 32 indivíduos aparentemente saudáveis. Os pacientes foram estratificados quanto ao uso da HU, 28 em uso e 8 sem uso de HU. O ID no DNA foi avaliado pela técnica do cometa, a LDH foi avaliado por método cinético e as dosagens de MetHb, ácido úrico e bilirrubinas por método espectrofotométrico. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism e o nível de significância foi de 5% para todas as análises. Do total de pacientes, 43% foram do sexo masculino e 57% do sexo feminino, com faixa de idade variando de 22 a 51 anos, e média de 33 anos. Os valores médios de hemácias, hemoglobina e hematócrito nos pacientes com AF foram inferiores aos do grupo controle. Os leucócitos e as plaquetas estavam aumentados no grupo de pacientes tratados com HU com relação aos outros grupos ( $P < 0,0001$ ). Os pacientes em uso de HU apresentaram um aumento significativo do ID quando comparados aos demais grupos. Em relação aos parâmetros de hemólise, os resultados mostraram que pacientes sem uso de HU apresentaram um aumento de todos os biomarcadores, em relação aos demais grupos. Os resultados demonstram que a HU apresenta um papel modulador da hemólise, porém com seu uso crônico demonstra uma genotoxicidade.

**Palavras-chave:** Anemia Falciforme; Hidroxiuréia; Hemólise.

## **ABSTRACT**

Sickle Cell Disease (SCD) is an inherited hemoglobinopathies caused by a specific mutation in the beta globin gene and it generates an abnormal hemoglobin called hemoglobin S (Hb S) in homozygous form. The disease is characterized by chronic hemolytic process, occurring with a decrease in the total hemoglobin concentration and increased reticulocytes count and hemolysis biomarkers. Hydroxyurea (HU) is a drug used to treat the disease by increasing the concentration of fetal hemoglobin (HbF) and decreasing the hemolytic process. The aim of this study was to evaluate the damage index in DNA and hemolysis biomarkers in patients with SCD. The study included 36 patients of both sexes with SCD clinical and molecular diagnosis who are being monitored in the Clinic Hematology of the Hospital Walter Cantídio in Fortaleza, Ceará. A control group of 32 individuals apparently healthy was constituted. Patients were stratified by use of HU, 28 in use and 8 without the use of HU. DNA in the ID was evaluated by the technique of the comet, LDH was evaluated by kinetic method and dosages MetHb, uric acid and bilirubin by spectrophotometric method. Data were analyzed using the statistical program GraphPad Prism and the significance level was 5% for all analyzes. Of the patients 43% were male and 57% female, with age group ranging from 22 to 51 years, and average of 33 years. Average values of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit in patients with SCD were lower than the control group. Leukocytes and platelets were increased in patients treated with HU related to other groups. HU use in patients has showed a significant increase in ID when compared to other groups ( $p < 0,0001$ ). Regarding hemolysis parameters, results showed that patients without HU use increased by all biomarkers in relation to other groups. The results demonstrate that HU has a modulatory role of hemolysis, but with its chronic use, it demonstrates a genotoxicity.

**Keywords:** Sickle Cell disease; hydroxyurea; Hemolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	— Relação entre fenômenos fisiopatológicos e manifestações clínicas no paciente com anemia falciforme.....	16
Figura 02	— Eletroforese sob condições alcalinas em baixo ponto de fusão em gel de agarose de células de um controle saudável classificado como cometa classe 0.....	31
Figura 03A	— Eletroforese em condições alcalinas em baixo ponto de fusão em gel de agarose de células de um paciente com AFSHU (-HU).....	31
Figura 03B	— Eletroforese em condições alcalinas em baixo ponto de fusão em gel de agarose de células de um paciente com AFHU (+HU).....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01	— ID no DNA em pacientes com AF e grupo controle.....	30
Gráfico 02	— ID no DNA em pacientes com AF com e sem uso de HU e indivíduos controles.....	30
Gráfico 03	— Concentração de metemoglobina (MtHb) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e Grupo controle.....	32
Gráfico 04	— Concentração de lactato desidrogenase (LDH) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e Grupo controle.....	32
Gráfico 05	— Concentração de bilirrubina indireta (BI) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e Grupo controle.....	33
Gráfico 06	— Concentração de bilirrubina direta (BD) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e Grupo controle.....	34
Gráfico 07	— Concentração de bilirrubina total (BT) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e Grupo controle.....	34
Gráfico 08	— Concentração de ácido úrico (AcU) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e Grupo controle.....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 — Parâmetros demográficos e hematológicos dos pacientes com AF com e sem uso de HU.....	29
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ác.U	—	Ácido úrico
AF	—	Anemia Falciforme
AF-SHU	—	Anemia falciforme sem hidroxiuréia
AVE	—	Acidente vascular encefálico
BD	—	Bilirrubina direta
BI	—	Bilirrubina indireta
BT	—	Bilirrubina total
DF	—	Doença falciforme
DMT	—	Dose maxima tolerada
FDA	—	Food and drug administration
GLU	—	Ácido glutâmico
GMP	—	Guanosina Monofosfato
Hb A	—	Hemoglobina A
Hb F	—	Hemoglobina fetal
Hb S	—	Hemoglobina S
HU	—	Hidroxiuréia
HUWC	—	Hospital universitário Walter Cantídio
ID	—	Índice de dano
LDH	—	Lactato desidrogenase
LMC	—	Leucemia mieloide crônica
MetHb	—	Metemoglobina
HT	—	Hematócrito
NO	—	Óxido Nitrico
PHHF	—	Persistência hereditária de hemoglobin fetal
RR	—	Ribonucleotídeo redutase
STA	—	Síndrome torácica aguda
TCLE	—	Termo de consentimento livre esclarecido
VAL	—	Valina
VCM	—	Volume corpuscular médio
MO	—	Medula óssea

## LISTA DE SÍMBOLOS

mM	—	Milimolar
%	—	Porcentagem
dL	—	Decilitro
mm <sup>3</sup>	—	Milímetro cúbico
uL	—	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>Fisiopatologia da anemia falciforme</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>Tratamento</b>	<b>17</b>
<b>1.3</b>	<b>Hemólise na anemia falciforme</b>	<b>19</b>
<b>1.4</b>	<b>Marcadores de Hemólise</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1</b>	<b><i>LDH – Lactato desidrogenase</i></b>	<b>20</b>
<b>1.4.2</b>	<b><i>Meta-hemoglobina</i></b>	<b>20</b>
<b>1.4.3</b>	<b><i>Bilirrubina Indireta</i></b>	<b>21</b>
<b>1.4.4</b>	<b><i>Ácido úrico</i></b>	<b>21</b>
<b>1.5</b>	<b>Identificação dos níveis de lesão do DNA</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Considerações éticas</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Casuística</b>	<b>25</b>
<b>3.3</b>	<b>Local do Estudo</b>	<b>25</b>
<b>3.4</b>	<b>Seleção da amostra</b>	<b>25</b>
<b>3.5</b>	<b>Coleta de amostra e dados</b>	<b>26</b>
<b>3.6</b>	<b>Testes realizados</b>	<b>26</b>
<b>3.6.1</b>	<b><i>Teste do cometa</i></b>	<b>26</b>
<b>3.6.2</b>	<b><i>Dosagem dos biomarcadores de hemólise</i></b>	<b>27</b>
<b>3.7</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Características da população em estudo</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>Comparação do ID no DNA em pacientes com AF e grupo controle</b>	<b>29</b>
<b>4.3</b>	<b>Comparação do ID no DNA em pacientes com AF com e sem uso de HU e GC</b>	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Comparação dos Biomarcadores de hemólise em pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>41</b>
	<b>APÊNDICE A – instrumento de coleta de dados</b>	<b>48</b>
	<b>ANEXO – Termo de consentimento livre e esclarecido</b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Fisiopatologia da Anemia falciforme.

A Anemia Falciforme (AF) é uma das doenças hereditárias mais comuns no mundo. É causada por uma mutação pontual no gene beta da globina S, em que há a substituição do nucleotídeo adenina por timina do códon GAG para GTG, resultando na troca do aminoácido ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição número seis do gene. Essa substituição origina uma molécula de hemoglobina anormal denominada hemoglobina S (HbS), ao invés da hemoglobina normal chamada de hemoglobina A (HbA). Essa pequena modificação estrutural é responsável por intensas alterações nas propriedades físico-químicas da molécula de hemoglobina em tensões reduzidas de oxigênio. (PAULING *et al.*, 1949).

No estado oxigenado, a molécula de HbS está “relaxada”, e nesta conformação estrutural as globinas beta S estão mais separadas. No estado desoxigenado, a molécula de HbS torna-se esticada e as globinas beta S ficam mais próximas. Essa mudança de conformação favorece o contato entre as regiões da desoxiemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado. Por meio da união de vários tetrâmeros de HbS, forma-se um número considerável de moléculas agregadas que geram longos polímeros, alterando a morfologia do eritrócito para a forma de foice (BENFATO, 2007).

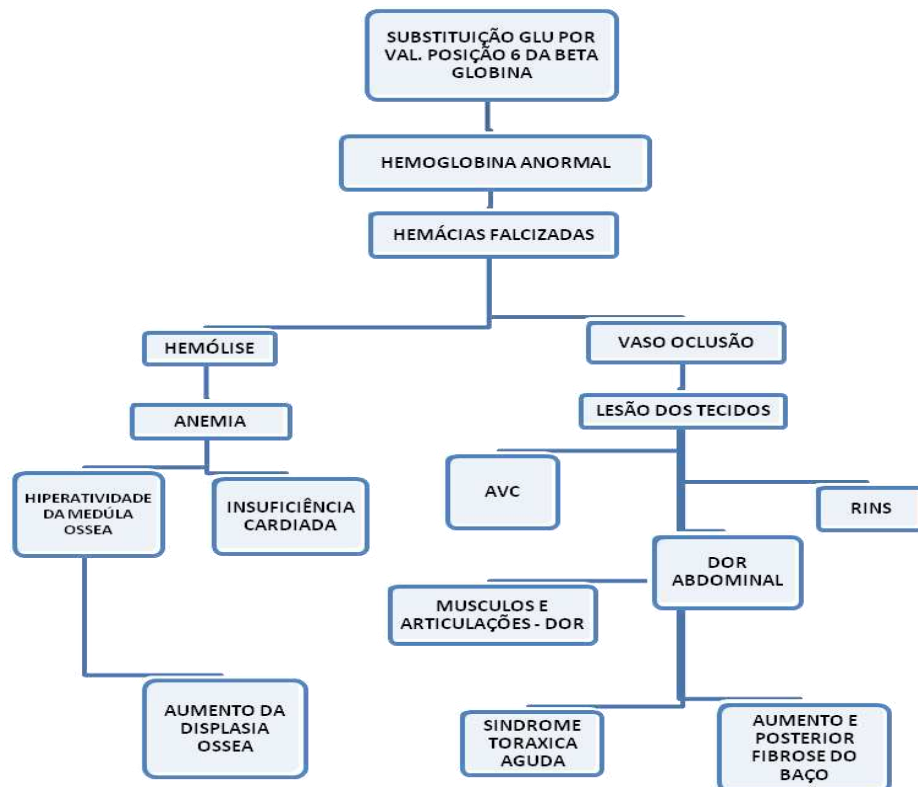
O fenômeno de falcização pode ser revertido quando concentrações elevadas de oxigênio são novamente atingidas, sendo que falcizações sucessivas alteram a estrutura da membrana da hemácia, favorecendo a formação de células irreversivelmente falcizadas (CHANG *et al.* 1997;).

A formação de polímeros de HbS no interior das hemácias acarreta múltiplas alterações nas células, como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular, a formação de polímeros da Hb com proteínas de membrana e a exposição de moléculas de adesão da membrana celular, entre outras. Além disso, essas alterações modulam vários processos na doença, como o inflamatório crônico, dano endotelial, aumento do estresse oxidativo e o estado de hipercoagulabilidade, através do aumento da adesão de hemácias ao endotélio; enrijecem a membrana da hemácia, encurtando sua sobrevivência na circulação; promovem lesões microvasculares; causam uma depleção de óxido nítrico (NO), que contribui para vasoconstrição, ativação da inflamação e ativação da cascata da coagulação. (Figura 2) (ZAGO; PINTO, 2007).

A cinética de falcização depende do grau de desoxigenação, concentração intracelular de hemoglobina S e presença ou ausência de Hb F. Essas alterações físico-

químicas, além de deformarem e enrijecerem a membrana celular ocasionam o fenômeno patológico de vaso-oclusão por predispor os eritrócitos falcêmicos a aderirem ao endotélio vascular. As células irreversivelmente falcizadas formadas em decorrência do afoijamento, são removidas e destruídas tanto no meio extravascular como no intravascular, encurtando assim a sua sobrevivência média eritrocitária para cerca de 17 dias, contribuindo desse modo para o agravamento da anemia (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

**Figura 1** - Relação entre fenômenos fisiopatológicos e manifestações clínicas no paciente com anemia falciforme.



Fonte: Zago e Pinto, 2007.

Nos pequenos vasos ocorrem o fenômeno da vaso-oclusão que representa o evento fisiopatológico determinante na origem da maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme, tais como as crises algícas, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda (STA), sequestro esplênico, priapismo, necrose asséptica do fêmur, acidente vascular encefálico (AVE), retinopatia, insuficiência renal crônica, entre outros (GALIZA; PITOMBEIRA, 2003).

A alteração celular causada pelo processo de falcização influencia intensamente o fluxo sanguíneo, aumentando a sua viscosidade. Os eritrócitos falciformes irreversíveis têm capacidade aumentada de adesão ao endotélio vascular, principalmente, devido à alta

viscosidade do sangue e também pela elevação dos níveis de fibrinogênio, que ocorre como resposta natural à infecções (GLADWIN, 2004).

A adesividade pode ser devida às forças eletrostáticas. A deposição de grande número de eritrócitos alterados na superfície endotelial reduz a luz dos capilares, provocando estase, que poderá se intensificar pela diminuição da temperatura do ambiente. Como consequência da estase, ocorre hipóxia tecidual, levando mais moléculas de HbS no estado desoxigenado, piorando a situação circulatória já desfavorável e lesando os tecidos perfundidos por estes capilares. Os tecidos mal perfundidos podem sofrer infartos com necrose e formação de fibrose, principalmente no baço, medula óssea e placenta. Esses eventos podem causar lesões tissulares agudas, com crises dolorosas e também cronificadas (BENFATO, 2007).

Os sintomas da hipóxia também podem ser agudos com crises dolorosas, ou insidiosas, caracterizadas por necrose asséptica de quadris e retinopatia causada por célula falciforme. Os efeitos dos danos teciduais agudos ou crônicos podem, em último caso, resultar na falência do órgão, principalmente em pacientes com idade avançada. Além disso, podem apresentar cardiomegalia, hematúria, úlcera de perna, osteoporose vertebral, manifestações neurológicas e fertilidade relativamente diminuída (DREW, 2004).

## 1.2 Tratamento

O tratamento da AF consiste no uso de vários medicamentos, incluindo analgésicos nas crises dolorosas, antibióticos, como profilaxia para combater infecções graves, vitaminas e antioxidantes com a finalidade de reduzir os sinais e sintomas da doença. Além disso, pode ser utilizado a transfusão sanguínea nos casos de anemia grave e o uso de hidroxiuréia (HU), com o objetivo de aumentar a concentração de HbF. O transplante de células-tronco hematopoéticas consiste no único tratamento curativo para a doença (IANNONE *et al.*, 2005).

A HU é o medicamento de escolha para o tratamento tanto de crianças como de adultos com AF. Os primeiros estudos do uso da HU na AF se iniciaram nos anos 70, mas somente na década de 90, nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou a sua utilização para o tratamento da AF em pacientes adultos com crises dolorosas recorrentes. No Brasil, o uso da HU para pacientes com DF foi aprovado em novembro de 2002, através da portaria de número 872 do Ministério da Saúde (CANÇADO *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2014).

A HU é um hidroxicarbamato inibidor seletivo da síntese da enzima ribonucleotídeo difosfato redutase (RR), interrompendo o mecanismo normal de redução de desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos no passo limitante da biossíntese de DNA, mantendo assim as células na fase G1/S do ciclo celular (MALUF *et al.*, 2009; WARE, 2010; SANTOS *et al.*, 2011). É usada principalmente em neoplasias do sistema hematopoético, como na leucemia mielóide crônica (LMC). Foi aprovada tanto pela *Food and Drug Administration* (em 1999) como pela Agência Europeia de Medicamentos (em 2008) para o uso na AF (HANFT *et al.*, 2001; GALLI *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2003).

A droga ao inibir a enzima RR promove a parada do ciclo celular e permite que o gene da  $\beta$ -globina seja mais ativamente expressado. Ao interferir na divisão celular, a HU altera a cinética da proliferação eritróide, forçando que mais eritrócitos sejam produzidos a partir de células progenitoras primitivas, além de estimular diretamente a produção de HbF (FRANCO *et al.*, 2006). A eficácia da HU no tratamento da AF é geralmente atribuído à sua capacidade de aumentar a HbF (PLATT *et al.*, 1984; NOGUCHI *et al.*, 1988; CHARACHE *et al.*, 1992; BORGNA-PIGNATTI, 2007; VOSKARIDOU *et al.*, 2010).

A HU além de proporcionar o aumento da concentração da HbF, promove a supressão da eritropoese endógena, redução da hemólise, diminuição da aderência dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio vascular (age sobre a membrana dos eritrócitos e plaquetas, reduzindo a exposição da fosfatidilserina, principal determinante da adesão eritrocitária alterada na AF), melhora da reologia com diminuição da viscosidade sanguínea e vasodilatação, contribuindo para a diminuição dos fenômenos inflamatórios e vaso-oclusivos, entre outros (CANÇADO *et al.*, 2009). Também atua como uma fonte de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, aumentando sua síntese e biodisponibilidade pela ativação da guanililciclase e consequente aumento do GMP cíclico (GMPc) intraeritrocitário e endotelial (HUANG *et al.*, 2003; CANÇADO *et al.*, 2009).

Atualmente, há movimentos reivindicatórios em muitos países, para a produção de HU em doses de 100 a 200 mg, como também em forma líquida, o que se torna mais conveniente. No Brasil, o Departamento de Atenção Farmacêutica (DAF/MS) está envolvido nessa questão, já que a tendência é reduzir ainda mais a idade de indicação do uso de HU. (BRASIL, 2014)

A despeito desta série de efeitos benéficos, o tratamento com HU pode gerar efeitos adversos como mielossupressão, hiperpigmentação cutânea, lesões ulcerativas em membros inferiores e aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , agravando as crises álgicas

(NAHAVANDI *et al.*, 2000). Além disso, estudos têm demonstrado que a droga parece ter efeitos mutagênicos, clastogênicos, teratogênicos e carcinogênicos (BYRD *et al.*, 1999; GILMORE, 2003; BARBUI, 2004; DAVIES; PLATT, 2008; STEINBERG *t al.*, 2010; WARE, 2010).

Na literatura, a capacidade da HU causar câncer é controverso e a eficácia e segurança no tratamento a longo prazo de pacientes com AF permanece indefinido (STEINBERG *et al.*, 2010). Alguns estudos têm demonstrado que a hidroxiureia é genotóxica, enquanto outros estudos sugerem que a HU tem baixa mutagenicidade *in vivo* (HANFT *et al.*, 2000; FRIEDRISCH *et al.*, 2008).

### 1.3 Hemólise na anemia falciforme

A hemólise é caracterizada por um dano ou rotura das membranas celulares dos eritrócitos, que leva a liberação de componentes intracelulares no plasma. Constitui a destruição prematura dos glóbulos vermelhos do sangue, por rompimento fisiológico ou patológico da membrana plasmática. A hemólise crônica pode ocorrer em várias condições, causando anemia hemolítica (COOK; BRUNS, 2012; CERQUEIRA *et al.*, 2010).

Os fatores causadores da hemólise *in vivo* podem ser classificados como hemólise intravascular e extravascular tomando por base o local da destruição das hemácias. Dependendo do tipo de dano à membrana das hemácias, as células podem se destruir imediatamente (intravascular) ou serem destruídas pelo sistema monocítico–macrofágico no baço, fígado, ou medula óssea (MO) (extravascular) (COOK; BRUNS, 2012).

NA AF a hemólise crônica causa desequilíbrio vascular, com diminuição da meia-vida das hemácias, refletindo na concentração de hemoglobina, contagem de reticulócitos, alterações nos níveis de bilirrubinas e LDH. Esses parâmetros têm sido estudados como forma de monitorar a evolução da doença, sendo utilizados na prática clínica. A dosagem de ácido úrico e de metemoglobina (MetHb) ainda não são utilizados clinicamente para essa finalidade no entanto, estão sendo estudados em pesquisas científicas e futuramente podem vir a ser utilizados (NOLAN *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2010).

O quadro de hemólise em pacientes com AF é associado com a evolução da doença, portanto, o uso de biomarcadores de hemólise tem sido utilizados na prática clínica, como monitoramento do tratamento em pacientes com AF, apesar do grande uso da dosagem da HbF como modulador da atividade da doença (SILVA FILHO *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2010).

## 1.4 Marcadores de Hemólise

Os biomarcadores de hemólise são fundamentais na avaliação do paciente com AF. A LDH é um marcador de hemólise intravascular, e sua elevação plasmática está associada ao subfenótipo clínico de hipertensão pulmonar, priapismo e úlcera de perna nos pacientes com AF (KATO *et al.*, 2006b). As concentrações de bilirrubina, principalmente a indireta, estão alteradas na hemólise (ROTHER *et al.*, 2005). A contagem de reticulócitos fornece uma estimativa da atividade da medula óssea, sendo utilizado no diagnóstico diferencial das anemias e no monitoramento do tratamento das mesmas. Outro marcador importante é a MetHb, que é liberada durante o processo de hemólise, se apresentando em quantidade elevada em pacientes com AF, como foi verificado em alguns estudos. O ácido úrico é outro marcador que pode ser utilizado, pois seu aumento na AF pode ocorrer devido à alteração da função tubular renal ou à reutilização de ácidos nucleicos provenientes da hemólise (HEBBEL, 2011).

### 1.4.1 LDH – Lactato desidrogenase

Lactato desidrogenase (LDH) é uma das enzimas da via glicolítica que catalisa a conversão do piruvato em lactato. A LDH sérica existe na forma de 5 isoenzimas que são numeradas de 1 a 5 de acordo com a sua mobilidade eletroforética. A distribuição das isoenzimas não é uniforme entre os tecidos, sendo encontrada nas hemácias principalmente nas formas LDH1 e LDH2. A LDH é considerada um marcador de hemólise, pois suas concentrações encontram-se elevadas na presença de hemólise. Como um terço da hemólise na AF é intravascular, estudos vêm demonstrando que a LDH pode ser um marcador útil de complicações relacionadas à hemólise na AF, elevadas concentrações de LDH tem sido correlacionadas com o aumento da incidência de priapismo e úlceras de perna na AF. (DAMANHOURI *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2015; ATAGA *et al.*, 2006; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

### 1.4.2 Metahemoglobina

A MetHb é a forma oxidada da hemoglobina cujo ferro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) da porção heme está oxidado ao estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e, por isso, não consegue se ligar ao oxigênio. A metemoglobinemia pode ocorrer por um desequilíbrio redox, devido a oxidação excessiva da hemoglobina, ou pela diminuição da atividade das enzimas redutoras (NAOUM; SOUZA, 2004; SILVA FILHO, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2008; LAURENTINO *et al.*, 2014; JIALAL; SOKOLL, 2015).

Na doença falciforme, a hemólise intravascular libera oxiemoglobina no plasma, que reage com NO produzindo nitrato bioinativo e metemoglobina; libera também arginase-1, que interfere na síntese de NO, através da conversão da arginina plasmática (precursora do NO) em ornitina; hemoglobina, heme e ferro livres, oriundos de hemácias rompidas, catalisam a produção de radicais livres de oxigênio, que limitam a bioatividade do NO. (KATO, 2007; KATO, 2009).

### **1.4.3 Bilirrubina Indireta**

Pacientes com AF comumente apresentam um processo hemolítico crônico decorrente da morte prematura das hemácias. Icterícia é frequentemente observada nestes doentes e reflete a presença de hiperbilirrubinemia, principalmente às custas de bilirrubina indireta (não-conjugada). No citoplasma dos macrófagos, a hemoglobina é degradada em globina e heme. O heme sofre a ação da enzima heme-oxidase e perde o ferro, enquanto que a porfirina tem seu anel tetrapirrólico aberto, liberando uma molécula de monóxido de carbono. O pigmento que resulta é a biliverdina. Esta sofre ação da enzima biliverdina-redutase e passa a bilirrubina, um pigmento amarelo. Em estudo realizado por Belini Junior e colaboradores (2015) demonstrou-se que pacientes com AF em uso de hidroxiuréia (HU) apresentaram diminuição de bilirrubina total, além de uma associação deste marcador com a gravidade da doença.

### **1.4.4 Ácido úrico**

O ácido úrico é uma substância formada pelo organismo através da decomposição das purinas. O aumento da concentração sérica de ácido úrico pode ocorrer devido ao aumento da síntese de nucleoproteínas ou à diminuição na excreção renal. Na AF a hiperuricemia pode ocorrer devido à alteração da função tubular renal ou à reutilização de ácidos nucleicos provenientes da hemólise (DIAMOND; MEISEL; HOLDEN, 1979; CONGER, 1990; MOREIRA *et al*, 2015). No estudo de Cerqueira e colaboradores (2011), encontrou-se uma correlação entre níveis de ácido úrico e marcadores de hemólise e no estudo de Moreira e colaboradores (2015) observou-se um aumento nas dosagens de ácido úrico em pacientes com AF em relação à indivíduos saudáveis.

## **1.5 Identificação dos níveis de lesão do DNA**

Agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, induzindo alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA, com isso, possuem a habilidade

de alterar a replicação do DNA e interferir na transmissão gênica às células filhas. Em grande parte dos casos, a lesão é reparada pelo próprio organismo e a célula alterada é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provoca alterações hereditárias - mutações - que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação; o agente desencadeador desse processo é denominado mutagênico (REKHA et al., 2006; ABHILASH et al., 2009). O Teste Cometa (teste de células individualizadas em gel de agarose) é uma técnica útil para o estudo de danos e reparos no DNA. As células com dano aumentado no DNA mostram um aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo em direção ao ânodo, que se assemelha à forma de um cometa (SPEIT; HARTMANN, 1999). O ensaio vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. O teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação.

O princípio da técnica é simples: as células são inclusas em gel sobre uma lâmina de microscopia, faz-se passar uma corrente elétrica e, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda. O DNA que não estiver rompido ou quebrado fica armazenado no núcleo, sendo muito grande para migrar (SILVA et al., 2003).

Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Assim, o teste pode ser utilizado em estudos de reparo do DNA, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo. O resultado poderá avaliar se houve ou não um efeito e estimar o tamanho deste efeito, podendo ser importante no diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento do câncer. Na AF o ensaio pode ser utilizado para detectar a intensidade da lesão no DNA e a resposta à medicação utilizada na doença (MCKENNA; OLIVE; BANATH, 2006; MCKEOWN; MCKELVEY, 2008; BARBERINO; JUNIOR; DOMINGOS, 2012).

Sabemos que a AF é um problema de saúde pública e que o uso da HU tem propiciado vários benefícios aos pacientes como a diminuição das comorbidades e da taxa de mortalidade. Porém o uso a longo prazo tem sido atribuído ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças neoplásicas. Por se tratar de uma doença benigna, mas com curso clínico grave, o fármaco tem sido utilizado sem restrições, e estudos como esse são importantes para avaliar a segurança da HU e obter informações mais consolidadas sobre a genotoxicidade desse medicamento.

Dentro desse contexto, o presente estudo propõe-se a investigar o possível efeito genotóxico com o uso crônico da HU, além de avaliar os níveis dos biomarcadores de

hemólise na AF e verificar se houve uma melhora no quadro hemolítico dos pacientes em tratamento.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

Avaliar o índice de dano (ID) no DNA e os parâmetros de hemólise em pacientes com anemia falciforme.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Identificar o perfil demográfico (sexo e idade) e laboratorial dos participantes da pesquisa;
- Determinar os índices de dano no DNA de pacientes com AF e grupo controle;
- Comparar os índices de dano no DNA de pacientes com AF com e sem uso de HU;
- Avaliar as concentrações dos biomarcadores de hemólise: metemoglobina (MetHb), bilirrubinas direta (BD), indireta (BI) e total (BT), ácido úrico e lactato desidrogenase (LDH) nos pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Considerações éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Ceará sob protocolo N° 706.154 e foi desenvolvido segundo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, contida na Resolução de nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

#### **3.2 Casuística**

Trata-se de um estudo corte transversal composto por 36 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de AF (forma homozigótica SS), confirmado por análise molecular, sendo 28 em tratamento com HU (AF-HU) (dose de 500 – 1500 mg/dia) por um período maior que 6 meses e 8 sem uso do medicamento (AF-SHU). Os pacientes são provenientes do ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital universitário Walter Cantídio (HUWC), hospital de referência em doenças hematológicas no estado do Ceará. Foi utilizado para comparação um grupo controle constituído por 32 indivíduos (12 do sexo masculino e 20 do sexo feminino), com idade entre 18 a 30 anos, voluntários e aparentemente saudáveis, sendo a maioria alunos do curso de farmácia da UFC.

#### **3.3 Local do Estudo**

O estudo foi realizado no HEMOCE onde foram realizadas as coletas sanguíneas e no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizados todos os testes.

#### **3.4 Seleção da Amostra**

Os pacientes foram selecionados aleatoriamente tendo os seguintes critérios de inclusão e exclusão do estudo:

##### **Critérios de Inclusão:**

- Pacientes adultos, voluntários, de ambos os sexos, com AF com e sem tratamento com HU;

**Crêterios de Exclusão:**

- Pacientes que tenham realizado terapêutica transfusional nos últimos três meses;
- Pacientes em uso de algum imunossupressor;
- Pacientes com sorologia positiva para Hepatite, HIV e HTLV;
- Pacientes Tabagistas, etilistas e gestantes;
- Pacientes em tratamento com HU há menos de 6 meses.

**Grupo controle:**

- Pacientes adultos, de ambos os sexos e aparentemente saudáveis, com HbAA.

**3.5 Coleta de amostras e dados**

Os pacientes selecionados para o estudo assinaram o TCLE, de acordo com as orienta es do Comitê de  tica do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará (ANEXO A). Os pacientes selecionados foram atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia do HUWC no período de março de 2015 a março de 2016. Nesse período foram colhidas duas amostras de cinco mililitros de sangue periférico, em tubo contendo heparina como anticoagulante, para a identifica o dos níveis de lesão do DNA, pela técnica do cometa e para dosagem dos biomarcadores de hemólise. Os dados clínicos e laboratoriais, bem como as informa es sobre a utiliza o ou não de HU foram obtidos dos prontuários médicos, através da ficha de coleta (Apêndice A).

**3.6 Testes realizados****3.6.1 Teste do cometa**

Os níveis de lesão no DNA foram identificados utilizando-se o ensaio do cometa. O protocolo foi utilizado conforme relatado por Singh *et al.* (1988). A técnica foi realizada em conformidade com as orienta es gerais para utiliza o in vivo do cometa (HARTMANN *et al.*, 2003; TICE *et al.*, 2000).

As amostras de sangue total foram misturadas a um baixo ponto de fusão e distribuídas em lâminas de vidro revestidas com agarose. Após a solidifica o das amostras, as lâminas foram embebidas por uma soluço de lise refrigerada (2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,2), sendo adicionados 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO,

ficando de 1 a 2 dias sob refrigeração. As lâminas foram então expostas à solução alcalina por 20 minutos afim de permitir a quebra da fita de DNA e logo após foram transferidas para uma cuba de eletroforese em solução alcalina (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13). Todas as etapas do ensaio, a partir do armazenamento do sangue até o final da eletroforese foram conduzidas sob luz fraca.

O material foi fixado de acordo com o protocolo de Nadin; Vargas-Roig e Ciocca (2001). Para a avaliação da lesão do DNA foram analisadas 100 células por campo em um microscópio ótico. As células analisadas receberam notas de 0 (nenhuma migração) a 4 (migração máxima) de acordo com a intensidade da cauda (Tamanho e forma). A pontuação total (índice de dano ou ID) de 100 células varia de 0 (todas as células sem migração) a 400 (todas as células com migração máxima) (MALUF; ERDTMANN, 2000).

### 3.6.2 Dosagem dos biomarcadores de hemólise

#### 3.6.2.1 Dosagem de MetHb

A dosagem de MetHb foi realizada utilizando amostra de sangue total, por método espectrofotométrico, segundo a metodologia proposta por Naoum, Radispiel e Moraes (2004). Essa técnica fundamenta-se na avaliação da solução de hemoglobina, previamente estabilizada em tampão fosfato 60 mol L<sup>-1</sup> (preparada segundo Camargo *et al*, 2007) em dois comprimentos de onda específicos para metemoglobina (630 nm) e oxiemoglobina (540 nm). Utilizou-se tampão fosfato 60 mol L<sup>-1</sup> e saponina a 1% como reagentes.

A dosagem de MetHb em porcentagem é obtida através do cálculo a seguir, utilizando as absorbâncias obtidas:

$$\text{Cálculo da MetHb (\%)} = \frac{\text{Abs } 630\text{nm} \times 100}{\text{Abs } 630\text{nm} + (\text{Abs } 540\text{nm} \times 10)}$$

Para esta técnica, a porcentagem normal de MetHb situa-se entre 1,9 a 3,8%. Valores acima de 4% são considerados elevados.

#### 3.6.2.2 Dosagem de LDH, ácido úrico e bilirrubinas

Foram realizadas usando amostras de plasma heparinizado, utilizando-se kits específicos da marca Labtest® obedecendo a metodologia sugerida pelo fabricante. A dosagem de LDH foi realizada por modo cinético, através de metodologia UV - Método Piruvato-Lactato. A dosagem de ácido úrico foi realizada mediante sistema enzimático, utilizando metodologia colorimétrica (Enzimático Trinder). As bilirrubinas total e direta

foram determinadas através de reação de ponto final, utilizando metodologia colorimétrica. Os níveis de bilirrubina indireta foram determinados a partir da subtração entre os valores de bilirrubina total e bilirrubina direta.

### **3.7 Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism 6.0 utilizando-se os testes de Kruskal – Wallis ou Anova, Mann Whitney ou T-student, dependendo da normalidade dos dados. O teste de Kruskal – Wallis ou Anova foi utilizado para comparação entre três grupos e o teste T-student ou Mann Withney usado para comparação entre dois grupos. O nível de significância foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características da população em estudo

Foram avaliados 36 pacientes adultos, com diagnóstico clínico e laboratorial de AF de ambos os sexos com idade variando de 22 a 51 anos, média de 33 anos, sendo 16 do sexo masculino (43%) e 20 do sexo feminino (57%). Os parâmetros demográficos (sexo e idade) e hematológicos dos pacientes com AF estão descritos na Tabela 1. Todos os pacientes estavam em estado estacionário com ausência de crises, de acordo com os critérios de Ballas (2012).

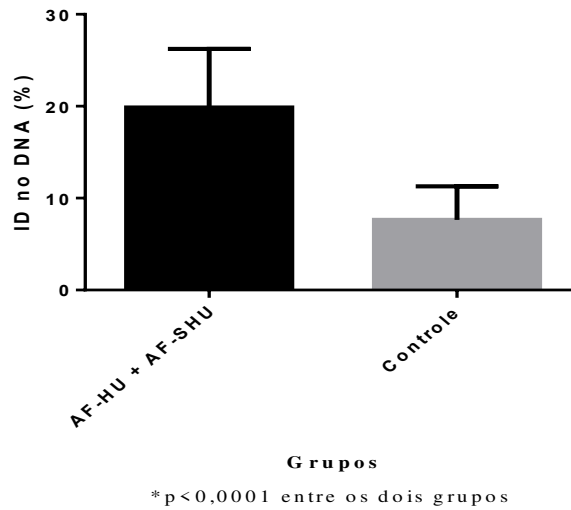
**Tabela 1** – Parâmetros demográficos e hematológicos dos pacientes com AF com e sem uso de HU e do grupo controle

	AF-HU	AF-SHU	CONTROLE
<b>FAIXA ETÁRIA (ANOS) (MÉDIA)</b>			
• Masculino	30	39	26
• Feminino	34,5	38,5	21
<b>SEXO</b>			
• Masculino	12/28	4/8	12/32
• Feminino	16/28	4/8	20/32
He ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	2,75	3,03	4,38
Hb (g/dL)	8,3	9	14,5
Ht (%)	26	30,1	42,5
Leucócitos/ $\text{mm}^3$	8.968	13.950	7.490
Plaquetas/ $\text{mm}^3$	378.200	487.500	217.000
HbF (%)	18,1	11,18	—
Reticulócitos. (%)	7,8	8,78	—

### 4.2 Comparação do ID no DNA em pacientes com AF e grupo controle

O gráfico 1 compara o ID no DNA de pacientes com AF e o grupo controle. Os resultados demonstram que o índice de dano no DNA (ID) mostrou-se estatisticamente elevado nos pacientes com AF (n = 36) (média = 19,85), em relação aos controles (n = 32) (média = 7,641) (p < 0,0001) (Gráfico 1).

**Gráfico 1:** ID no DNA em pacientes com AF e grupo controle (\* $p < 0,0001$ )

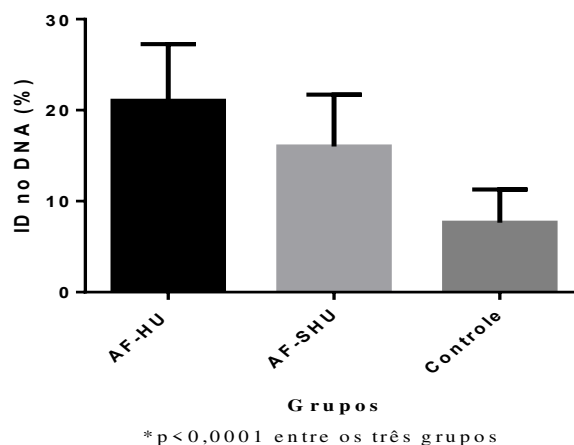


Nota: Comparação de médias de ID no DNA entre pacientes com AF e grupo controle. Valor de  $p$  obtido através do teste T-Student. \* $p < 0,05$ . Fonte: Do próprio autor.

#### 4.3 Comparação do ID no DNA em pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle

Os pacientes com AF foram estratificados quanto ao uso de HU. Verificou-se que o ID no grupo AF-HU ( $n = 28$ ) (média = 21,4) foi estatisticamente mais elevado em relação aos pacientes do grupo AF-SHU ( $n = 8$ ) (média = 16) e aos indivíduos do grupo controle ( $n = 32$ ) (média = 7,64) ( $p < 0,0001$ ) (Gráfico 2).

**Gráfico 2** - ID no DNA em pacientes com AF com e sem uso de HU e indivíduos controles (\* $p < 0,0001$ )

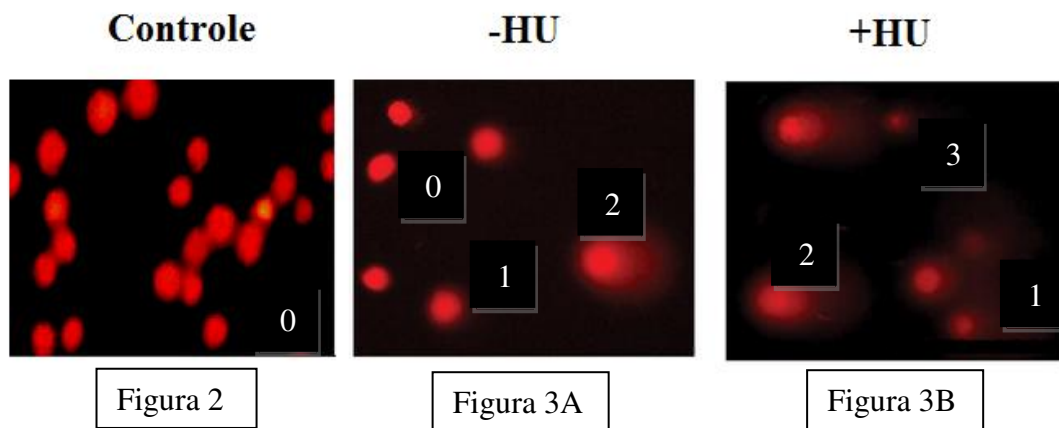


Nota: Comparação de médias do ID no DNA entre pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle. Valor de p obtido através do teste One-way Anova e pós teste de Tukey. \* $p < 0,05$ . Fonte: Do próprio autor.

As Figuras 2 e 3A -B ilustram o resultado do ensaio cometa nos três grupos estudados.

**Figura 2** – A eletroforese sob condições alcalinas em baixo ponto de fusão em gel de agarose de células de um controle saudável classificado como cometa classe 0.

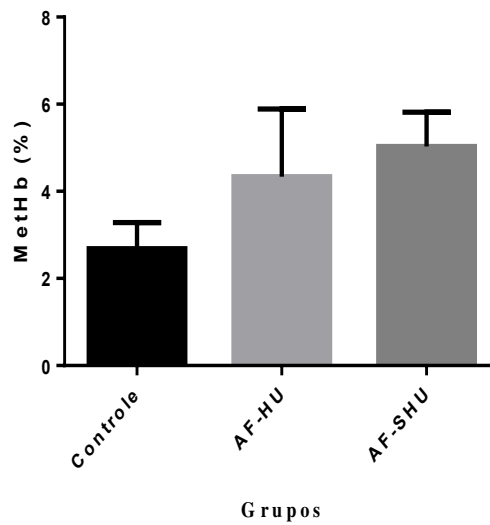
**Figuras 3 A - B**– Eletroforese em condições alcalinas em baixo ponto de fusão em gel de agarose de células de um paciente com AFSHU (-HU) e de um paciente com AFHU (+HU) classificados como cometa 0, 1, 2 e 3.



#### 4.4 Comparação dos biomarcadores de hemólise em pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle

As concentrações de MetHb em pacientes dos grupos AF-HU e AF-SHU foram, respectivamente,  $4,338 \pm 0,3876\%$  e  $5,033 \pm 0,4506\%$ . A concentração de MetHb foi estatisticamente superior nos grupos AF-HU e AF-SHU quando comparada ao grupo controle ( $2,682 \pm 0,06671\%$ ) ( $p < 0,0001$ ). Na comparação entre os grupos AF-HU e AF-SHU não houve diferença estatística, porém houve um aumento nas concentrações de MetHb nos pacientes sem o uso de HU (Gráfico 3).

**Gráfico 3** - Concentração de Methemoglobina (MetHb) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo de controle (\* $p < 0,0001$ )

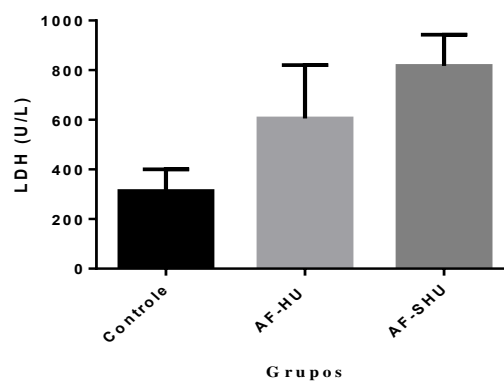


\*p<0,0001 - entre AF-HU e Controle  
 \*p<0,0001 - entre AF-SHU e Controle

Nota: Comparação de médias de MetHb entre pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle. Valor de p obtido através do teste One-way Anova e pós teste de Tukey. \*p<0,05. Fonte: Do próprio autor.

As concentrações de LDH nos grupos AF-HU e AF-SHU foram, respectivamente,  $605,5 \pm 59,56$  U/L e  $817,0 \pm 89,00$  U/L. A concentração de MetHb foi estatisticamente superior nos grupos AF-HU e AF-SHU quando comparada com o grupo controle ( $312,6 \pm 15,71$  U/L) ( $p<0,0001$ ). Na comparação entre os grupos AF-HU e AF-SHU não houve diferença estatística, porém houve um aumento nas concentrações de LDH nos pacientes sem o uso de HU (Gráfico 4).

**Gráfico 4** - Concentração de Lactato Desidrogenase (LDH) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo de controle (\*p<0,0001)

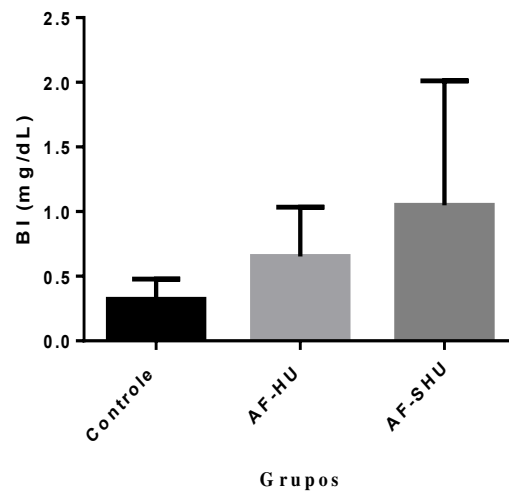


\*p<0,0001 - entre AF-HU e Controle  
 \*p<0,0001 - entre AF-SHU e Controle

Nota: Comparação de médias de LDH entre pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle. Valor de p obtido através do teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. \* $p < 0,05$ . Fonte: Do próprio autor.

A concentração de BI em pacientes do grupo AF-HU ( $0,6530 \pm 0,1208$  mg/dL) foi estatisticamente mais elevada quando comparada ao grupo controle ( $1,0500 \pm 0,6800$  mg/dL) ( $p=0,0134$ ). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos: AF-HU *versus* AF-SHU ( $1,0500 \pm 0,6800$  mg/dL) e AF-SHU *versus* grupo controle (Gráfico 5).

**Gráfico 5** - Concentração de Bilirrubina Indireta (BI) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo de controle (\* $p=0,0134$ )



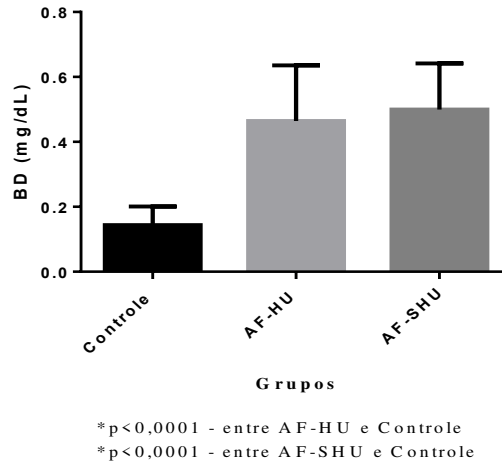
\* $p < 0,0134$  - entre AF-HU e Controle

Nota: Comparação de médias de BI entre pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle. Valor de p obtido através do teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn's. \* $p < 0,05$ . Fonte: Do próprio autor.

As concentrações de BD em pacientes dos grupos AF-HU ( $0,4870 \pm 0,05833$  mg/dL) e AF-SHU ( $0,5000 \pm 0,1000$  mg/dL) foi estatisticamente mais elevada quando comparada ao grupo controle ( $0,1439 \pm 0,01026$  mg/dL) ( $p < 0,0001$ ). Na comparação entre os pacientes com AF quanto ao uso de HU, não houve diferença estatística entre os grupos, porém houve um aumento nas concentrações de BD nos pacientes do grupo AF-SHU (Gráfico 6).

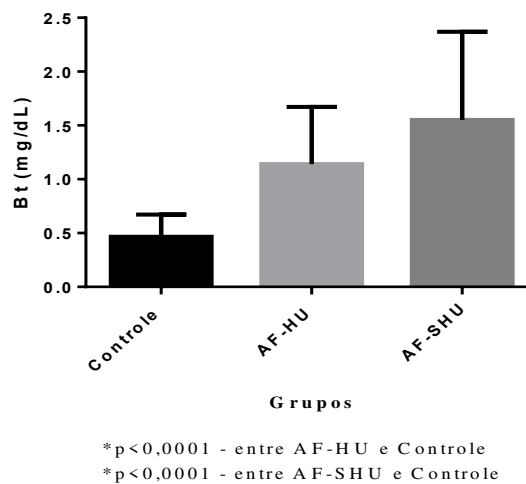
Em relação à BT, houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes dos grupos AF-HU ( $1,1400 \pm 0,1683$  mg/dL) e AF-SHU ( $1,5500 \pm 0,5800$  mg/dL) em comparação ao grupo controle ( $0,4655 \pm 0,03703$  mg/dL) ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença estatística na comparação entre os demais grupos (Gráfico 7).

**Gráfico 6** - Concentração de Bilirrubina Direta (BD) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo de controle (\* $p < 0,0001$ )



Nota: Comparação de médias de BD entre pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle. Valor de  $p$  obtido através do teste One-way Anova e pós teste de Tukey. \* $p < 0,05$ . Fonte: Do próprio autor.

**Gráfico 7** - Concentração de Bilirrubina Total (BT) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo de controle (\* $p < 0,0001$ )

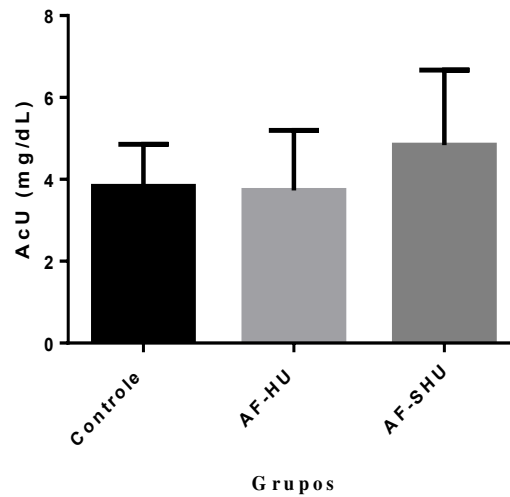


Nota: Comparação de médias de BT entre pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle. Valor de  $p$  obtido através do teste One-way Anova e pós teste de Tukey. \* $p < 0,05$ . Fonte: Do próprio autor.

Não houve diferença estatisticamente significativa entres as concentrações de  $\text{Ác.U}$  nos três grupos estudados: AF-HU ( $3,7810 \pm 0,3789$  mg/dL) *versus* AF-SHU ( $4,8370 \pm 1,0580$  mg/dL) *versus* grupo controle ( $3,8420 \pm 0,1843$  mg/dL) ( $p=0,3572$ ). Porém houve um

aumento nas concentrações de BT nos pacientes sem o uso de HU (Gráfico 8).

**Gráfico 8** - Concentração de Ácido Úrico (AcU) entre os grupos de pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo de controle ( $p < 0,3572$ )



Nota: Comparação de médias de AcU entre pacientes com AF com e sem uso de HU e grupo controle. Valor de p obtido através do teste One-way Anova e pós teste de Tukey. \* $p < 0,05$ . Fonte: Do próprio autor.

## 5 DISCUSSÃO

A AF é uma anemia hemolítica hereditária caracterizada pela presença da hemoglobina S, em homozigose, que por sua vez é uma hemoglobina anormal gerada por uma mutação da cadeia beta globina. Embora todos os pacientes com AF apresentem a mesma mutação genética no gene da beta-globina que compromete a formação da hemoglobina, observa-se uma ampla variabilidade clínica entre os pacientes. O uso de HU por esses pacientes promove modificações no perfil do hemograma como a redução do quadro anêmico, da leucocitose e do VCM, fato atribuído à ação citorredutora da droga, além do aumento da HbF (WONG *et al.*, 2014). Portanto os achados hematológicos no presente estudo estão de acordo com a literatura.

Os resultados do Ensaio Cometa evidenciaram que os pacientes com AF apresentaram, em sua maioria, células com ID de classes 2 e 3, enquanto que indivíduos do grupo controle, células com ID de classes 0 e 1. Ao se estratificar os pacientes quanto ao uso de HU e ao compará-los com o grupo controle os resultados comprovaram que os níveis de danos no DNA em indivíduos com AF tratados com HU foram significativamente maiores quando comparados aos controles e aos pacientes sem uso de HU. Silva-Rocha e colaboradores (2012) mostraram, pela técnica do ensaio cometa, que pacientes com AF em tratamento com HU apresentavam aumento de dano ao DNA, porém, sem diferença significativa. Friedrisch *et al.* (2008), sugeriram que a HU tem potencial tóxico apenas no início do tratamento, mas no uso por longos períodos (> 42 semanas) essa toxicidade é diminuída prevalecendo somente o estresse e lesão decorrentes dos eventos da AF. Esses resultados foram discordantes de nossos achados, pois a maioria dos pacientes de nosso estudo estavam utilizando HU por um período superior a 24 meses (> 102 semanas) e ainda assim os pacientes com AF em tratamento apresentaram um ID estatisticamente mais elevado quando comparado aos pacientes sem o uso e grupo controle.

Um possível mecanismo da toxicidade da HU é a redução de dNTP intracelular resultante da inibição da RR, o que prejudica os mecanismos de reparação de DNA, devido à falta de nucleotídeos para a DNA polimerase. Assim, a instabilidade do DNA potencialmente leva a carcinogênese, principalmente pela transformação leucêmica (LI; KAMINSKAS, 1987). Além disso, a natureza oxidativa e inflamatória da AF, motivos pelo qual os pacientes são tratados com HU, também devem ser levados em consideração. Este estado da doença está associado a danos lipídicos, proteicos e no material genético, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ANDERSON *et al.*, 2000; KUMAR; BANDYOPADHYAY, 2005).

Na AF a hemólise faz parte de uma cadeia de eventos que culminam na vaso-occlusão, podendo levar ao quadro de isquemia. Observa-se que quanto maior o quadro hemolítico, maior o risco de complicações tais como hipertensão pulmonar, úlceras de perna, priapismo e possivelmente doenças cerebrovasculares (KATO *et al*, 2007). A hemólise ocorre de forma crônica, promovendo redução da meia-vida das hemácias, que liberam substâncias no seu interior de forma progressiva causando várias complicações, dentre elas a redução da disponibilidade do NO (REES; GIBSON, 2011; MILTON *et al*, 2013; DAMANHOURI *et al*, 2015).

Indicadores de processos biológicos normais ou patogênicos em uma condição específica são denominados de biomarcadores (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Verificou-se um aumento significativo nas dosagens séricas de MetHb, LDH e bilirrubinas total, direta e indireta, nos pacientes com AF sem uso de HU em relação aos outros grupos. Resultados semelhantes foram encontrados por outros estudos na literatura (REES; GIBSON, 2011; MOREIRA *et al*, 2014; MIKOBİ *et al*, 2015).

A hemoglobina S (HbS) é uma hemoglobina instável que facilmente se oxida, causando aumento da produção de metemoglobina (MetHb) em pacientes com anemia falciforme (AF). A metemoglobinemia ocorre quando há freqüente oxidação da hemoglobina e isso ocorre de forma constante na AF, pois, a molécula de HbS tem enorme facilidade de sofrer oxidação e hemólise. O aumento de MetHb em pacientes com AF também foi constatado por Naoum e Souza (2004), Silva Filho (2005), Allen e colaboradores (2012) e Laurentino e colaboradores (2014).

O LDH, enzima associada ao quadro clínico de hiper-hemólise, é um dos novos marcadores que vem sendo descritos como moduladores da clínica da AF (STEINBERG, 2005; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; TAYLOR *et al.*, 2008). No presente estudo verificou-se um aumento significante da LDH sérica nos pacientes com AF sem uso de HU quando comparados ao grupo controle. Resultado atribuído ao processo hemolítico crônico na AF mesmo em estado basal. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Elias e colaboradores (2012), que obtiveram um aumento significante de LDH em relação ao grupo controle na mesma população em estudo.

Em outro estudo, Stojanovic e colaboradores (2012) verificaram uma elevação nos níveis séricos de LDH em pacientes com AF tanto em estado basal como em crises agudas de vaso-occlusão. Taylor *et al.* (2008) recomendam a determinação de LDH em pacientes com AF, em estado basal, como marcador preditivo de maior risco de mortalidade, com intervenções precoces em decorrência da freqüência de episódios de vaso-occlusão. A elevação da LDH está

relacionada a situações em que ocorre grande destruição celular, como nos casos das anemias hemolíticas, insuficiência cardíaca congestiva, doenças musculares, lesões hepáticas e neoplasias. Nas doenças falciformes associadas a crises de hemólise, a LDH apresenta-se com concentrações elevadas, fato que a caracteriza como sensível marcador biológico da destruição de eritrócitos (REES; GIBSON, 2011; BALLAS, 2013; DAMANHOURI *et al*, 2015; MIKOBİ *et al*, 2015).

A bilirrubina é o principal produto do metabolismo do grupo heme. Cerca de 70% são provenientes da destruição de eritrócitos senescentes. Na AF ocorre a destruição precoce dos eritrócitos, elevando a concentração de bilirrubina total, principalmente devido ao aumento de bilirrubina indireta. O aumento da bilirrubina indireta é tipicamente mais acentuado na AF. A alta taxa de excreção de bilirrubinas tem como consequência a formação de cálculos biliares Vilas-Boas *et al*. (2010).

No presente estudo foi observado um aumento nas frações direta e indireta e na bilirrubina total nos pacientes quando comparados ao grupo controle. Não houve alterações significativas ao estratificar-se quanto ao tratamento com HU. Milton e colaboradores (2013) também evidenciaram bilirrubinemia em pacientes com AF.

Em relação ao tratamento estatístico dos resultados da bilirrubina indireta, não foi possível analisar o grupo não tratado com HU, devido a limitações referentes à técnica e à disponibilidade de amostras. Assim, observou-se um aumento apenas do grupo AF-HU comparados ao controle.

Quanto ao parâmetro ácido úrico não foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre os grupos, porém houve um aumento desse biomarcador nos pacientes com AF sem uso de HU. Cerqueira *et al*. (2011) mostraram uma correlação positiva do ácido úrico com os seguintes marcadores de hemólise: bilirrubina total e indireta em pacientes com AF na Bahia. O grupo atribuiu à elevação do ácido úrico na doença devido ao aumento da atividade da Medula óssea e a renovação dos ácidos nucléicos que podem ocorrer durante o processo hemolítico. Esse mecanismo está associado a outras doenças, incluindo a AF (REYNOLDS, 1983). Nos pacientes em uso de HU, as concentrações de ácido úrico foram semelhantes aos indivíduos do grupo controle, evidenciando uma melhora do processo hemolítico após o tratamento.

## 6 CONCLUSÃO

- Houve uma predominância de pacientes do sexo feminino; pacientes com AF em uso de HU apresentaram valores mais baixos de parâmetros do hemograma e reticulócitos em relação ao grupo que não fazia uso do medicamento. A concentração de HbF foi mais elevada nos pacientes com AF em uso de HU;
- Pacientes com AF em uso de HU apresentaram ID no DNA mais elevados quando comparados aos pacientes sem o uso de HU e ao grupo controle;
- Pacientes com AF sem o uso de HU apresentaram um aumento dos parâmetros de hemólise em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa quando se comparou os pacientes com AF quanto ao uso de HU, porém houve um aumento nos níveis de todos os parâmetros nos pacientes com AF sem o uso do medicamento;

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados do presente estudo demonstraram que embora a HU apresente efeitos benéficos como a elevação da concentração de HbF e redução do quadro hemolítico, o seu uso requer atenção e investigação cuidadosa quanto às possíveis ações genotóxicas. Sendo necessários mais estudos para elucidar o seu potencial carcinogênico.

## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C; SINGH, N. Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. *Environ Sci Pollut Res*, v.16, p.727-40. 2009
- ANDERSON, D.; YARDLEY-JONES, A.; VIVES-BAUZA, C.; CHUA-ANUSORN, W.; COLE, C.; WEBB, J. Effect of iron salts, haemosiderins, and chelating agents on the lymphocytes of a thalassaemia patient without chelation therapy as measured in the comet assay. *Teratog. Carcinog. Mutagen*, v. 20, p. 251–264, 2000.
- ATAGA, K. I. et al. Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: A longitudinal study. *Br J Haematol*, USA, v.134, n.1, p.109-15, Jul. 2006.
- BALLAS, S.K. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. *Blood*, v. 121, n.1, 2013.
- BALLAS, S. K. *et al.* Hydroxyurea and sickle cell anemia: effect on quality of life. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 4, n. 1, p. 59, 2006.
- BARBERINO, W. M.; JUNIOR, E. B.; DOMINGOS, C. R. B. Comet Assay as a technique to evaluate DNA damage in sickle cell anemia patients. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v.34, n. 1, p. 67, 2012.
- BARBUI, T. The leukemia controversy in myeloproliferative disorders: is it a natural progression of disease, a secondary sequela of therapy, or a combination of both? **Semin. Hematol.**, v. 41, p. 15-17, 2004.
- BELINI JUNIOR, E.; SILVA, D.G.H.; TORRES, L.S.T.; OKUMURA, J.V.; LOBO, C.L.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Severity of Brazilian sickle cell disease patients: Severity scores and feasibility of the Bayesian network model use. *Blood Cells, Molecules and Diseases*. v. 54, p.321–327, 2015.
- BENFATO, Mara da Silveira. A FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA FALCIFORME. **Infarma: Ciências Farmacêuticas**, Porto Alegre, v. 19, n. 1/2, p.1-2, ago. 2007. Trimestral. Disponível em: <[http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path;=216&path;\[\]=204](http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path;=216&path;[]=204)>. Acesso em: 05 maio 2016.
- BORGNA-PIGNATTI, C. Modern treatment of thalassaemia intermedia. **Br J Haematol**, v.138, p. 291–304, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. Doença falciforme: Hidroxiureia: uso e acesso / Ministério da

Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência – 1. ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 56 p.: il.

BYRD, D. C.; PITTS, S. R.; ALEXANDER, C. K. Hydroxyurea in two pregnant women with sickle cell anemia. **Pharmacotherapy**, v. 19, p. 1459-1462, 1999.

CAMARGO, T.M.; ALVES, M.I.F.; OLIVEIRA, S.J.; SHITARA, E.S.; OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **RBAC**, Rio de Janeiro, v. 39 (2), p. 95-98, 2007.

CANÇADO, R. D.; LOBOC.; ÂNGULO, I.L.; ARAÚJO, P.I.C.; JESUS, J.A. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxíureia na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 361-366, 2009.

CERQUEIRA, B.A. BOAS, W.V.; ZANETTE, A.A.D.; REIS, M.G.; GONÇALVES, M.S. Associação de marcadores laboratoriais ao perfil clínico em pacientes com anemia falciforme de Salvador- Bahia. **Gaz. méd. Bahia**, v. 80, n. 3, p. 24-28, 2010.

CHANG, Y. P.; MAIER-REDELSPERGER, M.; SMITH, K. D.; CONTU, L.; DUCROCO, R.; DE MONTALEMBERT, M.; BELLOY, M.; ELION, J.; DOVER, G. J.; GIROT, R. The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. **Br. J. Haematol.**, v. 96, n. 4, p. 806-814, 1997.

CHARACHE, S.; DOVER, G. J.; MOORE, R. D. *et al.* Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, p. 2555–2565, 1992.

COOK, S. L.; BRUNS, D. E. Persistent hemolysis in a patient with pancreatitis. **Clin Chem**, v. 58, p. 974-8, 2012.

CONGER, J. D. Acute uric acid nephropathy. **Med Clin N Am.**v.74, n.4, p.859–71, 1990.

DAMANHOURI, G.A.; JARULLAH, J.; MAROUF, S.; HINDAWI, S.I.; MUSHTAQ, G.; KAMAL, M.A. Clinical biomarkers in sickle cell disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 24–31, 2015.

DIAMOND, H. S.; MEISEL, A. D.; HOLDEN, D. The natural history of urate overproduction in sickle cell anemia. **Ann Intern Med.**, v.90, n.5, p.752–7, 1979.

DREW, C., et al. Oxygen sensitivity of red cell membrane transporters revisited **Bioelectrochemistry**. v. 62, p. 153-158, 2004.

FRIEDRISCH, J.R.; PRA, D.; MALUF, S.W.; BITTAR, C.M.; MERGENER, M. *et al.* DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell. **Mutation research**,v.649, p. 213-220, 2008.

GALLI, A.; SCHIESTL, R. H. Hydroxyurea induces recombination in dividing but not in G1 or G2 cell cycle arrested yeast cells. **Mutat. Res.**, v. 354, n. 1, p. 69-75, 1996.

GALIZA NETO GC, PITOMBEIRA MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol Med Lab.* 2003;39(1):51-6.

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

GLADWIN, M.T., et al. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Rad. Biol. Med.* v.36, p. 707-717, 2004.

HANFT, V. N.; FRUCHTMAN, S. R.; PICKENS, C. V.; ROSSE, W. F.; HOWARD, T. A.; WARE, R. E. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood*, v.95, n.11, p. 3589-3593, 2000.

HANFT, V. N.; STEVEN, R.; FRUCHTMAN, R.; PICKENS, C. V.; WENDELL, F.; HOWARD, A.; WARE, R. E.; Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 589-593, 2001.

HARTMANN,A.;AGURELL,E.; BEEVERS,C.; BRENDLER-SCHWAAB,S.; BURLINSON, B. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45–51, 2003.

HEBBEL, R. P. Reconstructing sickle cell disease: a data-based analysis of the “hyperhemolysis paradigm” for pulmonary hypertension from the perspective of evidence-based medicine. *Am. J. Hematol.*, v. 86, p. 123–54, 2011.

IANNONE, R.; OHENE-FREMPONG, K.; FUCHS, E. J.; CASELLA, J. F.; CHEN, A. R. Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Anemia: Progress and Prospects. *Pediatr Blood Cancer*, v. 44, p. 436 – 440, 2005.

JIALAL, I.; SKOLL, L. J. Clinical Utility of Lactate Dehydrogenase. A Historical Perspective. *Am J Clin Pathol*; v. 143, p.158-159, 2015.

KATO, G. J.; MCGOWAN, V.; MACHADO, R. F.; LITTLE, J. A.; TAYLOR, J. T.; MORRIS, C. R.; NICHOLS, J. S.; WANG, X.; POLJAKOVIC, M.; MORRIS, S. M. JR; GLADWIN, M. T. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood.*, v. 107, n. 6, p. 2279-85, 2006b.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical sub-phenotypes. *Blood*

Reviews, USA, v.21, n.1, p. 37-47, Jan. 2007.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.*, v. 157, p. 175, 2005.

LAURENTINO, M.R.; MAIA FILHO, P.A.; BARBOSA, M.C.; BANDEIRA, I.C.J.; ROCHA, L.B.S.; GONÇALVES, R.P. Influence of  $\beta$  S-globin haplotypes and hydroxyurea on tumor necrosis factor-alpha levels in sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* v. 36, n. 2, p. 121–125, 2014.

LI, J.C; KAMINSKAS, E. Progressive formation of DNA lesions in cultured Ehrlich ascites tumor cells treated with hydroxyurea. *Cancer Res.*, v. 47, p. 2755–2758, 1987.

LIMA, P. D. L.; CARDOSO, P. C. S.; KHAYAAT, A. S.; BAHIA, M. O.; BURBANO, R. R. Evaluation of the mutagenic activity of hidroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. **Genet. Mol. Res.**, v. 2, n. 3, p. 328-333, 2003.

MCKENNA, D. J.; MCKEOWN, S. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*, v. 23, n. 3, p. 183–190, 2008.

MALUF, S.W.; ERDTMANN, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs e valuated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. **Mutat. Res.**, v. 471, p. 21–27, 2000.

MALUF, A.; PRAB, D.; FRIEDRISCH, J. R. *et al.*, Length of treatment and dose as determinants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, p. 26–29, 2009.

MIKOBI, T.M.; LUKUSA, T.P.; ALONI, M.N.; MVUMBI, L.G; AKILIMALI, P.Z.; MUYEMBE-TAMFUM, J.J.; RACE, V.; MATTHIJS, G; MBUYI, M.J.M. Correlation between the Lactate Dehydrogenase Levels with Laboratory Variables in the Clinical Severity of Sickle Cell Anemia in Congolese Patients. *PLoS One.* v. 6; n.10(5), 2015.

MILTON, J.N.; ROOKS, H.; DRASAR, E.; MCCABE, E.L.; BALDWIN, C.T.; MELISTA, E.; GORDEUK, V.R.; NOURAIE, M.; KATO, G.R.; MINNITI, C.; TAYLOR, J.; CAMPBELL, A.; LUCHTMAN-JONES, L.; RANA, S.; CASTRO, O.; ZHANG, Y.; THEIN, S.L.; SEBASTIANI, P.; GLADWIN, M.T.; WALK-PHAAST, INVESTIGATORS, STEINBERG, M.H. Genetic determinants of haemolysis in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* v.161, n.2, p 270-8, 2013.

MOREIRA, J.A.; LAURENTINO, M.R.; MACHADO, R.P.G.; BARBOSA, M.C.; MOTA, A.M.; ROCHA, L.B.S; MARTINS, A.M.C.; ARRUDA, A.B.L.; SOUZA, I.P.; GONÇALVES, R.P. Pattern of hemolysis parameters and association with fetal hemoglobin in

sickle cell anemia patients in steady state. *Rev bras hematol hemoter.*, n.37, v. 3, p.167–171, 2015.

NAHAVANDI, M.; PERLIN, E.; KASSIM, O. *et al.* Upregulation of TNF-alpha by hydroxyurea in patients with sickle cell anemia. **Blood.**, v. 96, n. 1, p. 44, 2000.

NASCIMENTO, T.S.; PEREIRA, R.O.L.; MELLO, H.L.D.; COSTA, J. Metemoglobinemia: do Diagnóstico ao Tratamento. *Rev Bras Anesthesiol.*, Campinas, n. 58, v. 6, p. 651-664, 2008.

NAOUM, P.C.; SOUZA, P.C. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da Hb S nos genótipos SS, SF (S/β0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. *J Bras Patol Med Lab*, São José do Rio Preto, v. 40, n. 4, p. 249-59, 2004.

NOGUCHI, C. T.; RODGERS, G. P.; SERJEANT, G. R. *et al.*, Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 318, p. 96–99, 1988.

NOLAN, V.G.; WYSZYNSKI, D.F.; FARRER, L.A. STEINBERG, M.H. Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood.* v. 106, n. 9, p. 3264–3267, 2005.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature**, v.1, n.1, 2006.

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

PLATT, O. S. Hydroxyurea for the Treatment of Sickle Cell Anemia. **N. Engl. J. Med.** v. 358, p. 1362 – 1369, 2008.

PLATT, O.S.; ORKIN, S.H.; DOVER, G. *et al.*, Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **J Clin Invest**, v. 74, p. 652–656, 1984.

REYNOLDS, M. D. Gout and hyperuricaemia associated with sickle cell anaemia. *Scam, Arthritis Rheum.*, v. 12, p. 404-13, 1983.

REKHA, D.; SUVARDHAN, K.; KUMAR, J. D. *et al.* Solid phase extraction method for the determination of lead, nickel, copper and manganese by flame atomic absorption spectrometry using sodium bispiperdine-1,1'-carbotetrathioate (Na-BPCTT) in water samples.v.146, p.131-6, 2007.

REES, D.C; GIBSON, J.S. Biomarkers in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, v.156, p.433–445, 2011.

ROTHER, R. P.; BELL, L.; HILLMEN, P.; GLADWIN, M. T. The clinical sequelae of

intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama*, v. 293, n. 13, p.1653-62, 2005.

SANTOS, J. L.; BOSQUESI, P. L.; ALMEIDA, A. E. *et al.*, Mutagenic and Genotoxic Effect of Hydroxyurea. **Int J Biomed Sci**, v. 7, p. 263-267, 2011.

SILVA FILHO, I.L.; GONÇALVES, M. S.; ADÔRNO, E.V.; CAMPOS, D.P.; FLEURY, M.K. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (HbAS), expostos a riscos ocupacionais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São José do Rio Preto, v. 27, n. 3, p. 183-187, 2005.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. *In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVA, Michelle C.; SHIMAUTI, Eliana L. T.. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 2, n. 28, p.144-148, fev. 2006. Bimestral.

SILVA-ROCHA, L. B. et al. DNA damage in leukocytes of sickle cell anemia patients is associated with hydroxyurea therapy and with HBB\*S haplotype. *Mutat. Research.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2012

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Met. Mol. Biol.*, v. 113, p. 203-212, 1999.

STEINBERG, M.H.; McCARTHY, W.F.; CASTRO, O.; BALLAS, S.K.; ARMSTRONG, F.D.; SMITH, W.; ATAGA, K.; SWERDLOW, P.; KUTLAR, A.; DeCASTRO, L.; WACLARWIN, M.A. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. **Am J Hematol.**, v.85, p.403-408, 2010.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* v.129, n.4, p.465-81, 2005.

STOJANOVIC, K. S.; STEICHEN, O.; LEFEVRE, G.; BACHMEYER, C.; AVELLINO, V.; GRATEAU, G.; GIROT, R.; LIONNET, F. High lactate dehydrogenase levels at admission for painful vaso-occlusive crisis is associated with severe outcome in adult SCD patients. *Clin Biochem.*, v. 45, p. 1578-82, 2012.

TAYLOR, J. G. V. I.; NOLAN, V. G.; MENDELSON, L.; KATO, G. J.; GLADWIN, M. T. Chronic Hyper-Hemolysis in Sickle Cell Anemia: Association of Vascular Complications and Mortality with Less Frequent Vasoocclusive Pain. *PLoS ONE*, v. 3, n.5, p. e2095, 2008.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSN, B.; HARTMANN, A. *et al.* Single cell gel/comet assay: guide lines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.35, p. 206–221, 2000.

VILAS-BOAS, W.; CERQUEIRA, B. A.; ZANETTE, A. M.; REIS, M. G.; BARRALNETTO, M.; GONCALVES, M. S. Arginase Levels and Their Association with Th17-Related Cytokines, Soluble Adhesion Molecules (Sicam-1 and Svcam-1) and Hemolysis Markers among Steady-State Sickle Cell Anemia Patients. *Annals of hematology*, v. 89, p. 877-82, 2010.


VOSKARIDOU, E.; CHRISTOULAS, D.; BILALIS, A. *et al.* 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, p. 2354-2363, 2010.

WARE, R. E. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 115, p. 5300-5311, 2010.

WONG, T.E.; BRANDOW, A.M.; LIM, W.; LOTTENBERG, R. Update on the use of hydroxyurea therapy in sickle cell disease. *Blood*: v.124, n. 26, 2014.

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 A

	<p>Universidade Federal do Ceará          Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE)          Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças          Hematológicas (LHGDH)</p>
---	--

### 1. Identificação do Paciente

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

Nome Completo: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 ( ) F

Sexo: ( ) M

Identidade (nº): \_\_\_\_\_

Endereço completo: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_

UF: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Celular: \_\_\_\_\_

e-mail: \_\_\_\_\_

Etnia:

( ) Nenhuma ( ) Branco ( ) Afrodescendente ( ) Índio ( ) Pardo

Deficiência:

( ) Nenhuma ( ) Auditiva ( ) Visual ( ) Física ( ) Dislexia  
 ( ) Múltipla

### 2. Diagnóstico

2.1 Data do diagnóstico: \_\_\_\_\_

2.2 Concentração de HbF ao diagnóstico: \_\_\_\_\_

#### 2.3 Eletroforese de hemoglobina:

Resultado: \_\_\_\_\_

#### 2.4 Hemograma:

<b>DATA</b>	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<b>dosagem de HU</b>									
<b>Hemácias</b>									
<b>Hb</b>									
<b>Ht</b>									
<b>VCM</b>									
<b>HCM</b>									
<b>CHCM</b>									
<b>RDW</b>									
<b>Leucócitos</b>									
<b>Bast</b>									
<b>Seg</b>									
<b>Eos</b>									
<b>Baso</b>									
<b>Linf</b>									
<b>Mon</b>									
<b>Meta</b>									
<b>Mielo</b>									
<b>Prom</b>									
<b>Blas</b>									
<b>Plaquetas</b>									
<b>Ret</b>									
<b>VHS</b>									

## 2.5 Dados Clínicos

<b>Ano/ Frequência</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
<b>Crises Dolorosas *</b>					
<b>AVC</b>					
<b>Priaprismo</b>					
<b>Crise Aplástica</b>					
<b>Sin. Torácica Aguda</b>					
<b>Crises de Sequestro Esplênico</b>					
<b>Úlceras nas Pernas</b>					
<b>Transfusões</b>					
<b>Infecções</b>					
<b>Internações</b>					

Data da última transfusão: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## 2.6 Dados Complementares:

- Complicações ósseas: ( ) sim ( ) não
- Complicações renais: ( ) sim ( ) não
- Complicações cardíacas: ( ) sim ( ) não
- Outros:

---



---

## 3. TRATAMENTO

3.1 Data do início do tratamento: \_\_\_\_\_

3.2 A quanto tempo usa a HU: \_\_\_\_\_

(aqui é mais importante verificar se houve mudança na dose e qual a data desta mudança, além de saber qual a dosagem de hbf após o início da nova dose)

<b>Tratamento: Hidroxiuréia</b>	<b>Dose / [ ]HbF</b>
<b>DATA:</b> / /	
<b>DATA:</b> / /	
<b>DATA:</b> / /	
<b>DATA:</b> / /	

<b>Tratamento (outros) / DATA</b>	<b>Dose</b>	<b>Início</b>	<b>Fim</b>	<b>Duração</b>

**Obs:** Descrever todos os medicamentos que o paciente esteja tomando (inclusive vitaminas).

## ANEXO A



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

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

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação do índice de dano no DNA e parâmetros de hemólise em pacientes com anemia falciforme**”, que tem como objetivo principal avaliar o dano endotelial e do DNA, NADPH-oxidase, marcadores de hemólise e moduladores genéticos em pacientes com Anemia Falciforme que são acompanhados no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC).

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Para tanto, necessitamos que o Sr.(a) autorize a obtenção de 2 (duas) amostras de sangue para que a pesquisa seja realizada. A coleta de sangue será realizada no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC). A participação na pesquisa, não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa devido à coleta do sangue. O senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa 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.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é Romélia Pinheiro Gonçalves, endereço para contato: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Porangabussu, CEP 60430-370 - Fortaleza, CE – Brasil, Telefone: (85) 33668264.

Se o Senhor(a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HUWC- Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 - Rodolfo Teófilo; Fone: (0xx)85 3366-8589- E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br.

Caso o Senhor (a) se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se o Senhor(a) concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

---

Assinatura do paciente/ representante legal

Data:        /        /

---

Assinatura do responsável pelo estudo

Data:        /