



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DARCIELLE BRUNA DIAS ELIAS

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE MALONALDEÍDO (MDA), ÓXIDO NÍTRICO (NO) E LACTATO DESIDROGENASE LÁCTICA (LDH) NA ANEMIA FALCIFORME E SUAS CORRELAÇÕES COM O USO DE HIDROXIURÉIA

FORTALEZA
2009

DARCIELLE BRUNA DIAS ELIAS

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE MALONALDEÍDO (MDA), ÓXIDO NÍTRICO (NO) E LACTATO DESIDROGENASE LÁCTICA (LDH) NA ANEMIA FALCIFORME E SUAS CORRELAÇÕES COM O USO DE HIDROXIURÉIA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará para apreciação do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

FORTALEZA
2009

E41a

Elias, Darcielle Bruna Dias

Avaliação dos níveis séricos de malonaldeído (MDA), óxido nítrico (NO) e lactato desidrogenase láctica (LDH) na anemia falciforme e suas correlações com o uso de hidroxiuréia / Darcielle Bruna Dias Elias. – Fortaleza, 2009.

79f. : il.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza-Ce, 2009.

1. Anemia falciforme. 2. Malonaldeído. 3. Hidroxiuréia. I. Gonçalves, Romélia Pinheiro (Orient.) II. Título.

CDD T616.1527

DARCIELLE BRUNA DIAS ELIAS

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE MALONALDEÍDO (MDA), ÓXIDO NÍTRICO (NO) E LACTATO DESIDROGENASE LÁCTICA (LDH) NA ANEMIA FALCIFORME E SUAS CORRELAÇÕES COM O USO DE HIDROXIURÉIA

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Farmácia Clínica.

Aprovada em: ____/____/2009

BANCA EXAMINADORA

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

Profª. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ronald Pinheiro Feitosa
Hemocentro do Estado do Ceará (HEMOCE)

Dedico primeiramente a Deus a concretização de mais este sonho na minha vida.

À minha mãe Francisca por sempre acreditar no meu sucesso e ter me dado como exemplo de vida, o estudo.

Ao meu esposo, Isaac, pelo grande companheirismo, compreensão e pelo grande incentivo para que eu nunca deixe de lutar pelos meus sonhos.

E finalmente, a pessoa mais importante da minha vida, a minha filha Isabelle, que me faz buscar sempre o melhor de mim.

AGRADECIMENTOS

À Funcap, pelo apoio financeiro.

A minha orientadora Profa. Dra Romélia Pinheiro Gonçalves, pelo carinho maternal, que me incentivaram em todas as horas, a dedicação e acima de tudo pela sua preciosa amizade.

Ao meu marido Isaac, pelo apoio irrestrito, amor, compreensão e auxílio. A minha filha Isabelle, que foi gerada e nasceu durante o período de realização deste trabalho, embora mereça todo amor, atenção e carinho, permitiu que a mamãe concluísse tranquilamente este trabalho.

A minha mãe Francisca e aos meus irmãos, Bruno e Jônatas por sempre acreditarem no meu sucesso.

Ao Prof. Dr. Juvêncio Nobre pela imensa colaboração na estatística deste trabalho.

À médica, Dra. Jacqueline Holanda, do Hemocentro do Estado do Ceará por acompanhar os pacientes, sempre relevando a importância da pesquisa;

Ao grande amigo Hemerson Yuri, que não mediu esforços para nos ajudar nesse trabalho;

Aos pacientes, que acreditaram na pesquisa e sem dúvida foram o motivo para o desenvolvimento desse estudo;

As grandes amigas Richeyla, Cristina, Lilianne e Michele pela amizade, companheirismo, entusiasmo e alegria.

A Raimundinha, secretária do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela amizade e atenção dispensada durante a realização deste curso.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

E acima de tudo, a Deus que me deu forças para continuar e vencer mais esse desafio

“Custa tanto ser uma pessoa plena, que muito poucos são aqueles que têm a luz ou a coragem de pagar o preço...

É preciso abandonar por completo a busca por segurança e correr o risco de viver com os dois braços...

É preciso cortejar a dúvida e a escuridão como preço do conhecimento...

É preciso ter uma vontade obstinada no conflito, mas também uma capacidade de aceitação total de cada consequência do viver e do morrer.”

Morris L. West

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará para apreciação do título de mestre. TÍTULO: Avaliação dos níveis séricos de malonaldeído (MDA), óxido nítrico (NO) e lactato desidrogenase láctica (LDH) na anemia falciforme e suas correlações com o uso de hidroxiuréia.

MESTRANDA: Darcielle Bruna Dias Elias

ORIENTADORA: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

RESUMO

INTRODUÇÃO: A anemia falciforme (AF) se caracteriza por anemia hemolítica crônica e com fenômenos vaso-oclusivos, seguidos de lesões a órgãos alvos, responsáveis pela mortalidade associada a esta doença. O fenômeno vaso-oclusivo está associado ao processo inflamatório desencadeado pela polimerização da HbS desoxigenada, favorecendo a impactação das hemácias na microcirculação e subsequente obstrução da luz do endotélio. Numerosas evidências sugerem que a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) pode ser um fator que favoreça a vaso-oclusão e que os radicais livres formados induzem à peroxidação lipídica e à subsequente produção de quantidades anormais de malonaldeído (MDA), que provoca alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária. Dentre os fatores genéticos que modulam a clínica da AF consta os níveis de HbF. A hidroxiuréia (HU) é utilizada no tratamento da AF e além de aumentar os níveis de HbF parece contribuir como um doador de óxido nítrico. **OBJETIVOS:** Nesse contexto, os objetivos do presente trabalho foram avaliar o estresse oxidativo por meio da dosagem sérica de MDA e determinar os níveis de NO e de lactato desidrogenase láctica (LDH) em pacientes com AF em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) e correlacionar com o uso da HU. **METODOLOGIA:** Desta forma foram utilizadas 65 amostras de sangue periférico de pacientes adultos com AF em uso ou não de HU, e um grupo controle foi elaborado por 20 doadores do banco de sangue com HbAA. Os níveis de NO, MDA e LDH foram determinados por métodos bioquímicos. Os participantes da pesquisa foram selecionados junto ao centro de hematologia e hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e foram submetidos a um questionário pré-estruturado. Os dados obtidos foram expressos como médias \pm desvio padrão e analisados utilizando-se o programa estatístico SPSS[®]15.0, utilizamos os coeficientes de correlação de Pearsaon e de Spearman para o estudo das correlações entre MDA, NO, LDH, HbF e Hb. Para comparar os três grupos através dos níveis de MDA, NO e LDH obtemos os resultados através da análise de deviance (ANODEV). **RESULTADOS:** verificamos um predomínio do sexo feminino, e das raças parda (grupo I) e negra (grupo II), sendo a grande maioria desses pacientes com idade variando de 20 a 35 anos (grupo I) e 20 a 40 anos (grupo II) e procedentes do estado de Ceará. Em sua maioria, não faziam uso de fumo\etilismo e de suplementação de vitaminas (C e E). Os níveis de MDA nos três grupos são todos diferentes, isto é, o grupo controle apresentou um nível médio de MDA superior ao grupo II, e este por sua vez superior ao grupo I. Não encontramos diferença nos níveis séricos de NO em relação ao uso de HU. Nos três grupos observamos que apenas o grupo controle difere, apresentando uma média bem inferior a dos dois grupos de pacientes quanto aos níveis de LDH. Observamos uma correlação inversamente proporcional entre os de níveis NO e de HbF para o grupo I, enquanto que para o grupo II não houve correlação. Em relação à concentração da Hb não houve correlação tanto no grupo I quanto no grupo II, com os níveis de NO. Não houve correlação significativa entre os níveis de MDA e Hb e HbF para nenhum dos grupos

estudados. Encontramos uma correlação inversamente proporcional entre os níveis de LDH e de Hb para o grupo I. Observou-se níveis elevados de MDA em pacientes do grupo II que realizaram duas ou mais transfusões no decorrer do ano, que apresentaram úlcera de perna maleolar e que tiveram três ou mais crises vaso-oclusivas para ambos os grupos. Não encontramos nenhuma relação do NO com as variáveis clínicas. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados mostram que os paciente em uso de HU não estão protegidos contra a peroxidação lipídica, hemólise quanto ao consumo de NO disponível.

Palavras Chaves: Anemia Falciforme, Malonaldeído, Hidroxiuréia.

Master's dissertation presented to the Post-Graduation in Pharmaceutical Sciences University Federal do Ceará for consideration by the title of master.

Title: Evaluation of serum levels of malonaldehyde (MDA), nitric oxide (NO) and lactate dehydrogenase (LDH) in sickle cell disease and their correlation with the use of hydroxyurea.

Master: Darcielle Bruna Dias Elias

GUIDANCE: Profa. Dra. Romelia Pinheiro Gonçalves

ABSTRACT

INTRODUCTION: The sickle-cell disease (SCD) is characterized by hemolytic chronic anemia and with vase-occlusive phenomena, followed by target organs which are responsible for the mortality associated with this disease. The vase-occlusive phenomenon is associated with the inflammatory process unleashed by the polymerization of deoxygenated HbS, which favors the polymerization of erythrocytes in the microcirculation and the subsequent obstruction of endothelia light. Several evidences suggest that the reduction of the bioavailability of the nitric oxide (NO) can be a factor to favor the vase-occlusion and that the free radicals produced give rise to the lipidic peroxidation and the subsequent production of the abnormal quantities of malonaldehyde (MDA), which induce the permeability of the red cell membrane. Among the genetic factors that modulate the clinic of the AF, there is the HbF levels. The hydroxyurea (HU) is used in the treatment of SCD and apart from increasing the HbF levels it also seems to contribute as a nitric oxide donator. **OBJECTIVES:** In this context, the present work aims to evaluate the oxidative stress by means of seric dosage of the MDA and to determinate the levels of NO and lactate desidogenase latica (LDH) in patients with SCD by means within the Walter Cantídeo University Hospital (HUWC) and to correlate with the use of HU. **EXPERIMENTAL:** This way, it was used 65 samples of peripheral blood of adult patients with AF with either HU or not, and a control group was composed by 20 donors of the blood bank with HbAA. The levels of NO, MDA and LDH were determined by biochemical methods. The participants of the research were selected in the Center of Hematology and Hemotherapy of Ceará State (HEMOCE). All the participants have signed a document stating free consent and approval (TCLE) and they were submitted to a previously elaborated questionnaire. The obtained data were expressed as averages \pm pattern deviation and analyzed by using a statistics software SPSS[®]15.0, using Pearson and Spearman correlation coefficients for the study of the correlations among MDA, NO, LDH, HbF and Hb. In order to compare the three groups through the levels of MDA, NO and LDH, the results were obtained by means of deviance analysis (ANODEV). **RESULTS:** It has been observed a majority of females and fallow race (group I) and black (group II), in which the most part of these patients have ages in the range of 20-35 (group I) and 20-40 (group II) and come from Ceará State. Most of them did not smoke, drink alcohol nor use vitamin supplements (C and E). The levels of MDA in the three groups are all different, *i. e.*, the control group showed an average level of MDA higher than group II, and the later higher than that of the group one. It was not verified difference in the seric levels of NO in relation to the use of HU. In the three groups, it was observed that only the control group is different, showing an average much lower than those of the other two groups of patients regarding the levels of LDH. It was also observed a correlation inversely proportional between the two levels of NO and HbF for the group I, while in the group II there was no correlation. Regarding to the concentration of Hb, there was no correlation both in the group I and in the group II, with levels of NO. There was no significantly correlation among the levels of MDA,

Hb and HbF for the studied groups. It was found a correlation inversely proportional between the levels of LDH and Hb for the group I. It was observed accentuated levels of MDA in patients of group II who have made two or more transfusions throughout the year, who had leg ulcers and who had three or more vase-occlusive crises form both the groups. It was found no relation of NO with the clinic variables. CONCLUSÃO: Our results have shown that patients who use HU are not protected against lipidic peroxidation, hemolysis and consume of available NO.

Key Words: Sickle-Cell Disease, Malonaldehyde, Hydroxyurea

LISTA DE FIGURAS

1.	Padrão de herança da AF e traço falciforme	20
2.	Hemácias em foice	21
3.	Alteração da membrana do eritrócito por polímeros de Hb S	24
4.	Vasculopatia e AVC na AF	25
5.	Oxidação no eritrócito	29
6.	Efeitos fisiopatológicos da hemoglobina livre no plasma e óxido nítrico	32
7.	Mecanismo de ação da HU na anemia falciforme a nível sanguíneo, vascular e na medula óssea.	35
8.	Distribuição dos pacientes em relação ao gênero	45
9.	Distribuição dos pacientes em relação à etnia	46
10.	Boxplot's da idade dos pacientes por grupo	46
11.	Relação do uso de paracetamol por grupo	47
12.	Relação do uso de vitaminas dos pacientes por grupo	48
13.	Transfusões de sangue dos pacientes por grupo	49
14.	Tabagismo e etilismo dos pacientes por grupo	50
15.	Boxplot's dos níveis de MDA, NO e LDH por grupo	51
16.	Dispersão entre os níveis de MDA, NO e LDH em relação aos grupos	52
17.	Dispersão dos níveis de MDA, NO e LDH individualizados por grupo	53
18.	Relações entre os níveis de NO, LDH, MDA, HbF e Hb para o grupo I	55
19.	Relações entre os níveis de NO, LDH, MDA, HbF e Hb para o grupo II	56

LISTA DE TABELAS

1.	Comparação entre os grupos através dos níveis	54
2.	Comparação dos fatores de prognósticos em relação ao nível de MDA	57
3.	Comparação dos fatores de prognósticos em relação aos níveis de NO.....	58
4.	Comparação dos fatores de prognósticos em relação ao nível de LDH	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
NO	Óxido Nítrico
CO ₂	Dióxido de Carbono
Fe	Ferro
Fe ⁺⁺	Ferro, forma ferrosa
Fe ⁺⁺⁺	Ferro, na forma férrica
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
Hb S	Hemoglobina S
O ₂ ⁻	Íon superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
MDA	Malonildialdeido
HU	Hidroxiuréia
Hb F	Hemoglobina fetal
Hb SS	Homozigose da hemoglobina S
G6PD	Glicose 6 – phosphato desidrogenase
Hb AS	Heterozigoto da hemoglobina S
GC	Guanilato ciclase
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
Hb A	Hemoglobina normal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Meta Hb S	Meta Hemoglobina S
SER	Sistema retículo endotelial
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
GSH-Px	Glutationa peroxidase
CAT	Catalase
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
VCAM-1	Molécula de adesão vascular
LDH	lactato desidrogenase láctica
SOD	Superóxido dismutase
GTP	Guanosina trifosfato
VCM	Volume corpuscular médio

ERN	Espécies reativas de nitrogênio
TBARS	Substâncias tiobarbitúricas ácido reativas
LHDGH	Laboratório de hemoglobina e doenças genéticas hematológicas
HEMOCE	Hemocentro do Estado do Ceará
TAS	Status total antioxidante
STA	Síndrome torácica aguda
ET-1	Endotelina 1
AVC	Acidente vascular encefálico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Histórico	17
2.2	Hemoglobina	18
2.3	Hemoglobinas normais	19
2.4	Anemia falciforme	20
2.5	Fisiopatologia da vaso-oclusão	22
2.6	Estresse oxidativo da Hb S	25
2.7	Fatores extrínsecos ao eritrócito que modulam a gravidade clínica da anemia falciforme	29
2.8	LDH na anemia falciforme	33
2.9	Estratégias terapêuticas	33
2.10	Hidroxiúria e o óxido nítrico	36
2.11	Alterações na peroxidação lipídica em pacientes com anemia falciforme	36
3	OBJETIVOS	38
3.1	Objetivos gerais	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	METODOLOGIA	39
4.1	Considerações éticas	39
4.2	Casuística	39
4.3	Desenho do estudo	39
4.4	Local de estudo	40
4.5	Seleção de amostra	40
4.6	Coleta de dados	41
4.6.1	Coleta de material	41
4.6.2	Obtenção do plasma	41
4.6.3	Obtenção dos valores da hemoglobina (Hb) e da hemoglobina fetal (HbF)	41
4.6.4	Avaliação do estresse oxidativo	41
4.6.5	Avaliação do grau de hemólise	42
4.7	Protocolo	42
4.8	Métodos	42
4.8.1	Determinação da peroxidação lipídica mensurada pela concentração de substâncias tiobarbitúricas ácido reativas	42
4.8.2	Determinação do nitrito	43
4.8.3	Determinação do Lactato desidrogenase láctica (LDH)	43
4.8	Análise estatística	43
4.9	Fluxograma	44
5	RESULTADOS	45
5.1	Características da amostragem	45
5.2	Dosagens de LDH, NO e MDA nos três grupos	50
5.3	Comparação das dosagens de MDA, NO e LDH nos três grupos	53
5.4	Estudo da relação das concentrações de MDA, NO, LDH, Hb fetal e Hb entre os grupos	54
5.5	Relações da concentração de NO, MDA e LDH com outros fatores de prognóstico	56
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65

APÊNDICE A	73
APÊNDICE B	74
ANEXO A	75
ANEXO B	82
ANEXO C	85

1 Introdução

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética determinada pela homozigose da hemoglobina S (Hb SS) caracterizada por anemia hemolítica crônica, susceptibilidade aumentada às infecções e repetidos episódios vaso-oclusivos, associados às lesões orgânicas crônicas e crises dolorosas agudas. Entre as doenças falciformes, esta é a que apresenta maior gravidade clínica e hematológica além de ser a mais prevalente (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

As oxidações biológicas têm um papel relevante na patologia humana. A compreensão dos mecanismos que levam ao estresse oxidativo no eritrócito tem esclarecido muitos dos processos que levam à lesão e morte celular, especialmente os relacionados às doenças hemolíticas. A anemia falciforme, as talassemias e a deficiência de G6-PD estão entre as anomalias genéticas mais frequentes que apresentam aumento do estresse oxidativo e, como consequência, encurtamento da sobrevida destes eritrócitos (KRUKOSKI, 2006).

A doença falciforme é causada por uma mutação pontual no gene responsável pela produção da globina β (beta), originando uma hemoglobina anômala, denominada hemoglobina S, que substitui a hemoglobina A. Nesta condição genética, o heterozigoto, chamado portador do traço falciforme, apresenta eritrócitos com hemoglobinas A e S (AS); enquanto o homozigoto forma apenas hemoglobina S (SS), expressando sintomatologia clínica grave (LEE *et al.*, 1999).

Nas células falciformes, um dos fatores que predispõe ao processo hemolítico é a degradação oxidativa da hemoglobina S pela sua desoxigenação com formação de hemicromos e precipitação na forma de corpos de Heinz (DAS; ERSMAN, 1990; WINTERBOURN, 1990). Nestes eritrócitos, ocorre um desequilíbrio entre a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio e o baixo conteúdo de antioxidantes, como a glutathione reduzida, principal protetora contra os danos intracelulares de radicais livres. O estresse oxidativo contribui para o processo de falcização e encurtamento da sobrevida do eritrócito (KLINGS; FARBER, 2001).

A Hidroxiuréia é utilizada no tratamento da anemia falciforme, aumentando a fração de hemoglobina fetal. Ainda não se sabe ao certo qual o mecanismo envolvido nesse processo, mas estudos realizados têm demonstrado que efeitos da hidroxiuréia incluem o aumento dos níveis de óxido nítrico, um importante vasodilatador, no sangue de pacientes

com anemia falciforme e do GMPc (guanosina monofosfato cíclica) (CANALLI 2008a; COKIC *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm sugerido que mutações falcêmicas levam à formação de Hb S e liberação de ferro. Isso ocorre porque os eritrócitos falcêmicos promovem uma auto-oxidação aumentada do ferro (Fe^{2+}) da hemoglobina, e a excessiva geração de radicais livres pode ser explicada, em parte, pelo Fe^{3+} descompartimentalizado pela hemina liberada da HbS desnaturada, todos esses fatores resultam em peroxidação lipídica, e eventual dano celular (CANALLI, 2008a; CHAVES, 2007).

Dentro deste contexto o presente estudo propõe-se a investigar a ocorrência de peroxidação lipídica através dos níveis séricos de MDA, determinar os níveis de NO e do LDH em pacientes com AF e suas correlações com o uso da HU.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

James Herrick, médico de Chicago, foi o primeiro a observar, em 1910, células em “foice”, no sangue de um estudante de medicina negro portador de um grave quadro anêmico acompanhado de icterícia, complicações pulmonar e de úlceras de membros inferiores. Em 1927, Hahn e Gillespie demonstraram a dependência do fenômeno de falcização com a tensão de oxigênio, atribuindo o defeito à hemoglobina, e não somente ao glóbulo vermelho. Em 1936, Ham e Castle propuseram uma explicação fisiopatológica do processo de falcização. Essa teoria sustentava a hipótese de que ocorria um “ciclo vicioso de estase eritrocitária” nas células falcizadas do sangue periférico, causando um aumento de viscosidade sanguínea com demora do fluxo sanguíneo através dos capilares e diminuição da tensão do oxigênio, provocando mais falcização. Em 1923 foi demonstrado que o afoiçamento das hemácias era herdado como um traço autossômico dominante (NAOUM, 1997).

Em 1949, Pauling e colaboradores descobriram que toda a hemoglobina dos pacientes com esta anemia apresentava uma lenta taxa de migração na eletroforese, enquanto que os pais destes pacientes apresentavam tanto a hemoglobina normal quanto a anormal. Pouco depois, outras hemoglobinas anormais foram descobertas ao serem submetidas à eletroforese. A natureza bioquímica do defeito foi elucidada por Ingram em 1957, no seu relatório sobre a substituição do ácido glutâmico por valina no sexto aminoácido da globina beta. Esta descoberta estabeleceu que a substituição de um único aminoácido em uma cadeia polipeptídica pode alterar a função do produto gênico de maneira suficiente a produzir variados efeitos clínicos (BEUTLER, 1988).

A AF originou-se na África, foi trazida às Américas pela imigração forçada dos escravos, e é atualmente encontrada em toda a Europa e em grandes regiões da Ásia. No Brasil, a distribuição da AF é heterogênea, sendo mais frequente onde a proporção de antepassados negros na população é maior, como ocorre no nordeste (CANALLI, 2004).

Uma das características dessa doença é a sua variabilidade clínica, dependente principalmente de fatores hereditários e adquiridos. Três características geneticamente determinadas têm importância na gravidade da evolução clínica: os níveis de hemoglobina fetal (HbF), a concomitância de alfa-talassemia e os haplótipos associados ao gene da HbS.

Os níveis de HbF são inversamente proporcionais à gravidade da doença. Há cinco diferentes haplótipos associados ao gene da HbS (Senegal, Benin, Bantu, Camarões e Árabe- Indiano). A AF associada aos haplótipos Senegal e Árabe-Indiano é de melhor prognóstico do que aquelas associadas aos demais haplótipos. No Brasil predomina o haplótipo Bantu seguido pelo Benin, com prevalência de formas mais graves da doença (STEINBERG *et al.*, 1997). Em 2009, Da Silva *et al.*, analisaram os haplótipos ligados ao gene da β S-globina em pacientes de Fortaleza, capital do Ceará, com anemia falciforme (AF), e encontraram 66,2% do tipo Bantu, 22% do Benin e 11,8% do atípico.

2.2 Hemoglobina

A hemoglobina é um tetrâmero, com peso molecular de 64.500 daltons é formada por quatro subunidades. Cada subunidade é composta por duas porções: a globina, fração protéica que varia geneticamente, e o heme, grupo prostético que contém o ferro (Fe^{2+}), o qual se combina com o oxigênio e confere à molécula sua capacidade de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do gás carbônico no sentido inverso. A fração protéica da molécula de hemoglobina é formada num total de 574 aminoácidos. Duas das subunidades são constituídas por 141 aminoácidos e são chamadas tipo alfa. As outras duas possuem 146 aminoácidos cada e são denominadas tipo beta (HONIG; ADAMS III, 1986).

Os tipos de cadeias globínicas variam de acordo com o estágio de desenvolvimento intra-uterino. Todas elas são chamadas por letras gregas: alfa(α), beta(β), gama(γ), delta(δ), epsilon(ϵ), e zeta(ζ). As cadeias ζ e ϵ são sintetizadas no início da vida intra-uterina; as cadeias α e γ , na vida fetal e as cadeias β e δ na vida pós fetal. No início da vida embrionária, a cadeia ϵ e ζ se combinam para formar a globina Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$). A cadeia α e a cadeia ϵ se combinam para formar a Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e cadeia γ com a cadeia ζ para formar a Portland ($\zeta_2\gamma_2$). Na vida fetal a molécula predominante é a HbF ($\alpha_2\gamma_2$), enquanto que após o nascimento a HbF é substituída pela HbA ($\alpha_2\beta_2$) e HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). Ao final da gestação a HbA aumenta, chegando a 20-30% ao nascimento, enquanto que a Hb F ainda representa 70-80% da hemoglobina do indivíduo. No quinto mês de vida a HbA atinge níveis semelhantes aos do adulto e a HbF passa a representar uma porcentagem mínima (LORENZI, 2003).

A gênese das cadeias globínicas é regulada por agrupamentos de genes nos cromossomos 11 e 16, na ordem cronológica em que são expressos (sentido 5' \rightarrow 3'), nos

períodos embrionário, fetal e adulto quando diferentes grupos de genes são ativados ou suprimidos e diferentes cadeias globínicas possibilitam a formação de hemoglobinas distintas, e para que o tetrâmero funcional seja formado é necessário um perfeito equilíbrio na formação destas cadeias (GALIZA; PITOMBEIRA, 2003).

2.3 Hemoglobinas Anormais

As hemoglobinopatias, também conhecidas como distúrbios hereditários da hemoglobina humana, são doenças geneticamente determinadas e apresentam morbidade significativa. Milhões de pessoas trazem em seu patrimônio genético, hemoglobinas anormais em várias combinações, com conseqüências que variam das quase imperceptíveis as letais (NASCIMENTO; CARDEL, 1996). Dentre as hemoglobinopatias, as mais prevalentes na nossa população são as HbS e HbC, que são capazes de produzir doença quando em homozigose. Entretanto quando em heterozigose, o portador é clinicamente assintomático, não apresentando a doença e nem a anemia (MELO-REIS *et al.*, 2006).

A maioria das hemoglobinas variantes ocorre por alterações pontuais na molécula, onde um aminoácido é substituído por outro. A HbS é resultante da mutação do gene beta, na posição 6, onde o ácido glutâmico é substituído pela valina na cadeia beta (MELO-REIS *et al.*, 2006).

As hemoglobinas anormais aparecem como resultado de mutações dos genes alfa, beta, gama ou delta. Como conseqüência, as cadeias de globina formam-se de modo anormal, perturbando a função desempenhada pela hemoglobina nos eritrócitos (NASCIMENTO; CARDEL, 1996).

Os defeitos hereditários da hemoglobina podem ser de três tipos: quando ocorre um defeito qualitativo dessas cadeias, ou seja, as mutações genéticas ocasionam alteração da estrutura das cadeias polipeptídicas. Quantitativo, ocorre quando as mutações genéticas são responsáveis por diminuição ou ausência da síntese dessas cadeias. E o terceiro tipo se dá, quando ocorre a persistência da HbF durante a vida adulta (LORENZI, 2003). Estes defeitos hereditários trazem manifestações clínicas que variam de episódios raros à incompatibilidade com a vida (NASCIMENTO; CARDEL, 1996).

2.4 Anemia Falciforme

A AF é uma doença hereditária da síntese de hemoglobina que está associada com significativa morbidade e mortalidade devido a seqüelas de episódios vaso-oclusivos, tais como crises de dor e danos a muitos órgãos (WOOD; GRANDER, 2007).

A síntese das cadeias de globina é um processo complexo e, embora raros, podem ocorrer erros, que levam ao aparecimento de variações na estrutura da hemoglobina. Os efeitos fisiopatológicos são variáveis na dependência do defeito e do local. A doença falciforme é um termo genérico usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pela presença de um gene mutante, que determina a formação da HbS (CHAVES, 2007).

A AF é uma doença hemolítica crônica, causada por uma mutação pontual (GAG→GTG) no gene da globina β (beta), originando uma hemoglobina anormal, denominada HbS, ao invés da hemoglobina normal denominada HbA. Essa mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina no 6º aminoácido da cadeia β , com conseqüente modificação físico-química da molécula de hemoglobina (CHAVES, 2007). Quando os pais são portadores de um único gene afetado (heterozigotos), produzindo HbA e HbS (AS), em geral assintomáticos, pode transmitir cada um deles um gene alterado para o filho, que assim recebe o gene anormal em dose dupla e é homozigoto para a formação de HbSS (Figura 1).

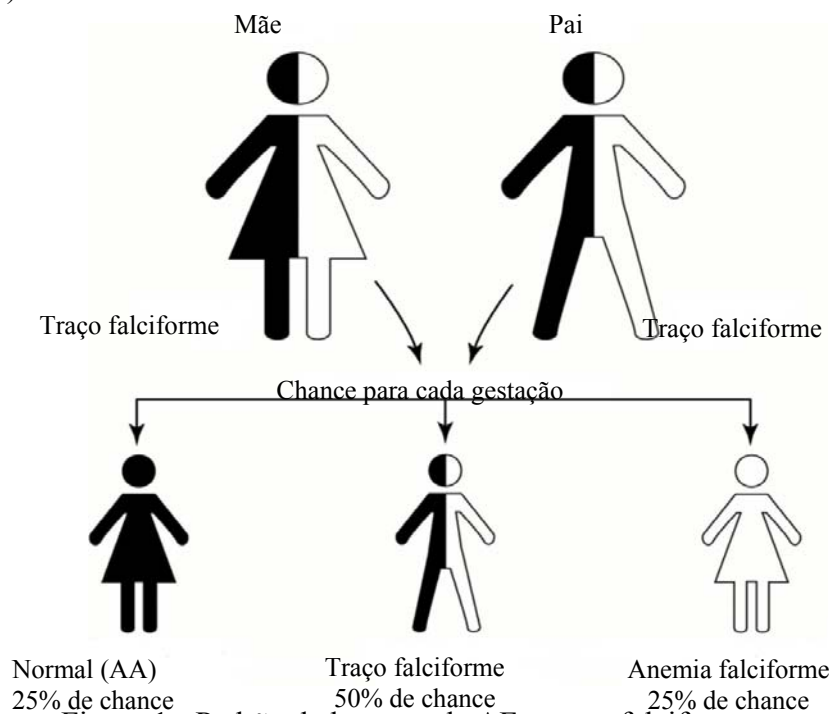


Figura 1 - Padrão de herança da AF e traço falciforme.

Fonte: Adaptado por GONÇALVES *et al.*, 2007

As conseqüências patológicas dos portadores de AF fundamentam-se na polimerização da molécula de HbS induzida por desoxigenação, com conseqüente afoçamento dos eritrócitos e aumento da viscosidade sanguínea (Figura 2). A HbS no estado de baixa tensão de oxigênio sofre modificação em sua molécula devido à interação de natureza hidrofóbica da valina com a fenilalanina da posição 85 e da leucina da posição 88, desencadeando assim a formação de polímeros num processo de nucleação e criando estrutura multipolimérica. A cinética de falcização depende do grau de desoxigenação, concentração intracelular de HbS e presença ou ausência de HbF. Essas alterações físico-químicas, além de deformar e enrijecer a membrana celular ocasiona o fenômeno patológico de vaso-oclusão por predispor os eritrócitos falcêmicos a aderirem ao endotélio vascular. As células irreversivelmente falcizadas formadas em decorrência do afoçamento, são removidas e destruídas tanto no meio extravascular como intravascular, encurtando assim a sua sobrevivência média eritrocitária para cerca de 17 dias (SILVA; SHIMAUTI, 2006).



Figura 2 - Hemácias em “foice”.

Fonte: STEINBERG *et al.*, 2001

A distribuição das doenças falciformes é ampla, abrangendo todos os continentes, notadamente África, América do Norte, América Latina e parte da Ásia. Segundo dados do Ministério da Saúde, as prevalências referentes à doença em diferentes regiões brasileiras permitem estimar a existência de mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS; mais de 8 mil afetados com a forma homozigótica (HbSS) que se manifesta por anemia grave. Estima-se o nascimento de setecentos a mil casos novos anuais de doenças falciformes no país (BANDEIRA *et al.*, 2007). Inclui-se no grupo de doenças das células falciformes as associações entre as HbS e HbC e HbS/ tal (NAOUM, 2000a).

O Brasil caracteriza-se por significativa mistura racial onde o processo de colonização teve grande influência na dispersão dos genes anormais, principalmente talassemias e falcemias. Assim, a distribuição das hemoglobinas anormais, provenientes de formas variantes e talassemias, estão relacionadas com as etnias que compõem nossa população. Dentre as hemoglobinas variantes, as mais freqüentes na população brasileira são a HbS e a HbC, ambas de origem africana, mostrando a intensa participação do negro na composição populacional brasileira. No Brasil, distribui-se heterogeneamente, sendo mais freqüente onde a proporção de antepassados negros na população é maior (Nordeste), no Ceará apresenta uma prevalência de 2,8% de heterozigotos (portadores de gene HbAS) (NAOUM, 1997).

O gene da Hb S é um gene semi-dominante que pode se manifestar em heterozigose (HbAS), originando o portador ou traço falcêmico, ou em homozigose (HbSS) caracterizando a anemia. A AF ocorre com maior freqüência na região central da África (5 a 20% da população), também ocorre nos países do mediterrâneo e na Índia, porém em porcentagens menores. A presença desta anemia nas Américas se deve a imigração de descendentes daquelas regiões. Quanto à etnia, a AF é característica dos negros, no entanto devido a intensa miscigenação no nosso país isso não ocorre (LEE *et al.*, 1999).

A AF apresenta-se no Brasil, sobretudo nas regiões que receberam maciços contingentes de escravos africanos. É a doença hereditária de maior prevalência no país, afetando cerca de 0,1% a 0,3% da população negra, sendo observada, também, em decorrência da alta taxa de miscigenação, em parcela cada vez mais significativa da população caucasóide brasileira (NAOUM, 1997).

2.5 Fisiopatologia da vaso-oclusão

As manifestações clínicas da anemia falciforme derivam diretamente da anormalidade molecular representada pela presença da HbS. As moléculas de HbS, quando desoxigenadas se organizam em longos polímeros de filamentos longos, que por sua vez se associam em feixes com um duplo filamento central rodeado de seis filamentos duplos de polímeros. Esses feixes de cristais dentro das hemácias podem ser vistos à microscopia

eletrônica e determinam deformações das células. A deformação mais conhecida é provocada por esse feixe de polímeros se organizando mais ou menos paralelamente, dando à hemácia uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou drepanócitos (ZAGO; PINTO, 2007).

A velocidade e a extensão da formação de polímeros no interior das hemácias dependem primariamente de três variáveis independentes: grau de desoxigenação, concentração intracelular de HbS e presença ou ausência de HbF (GALIZA NETO *et al.*, 2005).

Na AF, uma alteração genética na globina faz com que os eritrócitos assumam a forma de foice, depois que o oxigênio é liberado. As células em foice demonstram uma forte tendência à formação de polímeros, tornando-se rígidas ou endurecidas, levando a obstrução dos vasos sanguíneos, ocasionando fenômenos de vaso-oclusão e crises dolorosas (QUINN *et al.*, 2007).

Avanços no esclarecimento da fisiopatologia da doença mostram que a AF tem um curso clínico heterogêneo com uma variabilidade dos sintomas entre indivíduos e influência do meio ambiente. A doença tem as características clínicas complexas que podem ser modificadas pelos fatores como: idade, sexo, genéticos, hematológicos e ambientais (GALIZA NETO *et al.*, 2005).

A formação de polímeros de HbS dentro das hemácias tem como consequência múltiplas alterações, dentre as quais o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e a formação de polímeros da HbS que levam a exposição de proteínas transmembrana, em especial a fosfatidilserina (PS), de dentro para fora da célula, expondo cargas negativas glicolípídicas que contribuem para um estado pró-inflamatório e pró-trombótico (Figura 3). Os fenômenos que propiciam a falcização são: aumento da adesão de hemácias ao endotélio, desencadeando fenômenos inflamatórios; enrijecimento da membrana e toda a hemácia, encurtando a sobrevida do eritrócito e depleção de NO que contribuem para vasoconstrição e ativação da inflamação (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

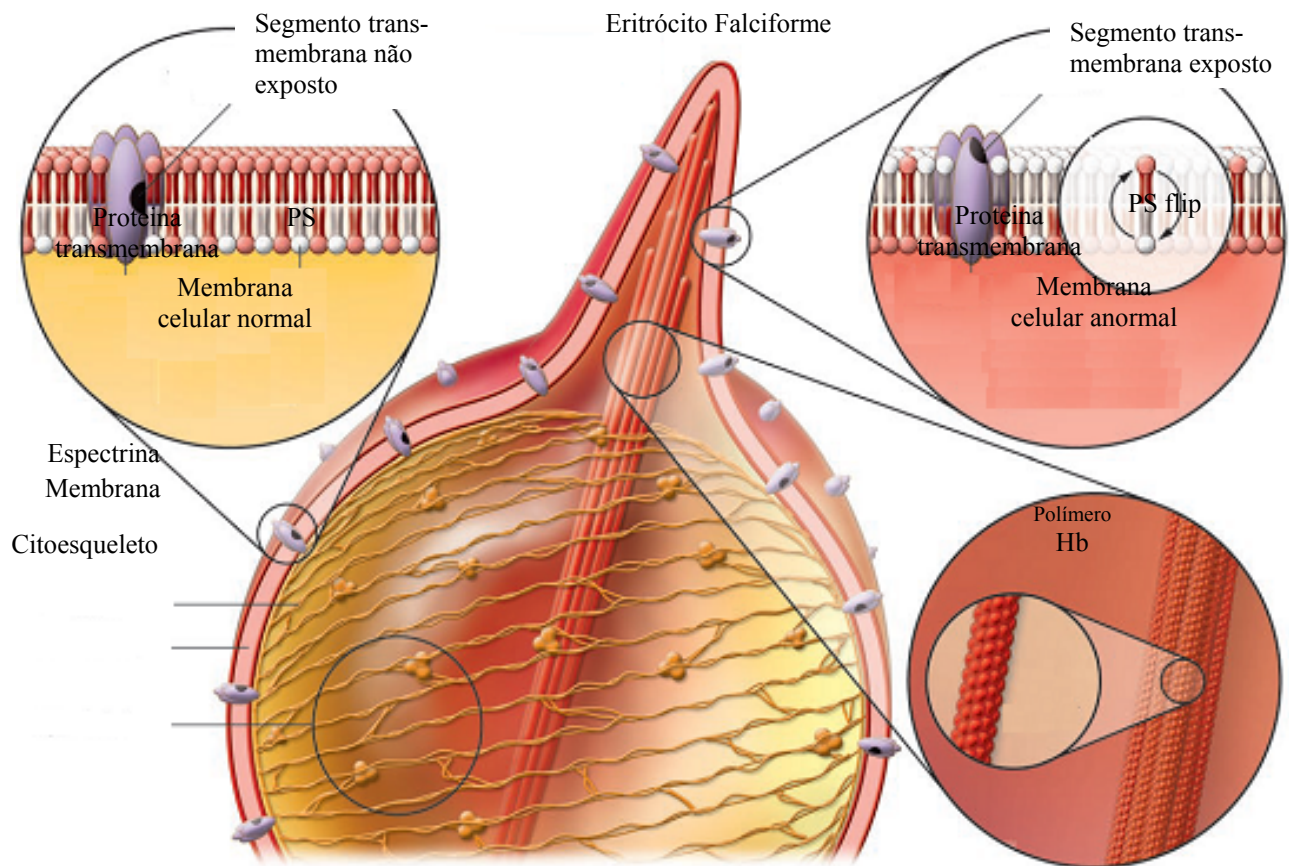


Figura 3 - Alteração da membrana do eritrócito por polímeros de hemoglobina S. A formação de polímeros de HbS ocasiona a exposição da proteína transmembrana, fosfatidilserina (PS), no eritrócito falciforme, expondo cargas negativas glicolipídicas, contribuindo para um estado pró-inflamatório.

Fonte: FRENETTE; ATWEH, 2007.

Outra importante alteração da hemácia na AF é a perda da sua maleabilidade, fato que lhe impossibilita transportar o oxigênio através de vasos com menor diâmetro dos capilares da microcirculação. A perda da elasticidade da célula deve-se ao incremento da concentração de HbS intracelular, resultando no aumento da viscosidade no citosol, à polimerização da HbS e à rigidez da membrana. Estes fatores, associados a uma maior adesão do eritrócito falcizado ao endotélio, mediada pelo complexo de integrina $\alpha_4\beta_1$, trombospondina, fator de von Willebrand e fibronectina, favorecem a formação de trombos na micro e na macrocirculação (GALIZA NETO *et al.*, 2005).

A ocorrência das crises de vaso-oclusões, principalmente em pequenos vasos, representa o evento fisiopatológico determinante na origem da grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme, tais como crises álgicas, crises hemolíticas, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda, seqüestro

esplênico, priaprismo, necrose asséptica de fêmur, retinopatia, insuficiência renal crônica, autoesplenectomia e acidente vascular cerebral (QUINN *et al.*, 2007).

A AF é um fator pré-eminente no desenvolvimento de doença cerebrovascular como resultado da aderência anormal ao endotélio vascular e hemólise. Esses fatores resultam em um estado pró inflamatório, manifestado em parte, por adesão leucocitária e agregação plaquetária. A secreção aumentada de endotelina 1 (ET-1) e a redução de NO através do consumo por dímeros de hemoglobina livre resulta em tônus vasomotor aumentado. Todo esse mecanismo leva a vasculopatia e oclusão vascular que é a manifestação clínica mais importante na anemia falciforme (Figura 4) (GONÇALVES *et al.*, 2007).

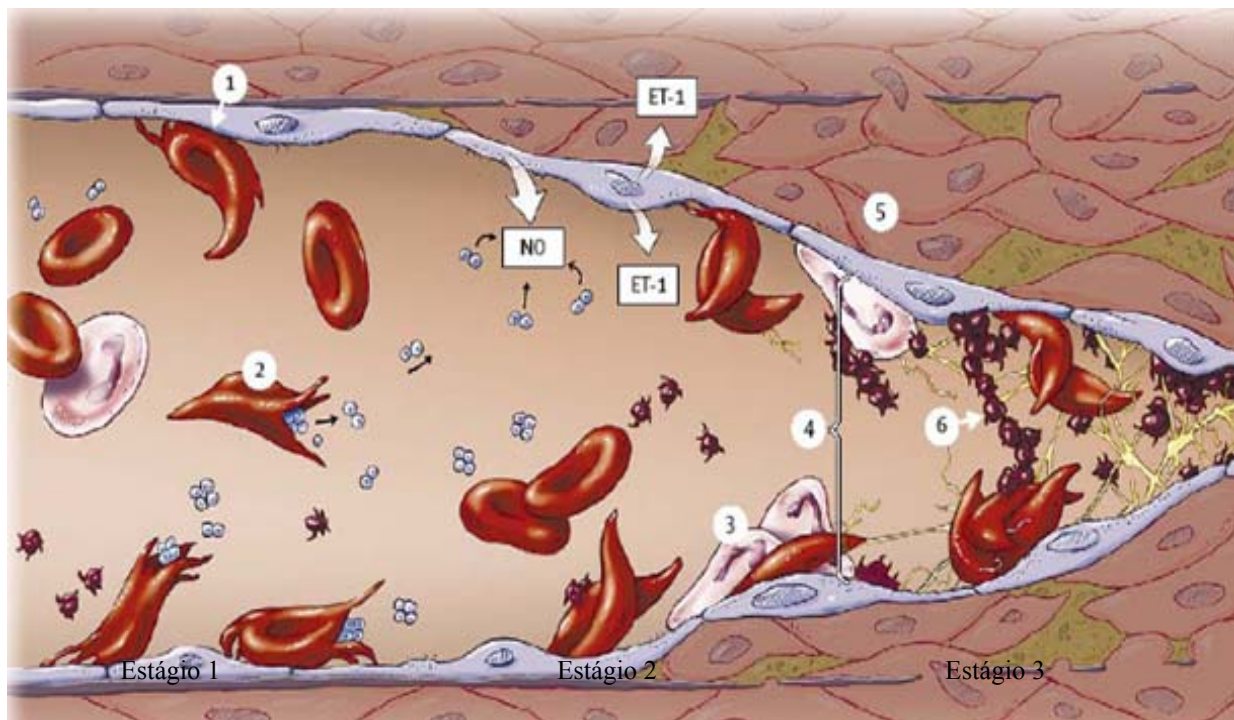


Figura 4 - Vasculopatia e AVC na anemia falciforme. (1) He adere ao vaso. (2) Hemólise. (3) Adesão leucocitária. (4) Início da oclusão. (5) Adesão leucocitária e agregação plaquetária. (6) Agregação plaquetária. (7) Vasculopatia. (8) Oclusão vascular.

Fonte: Adaptado por GONÇALVES *et al.*, 2007

2.6 Estresse Oxidativo da Hb S

As oxidações biológicas têm um papel relevante nas doenças humanas. A compreensão dos mecanismos que levam ao estresse oxidativo no eritrócito tem esclarecido muito dos processos que levam à lesão e morte celular, especialmente os relacionados às doenças hemolíticas. A AF, as talassemias e a deficiência de G-6PD estão entre as alterações genéticas mais freqüentes que apresentam aumento do estresse oxidativo e, como consequência, diminuição da sobrevivência destes eritrócitos (KRUKOSKI, 2006).

As células falciformes são mais frágeis que os eritrócitos normais na corrente sanguínea e por essa razão, apresentam uma vida média menor que o normal. Um dos fatores que predis põem o processo hemolítico das células falciformes induzindo-o às múltiplas consequências patológicas da doença falciforme deve-se à degradação oxidativa da Hb S (TUKAMOTO, 2008).

A HbS é muito menos solúvel que a hemoglobina normal (HbA) quando desoxigenada e polimeriza-se em fibras rígidas que provocam deformação do eritrócito, assim como a rigidez, e oclusão da microcirculação. Além disso, a HbS é menos estável que a HbA quando oxigenada e, portanto, auto-oxida-se em uma taxa muito rápida, por isso produz altas concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro do eritrócito falciforme (WOOD; HSU; GLADWIN, 2008).

O organismo humano sofre ação constante de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radiculares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN temos o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Enquanto alguns deles podem ser altamente prejudiciais ao organismo lesionando membranas dos eritrócitos, proteínas e DNA, outros reagem apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (BARREIROS; DAVID, 2006).

A produção de ERO e ERN, entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar um agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é

exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano conseqüente (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os produtos e subprodutos provenientes desses processos fisiopatológicos atacam a membrana do eritrócito com HbS lesando-a biologicamente, fato que propicia além da redução da vida da célula, outros eventos fisiopatológicos que caracterizam a doença falciforme. No caso da AF, o genótipo SS é suscetível à maior intensidade de degradação oxidativa (NAOUM, 2000a).

Quando os antioxidantes ocorrem de forma reduzida às células ficam mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Na AF essa quantidade de agentes antioxidantes permanece incerta. Baixos níveis das vitaminas A, C, E, selênio e glutathione peroxidase tem sido relatada em pacientes com esta doença. Além disso, observaram-se baixos níveis de glutathione peroxidase quando comparados com eritrócitos normais. Pacientes com anemia falciforme, em comparação com controles normais apresentam um estado antioxidante prejudicado (WOOD; GRANGER, 2007).

A desoxigenação da Hb S favorece a sua metahemoglobinização, ou seja, a formação de metahemoglobina S (MetaHbS), com a conseqüente elevação desse pigmento dentro do eritrócito. Quando a concentração de MetaHbS supera a ação da enzima MetaHb redutase, é desencadeada a degradação da MetaHbS, com formação de hemicromos reversíveis e irreversíveis, que por sua vez, irão provocar a precipitação da globina e depleção do grupo heme. A precipitação da globina S oxidada sob a forma de corpos de Heinz irá provocar alteração na proteína banda-3, com conseqüente lesão e rigidez da membrana do eritrócito (Figura 5), fazendo com que este seja reconhecido pelo sistema imunológico, levando à fagocitose pelos macrófagos do sistema retículo endotelial (SER), causando hemólise e anemia (STEINBERG, 1998; WINTERBOURN, 1990).

Outro mecanismo que justifica a lesão e rigidez da membrana do eritrócito ocorre quando a oxi-Hb S origina deoxi HbS, ocasionando a liberação do oxigênio que o torna suscetível ao ataque de elétrons que se encontram no interior da célula. Para evitar o aumento da concentração de ion superóxido (O_2^-), a enzima anti-oxidante eritrocitária conhecida por superóxido dismutase (SOD) atua no sentido de converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio, que também é um radical livre, sofre a ação anti-oxidante de outras duas enzimas eritrocitárias: a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a catalase (CAT), transformando-o em moléculas de água (Figura 5). Essas são as reações que ocorrem em

um amplo sistema de detoxificação celular com o intuito de estabelecer um equilíbrio; porém, existem algumas doenças, como a AF, em que esse sistema de detoxificação celular é deficitário, contribuindo ainda mais para a oxidação da HbS, elevando a formação de produtos de degradação desta hemoglobina, fato que causa a redução da vida média do eritrócito falcêmico, aumento do grau de hemólise e intensificação da anemia (NAOUM, 2000a).

O estresse oxidativo elevado destes eritrócitos falcêmicos pode ser atribuído a um aumento da instabilidade da hemoglobina S e ocorre por desequilíbrio entre uma maior geração de espécies reativas de oxigênio e o baixo conteúdo de antioxidantes, como a glutathione reduzida, principal protetora contra os danos intracelulares de radicais livres (AMER; FILBACH, 2005; KLINGS; FARBER, 2001). Os eritrócitos falcêmicos podem gerar espontaneamente duas vezes mais $O_2^{\bullet-}$, peróxidos e radicais OH^{\bullet} que eritrócitos normais, promovendo assim, uma auto-oxidação aumentada do ferro (Fe^{+2}) da hemoglobina. Além disso, o estresse oxidativo pode contribuir para o processo de falcização, formação de “células densas” e o próprio encurtamento da sobrevivência do eritrócito através da hemólise (HEBBEL *et al.*, 1982). Os radicais livres formados induzem à peroxidação lipídica e à subsequente produção de quantidades aumentadas de malonaldeído (MDA), ocorrendo aumento da rigidez, diminuição da deformabilidade e alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária (CHAN; CHOW; CHIU, 1999)

Dentre as classes de moléculas que podem ser lesadas pelas espécies reativas de oxigênio, os lipídeos são dos mais susceptíveis à oxidação. A destruição dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como MDA e outros aldeídos são especialmente danosos, reduzindo a viabilidade das células. A peroxidação lipídica caracteriza-se por uma reação em cadeia. A oxidação inicial de poucas moléculas de lipídeos pode resultar em um significativo dano tissular (TUKAMOTO, 2008).

As principais conseqüências da lipoperoxidação da membrana são: alteração da bomba de Na^+ , K^+ , Ca^{++} e ATPase, permeabilidade, transporte de substâncias orgânicas e inorgânicas, danos ao DNA e morte celular (NAOUM; NAOUM, 2004).

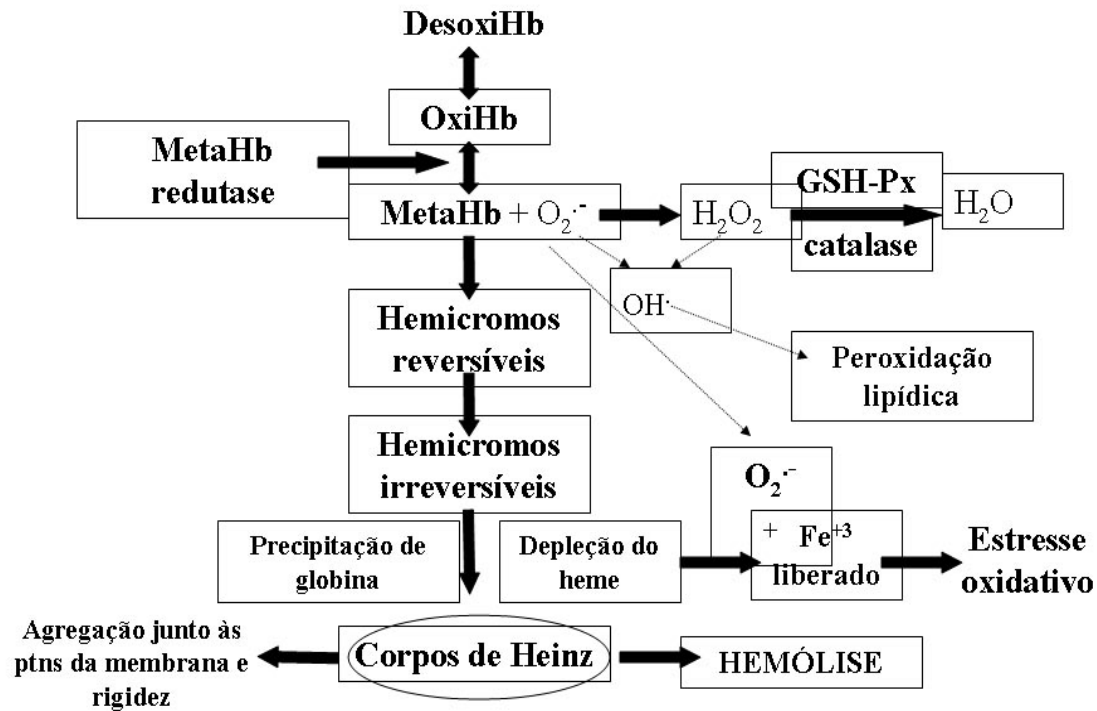


Figura 5 - Oxidação no eritrócito. O estresse oxidativo da HbS ocorre quando a desoxiHbS se transforma em oxiHbS gerando EROs e MetaHb, saturando a ação da enzima MetaHb redutase, formando os corpos de Heinz e ocasionando hemólise. Além disso, as EROs saturam as enzimas antioxidantes, que estão reduzidas em pacientes com anemia falciforme, gerando o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica.

Fonte: CHAVES, 2007

2.7 Fatores extrínsecos ao eritrócito que modulam a gravidade clínica da anemia falciforme

O paciente com AF apresenta vasculopatia onde o dano endotelial foi induzido por variados fatores, tais como células falcizadas, inflamação, lesão decorrente da reperfusão, presença de radicais livres e diminuição da bioviabilidade de óxido nítrico (NO) (DHANANJAY *et al.*, 2006).

Recentemente tem sido de muito interesse o entendimento do papel fisiopatológico e farmacológico do óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador fisiológico. Além disso, devido à disfunção endotelial nos pacientes falciformes, os níveis de endotelina (vasoconstritor) são maiores que os níveis de NO (vasodilatador) contribuindo para a vasoconstrição. Os dados da literatura sugerem que o NO pode ter um papel importante na

fisiopatologia da anemia falciforme, particularmente durante o estresse oxidativo (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; WOOD; GRANGER, 2007).

Os pacientes com AF podem apresentar diminuição da produção de NO pelo endotélio. Existem três grandes mecanismos de redução da biodisponibilidade do NO na AF: pela diminuição da L-arginina, pelo consumo de NO por meio das espécies reativas de NO (ROS) e, talvez o mais importante, pelo consumo de NO através da hemoglobina livre no plasma. O substrato L-arginina para a produção de NO através da enzima NOS pode também ser degradado para ornitina na presença da enzima arginase. A arginase é encontrada em alta concentração em eritrócitos jovens e sob hemólise intravascular. Assim, a L-arginina plasmática é transformada em ornitina, diminuindo assim, a disponibilidade de L-arginina para a produção de NO (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). O NO pode também ser consumido pelo excesso de ROS no plasma e no endotélio dos pacientes com AF. Finalmente, outro fator que também contribui para a redução da biodisponibilidade de NO nos pacientes com AF, é o consumo de NO através da hemoglobina livre no plasma, liberada durante a hemólise. A hemoglobina livre no plasma reage com o NO produzindo metahemoglobina e nitrato. A diminuição do NO facilita a vasoconstrição, aumenta a ativação plaquetária, e a adesão endotelial e leucocitária levando ao processo vaso-oclusivo (CANALLI, 2008a).

O óxido nítrico biodisponível é mantido a partir de um balanço entre a produção endotelial e o consumo, esse balanço é interrompido na anemia falciforme, no estresse e na hipóxia tecidual. Em indivíduos do sexo masculino, a biodisponibilidade do óxido nítrico é reduzida por conta da doença. Essa indisponibilidade deve-se ao rápido consumo a partir da hemoglobina livre, como também radicais livres, e à baixa concentração do substrato L-arginina. Além disso, a quantidade de hemoglobina livre é maior em homens com anemia falciforme que em mulheres, o que explica em parte essa diferença entre os sexos (STUART; NAGEL, 2004). Recentemente, Wood, Hsu e Gladwin (2008), explicam essa diferença pelo envolvimento de efeitos estrogênicos na síntese, expressão e atividade do óxido nítrico.

Vários estudos mostram que os neutrófilos têm papel ativo no processo de vaso-oclusão, sugerindo que a diferença na expressão gênica dos neutrófilos pode ser responsável por algumas das variações fenotípicas observadas na AF. Os experimentos atuais mostram que o endotélio na AF encontra-se alterado. Células endoteliais circulantes de pacientes com AF apresentam aumento da expressão de ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion factor*) e fator tissular (DHANANJAY *et al.*, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

É sabido que a interação entre células endoteliais e eritrócitos falciformes é mediada por citocinas inflamatórias, que se encontram elevadas em pacientes fora de crise. Portanto, de modo geral, o estado de ativação endotelial observado nestes pacientes parece ser fator contribuinte da oclusão vascular (ROTHER *et al.*, 2005; FIGUEIREDO, 2007).

Em casos de hemólise crônica, como na anemia falciforme, ocorre saturação do sistema de remoção de hemoglobina, provocando aumento dos níveis de hemoglobina livre no plasma, estas, por sua vez convertem o NO em nitrato inativo. Paralelamente, a lise de eritrócitos libera arginase que destrói L-arginina, substrato para a produção de NO, contribuindo para a diminuição da concentração de NO. O NO é um importante cofator da enzima guanilato-ciclase, responsável pela conversão de GTP (trifosfato de guanosina) em cGMP (monofosfato de guanina cíclica) que leva ao relaxamento dos músculos lisos vasculares e vasodilatação. A baixa bioviabilidade de NO altera a homeostasia vascular, contribuindo para a ativação plaquetária e a adesão de moléculas ao endotélio, levando ao desvio do balanço constrição-relaxamento em direção a uma maior vaso-constrição, que aumenta a possibilidade de vaso-occlusão (Figura 6) (ROTHER *et al.*, 2005; FIGUEIREDO, 2007).

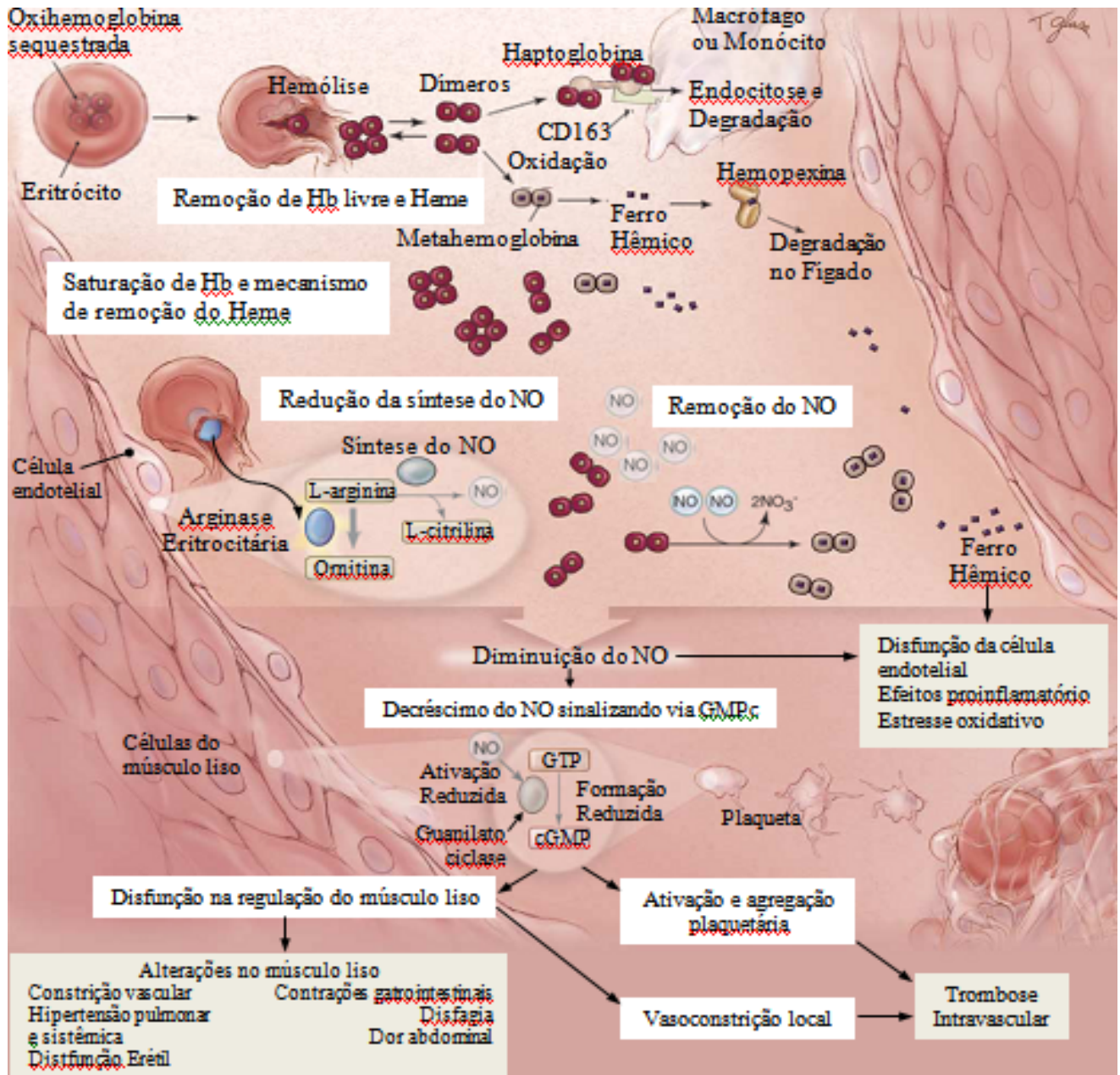


Figura 6 - Efeitos fisiopatológicos da hemoglobina livre no plasma e óxido nítrico. Durante a hemólise intravascular, a Hb é liberada no plasma, onde é removida através da haptoglobina, CD163, e hemopexina. O complexo haptoglobina-Hb se liga ao CD163 na superfície do macrófago onde é endocitado e degradado. A Hb também libera ferro hêmico quando oxidada, o qual se liga a hemopexina e é degradado através dos hepatócitos no fígado. Excesso de hemólise leva a saturação desse mecanismo de remoção de Hb, deixando Hb e heme livre no plasma, gerando um estado pró inflamatório, pró oxidante e disfunção da célula endotelial. NO é normalmente gerado a partir a L-arginina nas células endoteliais através da enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Durante a hemólise intravascular, NO biodisponível pode ser reduzido através da reação com oxihemoglobina e da redução da L-arginina, que é consumida através da arginase eritrocitária, e transformada em ornitina. Redução de NO resulta em redução da ativação da guanilato ciclase. Decréscimo dos níveis de GMPc resultam em distonias, hipertensão pulmonar sistêmica, disfunção erétil, disfagia, e dor abdominal e podem levar a ativação e agregação plaquetária, promovendo trombose intravascular

.Fonte: Adaptado de ROTHER *et al.*, 2005

2.8 LDH na Anemia Falciforme

A lactato desidrogenase láctica (LDH) é considerada um marcador de hemólise intravascular. Os níveis séricos são levemente elevados na hemólise extravascular, assim como na anemia hemolítica. Níveis elevados de LDH servem com um marcador substituto de hemólise intravascular em pacientes com anemia falciforme associado com a lise do eritrócito e a liberação de hemoglobina. É um marcador do processo hemolítico correlacionado com a arginase liberada no plasma durante a hemólise, servindo como um marcador da biodisponibilidade do óxido nítrico tendo em vista o seu consumo por dímeros de hemoglobina livre (KATO *et al.*, 2006).

2.9 Estratégias terapêuticas

As opções terapêuticas indicadas para o tratamento da anemia falciforme são o uso de ácido fólico, hidroxiuréia (HU), transfusão sanguínea e transplante de medula óssea. Entretanto, com as novas descobertas a cerca da fisiopatologia da doença, onde a AF atualmente é vista também como uma doença inflamatória crônica, têm surgido perspectivas no sentido de se buscar novas propostas terapêuticas, com a finalidade de atenuar o processo inflamatório, com isso colaborando para amenizar o processo hemolítico e o estresse oxidativo envolvido na anemia falciforme (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

A HU, considerada como um agente citotóxico, mutagênico, recombinogênico e antineoplásico vêm sendo, utilizada no tratamento da anemia falciforme. Inúmeros estudos têm reportado a eficácia da HU em pacientes com anemia falciforme devido ao aumento da concentração da Hb F, logo diminuindo os episódios de hemólise e conseqüentemente melhorando o quadro clínico. A droga é indicada para pacientes, incluindo crianças, com três ou mais episódios de crises vaso-oclusivas com necessidade de atendimento médico; uma crise torácica aguda recidivante; uma ou mais acidentes vasculares encefálicos; priapismo recorrente e anemia grave e persistente, nos últimos 12 meses (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

Estudos mostram que a HU tem efeitos múltiplos sobre a linhagem eritrocitária, isto é, promove elevação no nível de Hb F em cerca de 60% dos pacientes tratados, eleva a taxa de hemoglobina, do VCM (volume corpuscular médio) e reduz o número de reticulócitos.

A concentração da Hb F apresenta correlação com redução das crises dolorosas durante o tratamento (WALTERS; NENHUIS; VICHINSKY, 2002; COVAS *et al.*, 2004).

Em pacientes com AF, a redução na concentração da hemoglobina associada à acentuada reticulocitose caracteriza a gravidade da anemia hemolítica, assim a redução no nível de reticulócitos durante o tratamento, sugere a redução na hemólise (WALTERS; NENHUIS; VICHINSKY, 2002; COVAS *et al.*, 2004).

Outra resposta favorável, deste agente terapêutico, tem sido a diminuição da expressão de moléculas de adesão tais como fosfatidilserina da superfície eritrocitária e plaquetária, a anexina V, bem como a diminuição das proteínas receptoras localizadas em células endoteliais, contribuindo desse modo para a redução das crises vaso-oclusivas (COVAS *et al.*, 2004).

Vários trabalhos tem atribuído uma relação dos níveis elevados da HbF na anemia falciforme em tratamento com a HU a um significativo aumento do NO e GMPc (CANALLI, 2008b). COKIC *et al.* (2008), demonstraram níveis de GMPc significativamente elevados em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia quando comparados com indivíduos normais.

Foi observado também, que propriedades antioxidantes da HU possam contribuir para a sua ação terapêutica na anemia falciforme, inibindo a peroxidação lipídica induzida e a formação de meta-hemoglobina (AGIL; SADRZADEH, 2000).

A HU age na medula óssea e, por seus efeitos citotóxicos, aumenta a população de eritroblastos que sintetizam grandes quantidades de HbF. A celularidade da medula pode também ser diminuída. Altas concentrações de HbF reduzem a polimerização da HbS e o número de eritrócitos deformados, densos ou danificados. As células que contêm HbF possuem sobrevida longa, atenuando a hemólise e diminuindo a contagem de reticulócitos. As contagens de granulócitos, monócitos e plaquetas circulantes diminuem. A diminuição do número de eritrócitos densos e deformados que podem aderir ou lesar o endotélio reduz a probabilidade de ocorrer às crises vaso oclusivas (Figura 7) (MANFREDINI, 2008).

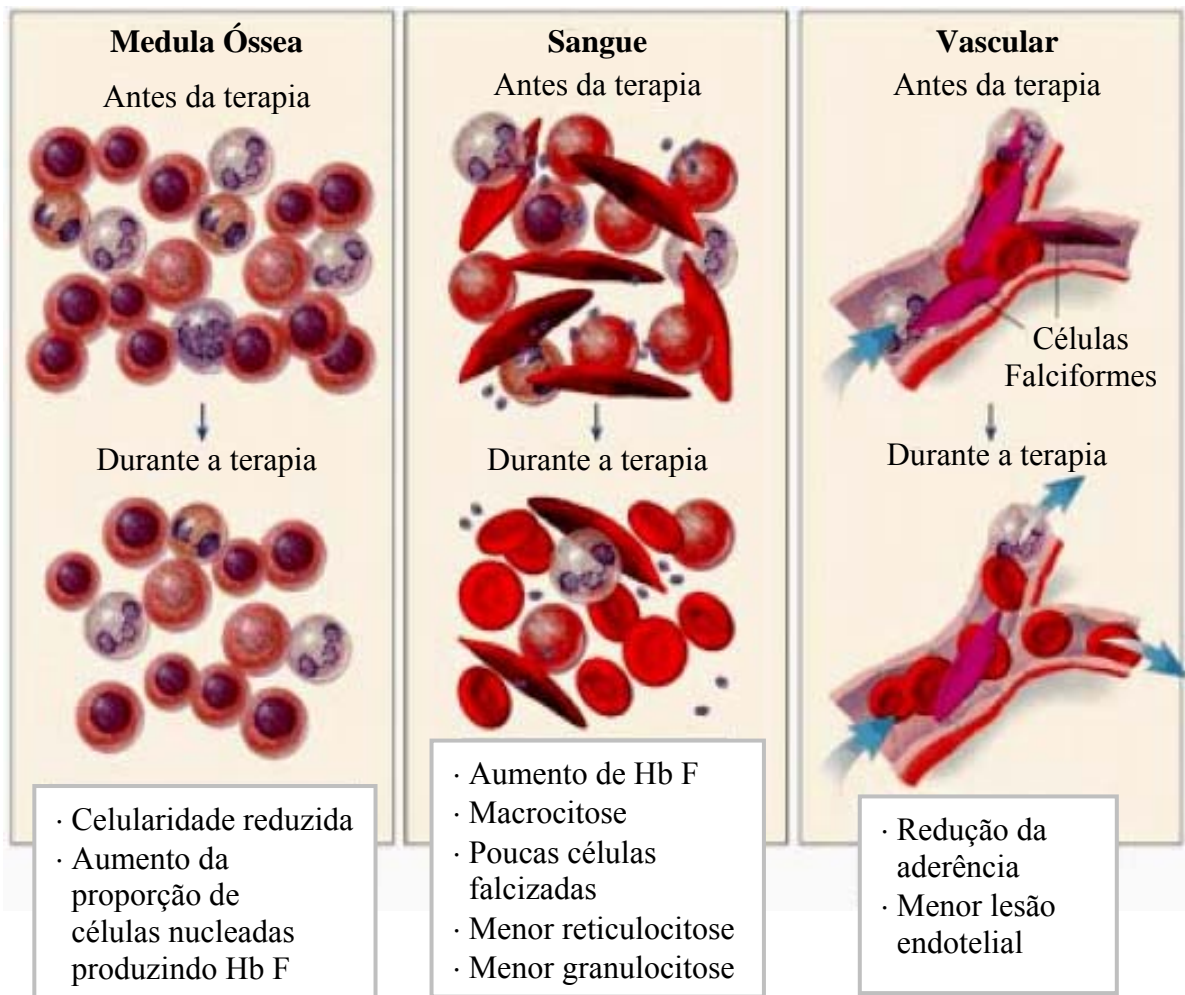


Figura 7- Mecanismo de ação da hidroxiuréia na anemia falciforme a nível sanguíneo, vascular e na medula óssea.

Fonte: STEINBERG, 1999

Entre as novas propostas terapêuticas para anemia falciforme destacam-se a sulfasalazina, como terapia antiinflamatória e anti-adesiva, sendo um potente inibidor de NF- κ B (que controla a expressão da variedade de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e imunes). Além de causar uma redução significativa da expressão de receptores de adesão (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina) em células endoteliais. Em 2007, Aslan e Bruce mostraram que pacientes com anemia falciforme e com crises álgicas recorrentes, tratados cronicamente com pequenas doses de heparina, como anticoagulante, ocasionou uma redução de 73% em dias de hospitalização e 74% em horas gastas em sala de emergência por ano.

O uso da vitamina E, como antioxidante de baixo peso molecular, promoveu o aumento da concentração de α -tocoferol (0.7 ± 0.2 to 2.3 ± 0.3 mg/g lipídio) e uma redução

significante de células falcizadas ($25 \pm 3\%$ to $11 \pm 1\%$) em pacientes com anemia falciforme. Entretanto, os achados clínicos não foram avaliados nesse estudo (ASLAN; BRUCE, 2007). Além disso, outras drogas, tais como o Sildenafil, inalação de NO e suplementação de L-arginina foram utilizadas como estratégias terapêuticas com a finalidade de promover o aumento do óxido nítrico, onde o inibidor da 5-fosfodiesterase, sildenafil, age potencializando o efeito do NO através da inibição da degradação de GMPc (ASLAN; BRUCE, 2007; WOOD; HSU; GLADWIN, 2008).

2.10 Hidroxiurea e o NO

A HU é uma droga utilizada no tratamento de doenças mieloproliferativas e da AF. Na AF, a HU age aumentando os níveis de HbF, reduzindo portanto a polimerização da HbS, a neutrofilia e reduz o fenômeno vaso-oclusivo. Alguns estudos mostram que a HU é um doador de NO. Ela pode ser oxidada pela hemoglobina e formar a nitrosilhemoglobina (HbNO) e o NO (GLADWIN *et al.*, 2002). Além disso, a HU pode se decompor química ou enzimaticamente em NO através das enzimas peroxidase, urease e catalase. Outros estudos mostram que a HU estimula a fosforilação e a ativação da eNOS que resultam na produção de NO (COKIC *et al.*, 2008; CANALLI, 2008b).

2.11 Alterações na peroxidação lipídica em pacientes com Anemia Falciforme

A AF é primariamente uma alteração de células sangüíneas que sofre significativa influência de radicais livres em sistemas biológicos. A ligação que ocorre entre o heme e o oxigênio na hemoglobina oxigenada está associada com uma transferência de elétron. Em resposta, há um trabalho integrado do sistema de antioxidantes, consistindo de enzimas de baixo peso molecular que ajudam a minimizar o estresse oxidativo e a injúria causada a hemácia e aos tecidos em geral. Na anemia falciforme, este balanço pode estar alterado, contribuindo desta forma com uma reação pró-oxidante. FASOLA *et al.* (2007) estudaram o status total antioxidante (TAS) em níveis séricos de pacientes com anemia falciforme e correlacionou com suas histórias clínicas. Observou que pacientes em que o TAS baixo (<

1,00) apresentaram mais de três crises vaso-oclusivo no último ano, mas somente 16% daqueles com TAS > 1,00 tiveram experiência de algum fenômeno vaso-oclusivo.

Dentro deste contexto julgamos importante a avaliação de parâmetros gerados na peroxidação lipídica como o MDA, assim como a determinação do óxido nítrico e correlacionar com os achados clínicos em pacientes com AF com e sem uso de HU com a finalidade de constatarmos o estresse oxidativo e se a HU contribui reduzindo esse processo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a peroxidação lipídica por meio da dosagem sérica de MDA (malonaldeído) e determinar os níveis de óxido nítrico (NO) e de LDH em pacientes com AF em acompanhamento ambulatorial no Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) e correlacionar com o uso da Hidroxiuréia.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil demográfico dos pacientes com AF através das variáveis: idade, sexo, etnia e procedência;
- Caracterizar os pacientes com AF em relação as variáveis: tabagismo, etilismo e ao uso de suplementação vitamínica (C e E);
- Determinar os níveis séricos de MDA, NO e LDH em pacientes com anemia falciforme com e sem tratamento com HU e comparar com o grupo controle, constituído por doadores de sangue com HbAA;
- Correlacionar os níveis de MDA, NO e LDH com a dosagem de Hb e com os níveis de Hb F, nos pacientes com anemia falciforme;
- Correlacionar os níveis de MDA, NO e LDH com as variáveis clínicas: crises vaso-oclusivas; crise torácica aguda (STA); acidente vascular encefálico (AVC); priapismo recorrente, necrose avascular de cabeça de fêmur, hipertensão pulmonar, úlcera de perna/maleolar, hepatite, insuficiência cardíaca e infecções recorrentes, nos pacientes com anemia falciforme.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações Éticas

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal do Ceará, já tendo obtido a aprovação pelo mesmo, sob o nº113.12.07.

4.2 Casuística

Neste trabalho, foram utilizadas 65 amostras de sangue periférico de pacientes com AF, após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme submetido no Comitê de Ética em Pesquisa, provenientes de pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídeo de Fortaleza HUWC – Ceará, as quais foram agrupadas da seguinte maneira:

- I – 51 pacientes com anemia falciforme (HbSS) sem o uso do medicamento Hidroxiuréia.
- II – 14 pacientes com anemia falciforme (HbSS) em uso do medicamento Hidroxiuréia.
- III – 20 pacientes do grupo controle com hemoglobina normal Hb AA.

A diferença na casuística entre os grupos I e II se deve ao fato do pequeno número de pacientes com AF, em tratamento com HU.

4.3 Desenho do Estudo

Estudo transversal prospectivo dos parâmetros malonaldeído (MDA), óxido nítrico (NO) e LDH e suas correlações com a Hidroxiuréia na Anemia Falciforme.

4.4 Local de Estudo

O estudo foi realizado no HEMOCE e no Laboratório de hemoglobina e doenças genéticas hematológicas (LHDGH) do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizados todos os exames.

4.5 Seleção da Amostra

Critérios de Inclusão:

- Pacientes adultos com AF em uso ou não de HU.
- Para o grupo controle III: constituído por doadores do banco de sangue com Hb AA confirmada pelos testes de solubilidade e eletroforese de hemoglobina.

Critérios de Exclusão:

- Foram excluídos do estudo os pacientes não portadores da anemia falciforme ou quando se recusarem a participar do estudo, não assinando o Termo de Consentimento e aqueles que tenham realizado terapêutica transfusional nos últimos três meses e em uso de quelante de ferro.

Cálculo do tamanho da amostra:

- Por se tratar de uma doença onde a incidência é de 0,2% no Estado do Ceará, a amostra foi de conveniência, composta por 65 (32.5%) pacientes com anemia falciforme atendidos no ambulatório do HUWC (sendo 51 do grupo I + 14 do grupo II) acrescidos de 20 doadores de sangue com Hb AA para a constituição do grupo controle.

4.6 Coleta de Dados

Foram selecionados os pacientes atendidos no ambulatório do HUWC no período de 01 de abril de 2008 a 06 de janeiro de 2009, onde foi colhida amostra de sangue em tubo com heparina, para realização dos testes. Realizou-se um questionário (Apêndice) e os dados clínicos foram coletados no prontuário.

4.6.1 Coleta de Material

Para os grupos I e II foram coletados 4ml de sangue venoso, em tubos com heparina como anticoagulante. Para a constituição do Grupo III foram coletados dois tubos, sendo um com heparina e outro com EDTA, sendo este último para realização dos testes de solubilidade e a eletroforese de hemoglobina em pH alcalino, para confirmação de HbAA.

4.6.2 Obtenção do plasma

Para a separação do plasma, o sangue coletado foi deixado durante 15 minutos em repouso em banho maria a 37°C. Após esse período o sangue foi centrifugado a 3.500rpm por 15min, sendo separado o plasma e armazenado em tubo, ficando sob refrigeração a uma temperatura de -20°C por até seis meses.

4.6.3 Obtenção dos valores da hemoglobina (Hb) e da hemoglobina fetal (HbF)

Os valores referentes a Hb e a HbF foram obtidos através do prontuário dos pacientes.

4.6.4 Avaliação do estresse oxidativo

Avaliou-se a concentração de óxido nítrico (NO) e malonaldeído (MDA) por métodos bioquímicos.

4.6.5 Avaliação do grau de hemólise

Para avaliar o grau de hemólise nesses pacientes realizamos dosagens de LDH por métodos bioquímicos.

4.7 Protocolo

Depois de ter sido esclarecido aos pacientes os objetivos do estudo e dos mesmos terem assinado o termo de consentimento foi aplicado um questionário (APÊNDICE A). Em seguida, foi procedida coleta de sangue por punção venosa periférica em tubo contendo heparina para obtenção de amostras para a realização dos seguintes exames laboratoriais:

- Malonaldeído (MDA)
- Oxido nítrico (NO)
- Lactato desidrogenase láctica (LDH)

4.8 Métodos

4.8.1 Determinação da peroxidação lipídica mensurada pela concentração de substâncias tiobarbitúricas ácido reativas (TBARS).

A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O malonaldeído é um biomarcador do dano causado pelas ERO e ERN, derivado da peroxidação lipídica das membranas celulares (VASCONCELOS *et al.*, 2007). O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo, que tem absorvância máxima em solução ácida 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste cromóforo num comprimento de onda de 535 nm, pH 1,0, é $1,53 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$. Após o período de incubação, o sobrenadante é descartado e as células são lisadas com 1mL de Triton X-100.

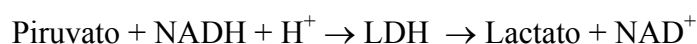
Então, 250 µL do plasma são adicionados a tubos de vidro e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h, seguido por adição de 400 µL de ácido perclórico a 35% para precipitar as proteínas. A mistura é centrifugada a 1400 g por 10 min. e 600 µL do sobrenadante são adicionados a 200 µL de uma solução de tiobarbiturato de sódio a 1,2%. A mistura é levada a banho-maria e aquecida a 95 °C por 30 min. Após resfriada, a absorbância é medida em um leitor de microplacas a 535 nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

4.8.2 Determinação de Nitrito

Após o período de incubação, a concentração de nitrito foi determinada segundo o método de GREEN e colaboradores (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorbância de 560 nm. Para esta experiência 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0.1% / H3PO4 em 1% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 µL do plasma e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 à 100 µM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 µL do reativo de Griess a 100 µL do plasma e a absorbância será medida em leitor de microplacas em 560 nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

4.8.3 Determinação do Lactato desidrogenase láctica (LDH)

O grau de hemólise foi avaliado através das dosagens de LDH pelo método cinético. A desidrogenase láctica catalisa a redução do piruvato com o NADH, obtendo-se NAD⁺. A concentração catalítica se determina a partir da velocidade de decomposição do NADH, medida pela queda da absorvidade a 340nm conforme recomendação do fabricante BIOCLIN[®] (ANEXO C).

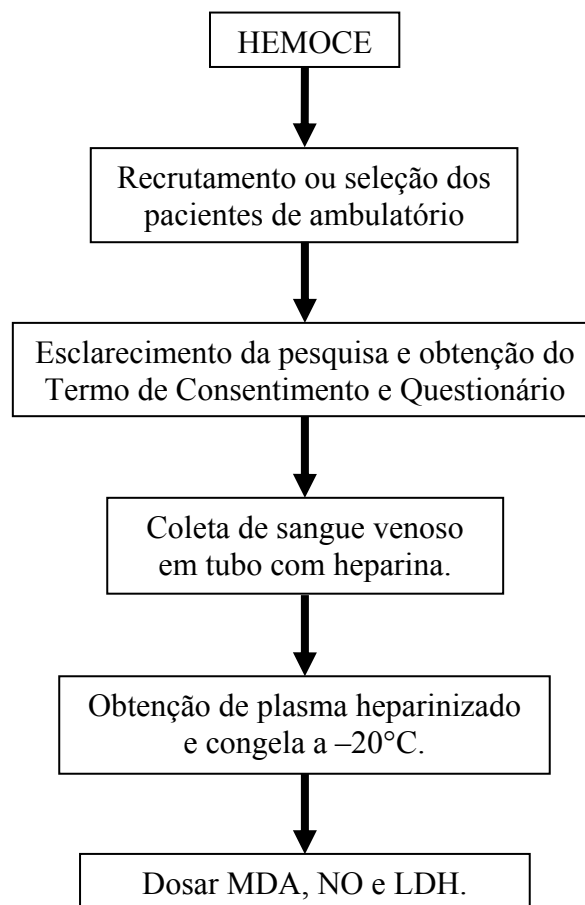


Adicionou-se 20µl de amostra a 1,0ml do reagente de trabalho (9 partes do reagente n° 1 com uma parte do reagente n° 2), misturou-se e transferiu para a cubeta termostaticada a 37°C e esperou 1 minuto. Realizou-se as leitura espectrofotométricas no aparelho LABQUEST[®].

4.9 Análises Estatísticas

A análise dos dados foi feita mediante a utilização do programa estatístico SPSS® 15.0 software para a construção dos gráficos dos fatores de prognósticos, para os testes estatísticos foi utilizado o software RGui (2008). O estudo de correlação das concentrações de MDA, NO, LDH, Hb fetal e Hb entre os grupos, foram feito tanto sob métodos paramétricos como não-paramétricos, assim expressamos os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman para cada combinação de duas dessas concentrações, ajustando para elas a linha de tendência sob o modelo de regressão linear simples e a curva utilizando o método de lowess. Para comparar os três grupos através dos níveis de MDA, NO e LDH, aplicamos a técnica dos modelos lineares generalizados (MLGs) obtendo os resultados através da análise de *deviance* (ANODEV). Aplicamos a mesma técnica para comparar esses níveis em relação às categorias dos fatores de prognósticos. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significante.

4.10 Fluxograma



5 RESULTADOS

A população em estudo foi constituída de 65 pacientes com anemia falciforme, sendo que esses foram divididos em dois grupos de acordo com o uso ou não de HU, o grupo I (pacientes com AF sem tratamento com HU (n = 51) e grupo II (pacientes com AF em tratamento com HU (n = 14). Um grupo controle foi constituído por doadores de sangue do HEMOCE (n=20).

5.1 Características da Amostragem

Na figura 8 verificamos que em relação ao sexo houve um predomínio do gênero feminino nos dois grupos (I e II), sendo que no grupo I foi de 64,7 e no grupo II de 64,3.

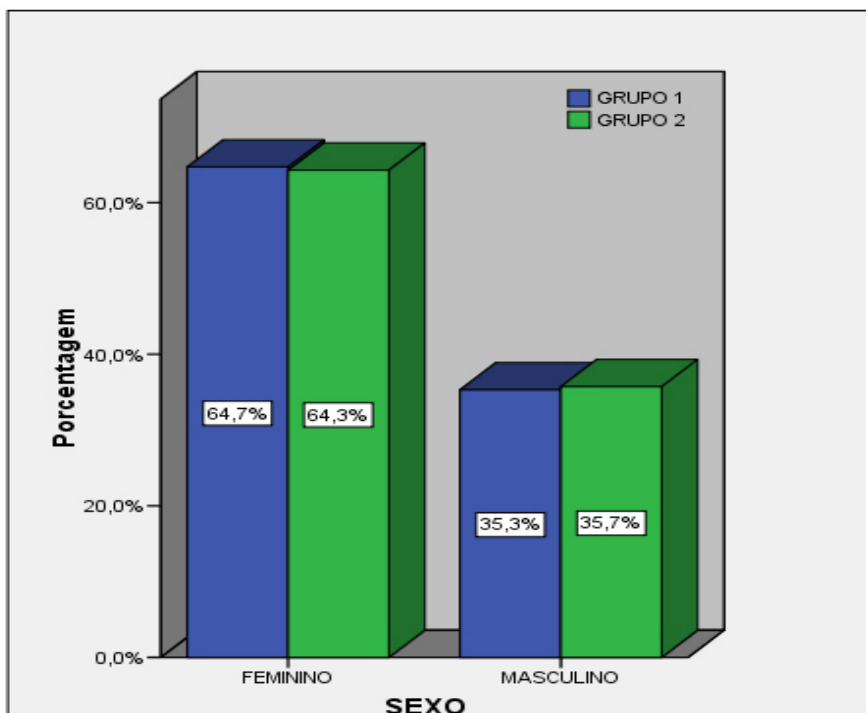


Figura 08 - Distribuição dos pacientes em relação ao gênero

Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU.

Na figura 9, em relação a etnia identificamos o predomínio da etnia parda (70,6) no grupo I e da etnia negra (50) no grupo II.

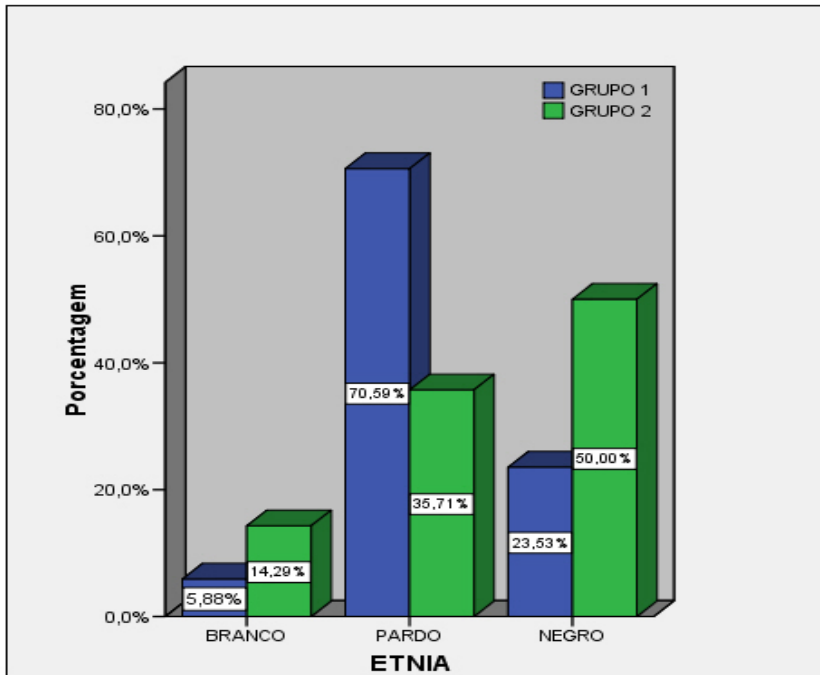


Figura 09 - Distribuição dos pacientes em relação à etnia.
Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU.

Os Boxplot's da figura (10) nos informa que para o grupo I a maioria dos pacientes são pessoas adultas (faixa etária entre 20 e 35 anos), para o grupo II observa-se a mesma tendência de pacientes adultos (faixa etária entre 20 e 40 anos), sendo o grupo II mais velho em média 4,5 anos em relação a média do grupo I.

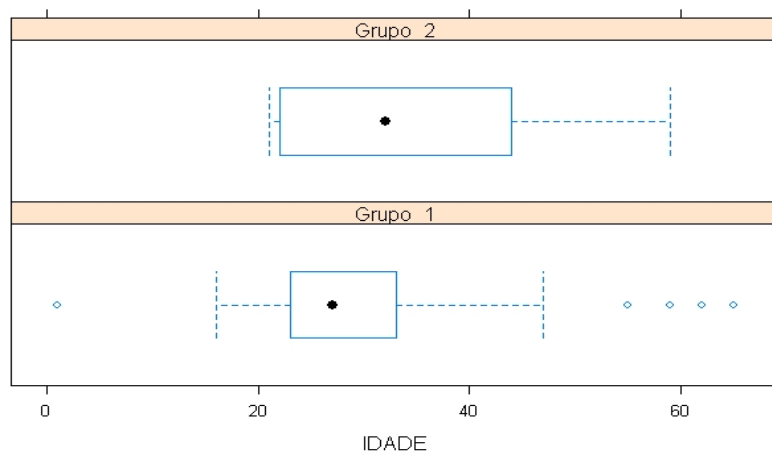


Figura 10 - Boxplot's da idade dos pacientes por grupo

Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU.

Percebe-se claramente nas figuras (11) e (12) o não uso de paracetamol e o não uso de vitaminas para ambos os grupos.

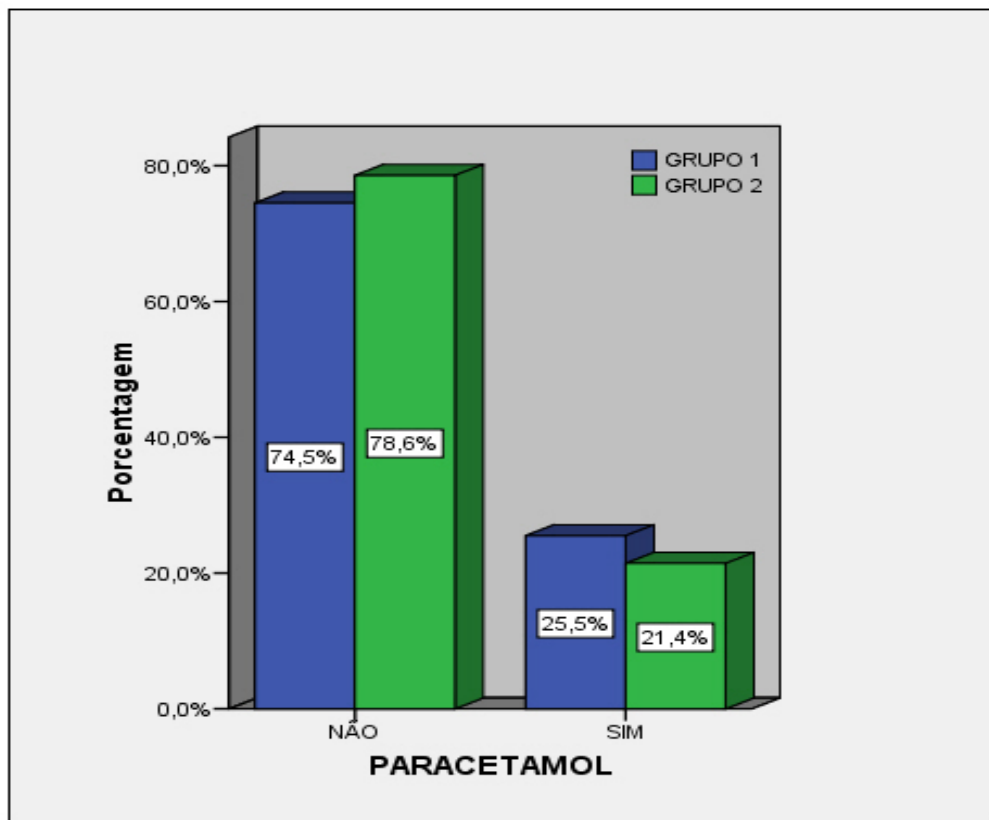


Figura 11- Relação do uso de paracetamol por grupo.

Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU.

Na figura 12, distribuímos os pacientes em relação ao uso de vitaminas. Quando questionadas se tomavam vitaminas diariamente mais de 90% em ambos os grupos responderam que não tinham o hábito de utilizar nenhum tipo de vitaminas, tendo apenas cinco (9,8%) e um (7,1%) respectivamente, respondido que ingeriam vitamina C regularmente.

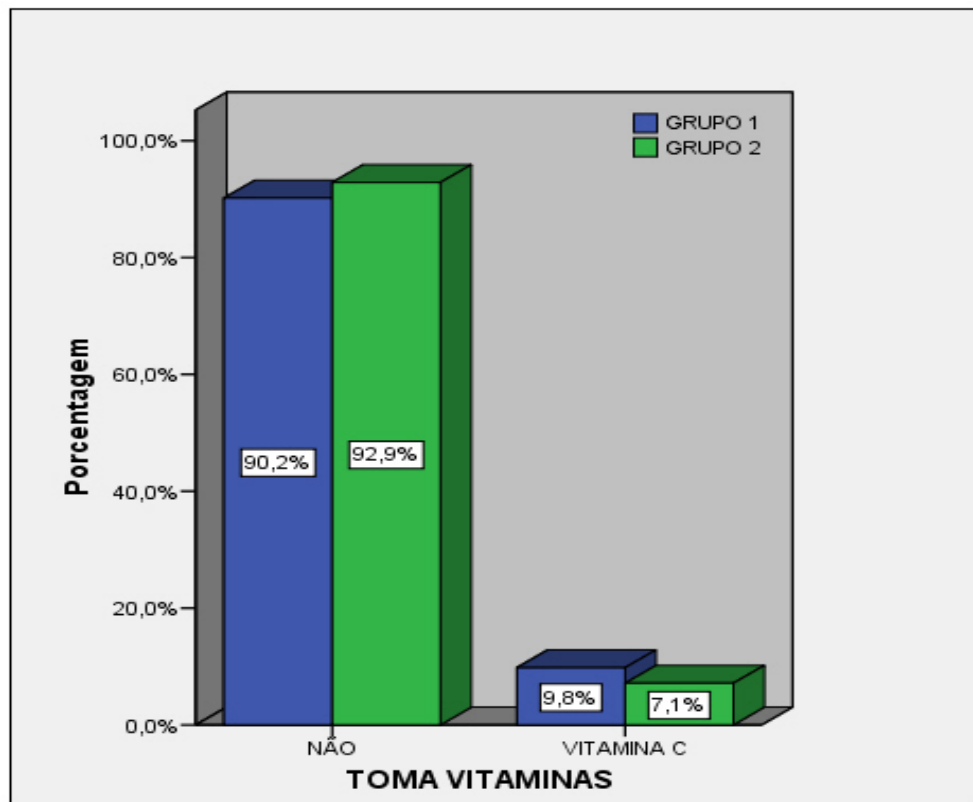


Figura 12 - Relação do uso de vitaminas dos pacientes por grupo.

Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU.

No que se refere à clínica dos pacientes podemos afirmar que em ambos os grupos mais de 70% dos pacientes avaliados necessitaram de zero a uma transfusão sanguínea no ano. Podemos observar que 21,4% no grupo II realizaram de duas a três transfusões no ano, como mostrado na figura 13.

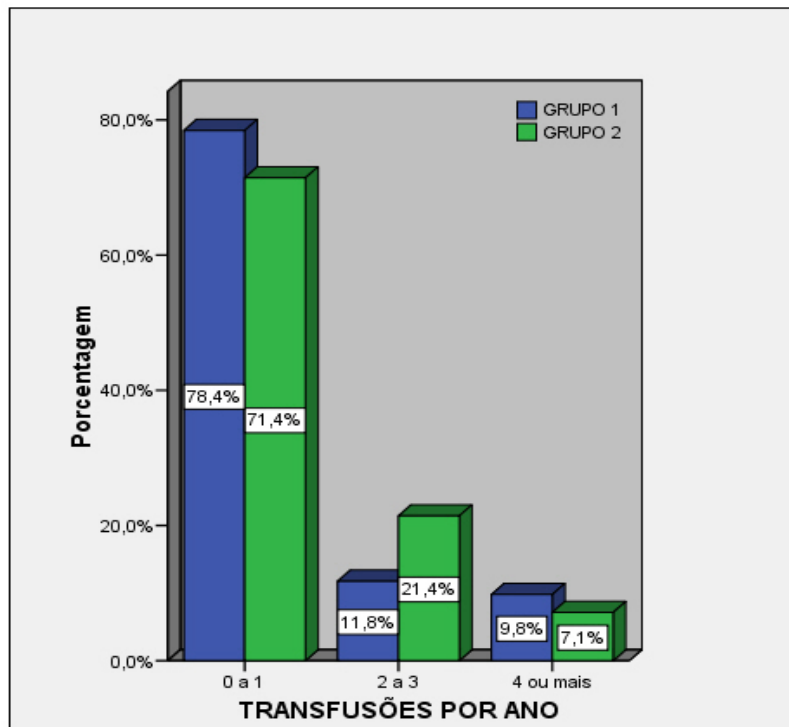


Figura 13 - Transfusões de sangue dos pacientes por grupo.

Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU.

Quando interrogados quanto ao hábito de fumo ou etilismo 74,5% e 57,1% nos grupos I e II respectivamente, respondeu não possuir nenhum dos dois hábitos, enquanto que apenas 3,9% e 7,1% nos grupos I e II respectivamente assumiram possuir os dois hábitos simultaneamente, tal como exposto na figura 14.

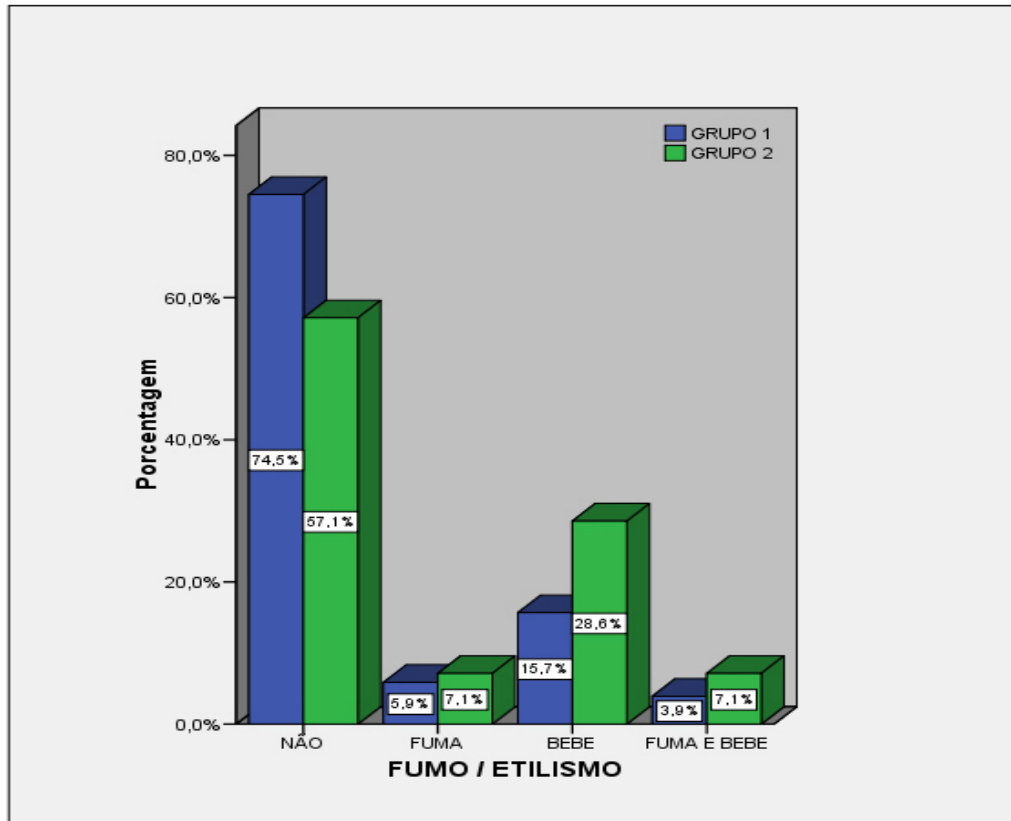


Figura 14 - Tabagismo e etilismo dos pacientes por grupo.

Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU.

5.2 Dosagens de LDH, NO e MDA nos três grupos

Com os gráficos de Boxplot's da figura (15), podem-se perceber as diferenças entre os grupos para cada nível avaliado, sem fazer nenhuma suposição para as distribuições populacionais dos níveis. Essas diferenças são notadas quanto à variabilidade dos níveis (os quartis), a assimetria, os pontos discrepantes e quanto à medida de localização. Observa-se que o grupo controle tende a possuir uma maior e mais homogênea concentração de MDA em relação aos outros grupos, e ainda para essa concentração o grupo I se destaca quanto à elevada dispersão. Em relação aos níveis de NO, percebe-se uma razoável *assimetria positiva* para os três grupos (esses níveis tendem a se concentrar mais em valores baixos), e o grupo I

apresentando uma significativa presença de pontos discrepantes em relação aos outros grupos. Para os níveis de LDH o grupo controle é mais homogêneo e com uma menor concentração de LDH em relação aos outros grupos, e ainda nota-se que os grupos I e II são bem parecidos quanto ao parâmetro de localização, tendo o grupo II o parâmetro de dispersão ligeiramente inferior que o do grupo I.

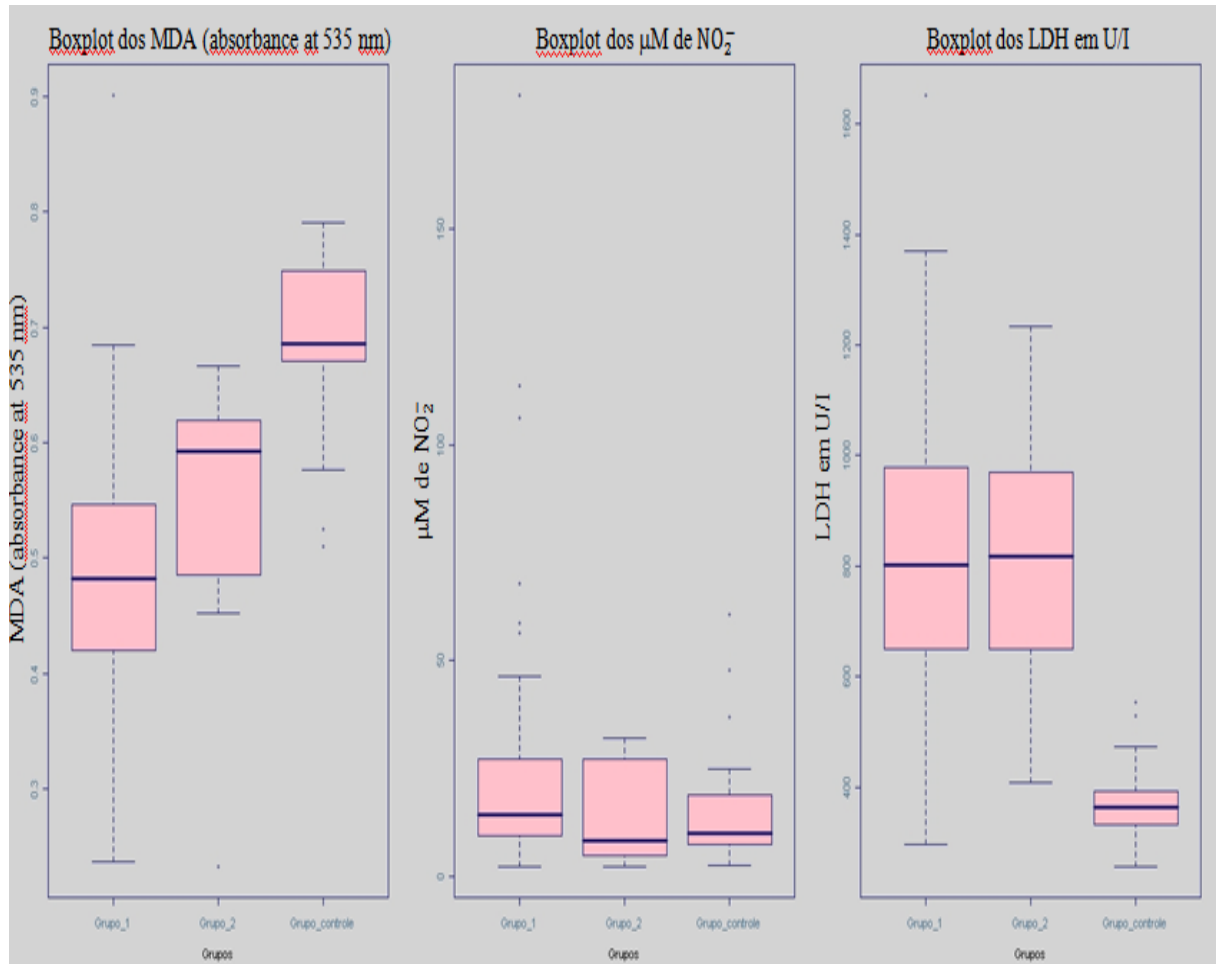


Figura 15 - Boxplot's dos níveis de MDA, NO e LDH por grupo.

Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU;
Grupo controle – Doadores de sangue com HbAA.

As relações das concentrações de MDA, NO, LDH entre os grupos podem ser avaliadas previamente através de um gráfico de dispersão. Na figura (16) apresentamos esse gráfico conjuntamente para os três grupos e na figura (17) apresentamos a dispersão dos níveis individualizada por grupo. Verifica-se que para o grupo I os pontos estão bem dispersos (distribuídos aleatoriamente) entre os níveis de MDA e LDH, ou seja, isso é uma

indicativa que não podemos associar alguma relação entre os níveis de MDA e LDH nesse grupo. Ainda para o grupo I, tem-se que a relação dos níveis de NO com o de MDA é bem parecida com a relação de NO com de LDH, isto é, a maioria dos valores de NO são baixos e razoavelmente distribuídos entre os níveis de MDA e LDH. Note que as dispersões desses níveis no grupo I são bem semelhantes a do grupo II. Observa-se que os níveis de NO como foi comentado anteriormente eles têm uma maior concentração em valores baixos (assimetria positiva) para todos os grupos, nota-se que para os grupos I e II a maioria desses níveis que são baixos estão bem distribuídos nos de MDA e LDH, já isso não ocorre no grupo controle, há uma concentração tanto de baixos níveis de NO com baixos níveis de LDH. Além disso, as dispersões dos níveis para grupo controle tendem a se concentrarem em certos pontos, ou seja, esse grupo não apresenta tantas variações como ocorrem nos grupos I e II.

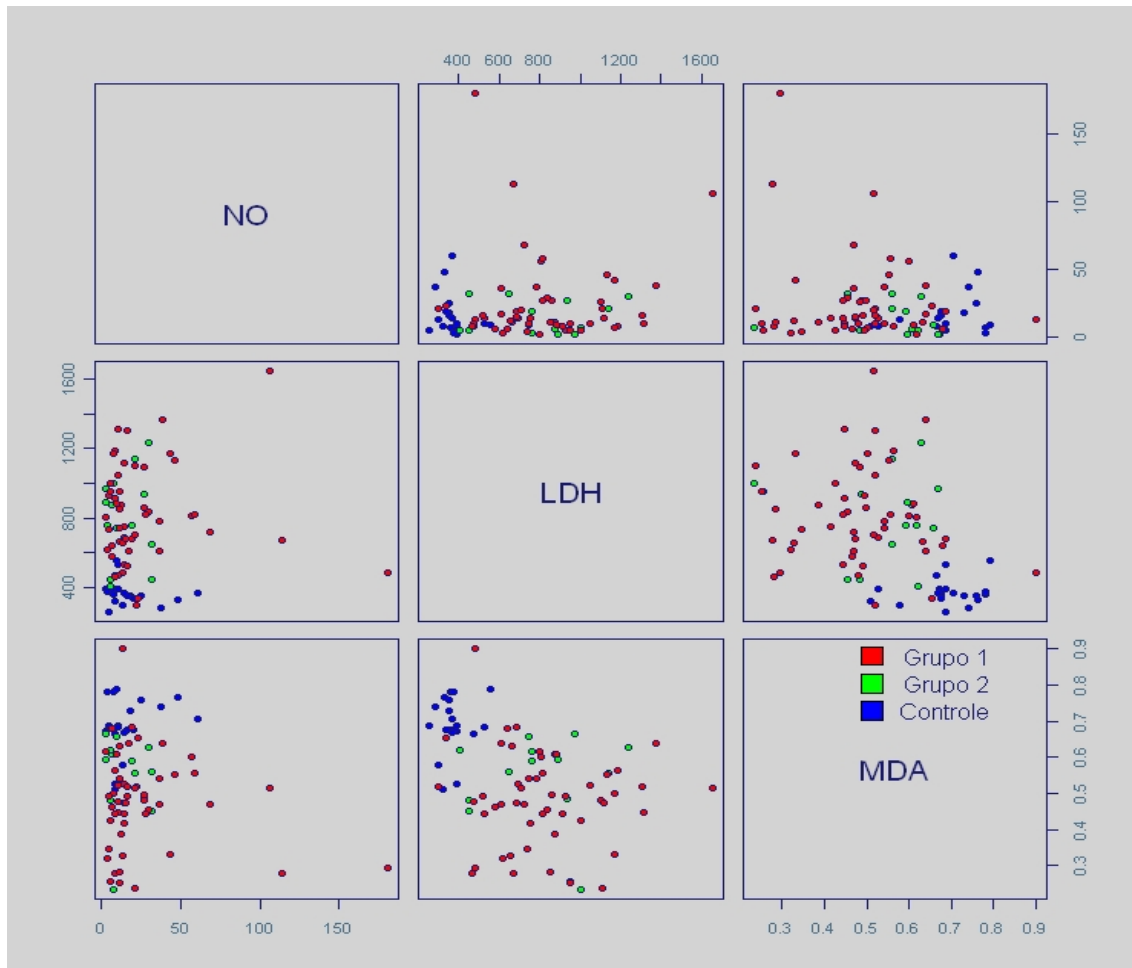


Figura 16 - Dispersão entre os níveis de MDA, NO e LDH em relação aos grupos. Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU; Grupo controle – Doadores de sangue com HbAA.

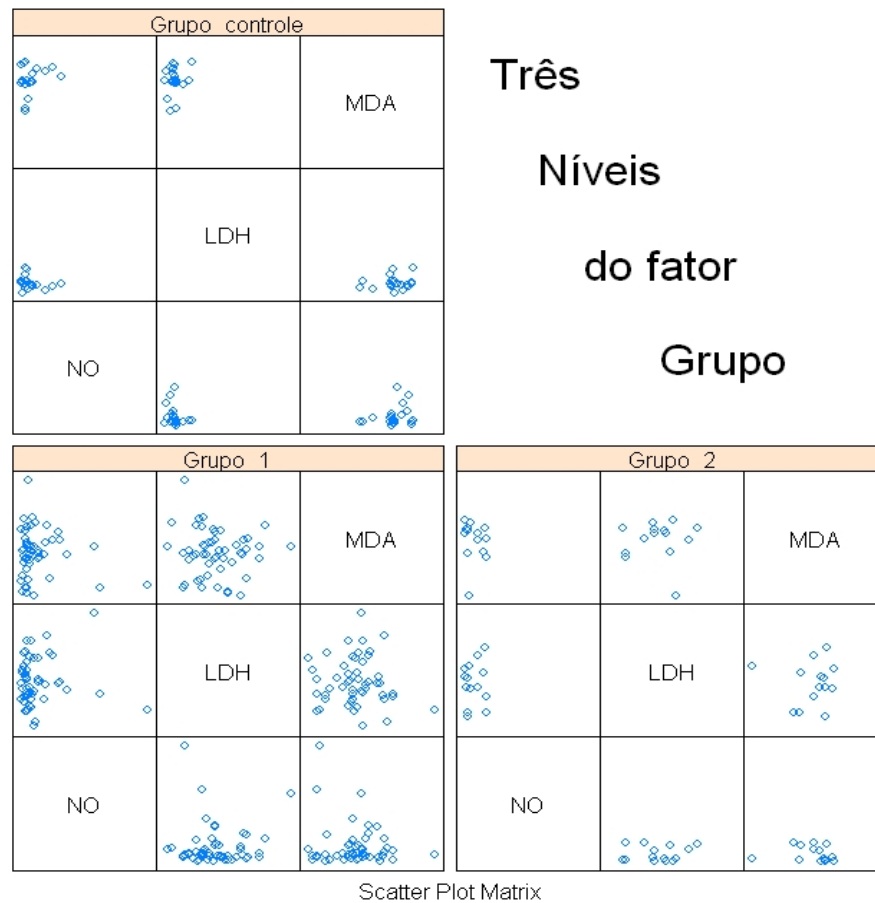


Figura 17- Dispersão dos níveis de MDA, NO e LDH individualizados para os grupos.

Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU;
Grupo controle – Doadores de sangue com HbAA.

5.3 Comparação das dosagens de MDA, NO e LDH nos três grupos

A tabela abaixo apresenta a comparação entre os grupos para os níveis de MDA, NO e LDH. Para o nível de MDA os três grupos são todos estatisticamente diferentes entre si, ao nível de significância de 0,05. Isto é, o grupo controle apresenta um nível médio de MDA (0.6879) superior ao grupo II, e o grupo II por sua vez apresenta um nível médio de MDA (0.5536) superior ao grupo I (0.4800), com uma probabilidade de 0,95 de confiança. Para o nível de NO não rejeitamos a hipótese que média de todos os níveis são iguais. Para o nível de LDH apenas o grupo controle difere, apresentando uma média bem inferior a dos dois grupos de pacientes, com uma probabilidade de 0,95 de confiança. Note também que não rejeitamos a hipótese que a média dos níveis de LDH são iguais a do grupo I e II.

Tabela 1 - Comparação entre os grupos através dos níveis.

Nível		Grupos		
		Grupo 1	Grupo 2	Grupo controle
MDA Absorbance at 535nm	<i>Comparação</i>	C	B	A
	<i>Média</i>	0,48	0,55	0,69
	<i>Desvio padrão</i>	0,13	0,11	0,08
NO μM	<i>Comparação</i>	A	A	A
	<i>Média</i>	25,76	14,48	16,56
	<i>Desvio padrão</i>	32,02	11,74	15,38
LDH U/l	<i>Comparação</i>	A	A	B
	<i>Média</i>	825,09	804,42	372,90
	<i>Desvio padrão</i>	279,22	253,29	73,90

Nota: Letras diferentes indicam que as médias são estatisticamente diferentes ao nível de 0,05, em que A>B>C. Grupo I – Pacientes com AF sem HU; Grupo II – Pacientes com AF em uso de HU; Grupo controle – Doadores de sangue com HbAA.

5.4 Estudo da relação das concentrações de MDA, NO, LDH, Hb fetal e Hb entre os grupos.

As relações dos níveis de NO, LDH, MDA, Hb Fetal, e Hb são analisadas através da figura (18) e (19), ou seja, procuramos descobrir uma relação funcional entre dois desses níveis. Utilizamos para isso o modelo de regressão paramétrico (acima da diagonal principal), e o não-paramétrico (abaixo da diagonal principal). Na parte superior da diagonal principal são mostrados para cada combinação de dois a dois níveis *os coeficientes de correlação de Pearson* (suposição que a relação entre os níveis é linear) com a reta ajustada sob *o modelo de regressão linear simples*. Na parte inferior da diagonal principal são mostrados *os coeficientes de correlação de Spearman*, (não requer nenhuma suposição). Ajustamos a curva utilizando o método de lowess (Local Polynomial Regression) de forma que pesos maiores são dados a pontos concordantes. Esse é um método de alisamento de diagramas de dispersão robusto e resistente a *outlier*. Os asteriscos ao lado dos coeficientes indicam que o teste de correlação foi significativo ao nível de 0,05 (o coeficiente é diferente de zero com probabilidade de 0,95 de confiança).

Assim para o grupo I (figura 18) notamos uma fraca correlação negativa significativa entre os níveis de LDH e de Hb no método paramétrico, já no método não-paramétrico observamos esse fato entre os níveis NO e de Hb fetal.

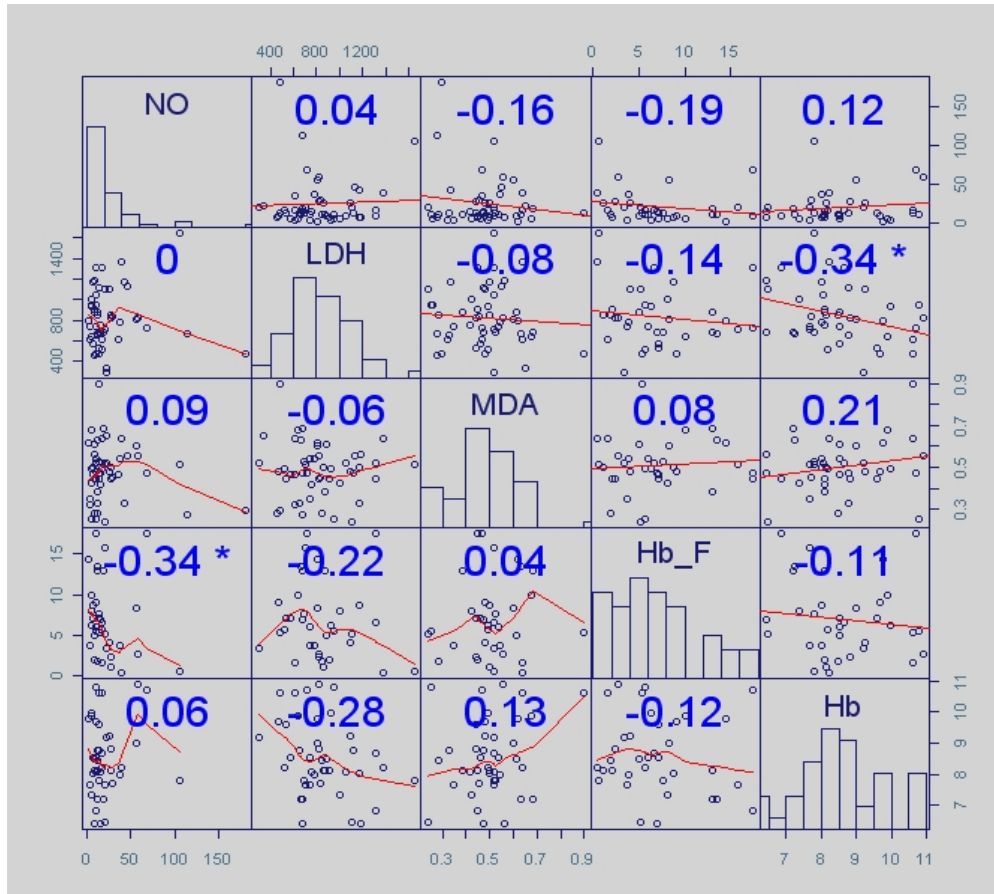


Figura 18 - Relações entre os níveis de NO, LDH, MDA, Hb F e Hb para o Grupo I.

* Significante ao nível de 0,05.

NO – óxido nítrico; LDH – Lactato desidrogenase láctica; MDA– malonaldeído; HbF– hemoglobina fetal; Hb – hemoglobina; Grupo I – pacientes com AF sem HU.

Para o grupo II (figura 19), só é detectado uma relação significativa (entre os níveis de LDH e Hb) e isso ocorre sob teste de correlação de Spearman. Em geral, as correlações detectadas entre os níveis avaliados são relativamente “fracas”, isto é, existe pouca ou nenhuma associação (relação funcional) entre dois níveis quaisquer.

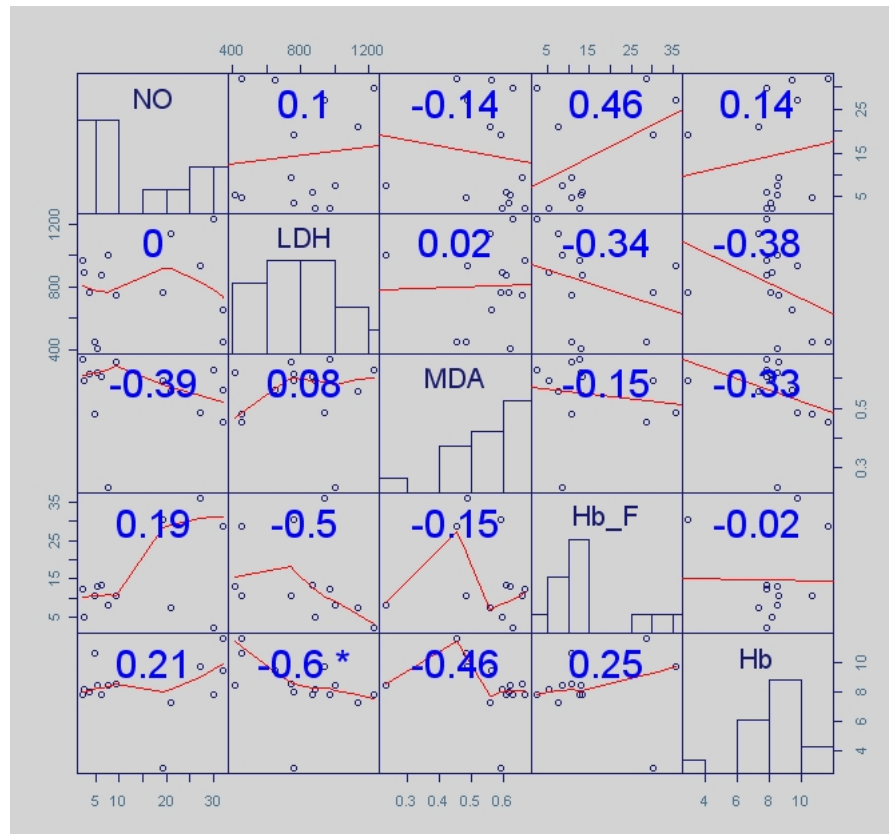


Figura 19 - Relações entre os níveis de NO, LDH, MDA, Hb F e Hb para o Grupo II.

* Significante ao nível de 0,05.

NO – óxido nítrico; LDH – Lactato desidrogenase láctica; MDA– malonaldeído; HbF– hemoglobina fetal; Hb – hemoglobina; Grupo I – pacientes com AF em uso de HU.

5.5 Relações da concentração de NO, MDA e LDH com outros fatores de prognóstico.

Para avaliar a concentração de NO e MDA com outros fatores de prognóstico, utilizamos a mesma técnica empregada na comparação entre os grupos, a análise de *deviance* (ANODEV).

A tabela (2) diz respeito ao nível de MDA, nota-se que para o fator Crise vaso-oclusivas, o nível médio de MDA para as suas categorias diferem em relação aos dois grupos, isto é, o nível médio de MDA é superior para os pacientes que tiveram três ou mais crises. Na tabela (3) vemos que o nível de NO para ambos os grupos não diferem para as categorias dos fatores analisados. Na tabela (4) temos em relação ao nível de LHD, apenas o grupo II apresenta diferença nas categorias do fator Fumo/Etilismo, ou seja, os pacientes com o uso de hidroxiuréia (grupo II) que fumam ou bebem apresenta o nível médio de LDH inferior aos que não fumam ou bebem ao nível de significância de 0,05.

Tabela 2 – Comparação dos fatores de prognósticos em relação ao nível de MDA.

Fatores Analisados		MDA							
		Grupo 1				Grupo 2			
		Desv.		Comparação	Valor p	Desv.		Comparação	Valor p
Média	Padrão	Média	Padrão						
Sexo	Feminino	0,50	0,14	=	0,0934	0,59	0,07	=	0,1233
	Masculino	0,44	0,11	=		0,49	0,15	=	
Transfusões por ano	0 a 1	0,47	0,14	=	0,2711	0,54	0,12	< **	0,0469
	2 ou mais	0,52	0,10	=		0,63	0,04	> **	
Fumo/Etilismo	Não	0,46	0,12	=	0,1164	0,6	0,06	=	0,0669
	Fuma ou bebe	0,53	0,18	=		0,5	0,14	=	
Crise vaso-oclusivas	1 ou 2 crises	0,43	0,12	< **	0,0051	0,43	0,14	< **	0,0031
	3 ou mais	0,53	0,13	> **		0,6	0,05	> **	
Paracetamol	Não	0,46	0,12	=	0,0645	0,56	0,12	=	0,3250
	Sim	0,54	0,16	=		0,52	0,07	=	
Úlceras de perna/maleolar	Não	0,47	0,12	=	0,3292	0,54	0,06	< **	0,0400
	Sim	0,51	0,15	=		0,64	0,12	> **	
Infecções recorrentes	Nenhuma	0,46	0,15	=	0,3790	0,54	0,11	=	0,1114
	Pelo menos 1	0,50	0,11	=		0,64	0,02	=	

Nota: ** Nível de significância de 0,05. MDA- malonaldeído; Grupo I- pacientes com AF sem HU; Grupo II – pacientes com AF em uso de HU

Tabela 3 - Comparação dos fatores de prognósticos em relação ao nível de NO.

Fatores Analisados		NO							
		Grupo 1				Grupo 2			
		Desv.		Comparação	Valor p	Desv.		Comparação	Valor p
Média	Padrão	Média	Padrão						
Sexo	Feminino	30,58	38,30	=	0,4966	11,78	11,07	=	0,2648
	Masculino	16,92	11,30	=		19,34	12,54	=	
Transfusões por ano	0 a 1	27,04	35,18	=	0,8389	16,93	12,44	=	0,2239
	2 ou mais	21,11	16,44	=		8,35	7,95	=	
Fumo/Etilismo	Não	28,42	36,29	=	0,9784	14,38	11,30	=	0,8760
	Fuma ou bebe	18,01	11,20	=		14,62	13,40	=	
Crise vaso-oclusivas	1 ou 2 crises	28,78	40,76	=	0,8642	21,86	10,59	=	0,1430
	3 ou mais	23,10	22,07	=		21,86	11,31	=	
Paracetamol	Não	21,17	20,92	=	0,1314	14,96	12,13	=	0,7578
	Sim	39,18	51,59	=		12,73	12,45	=	
Úlceras de perna/maleolar	Não	30,42	37,41	=	0,2258	13,36	11,97	=	0,7446
	Sim	15,59	9,20	=		15,32	12,32	=	
Infecções recorrentes	Nenhuma	30,82	39,29	=	0,2824	13,63	11,75	=	0,5278
	Pelo menos 1	20,51	21,72	=		19,60	14,61	=	

Nota: ** Nível de significância de 0,05. NO- óxido nítrico; Grupo I- pacientes com AF sem HU; Grupo II – pacientes com AF em uso de HU

Tabela 4 - Comparação dos fatores de prognósticos em relação ao nível de LDH.

Fatores Analisados		LDH							
		Grupo 1				Grupo 2			
		Desv.		Comparação	Valor p	Desv.		Comparação	Valor p
Média	Padrão	Média	Padrão						
Sexo	Feminino	806,78	278,61	=	0,5315	836,55	280,16	=	0,5459
	Masculino	858,66	285,21	=		746,60	212,19	=	
Transfusões por ano	0 a 1	811,40	272,15	=	0,5096	789,80	296,69	=	0,7473
	2 ou mais	874,90	312,20	=		841,00	106,93	=	
Fumo/Etilismo	Não	855,21	283,62	=	0,1907	929,25	181,37	> **	0,0262
	Fuma ou bebe	737,07	256,02	=		638,00	250,18	< **	
Crise vaso-oclusivas	1 ou 2 crises	795,45	198,66	=	0,6881	881,25	300,73	=	0,4951
	3 ou mais	851,44	336,87	=		773,70	242,60	=	
Paracetamol	Não	834,05	273,25	=	0,6995	818,54	261,25	=	0,7062
	Sim	798,92	306,00	=		752,66	265,78	=	
Úlceras de perna/maleolar	Não	823,65	294,05	=	0,9572	861,00	274,00	=	0,4914
	Sim	828,25	252,72	=		762,00	246,42	=	
Infecções recorrentes	Nenhuma	756,80	241,24	=	0,0746	896,12	240,18	=	0,2815
	Pelo menos 1	773,58	302,50	=		989,50	345,78	=	

Nota: ** Nível de significância de 0,05. LDH- lactato desidrogenase láctica; Grupo I- pacientes com AF sem HU; Grupo II – pacientes com AF em uso de HU

6 DISCUSSÃO

Pacientes com anemia falciforme estão sujeitos ao aumento do estresse oxidativo, particularmente durante as crises vaso-oclusivas e na síndrome torácica aguda. A fisiopatologia da anemia falciforme resulta do estresse oxidativo em eritrócitos. O estresse oxidativo representa o desequilíbrio entre o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e o baixo conteúdo celular de antioxidantes (MANFREDINI *et al.*, 2008).

Eritrócitos normais são particularmente susceptíveis ao dano peroxidativo por conter hemoglobina, um poderoso catalisador para as reações peroxidativas. Nos eritrócitos falcêmicos ocorre um desequilíbrio entre a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio e o baixo conteúdo de antioxidantes, podendo gerar espontaneamente duas vezes mais $O_2^{\cdot-}$, peróxidos e radicais OH^{\cdot} do que os eritrócitos normais. Esse processo pode gerar uma auto-oxidação aumentada do ferro (Fe^{+2}) da hemoglobina, contribuindo no processo de falcização, formação de “células densas” e no encurtamento da sobrevivência do eritrócito através da hemólise. Os radicais livres formados induzem à peroxidação lipídica e à subsequente produção de quantidades anormais de MDA (HEBBEL *et al.*, 1982). O dano peroxidativo provoca alterações nas propriedades da membrana eritrocitária, tais como aumento da rigidez, redução da maleabilidade eritrocitária e alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária podendo levar a hemólise (MANFREDINI *et al.*, 2008).

No presente estudo, verificamos que a idade na maioria dos pacientes variou de 20 a 35 anos, no grupo I e de 20 a 40 anos no grupo II. Loureiro e Rozenfeld (2005) demonstraram em uma população de 9.349 pacientes com diagnóstico de doença falciforme internados em hospitais da Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo, no período de 2000 a 2002 que a média de idade variou de 11,0 a 12,0 anos e cerca de 70% das internações foram abaixo dos 20 anos. Foi observada também maior letalidade hospitalar entre adultos. A média da idade do óbito foi baixa (26,5 a 31,5 anos).

Em relação ao sexo, etnia e procedência houve predomínio do sexo feminino, e das raças parda (grupo I) e negra (grupo II) e em sua maioria procedentes do estado do Ceará. Segundo Álvares Filho e colaboradores (1995) a distribuição geográfica da HbS no Brasil tem frequências menores entre as populações da região Sul e Sudeste (2,71% e 2,35%, respectivamente) e maiores nas regiões Norte e Nordeste (5,93% e 6,13%, respectivamente), o que está de acordo com os dados do IBGE, que descreve a região Nordeste como a que possui

maior população de afro-descendentes, quando somados o número de indivíduos negros e pardos (IBGE, 1996-2003).

Em relação ao uso de paracetamol e de vitaminas C, a maioria dos pacientes não fazia uso, além de não possuir hábitos como fumo e ou etilismo. O paracetamol, vitamina C, fumo/etilismo são substâncias que podem interferir na avaliação do estresse oxidativo. Recentemente, o estresse oxidativo tem sido sugerido como uma das principais causas de lesão tecidual. Segundo Lee e colaboradores (2001), o estresse oxidativo tem um papel fundamental no início e desenvolvimento das patologias hepáticas. Dessa forma, deve ser considerada a exposição a uma variedade de compostos hepatotóxicos, como por exemplo, o uso de tintas e seus derivados, reagentes químicos (tetracloreto de carbono, CCl₄), exposição ao fumo, etilismo e alguns medicamentos como o paracetamol.

Estudos recentes sugerem que pacientes com AF sofrem decréscimo das reservas de NO principalmente durante as crises vaso-oclusivas e na síndrome de seqüestro agudo, sendo os níveis de NO inversamente proporcional aos sintomas dolorosos, de forma que a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico pode contribuir para a fisiopatologia da anemia falciforme (MACK; KATO, 2006).

A avaliação dos níveis séricos de NO nos três grupos estudados, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Podemos, portanto verificar que o uso da HU não alterou os níveis séricos de NO no presente estudo. Esse achado difere de alguns trabalhos onde demonstram um aumento de NO com o uso da HU, no entanto esse fenômeno é transitório (GLADWIN *et al.*, 2002; COKIC *et al.*, 2008; KING, 2004). Em 2003, Morris *et al.*, estudaram o efeito da HU e da suplementação com arginina sobre a produção de NO em cinco pacientes com AF assintomáticos e observaram que quando a HU foi administrada, houve aumento dos níveis de NO em quatro pacientes e decréscimo em um paciente. Quando a HU foi associada a arginina (0,1 g/kg), todos os pacientes demonstraram um significativo aumento na produção dos níveis séricos de NO após duas horas com um subsequente declínio entre três e quatro horas. Em um estudo com pacientes adultos com anemia falciforme, apresentando crises vaso-oclusivas foi observado baixos níveis de L-arginina e de óxido nítrico quando comparados com pacientes com anemia falciforme assintomáticos (LOPEZ *et al.*, 2003).

Três mecanismos estão envolvidos na redução da disponibilidade de óxido nítrico em pacientes com anemia falciforme: baixos níveis plasmáticos de L-arginina, consumo de NO pelas EROs e o consumo de NO através da hemoglobina liberada no plasma durante a hemólise. Estudos recentes indicam que 50% dos pacientes com anemia falciforme

apresentam disfunção endotelial devido em grande parte ao consumo de NO por hemoglobina livre no plasma (MACK; KATO, 2006).

Quando avaliamos a correlação dos níveis de NO com as concentrações de Hb e de HbF encontramos uma correlação negativa entre os de níveis NO e de HbF para o grupo I. Enquanto que para o grupo II não houve correlação. Logo, no grupo de pacientes com AF sem tratamento com a HU, a concentração de HbF é inversamente proporcional aos níveis de NO. Os resultados não estão de acordo com dados da literatura, na qual atribuem uma correlação positiva entre os níveis de NO e de HbF em pacientes com AF em tratamento com HU (COKIC *et al.*, 2008; KING, 2004). Em relação à concentração da Hb não houve correlação com os níveis de NO em ambos os grupos. Esses achados podem ser atribuídos a vários fatores, tais como: a heterogeneidade dos grupos quanto ao curso clínico e a fatores relacionados ao medicamento, como dose, tempo de medicação e associações e período da realização das dosagens.

A hidroxiuréia tem sido usada no tratamento da anemia falciforme, tendo demonstrado redução na frequência de crises vaso-oclusivas, em eventos pulmonares, crises hemolíticas, e na redução nas frequências de transfusões sanguíneas e de dias de hospitalização com poucos efeitos colaterais adversos. Os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos da terapia com hidroxiuréia permanecem indefinidos, porém, a indução de hemoglobina fetal, redução do número de leucócitos, inibição da mieloperoxidase, e a doação de óxido nítrico são propriedades da droga que têm recebido atenção especial. Os mecanismos envolvidos na liberação de óxido nítrico a partir da hidroxiuréia são reação mediada pela hemoglobina, enzimas contendo heme e hidrólise (WOOD; GRANDER, 2007).

Estudos relacionados ao benefício da HU na AF mostram que a HU é capaz de reduzir os episódios de crises vaso-oclusivas e aumentar o tempo entre as crises, sugerindo que os benefícios desta droga podem ocorrer parcialmente devido a habilidade da HU em aumentar a geração de óxido nítrico na presença de peróxido de hidrogênio e proteína heme, presentes na hemoglobina (FASOLA *et al.*, 2007). Outros trabalhos relatam que a administração de hidroxiuréia em concentrações conhecidas em ratos leva ao aumento de nitrosil - hemoglobina, que é consistente com o aumento da geração de óxido-nítrico (JIANG *et al.*, 1997).

Quando comparamos as dosagens de LDH, nos três grupos observamos que o grupo controle difere, apresentando uma média inferior a dos demais grupos, com uma probabilidade de 0,95 de confiança e que a média dos níveis de LDH são semelhantes nos grupos I e II. Portanto os níveis de LDH foram elevados nos pacientes com AF independente

do tratamento com HU. Os resultados obtidos corroboram com os estudos realizados por Kato *et al.*, (2006) que demonstraram níveis elevados de LDH em pacientes com AF sem tratamento com HU. A LDH é um marcador de hemólise intravascular, estando por sua vez associado com a liberação de hemoglobina e arginase no plasma sanguíneo. Deste modo, pacientes com AF desenvolvem um estado de resistência ao óxido nítrico, devido ao consumo de NO pela hemoglobina livre no plasma e pela depleção de arginina, o substrato para formação de NO (KATO *et al.*, 2006).

Avaliamos a correlação dos níveis de LDH com as variáveis Hb e HbF nos grupos I e II. Encontramos uma correlação negativa entre os níveis de LDH e de Hb para o grupo I. Portanto os níveis de LDH são inversamente proporcionais à dosagem da hemoglobina em pacientes com AF sem uso de HU. Resultados semelhantes demonstrados pelo grupo de Kato *et al.*, (2006) onde verificaram uma correlação negativa entre LDH e Hb em pacientes com AF sem uso de HU. Os resultados demonstram que quanto maior o grau de anemia maior os níveis de LDH e que a condição independe do tratamento com a HU.

Em relação ao parâmetro MDA, foi observado que o grupo controle tende a possuir uma maior e mais homogênea concentração de MDA em relação aos outros grupos, e que o grupo I se destaca quanto à elevada dispersão. Quando comparamos os níveis de MDA nos três grupos, verificamos que são todos estatisticamente diferentes entre si, isto é, o grupo controle apresenta um nível médio de MDA (0,6879 absorbance at 535nm) superior ao grupo II, e o grupo II por sua vez apresenta um nível médio de MDA (0,5536 absorbance at 535nm) superior ao grupo I (0,4800 absorbance at 535nm), com uma probabilidade de 0,95 de confiança. Os resultados refletem que houve dano oxidativo em todos os grupos, independente do tratamento com HU. Estes resultados corroboram com os achados de Manfredini *et al.*, (2008) demonstraram que pacientes com AF apresentavam níveis elevados de MDA mesmo isentos de tratamento com HU, quando comparados com o controle, constituído por familiares dos pacientes, com a finalidade de restringir a variabilidade genética e a alimentar.

Em 1984, Hebbel e Miller demonstraram em experimentos *in vitro* que eritrócitos normais na presença de MDA, um produto da peroxidação lipídica, são reconhecidos e ingeridos por macrófagos, responsáveis pela lise celular. Em 1985, Schwartz *et al.*, demonstraram que a peroxidação lipídica provoca externalização da fosfatidilserina em membrana eritrocitária, e esta exposição na superfície da membrana está associada com o aumento da fagocitose de eritrócitos, através de reconhecimento de macrófagos, e além disso, induz a ativação do sistema complemento, o que contribui para lise celular.

Ao se avaliar a correlação dos níveis de MDA com a quantidade de crises vaso-oclusivas no ano (parâmetro temporal), observamos que o nível médio de MDA para as suas categorias difere em relação aos dois grupos, isto é, o nível médio de MDA foi superior nos pacientes que tiveram três ou mais crises, em ambos os grupos. Em 2007, Fasola *et al.* Examinando a relação entre a frequência de crises vaso-oclusivas e o *status total antioxidante* (TAS) observaram que a média de TAS, em 25 pacientes com AF, foi menor naqueles que apresentaram três ou mais crises, no ano anterior. Isso indica que o ambiente pró-oxidante pode ser propício para as crises vaso-oclusivas.

Avaliamos a correlação dos níveis de MDA com a concentração de Hb e com os níveis de HbF nos grupos em estudo. Os resultados demonstraram não haver correlação significativa entre essas variáveis para nenhum dos grupos estudados. O aumento da HbF promovido pela HU, nos pacientes com AF ocorre após três meses de uso do medicamento (RODGERS *et al.*, 1990). Portanto os resultados obtidos podem ter sido influenciados pelo curto tempo de tratamento dos pacientes onde a grande maioria fazia uso da HU por um período inferior a três meses.

A correlação entre as concentrações de MDA, NO, LDH entre os grupos em estudo foi demonstrada através de um gráfico de dispersão, onde foi verificado que para o grupo I os pontos estão bem dispersos (distribuídos aleatoriamente) entre os níveis de MDA e LDH, ou seja, isso é indicativo que não existe relação entre os níveis de MDA e LDH nesse grupo. Ainda para o grupo I, tem-se que a relação dos níveis de NO com o de MDA é bem parecida com a relação de NO com de LDH, isto é, a maioria dos valores de NO são baixos e razoavelmente distribuídos entre os níveis de MDA e LDH. Avaliou-se ainda que as dispersões desses níveis no grupo I são bem semelhantes ao do grupo II, já no grupo controle, há uma concentração de baixos níveis de NO com baixos níveis de LDH. Além disso, as dispersões dos níveis para grupo controle tendem a se concentrarem em certos pontos, ou seja, esse grupo não apresenta tantas variações como ocorre nos grupos I e II.

Em suma, os resultados demonstram que em relação ao óxido nítrico os três grupos apresentaram valores baixos e homogêneos, não havendo diferença entre eles. Quanto ao LDH foram observados níveis aumentados em pacientes com AF, independente do tratamento e os níveis de MDA foram aumentados nos três grupos, dispostos da seguinte forma: grupo controle, pacientes com AF em uso de HU e pacientes com AF sem uso de HU. Os resultados demonstram uma não proteção do dano celular e nem a nível vascular em pacientes com AF em uso de HU.

7. CONCLUSÃO

- A idade variou de 20 a 35 anos no grupo I e de 20 a 40 anos no grupo II. Houve um predomínio do sexo feminino em ambos os grupos. E das raças parda (grupo I) e negra (grupo II). A maioria dos pacientes não fazia uso de fumo\etilismo, paracetamol e de suplementação de vitaminas (C e E). E a maioria foi proveniente do estado de Ceará.
- Os níveis de MDA foram aumentados nos três grupos. E não houve diferença entre os níveis de NO. A LDH foi aumentada nos pacientes com AF independente do tratamento.
- Houve uma correlação negativa entre os de níveis NO e de HbF para o GI.
- Não houve correlação entre os níveis de MDA, Hb e HbF para nenhum dos grupos.
- Encontramos uma correlação negativa entre os níveis de LDH e de Hb para o GI.
- Observamos níveis aumentados de MDA em pacientes do GII que realizaram duas ou mais transfusões no ano. E que tiveram úlcera de perna maleolar.
- Observamos níveis elevados de MDA nos pacientes que tiveram três ou mais crises vaso oclusivas, em ambos os grupos.
- Não encontramos nenhuma relação do NO com as variáveis clínicas.
- Finalizando, os resultados comprovam que não houve mudança em relação ao uso do medicamento HU quanto o dano oxidativo, a hemólise e a biodisponibilidade do óxido nítrico.

REFERÊNCIAS

ÁLVARES FILHO, F.; NAOUM, P. C.; MOREIRA, H. W.; CRUZ, R.; MANZATO, A. J.; DOMINGOS, C. R. B. Distribución geográfica etária y racial de la hemoglobina S en Brasil. *Sangre*, v. 40, p. 97-102, 1995.

AGIL, A.; SADRZADEH, S. M. H. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Report*, v. 5, n.1, p. 29-34, 2000.

AMER, J.; FILBACH, E. Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta –thalassaemia patients. *Br. J. Haematol.*, v. 129, p. 435-441, 2005.

ASLAN, M.; BRUCE, A. F. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radical Biol. Med.*, v. 43, p. 1469-1483, 2007.

BANDEIRA, F. M. G. C.; BEZERRA, M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; GOMES, Y. M.; ARAÚJO A. S.; ABATH, F. G. C. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do Organismo. *Quim. Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEUTLER, E. The common anemias: review. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 259, n. 16, p. 2433 – 2437, 1988.

CANALLI, A. A. **Ação do óxido nítrico e da via dependente de Guanosina Monofosfato Cíclico nas propriedades adesivas de leucócitos de pacientes com anemia falciforme.** Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008a.

CANNALLI, A. A. Increased adhesive properties of the neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. **Hematol. J.**, v. 93, n. 4, p. 605-609, 2008b.

CANALLI, A. A. **Função e expressão das integrinas nos eosinófilos de pacientes com anemia falciforme.** Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CHAN, A.; CHOW, C.; CHIU, D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 222, p. 274-282, 1999.

CHAVES, M. A. F. **Ação Antioxidante das vitaminas C e E no processo oxidativo em eritrócitos de indivíduos portadores de Hemoglobina S.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

COKIC, V. P.; ANDRIC, S. A.; STOJIKOVIC, S. S.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1117-1123, 2008.

COVAS, D. T.; DE LUCENA ANGULO, I.; VIANNA BONINI PALMA, P.; ZAGO, M. A. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, n.3, p.273-280, 2004.

DA SILVA, L. B.; GONÇALVES, 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.

DAS, D. K.; ERSMAN, W. B. **Oxygen radicals:** Sistemic events and disease process. Basel: Karger, p. 196, 1990.

DHANANJAY, K.; KAUL, X. D. L.; XIAOQUIN, Z.; LI, M.; CARLETON, J. C. H.; NAGEL, R. L. Inhibition of sickle red cell adhesion and vasoocclusion in the microcirculation by antioxidants. **Am. J. Physiol. Heart Cir. Physiol.**, v. 291, p. 167-175, 2006.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondial dehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.

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. Méd. Assoc.**, v. 99, n. 8, p. 891-894, 2007.

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.

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. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

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

GLADWIN, M. T.; SHELHAMER, J. H.; OGNIBENE, F. P.; PEASE-FYE, M. E.; NICHOLS, J. S.; LINK, B.; DAKSESH, B. P.; MARCIN, A. J.; LEWIS, K. P.; 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.; et al. (CPqGM-FIOCRUZ/FARMÁCIA-UFBA). Anemia falciforme: fluxograma para diagnóstico. 41º Congresso brasileiro da Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial. Salvador-BA, setembro, 2007.

HEBBEL, R.; EATON, J.; BALASINGAM, M.; STEINBERG, M. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 70, p.1253-1259, 1982.

HEBBEL, R. P.; MILLER W. J. Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and determinants of hemolytic anemia. **Blood**, v. 64, p.733-741, 1984.

HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. **Human hemoglobin genetics**. New York: Springer-Verlag, 1986.

IBGE- Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios- 1996-2003.

JIANG, J.; JORDAN, S. J.; BARR, D. P.; GUNTHER, M. R.; MAEDA, H.; MASON, R. P. *In vivo* Production of Nitric Oxide in Rats after Administration of Hydroxyurea. **Molecular Pharmacology**, v. 52, p. 1081-1086, 1997.

KATO, G. J.; McGOWAN, V.; MACHADO, R. F.; LITTLE, J. A.; TAYLOR VI, J.; MORRIS, C. R.; NICHOLS, J. S.; WANG, X.; POLJAKOVIC M.; MORRIS Jr, S. M.; 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. 2279-2285, 2006.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood**, v. 21, n.1, p.37-47, 2007.

KING, S. B. Nitric oxide production from hydroxiurea. **Free Rad. 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. **Resp. Res.**, v. 2, p. 280-285, 2001.

KRUKOSKI, D. W. **Ação Antioxidante do ácido L- ascórbico e desferoxamina em eritrócitos humanos isolados submetidos a sobrecarga oxidativa por Terc-Butilhidroperóxido**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LEE, K. S.; LEE, S. J.; PARK, H. J.; CHUNG, J. P.; HAN, K. H.; CHON, C. Y.; LEE, S. I.; MOON, Y. M. Oxidative stress effect on the activation of Hepatic Stellate Cells. **Yonsei Medical Journal**. v. 42, n. 1, p. 1-8, 2001.

LEE, R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J.; RODGERS, G. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 196-217.

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, p. 532-534, 2003.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia propedêutica e clínica**. Rio de Janeiro. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

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

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

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 Sickle Cell Anemia Patients Steady State. **J. Nat. Med. Assoc.**, v. 100, n. 8, p. 897-902, 2008.

MELO-REIS, P. R.; ARAÚJO, L. M. M.; DIAS-PENNA, K. G. B.; MESQUITA, M. M.; CASTRO, F. S. A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p.149-152, 2006.

MORRIS, C. R.; VICHINSKY, E. P.; VAN WARMENDAM, J.; MACHADO, L.; KEPKALLENHART, D.; MORRIS, S. M. Jr.; KUYPERS, F. A. Hydroxyurea and arginine therapy: impact n nitric oxide production in sickle cell disease. **J. Pediatric. Hematol. Oncol.**, v. 25, n. 8, p.629-634, 2003.

NASCIMENTO, M. L. P.; CARDEL, R. C. Complicações da gestação na anemia falciforme. **Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 18, supl., 1996.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.

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

_____. Prevalência e Controle da Hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 22, suplemento 2, p. 142-148, 2000b.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Doença das células falciformes**. São José do Rio Preto: Sarvier, 2004.

QUINN, C. T.; SHULL, E. P.; AHMED, N.; LEE, N. J. ; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R.; Prognostic significance of early vaso-occlusive complications in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 109, p. 40-45, 2007.

RODGERS, G. P.; DOVER, G. J.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N.; NIENHUIS, A. W.; Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, n. 15, p. 1037-1045, 1990.

ROTHER, P. R.; 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. 1653-1662, 2005.

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.

SCHWARTZ, S.; TANAKA, Y.; FIDLER, Z. Y.; CHIU, D. T.; LUBIN, B.; SCHROIT, A. J. Increased adherence of sickle and phosphatidylserine-enriched human erythrocytes to culture human peripheral blood monocytes. **J Clin. Invest.**, v. 75, n. 6, p. 1965-1972, 1985.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Clin. Haematol.**, v. 11, p. 163-184, 1998.

_____. Management of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 1021-1030, 1999.

STEINBERG, M. H.; LU, Z. H.; BARTON, F. B.; TERRIN, M. L.; CHARACHE, S.; DOVER, G. J. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: determinants of response to hydroxyurea. **Blood**, v. 89, n. 3, p. 1078-1088, 1997.

STEINBERG, M. H.; FORGET, B. G.; HIGGS, D. R.; NAGEL, R. L. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management**. Cambridge University Press; Cambridge, 2001.

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

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S.; MANFREDINI, V.; 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. **Quim. Nova**, v. 30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

WALTERS, M. C.; NENHUIS, A.W.; VICHINSKY, E. Novel therapeutic approaches in sickle cell disease. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 10-34, 2002.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Semin. Hematol.**, v. 27, n. 1, p. 41-50, 1990.

WOOD, K. C.; GRANGER, D. N. Sickle cell disease: Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 34, p. 926-932, 2007.

WOOD, K. C.; HSU, L.L.; GLADWIN, M. T. Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. **Free Rad. Biol. Méd.**, v. 44, p. 1506-1528, 2008.

TUKAMOTO JR, N. C. **Influência do polimorfismo de GST e peroxidação lipídica no fenótipo de Hb S e mutantes no gene HFE.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Programa de Pós- Graduação em genética, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

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

Questionário

Data: ____/____/____

Nome completo: _____ Sexo: () fem () masc

Endereço: _____

Cidade onde mora: _____ Telefone: (____) _____

Idade: ____ Data de nasc: ____/____/____ Local de nasc _____

Profissão atual: _____

Fuma? () não () sim - A quanto tempo? _____

Se fumava, quanto tempo faz que você parou de fumar? _____

Toma bebidas alcoólicas?

() não () sim - A quanto tempo? _____

- Quando foi a última vez que você ingeriu bebida alcoólica? _____

Toma medicamentos?

() não () sim Quais? _____

Você toma vitaminas ou complementos alimentares? (Exemplo: vit C, vit E...)

() não () sim, regularmente. () sim, não regularmente

Se a resposta for sim, indicar quais vitaminas ou complementos alimentares você toma:

Você já realizou alguma transfusão sanguínea?

() não () sim, quantas? _____

Se sim quando foi a última transfusão? _____

Você teve no último ano crises álgica ou crises de dor, Quantas?

() não () sim Se sim, com que frequência você as sente? _____

Você tem lesões de órgão alvo?

() não () sim (), Qual o órgão atingido? _____

Apresenta crises torácicas (dor no peito, com comprometimento pulmonar, dificuldade respiratória e tosse) _____

Dados: _____ Data: ____/____/____

Hb = _____

HbF _____

APÊNDICE B

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

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

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário do projeto de pesquisa intitulada “**Parâmetros oxidantes e antioxidantes e suas correlações com tratamento na Anemia Falciforme.**”. O estudo Será realizado com amostra de sangue colhida com heparina e tem como objetivo principal realizar dosagens bioquímicas com o intuito de verificar a capacidade oxidante e antioxidante, visando esclarecer as diferenças de manifestações clínicas entre os indivíduos com anemia falciforme.

Convido-o a participar da pesquisa, 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 a Senhora autorize a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa. A coleta de sangue será realizada nos Hemocentros do Estado do Ceará, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo.

A sua participação na pesquisa será 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 a entrevistada e a outra com a pesquisadora.

Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifestos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante da pesquisa

Pesquisador responsável

ANEXO A

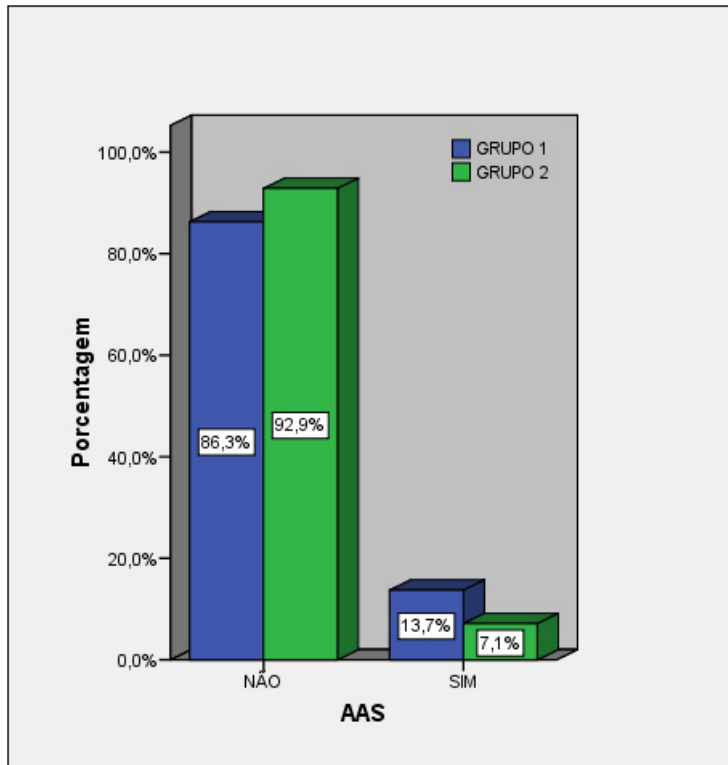


Figura 20 - AAS dos pacientes por grupo.

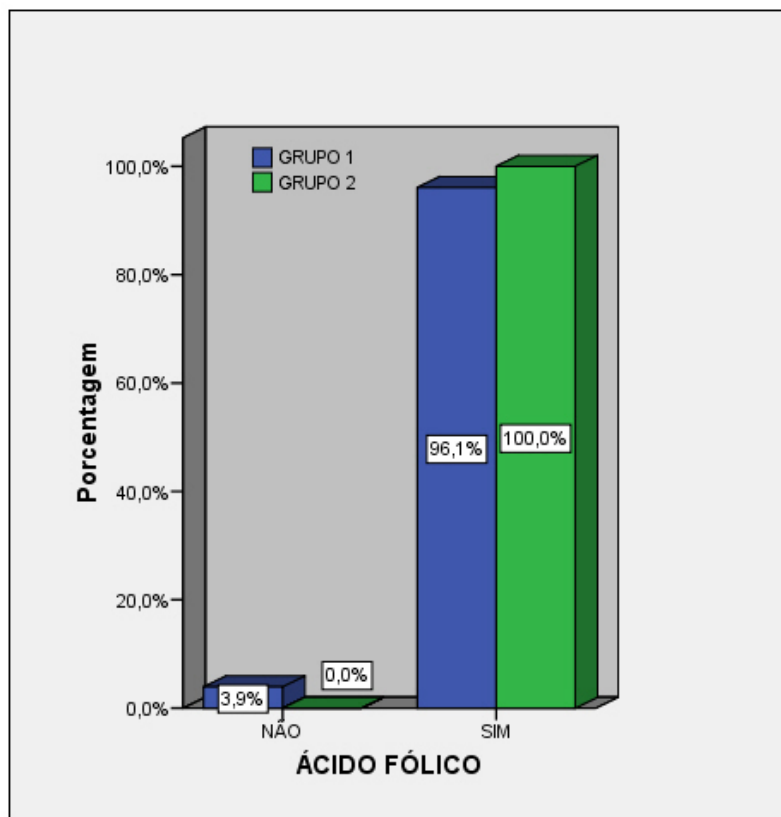


Figura 21 - Ácido fólico dos pacientes por grupo.

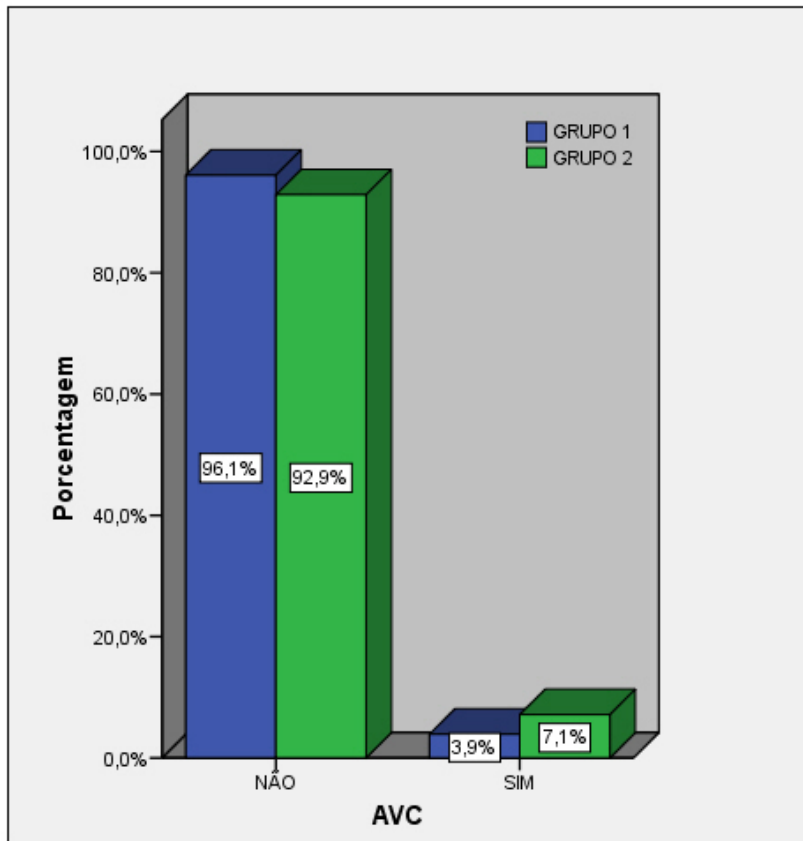


Figura 22 - AVC dos pacientes por grupo.

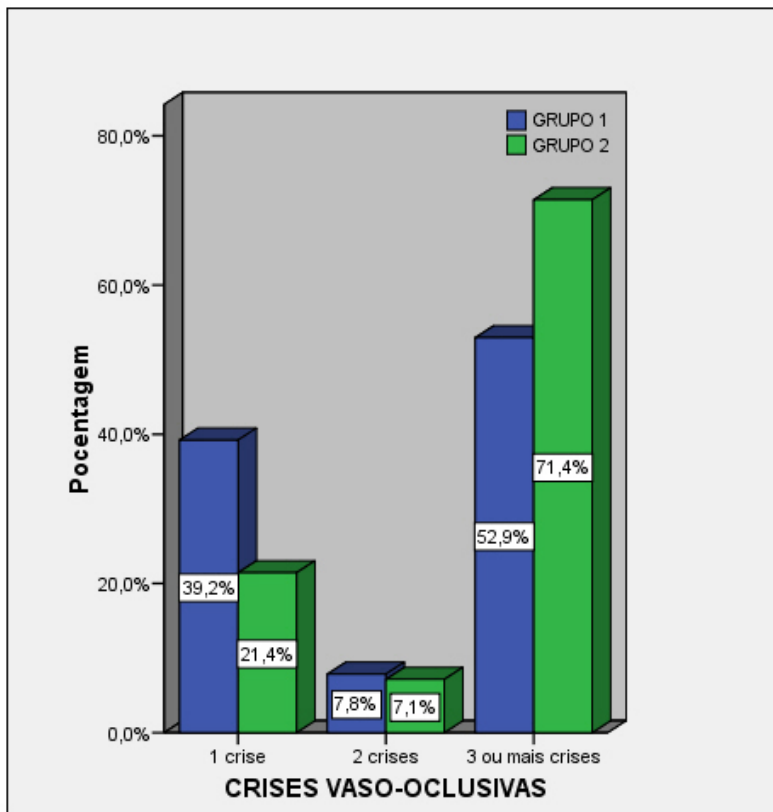


Figura 23 - Crises vaso-oclusivas dos pacientes por grupo.

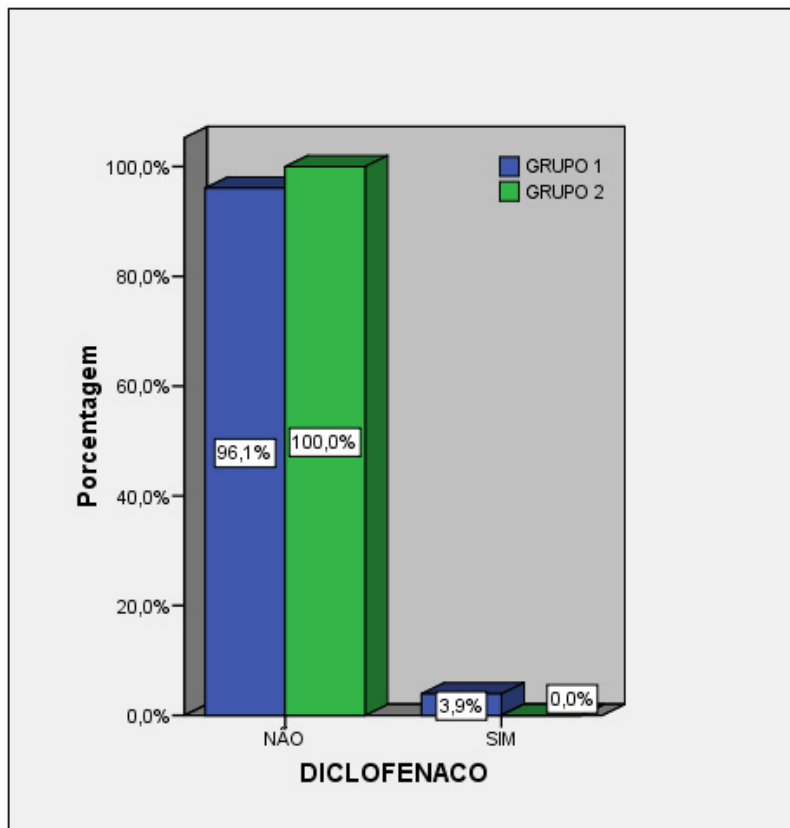


Figura 24 - Relação do uso de Diclofenaco por grupo.

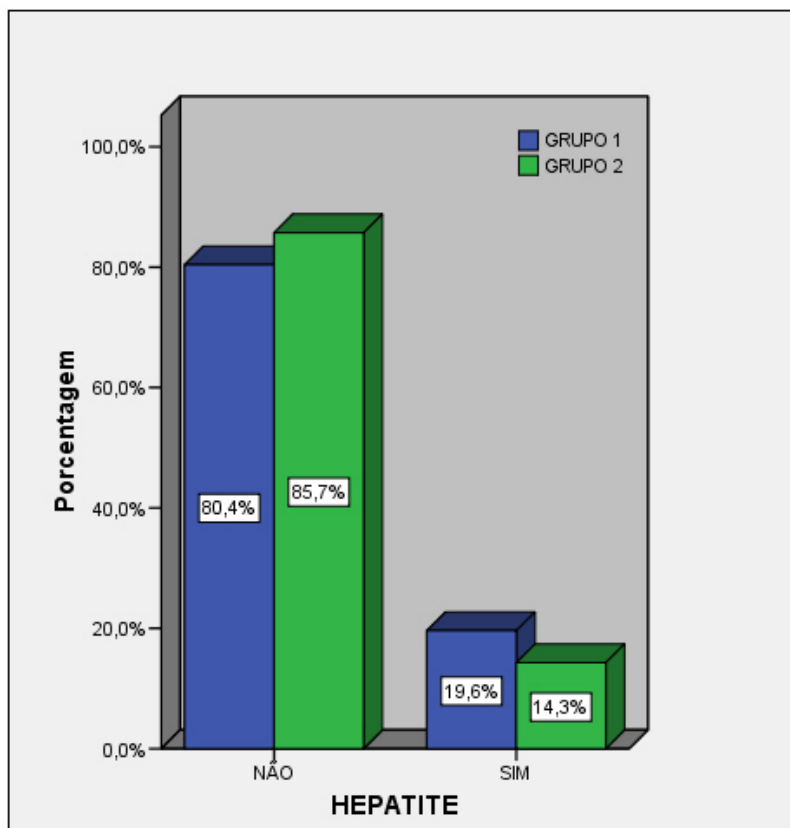


Figura 25 - Relação da hepatite por grupo.

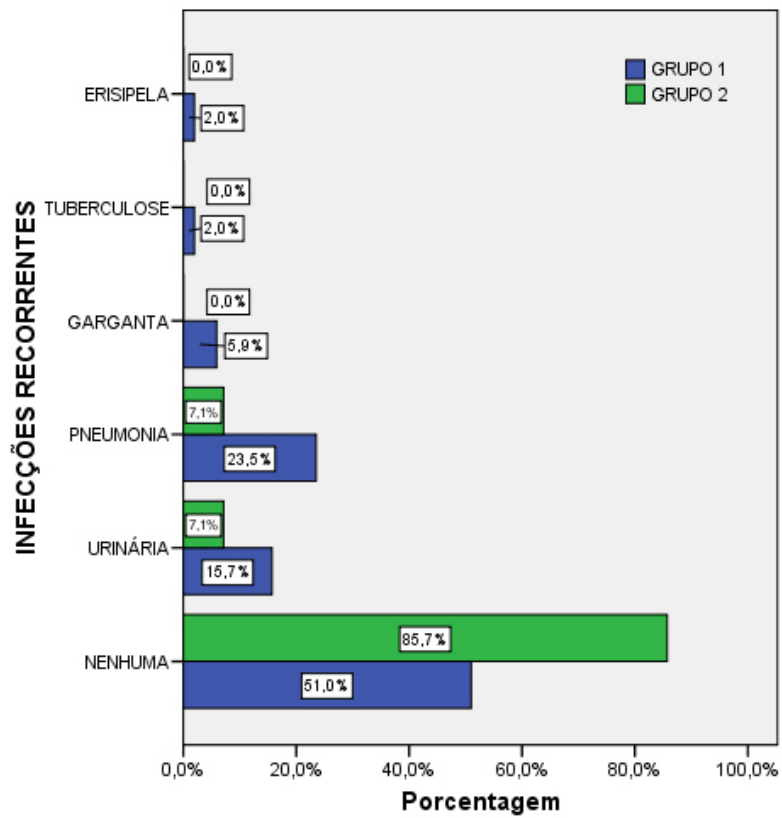


Figura 26 - Infecções recorrentes dos pacientes por grupo.

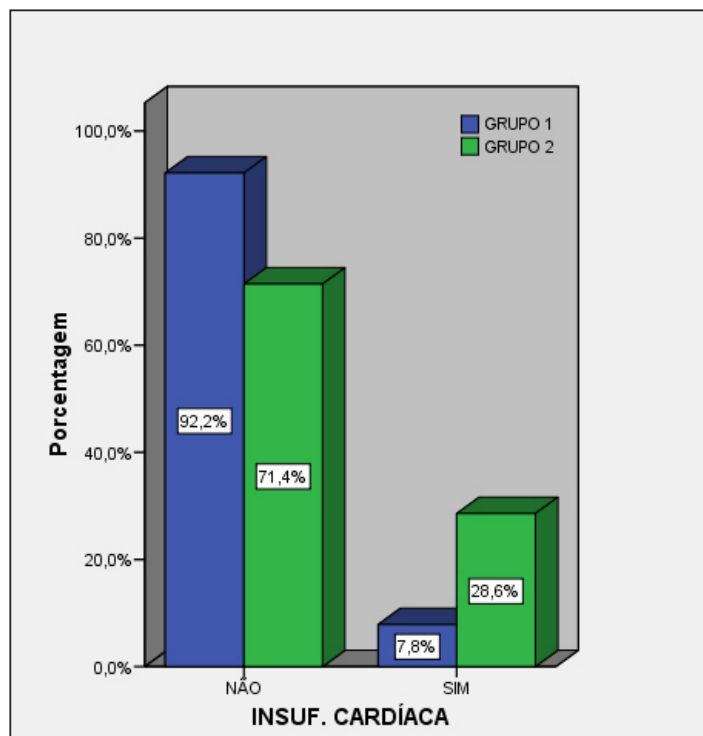


Figura 27 - Insuficiência cardíaca dos pacientes por grupo.

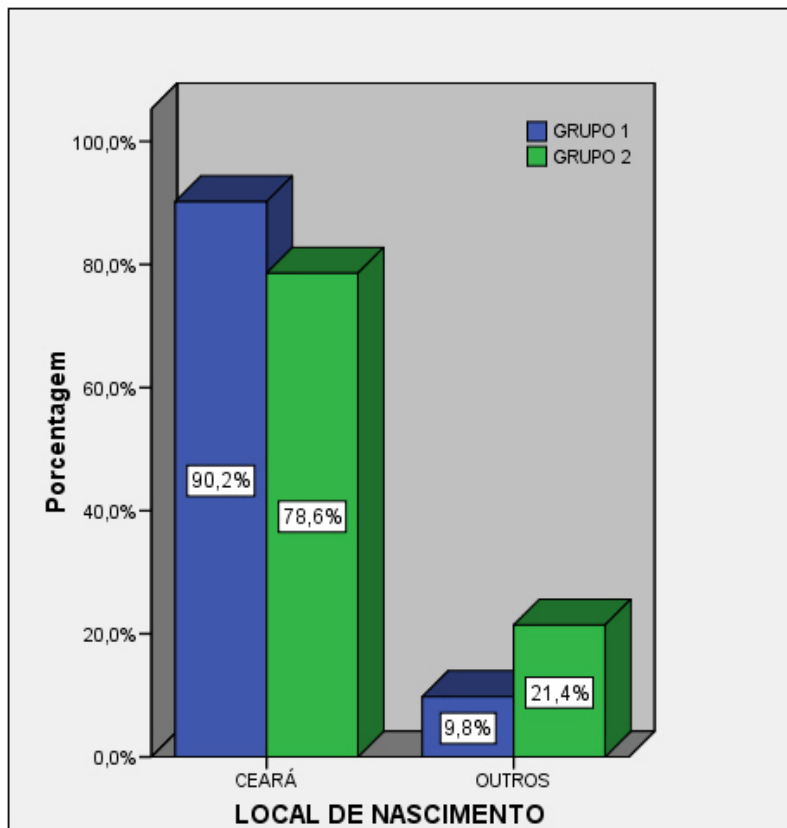


Figura 18 - Local de nascimento dos pacientes por grupo.

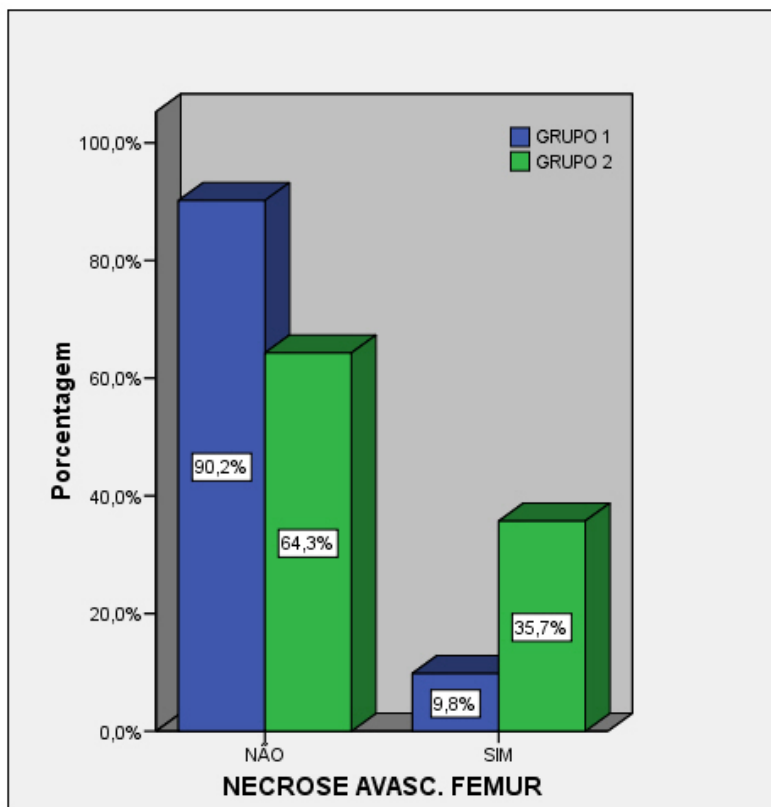


Figura 29 - Necrose avasc. femur dos pacientes por grupo.

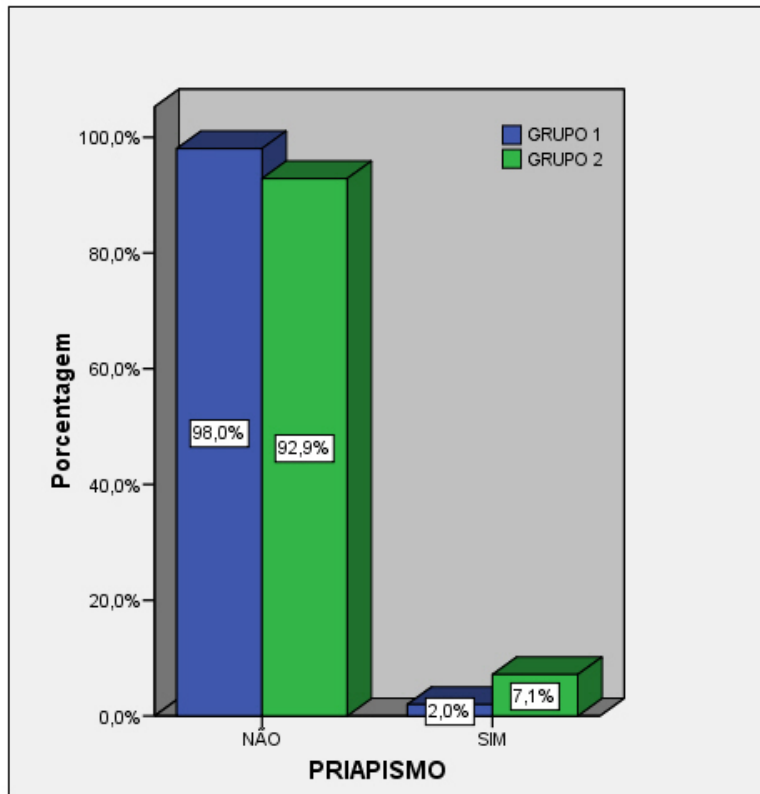


Figura 30 - Priapismo dos pacientes por grupo.

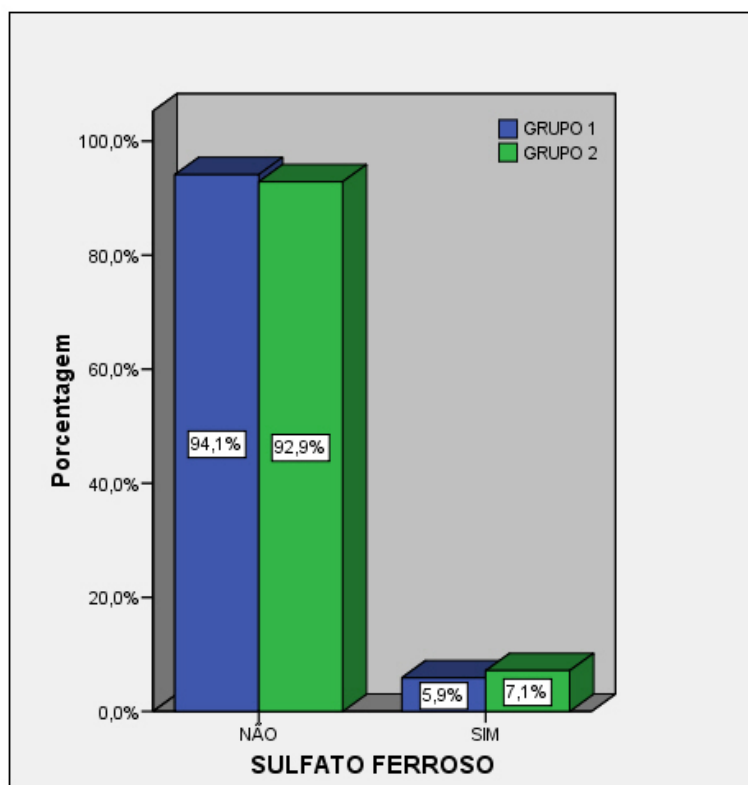


Figura 31 - Sulfato ferroso dos pacientes por grupo.

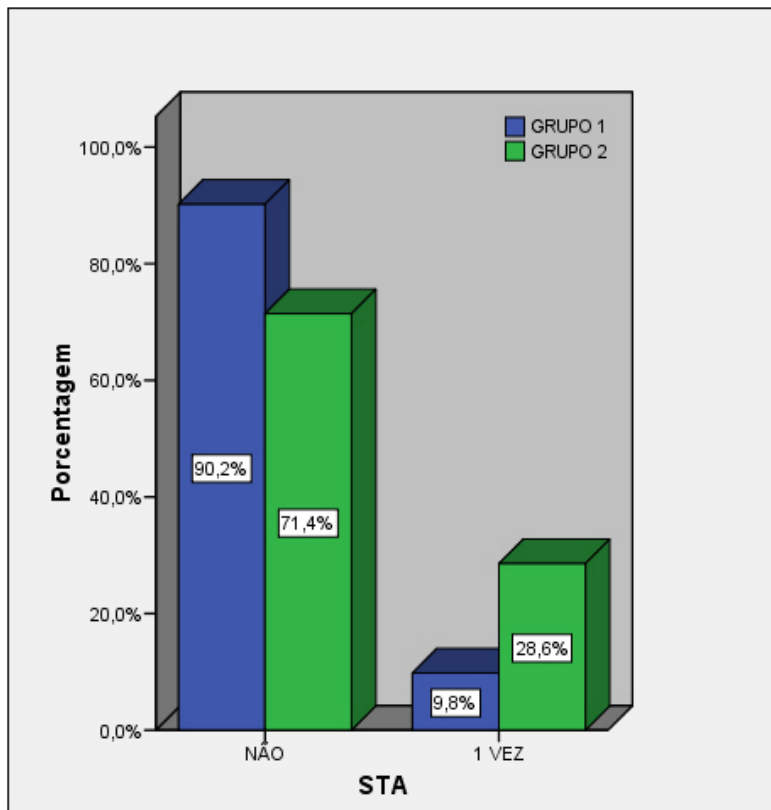


Figura 32 - STA dos pacientes por grupo.

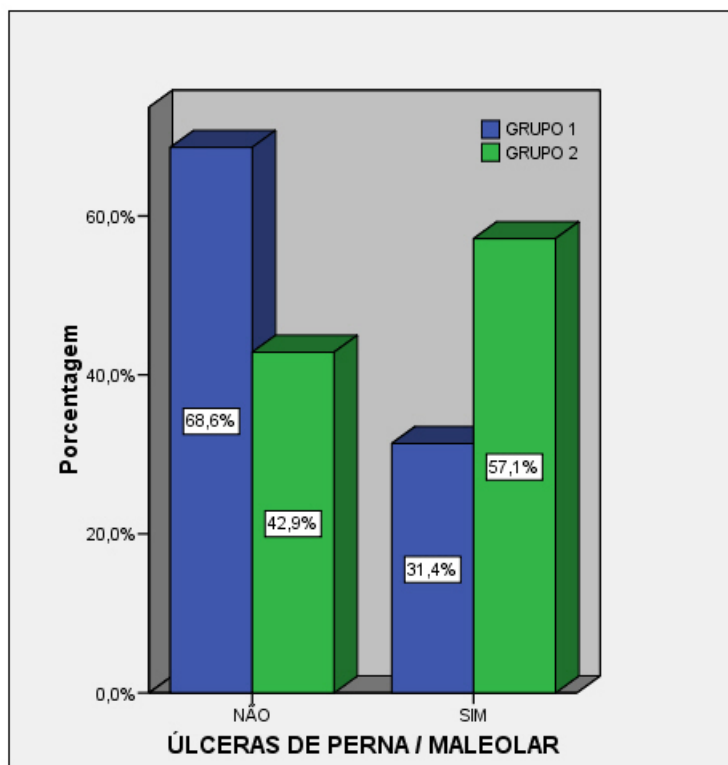


Figura 33 - Úlceras de perna/ Maleolar dos pacientes por grupo.

ANEXO B

PACIENTE Grupo I	LDH (U/L)	Hb FETAL (%)	Hb (g/dl)	[CONCENTRAÇÃO] NITRITO (NO) μ M	[CONCENTRAÇÃO] TBARS (MDA) absorbance at 535nm
1	801	14,4	9,78	2,373377	0,616666667
2	481	5,3	10,6	13,04503	0,900333333
3	689	7,7	7,79	14,26079	0,525333333
4	1371	0,4	8,21	38,44086	0,638666667
5	721	17,5	10,7	67,88921	0,469666667
6	1651	0,6	7,78	106,2531	0,516
7	809	8,3	9	56,40706	0,599666667
8	641	10	9,9	5,885566	0,679
9	681	13	7,18	18,85365	0,684666667
10	753	NA	8,09	14,53096	0,416
11	1307	6,6	8,66	16,28705	0,519333333
12	785	3,8	8	36,81985	0,541666667
13	529	7,2	9,6	14,1257	0,443333333
14	296	3,4	9,21	21,69042	0,519666667
15	665	13,5	7,22	11,15385	0,631666667
16	1050	NA	8,06	10,07318	0,520666667
17	577	7,2	8,54	6,155734	0,464
18	745	6	8,54	10,7486	0,54
19	1186	NA	6,42	8,181997	0,562
20	1170	8,8	8,02	7,64166	0,501
21	873	13	8,11	11,69419	0,386
22	881	5	8,51	8,992503	0,61
23	472	9,1	9,68	10,61351	0,479
24	929	6,3	9,97	4,804893	0,492666667
25	1106	5,2	6,46	21,28517	0,237
26	1098	4,1	9,23	26,28328	0,482333333
27	609	1,6	10,6	16,96247	0,638333333
28	1114	NA	8,76	14,26079	0,472666667
29	857	1,1	8,14	27,09378	0,497666667
30	833	NA	7,7	29,5253	0,454666667
31	705	15,8	7,67	20,74483	0,516333333
32	1315	17,5	6,85	9,938091	0,447
33	521	5,7	8,2	16,28705	0,492
34	817	2,7	10,9	58,56841	0,555
35	464	NA	NA	8,452167	0,279
36	737	3,7	7,66	4,129471	0,347
37	673	NA	NA	113,5477	0,277666667
38	481	NA	NA	180,6845	0,295
39	953	NA	NA	5,615397	0,255333333
40	657	NA	8,76	12,77486	0,328666667
41	617	NA	NA	3,589134	0,321333333
42	953	5,6	10,8	10,7486	0,253

PACIENTE Grupo I	LDH (U/L)	Hb FETAL (%)	Hb (g/dl)	[CONCENTRAÇÃO] NITRITO (NO) µM	[CONCENTRAÇÃO] TBARS (MDA) absorbance at 535nm
43	849	1,9	8,47	11,28893	0,283
44	1170	NA	NA	42,76355	0,332
45	336	NA	NA	22,90617	0,652666667
46	817	2,4	8,83	27,36395	0,445
47	1130	NA	NA	46,41083	0,551666667
48	609	NA	NA	36,00935	0,468333333
49	681	7	6,42	15,34146	0,473333333
50	913	2	8,11	8,722334	0,445333333
51	1002	8,1	7,35	5,750482	0,425

PACIENTE Grupo II	LDH (U/L)	HbF (%)	Hb (g/dl)	[CONCENTRAÇÃO] NITRITO (NO) μM	[CONCENTRAÇÃO] TBARS (MDA) absorbance at 535nm
1	1002	8,3	8,46	7,506577	0,233
2	649	NA	9,41	31,82173	0,560333333
3	448	10,7	10,6	4,939977	0,482
4	937	35,8	9,69	27,09378	0,486
5	448	28,5	11,6	31,95682	0,45275
6	873	13,4	7,83	6,155734	0,607
7	745	10,8	8,54	9,262671	0,657333333
8	1234	2,3	7,78	29,93055	0,627
9	761	NA	8,04	3,724219	0,616
10	408	13	8,46	5,345229	0,619666667
11	969	12,5	7,8	2,373377	0,666333333
12	761	30,2	2,87	19,2589	0,591
13	889	5,3	8,14	2,508461	0,594666667
14	1138	7,5	7,3	20,87991	0,557666667

PACIENTE Grupo III	LDH (U/l)	[CONCENTRAÇÃO] NITRITO (NO) μM	[CONCENTRAÇÃO] TBARS (MDA) absorbance at 535nm
1	472	8,452167	0,666
2	296	13,45028	0,577
3	352	18,31331	0,728
4	256	4,804893	0,687
5	360	7,101324	0,782
6	352	16,42213	0,676
7	368	60,59467	0,706
8	352	24,93244	0,758
9	336	19,79924	0,675
10	392	2,508461	0,673
11	553	9,667924	0,79
12	328	47,89676	0,764
13	384	5,480314	0,68
14	392	8,181997	0,525
15	280	37,09002	0,739
16	392	10,07318	0,687
17	320	8,722334	0,51
18	376	3,048798	0,781
19	529	10,07318	0,685
20	368	14,53096	0,669

ANEXO C**Determinação da Desidrogenase Láctica LDH UV K 014**

Método Cinético

Princípio do Teste

Piruvato + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Lactato + NAD⁺

Características

- aplicável a vários tipos de analisadores automáticos e semi-automáticos
- linearidade: até 2000 U/L
- comprimento de onda: 340 nm
- tipos de amostra: soro, plasma-EDTA ou heparina
- número de testes:
60 Testes / 20 microlitros de amostra / 1,0 mL de Reagente de Trabalho
120 Testes / 10 microlitros de amostra / 0,5 mL de Reagente de Trabalho
- tempo de reação: 4 minutos

K014

REAGENTES -----Apresentação

Reagente No 1 - Substrato Tamponado-----1 x 54 mL

Reagente No 2 - Coenzima -----1 x 6 mL

ARMAZENAR DE 2 a 8 °C – ABRIGAR DA LUZ