



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Édis Belini Júnior

**ESTRESSE OXIDATIVO EM DOENTES FALCIFORMES:
INFLUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS E USO DE MEDICAÇÃO
ESPECÍFICA**

São José Do Rio Preto - SP
2010

Édis Belini Júnior

ESTRESSE OXIDATIVO EM DOENTES FALCIFORMES: INFLUÊNCIA
DOS HAPLÓTIPOS E USO DE MEDICAÇÃO ESPECÍFICA.

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos

São José Do Rio Preto – SP
2010

Belini Junior, Édis.

Estresse oxidativo em doentes falciformes: influência dos haplótipos e medicação específica / Édis Belini Júnior. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.

165 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Claudia Regina Bonini Domingos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobinopatia. 2. Sangue - Doenças. 3. Doença falciforme. 4. Estresse oxidativo. 5. Hidroxiureia. 6. Deferasirox. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 616.155

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Édis Belini Júnior

**ESTRESSE OXIDATIVO EM DOENTES FALCIFORMES: INFLUÊNCIA DOS
HAPLÓTIPOS E USO DE MEDICAÇÃO ESPECÍFICA.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Genética junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
Professora Doutora da Universidade Estadual Paulista, UNESP, São José do Rio Preto/SP

Prof^a. Dr^a. Dorotéia Rossi Silva Souza
Professora Doutora da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/ SP- FAMERP

Prof. Dr. Ivan de Lucena Angulo
Professor Doutor da Universidade de São Paulo - USP, Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto/SP

São José do Rio Preto, 23 de fevereiro de 2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do Ministério da Saúde e do CNPq.

Dedico este trabalho aos meus pais, Édis e Iris, por acreditarem em mim e em meus sonhos, pelo amor e responsáveis por tudo que sou hoje. Aos meus irmãos Leonardo e Glaucia, pelo apoio e carinho. À minha esposa, Juliana, pelo companheirismo, paciência, amor e por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha existência e por iluminar todos os meus passos.

*Aos meus pais, **Édis Belini e Iris M. S. Belini**, meus exemplos de vida, sempre presentes, me dando forças e por terem apoiado nas minhas escolhas.*

*À minha esposa, **Juliana R. G. Belini**, pela paciência, companheirismo, amor, compreensão e pelos momentos felizes que juntos compartilhamos.*

*Aos meus irmãos, **Leonardo Belini e Glaucia C. Belini Chaves**, pelo carinho, respeito e admiração. Ao meu cunhado, **Luis A. F. Chaves**, e a minha cunhada, **Isis A. Gonçalves**, pelos momentos de alegria, diversão e descontração.*

*Aos meus tios, **José A. A. Queiroz e Maria de Fátima Belini**, por terem sido meus pais “postiços” durante um período da minha vida me dando forças e carinho.*

*Aos membros da minha grande família, **avô Miguel, avó Maria, Tia Rô, Tio Rê, Tia Mara, Tio Toninho, Tio Edilson, Tia Zulmira, Tia Lourdes, Tia Celinha, Tio Osmar, Tio Tutu, Tia Elis, Tio Zé e Tia Marli**, aos meus primos, **Pedro, Ná, Lipão, Rayane, Guizão, Carolzinha, Elisangela, Élder, Dudu e Jú**, que mesmo distantes, sempre torceram e transmitiram sentimentos de carinho e amor.*

*Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), **Danilo, Gisele, Paula, Larissa, Tiago, Isabel, Carol, Eliane, Isabeth, Vinicius, Ítalo, Júlia, Lidiane, Haruo, Wilian, Isabela, Rafael, Marina, Carlos, João Vitor** e àqueles que passaram pelo laboratório, pelos momentos de discussão, aprendizagem, amizade e diversão.*

*À **Profa. Glória M. G. de Oliveira** pelo ensinamento, carinho e por ser responsável pelo meu primeiro contato na pesquisa científica.*

*Ao **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida e Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos** pela valorosa colaboração durante o exame de qualificação.*

Ao Dr. Octávio Ricci Júnior e Dr. Rodolfo D. Caçado que autorizaram as coletas de amostras dos doentes falciformes e toda equipe do Hemocentro de São José do Rio Preto e da Santa Casa de São Paulo, pois esse trabalho não poderia ter sido realizado sem a colaboração de todos vocês.

*A toda família Guimarães, **Rosenice, Leandro, Jaqueline, Nevilde e Ivan (in memorian)**, pelo carinho e atenção durante todos esses anos.*

*Aos meus amigos distantes geograficamente, **Humer, Nara, Renan, Juliana Ito, Flávio, André, Tião, Fabrício, PC, Leandro, Léo (moça), Carla, Gabi, Kido, Carina, Lucão, Thales, Gustavo, Mamede, Bruno, Fernanda, Danilo (Bad), Thiago (RRL), Caio e Paulão**, pela amizade de vários anos.*

*Aos Bonini-Domingos, **Luiz Henrique, Claudia, Ana Luiza, Ana Carolina, D. Nadir e Lucas**, pelos momentos de alegria, confiança, amizade e descontração.*

*Aos amigos, **Luciana S. Ondei, Paula J. A. Zamaro, Nelson C. T. Junior e Fabrício B. Teresa**, pela amizade e por terem contribuído nas análises laboratoriais e estatísticas deste estudo.*

Ao CNPq pela minha bolsa de estudos.

*Á minha orientadora **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, pela orientação, ensinamentos, apoio, amizade, carinho, por participar ativamente na minha formação profissional, ser a protagonista desta minha conquista e, principalmente, pela paciência.*

Sempre serei grato por tudo isso.

*"Se você quer ter boas idéias, você precisa ter muitas idéias.
A maioria delas estará errada, o que você precisa aprender é
quais delas devem descartar."*

(Linus Pauling)

Resumo

A causa principal da doença falciforme (DF) é uma mutação pontual no gene β globina que codifica uma hemoglobina (Hb) com características diferentes da Hb normal, denominada de Hb S. Sua fisiopatologia multifacetada envolve múltiplas alterações nos eritrócitos falcêmicos, episódios vaso-oclusivos, hemólise, ativação de mediadores inflamatórios, disfunção das células endoteliais e estresse oxidativo. Com isso, há uma diminuição do fluxo sanguíneo e obstrução da microcirculação acarretando aos portadores, anemia, crises de dor e insuficiência de múltiplos órgãos. Visto que o excesso de espécies reativas de oxigênio é citotóxico modificando vários mecanismos celulares e, conseqüentemente, ocasionando danos aos órgãos, pretendeu-se avaliar a capacidade antioxidante e o estresse oxidativo em DF, correlacionando com os genótipos da DF, haplótipos do *cluster* β globina e o uso de medicação específica. Em um estudo longitudinal, foram avaliadas, para o Tempo 1 (T1) de análise, 69 amostras de sangue e, para o Tempo 2 (T2), 55 amostras de DF do Hemocentro de São José do Rio Preto (SJRP) e do Hemocentro da Santa Casa de São Paulo (SP). As amostras foram submetidas a testes eletroforéticos, cromatográficos e moleculares para a identificação dos genótipos da DF e haplótipos do *cluster* β , bem como dosagens bioquímicas para determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC). Por meio da caracterização genotípica da DF, encontramos um maior número de Hb SS, tanto em SP quanto em SJRP. Houve maior frequência da interação Hb S/Beta talassemia em SJRP (10,9%) com as mutações características de países mediterrâneos como a CD39 e IVS-I-110. O haplótipo Bantu foi mais frequente nos dois grupos (60,6%); o haplótipo II esteve associado à mutação CD39 e o haplótipo I com a IVS-I-110. Encontramos um haplótipo Camarões, raro na população brasileira e 9,8% de haplótipos atípicos; destes, um com a presença do polimorfismo *XmnI*, conferindo ao portador 15,8% de Hb Fetal e manifestação clínica benigna. A melhor resposta ao uso de medicação/tratamento específico no processo oxidativo, tanto em T1 como em T2, foi o uso da hidroxiuréia (HU) associada ao deferasirox (DFX). Após a exposição média de 381,8 dias ao DFX, os pacientes sob terapia transfusional e uso de DFX, mostrou eficiência na quelação do ferro, diminuindo os valores do índice de saturação de transferrina ($p=0,001$), ferro sérico ($p=6 \times 10^{-4}$) e capacidade total de ligação do ferro ($p=0,01$), e como consequência, diminuindo a peroxidação lipídica ($p=0,04$). Os pacientes sem o uso de medicação específica apresentaram aumento da peroxidação lipídica ($p=0,03$) e diminuição da capacidade antioxidante ($p=0,02$) após a avaliação longitudinal. Ainda neste grupo, verificamos correlação linear positiva entre os valores de TBARS e a porcentagem de monócitos (T1: $r=0,81, p=0,02$ e T2: $r=0,82, p=0,02$) e, quanto maior os valores de TEAC maior o número de leucócitos (T1: $r=0,81, p=0,02$ e T2: $r=0,82, p=0,02$). O aumento dos valores do ferro sérico, nos pacientes transfundidos dentro de 60 dias, estão associados ao aumento de 35% ($p=0,02$ e $R^2=0,35$) nos valores de TBARS. Este estudo representa a primeira avaliação longitudinal do perfil oxidativo em pacientes com a DF considerando o genótipo, haplótipos e diferentes medidas terapêuticas para o tratamento da DF, no Brasil.

Palavras-chave: doença falciforme, TBARS, TEAC, hidroxiureia, deferasirox.

Abstract

The main cause of sickle cell disease (SCD) is a single β -globin gene mutation that encodes a hemoglobin (Hb) with different characteristics from normal Hb, called Hb S. This disease is characterized by presenting a multifaceted pathophysiology which involves multiple changes in sickle erythrocytes, vaso-occlusive episodes, hemolysis, inflammatory mediators activation, oxidative stress and endothelial cells dysfunction. Thereby, there is a decrease in blood flow and obstruction of the microcirculation leading the patients to anemia, pain crises and failure of multiple organs. Since the excess of reactive oxygen species is cytotoxic, modifying various cellular mechanisms, and thus, causing damage to organs, the aim of this work was to assess the antioxidant capacity and oxidative stress in SCD, correlating with SCD genotypes, cluster β -globin haplotypes and specific medication. In a longitudinal study were evaluated for the T1: 69 samples of peripheral blood, and for the T2: 55 samples of the SCD patients from Blood Center of the São José do Rio Preto (SJRP) and the Blood Center of the Santa Casa Medical School of São Paulo (SP). We performed electrophoretics, chromatographic and molecular assays for SCD genotypes and cluster β -globin identification, such as biochemical measurements for the determination of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and Trolox equivalence antioxidant capacity (TEAC). Through SCD genetic characterization, we found a greater number of Hb SS in both SP and in SJRP. There was a higher frequency of interaction Hb S/Beta-thalassemia in SJRP (10.9%) with typical mutation of Mediterranean countries such as CD39 and IVS-I -110. The Bantu haplotype was more frequent in both groups (60.6%); the haplotype II was associated with CD39 mutation and the haplotype I with the IVS-I-110. We found a patient with Cameroon haplotype, rare in the Brazilian population; and 9.8% of evaluated samples to showed atypical haplotypes, one of them with *XmnI* polymorphism, giving to the patient 15.8% of Hb Fetal and minimal clinical manifestations. The best response to medication / treatment specific to the oxidative process in both T1 and T2, was the use of hydroxyurea (HU) associated with deferasirox (DFX). Patients undergoing transfusion therapy and the use of DFX, after the average exposure of 381.8 days to DFX, showed a decrease to values of transferrin saturation index ($p=0.001$), serum iron ($p=6 \times 10^{-4}$) and total iron binding ($p=0.01$), and as result, decreasing of lipid peroxidation ($p=0.04$). Patients without the use of specific medication showed a increase in lipid peroxidation ($p=0.03$) and decrease in antioxidant capacity ($p=0.02$) after the longitudinal evaluation. Also in this group, we found positive linear correlation between the values of TBARS and the percentage of monocytes (T1: $r=0.81$, $p=0.02$ and T2: $r=0.82$, $p=0.02$); and the higher TEAC values, greater the number of leukocytes (T1: $r=0.81$, $p=0.02$ and T2: $r=0.82$, $p=0.02$). The serum iron increase in transfused patients within 60 days, are associated with an increase of 35% ($p=0.02$ and $R^2=0.35$) in TBARS values. This study represents the first longitudinal evaluation of oxidative profile in patients with DF considering genotype, haplotypes and different therapeutic approach for the treatment of DF, Brazil.

Key-words: sickle cell disease, TBARS, TEAC, hydroxyurea, deferasirox.

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Alteração na membrana eritrocitária por polímeros de hemoglobina falcêmica	22
FIGURA 2. Relação da hemólise com a disfunção endotelial na doença falciforme	23
FIGURA 3. <i>Cluster</i> β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S segundo Sutton, Bouhassira, Nagel, (1989)	27
FIGURA 4. <i>Cluster</i> β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^{Tal} segundo Orkin et al. (1982).	27
FIGURA 5. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene β globina e dos sítios específicos para a enzima <i>Dde</i> I.	51
FIGURA 6. Foto de um gel de agarose a 1,5%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para Hb S.	51
FIGURA 7. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene β globina para a mutação S e/ou C.	53
FIGURA 8. Foto de um gel de agarose a 2,0%, com iluminação UV. PCR-AE para Hb S e Hb C.	53
FIGURA 9. Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene β globina para a mutação CD39	55
FIGURA 10. Foto de um gel de agarose a 2,0 %, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-AE para detecção da mutação CD39	56
FIGURA 11. Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene β globina para a mutação IVS-I-110	57
FIGURA 12. Foto de um gel de agarose a 2,0 %, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-AE para detecção da mutação IVS-I-110	58
FIGURA 13. Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> no gene β globina para a mutação IVS-I-6	59
FIGURA 14. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR–AE para a mutação IVS-I-6	60
FIGURA 15. Representação da localização dos <i>primers</i> no gene β globina para a mutação IVS-I-1.	61
FIGURA 16. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR –AE para a mutação IVS-I-1	62
FIGURA 17. Comparação dos valores de TBARS entre os genótipos e localidade dos doentes falciformes no Tempo 1 de análise.	83
FIGURA 18. Comparação dos valores de TEAC entre os genótipos e localidade dos doentes falciformes no Tempo 1 de análise.	83
FIGURA 19. Valores médios de TBARS entre as localidades e tipo de medicação/tratamento no Tempo 1 de análise.	87
FIGURA 20. Valores médios de TEAC entre as localidades e tipo de medicação/tratamento no Tempo 1 de análise.	87

FIGURA 21. Correlação entre o número total de leucócitos e capacidade antioxidante nos doentes falciformes sem medicação específica de São José do Rio Preto.	89
FIGURA 22. Correlação entre a porcentagem de monócitos e peroxidação lipídica nos doentes falciformes sem medicação específica de São Paulo.	89
FIGURA 23. Valores médios de TBARS entre as localidades e tipo de medicação/tratamento no Tempo 2 (T2) de análise.	96
FIGURA 24. Valores médios de TEAC entre as localidades e tipo de medicação/tratamento no Tempo 2 (T2).	96
FIGURA 25. Correlação entre o número total de leucócitos e capacidade antioxidante nos doentes falciformes sem medicação específica do Tempo 2 (T2) de São José do Rio Preto.	97
FIGURA 26. Correlação entre a porcentagem de monócitos e peroxidação lipídica nos doentes falciformes sem medicação específica de São Paulo do Tempo 2 (T2) de análise.	98
FIGURA 27. Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) em doentes falciformes classificados de acordo com o número de episódios de dor/ano nos últimos 3 anos.	100
FIGURA 28. Avaliação da peroxidação lipídica entre os dois períodos de estudo, T1 e T2.	101
FIGURA 29. Avaliação da capacidade antioxidante entre os dois períodos de estudo, T1 e T2.	102
FIGURA 30. Perfil leucocitário dos doentes falciformes no T1 e no T2 separados de acordo com o tipo de tratamento/medicação específica.	103
FIGURA 31. Perfil do ferro nos doentes falciformes comparado dentro e entre os dois períodos de estudo.	104

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1. Sequências dos <i>primers</i> e o tamanho dos fragmentos amplificados na reação de PCR-AE para a identificação da Hb S e Hb C	52
TABELA 2. Sequências dos <i>primers</i> e o tamanho dos fragmentos amplificados na reação de PCR-AE para a identificação da mutação CD39	54
TABELA 3. Componentes das reações com as concentrações dos reagentes utilizadas em cada “mix” para a mutação CD39.	55
TABELA 4. Sequências dos <i>primers</i> e o tamanho dos fragmentos amplificados na reação de PCR-AE para a identificação da mutação IVS-I-110.	56
TABELA 5. Componentes das reações com as concentrações dos reagentes utilizadas em cada “mix” para a mutação IVS-I-110	57
TABELA 6. Componentes das reações com as concentrações dos reagentes utilizadas em cada “mix” para a mutação IVS-I-6.	59
TABELA 7. Componentes das reações com as concentrações dos reagentes utilizadas em cada “mix” para a mutação IVS-I-1.	61
TABELA 8. <i>Primers</i> utilizados para amplificação de regiões do <i>cluster</i> β .	63
TABELA 9. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β	63
TABELA 10. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina β .	64
TABELA 11. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.	64
TABELA 12. Caracterização genotípica dos portadores para a DF no grupo de estudo.	72
TABELA 13. Distribuição dos alelos mutantes encontrados no grupo de estudo.	72
TABELA 14. Dados hematológicos distribuídos por localidade e pelo genótipo da doença falciforme.	74
TABELA 15. Comparação dos dados hematológicos entre os genótipos da doença falciforme e localidade	74
TABELA 16. Contagem diferencial de leucócitos em doentes falciformes de São Paulo.	75
TABELA 17. Comparação do perfil do ferro dentro e após o intervalo de 60 dias da data da última transfusão.	76
TABELA 18. Caracterização dos alelos atípicos dos haplótipos β^S e β^{Tal} .	77
TABELA 19. Frequência dos haplótipos β^S / β^S por localidade e no total dos pacientes.	78
TABELA 20. Frequência dos haplótipos β^S / β^{Tal} .	78
TABELA 21. Frequência dos alelos β^S e β^{Tal} encontrados no grupo de estudo.	79
TABELA 22. Concentração de Hb F de acordo com os haplótipos e uso de hidroxiureia, nos DF de ambas as localidades.	80
TABELA 23. Análise da interferência dos haplótipos na expressão da Hb F.	81
TABELA 24. Análise da interferência da hidroxiureia na expressão de Hb F entre os haplótipos.	81
TABELA 25. Análise de regressão linear simples entre os valores de ferritina e os índices do estado oxidativo em doentes falciformes de SJRP.	84

TABELA 26. Análise de regressão linear simples entre os parâmetros de ferro e os índices do estado oxidativo em doentes falciformes de SP	85
TABELA 27. Avaliação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante nos doentes falciformes de acordo com a medição/tratamento e localidade.	86
TABELA 28. Correlação entre o número de leucócitos totais e TBARS e TEAC dentro de cada subgrupo.	88
TABELA 29. Correlação entre a porcentagem de monócitos, TBARS e TEAC nos pacientes de SP.	89
TABELA 30. Correlação entre o número de plaquetas e TBARS e TEAC dentro de cada subgrupo para uso de medicação.	91
TABELA 31. Análise do TBARS entre os haplótipos, com e sem o uso de hidroxiureia, e dentro do mesmo haplótipo com e sem o uso da hidroxiureia.	91
TABELA 32. Análise do TEAC entre os haplótipos, com e sem o uso de hidroxiureia, e dentro do mesmo haplótipo com e sem o uso da hidroxiureia.	92
TABELA 33. Caracterização do número de doentes falciformes envolvidos no T1 e no T2, reparados pelo genótipo e localidade.	92
TABELA 34. Número de leucócitos e de plaquetas distribuídos por localidade e pelo genótipo da doença falciforme.	93
TABELA 35. Comparação do número de leucócitos e de plaquetas entre os genótipos da doença falciforme e localidade.	93
TABELA 36. Análise do perfil do ferro e estado oxidativo dos pacientes transfundidos dentro e acima de 60 dias.	94
TABELA 37. Avaliação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante nos doentes falciformes de acordo com a medição/tratamento e localidade do Tempo 2 (T2) de análise.	95
TABELA 38. Correlação entre o número de leucócitos totais e TBARS e TEAC dentro de cada subgrupo no Tempo 2 (T2).	97
TABELA 39. Correlação entre a porcentagem de monócitos, TBARS e TEAC nos pacientes de SP do Tempo 2.	98
TABELA 40. Aspectos clínicos da Doença Falciforme nos pacientes de São Paulo e São José do Rio Preto.	100

LISTA DE ABREVIATURAS

Hb	hemoglobina
et al.	e outros
OMS	Organização Mundial da Saúde
2,3-BPG	2,3-bifosfoglicerato
Hb S	hemoglobina S (falcêmica)
Hb A	hemoglobina A (normal)
Hb F	hemoglobina fetal
CD36	proteína de membrana (<i>Cluster of Differentiation 36</i>)
CD47	proteína de membrana (<i>Cluster of Differentiation 47</i>)
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular - 1
NO	óxido nítrico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DF	doença falciforme
Hb SS	homozigoto para a Hb S (anemia falciforme)
Hb SC	duplo heterozigoto para a Hb S e Hb C
Hb S/beta	interação Hb S e beta talassemia
CAR	República Centro Africana ou Bantu
SAUDI	Índia-Arábia Saudita
CAM	Camarões
AVC	Acidente Vascular Cerebral
DTC	doppler transcraniano
STA	Síndrome Torácica Aguda
ERO	espécie reativa de oxigênio
ERN	espécie reativa de nitrogênio
CAT	enzima catalase
GPx	enzima peroxidase
GSTs	glutathiona S-transferase
SOD	superóxido dismutase
MDA	malondialdeído
HU	hidroxiureia
DFO	deferroxamina
DFP	deferiprona

DFX	deferasirox
TEAC	capacidade antioxidante em equivalência ao trolox
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
EDTA	Ácido etinoadaminotetracético
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
TEB	Tris-EDTA-Borato
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
pb	pares de base
UV	ultravioleta
TBA	ácido tiobarbitúrico
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
SDS	dodecil sulfato de sódio
VCM	volume corpuscular médio
HCM	hemoglobina corpuscular média
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular
NTBI	ferro não ligado a transferrina (<i>non-transferrin-bound iron</i>)
LPI	ferro lábil no plasma (<i>labile plasma iron</i>)

LISTA DE SIMBOLOS

α	gene alfa
ζ	gene zeta
ε	gene epsílon
γ^G	gene gama glicina
γ^A	gene gama alanina
δ	gene delta
β	gene beta
CD39	códon 39
β^+	beta mais talassemia
β^0	beta zero talassemia
β^S	gene beta S mutante
β^{Tal}	gene beta talassêmico
$O_2^{\cdot-}$	radical superóxido
$\cdot OH$	radical hidroxil
RO_2^{\cdot}	radical peroxil
RO^{\cdot}	radical alcoxil
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HOCl	ácido hipocloroso
O_3	ozônio
mM/L	mili molar por litro
ng/mL	nanograma por mililitro
g/dL	gramas por decilitro
μL	microlitro
NaCl	cloreto de sódio
Na_2HPO_4	fosfato de sódio dibásico anidro
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	fosfato de Sódio monobásico Monohidratado
$MgCl_2$	cloreto de magnésio

SUMÁRIO

1 Introdução	19
1.1 Hemoglobinopatias Hereditárias	19
1.2 Hemoglobinas Variantes	20
1.3 Hemoglobina S	21
1.4 Doença Falciforme	23
1.5 Talassemias	24
1.6 Interação S/ β talassemia	25
1.7 Haplótipos β^S e β^{Tal}	26
1.8 Complicações clínicas na doença falciforme	28
1.9 Estresse Oxidativo	32
1.10 Processo oxidativo na doença falciforme	33
1.11 Terapia para as doenças falciformes	34
2. Objetivos	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. Material e Método	41
3.1 Casuística	41
3.2 Considerações Éticas	42
3.3 Análises Estatísticas	42
3.4 Método	43
4. Resultados	72
4.1 Genotipagem do grupo de Doentes Falciformes	72
4.2 Identificação dos Haplótipos do <i>cluster</i> β	77
4.3 Avaliação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante	82
4.3.1 Tempo 1 (T1) de análise	82
4.3.2 Tempo 2 (T2) de análise	92
4.4 Comparação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante entre o Tempo 1 (T1) e Tempo 2 (T2) de análise	99
5. Discussão	106
6. Conclusões	115
7. Referências	117
APÊNDICE A- ARTIGOS	133
APÊNDICE B-PLANILHAS	154
APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO	162
APÊNDICE D- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	164

1 Introdução

1 Introdução

1.1 Hemoglobinopatias Hereditárias

A hemoglobina (Hb) humana é uma proteína globular tetramérica formada pela combinação de duas cadeias polipeptídicas (globinas) do “tipo alfa” com duas cadeias do “tipo beta”. Cada globina está associada a um grupo prostético heme que contém o ferro, o qual se liga reversivelmente ao oxigênio conferindo à molécula sua capacidade de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do gás carbônico no sentido inverso (HONIG; ADAMS III, 1986; ZAGO; FALCÃO; PAQUINI, 2004).

Os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas estão organizados em famílias gênicas (*clusters*), o *cluster* α , localizado na região telomérica do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3), possui os genes α e ζ que codificam as globinas alfa e zeta; o *cluster* β , localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5), constituído pelos genes ϵ , γ , δ e β e que sintetizam as globinas épsilon, gama, delta e beta. (HONIG; ADAMS III, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A expressão dos genes da globina em cada etapa do desenvolvimento resulta em diferentes tetrâmeros funcionais. Na fase embrionária são formadas as Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$), Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$) e Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$); estas são substituídas pela Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), predominante durante todo o período fetal. Por ocasião do nascimento, a Hb F, gradativamente, é substituída pelas hemoglobinas do adulto, Hb A ($\alpha_2\beta_2$), majoritária, e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$), minoritária (WEATHERALL; CLEGG, 1981; BUNN; FORGET, 1986). Seis meses após o nascimento, a Hb A é absolutamente predominante, compondo 96 – 98% do total de Hb, enquanto a Hb A₂ se mantém entre 2,5 – 3,5%, e a Hb Fetal 0 – 1% (HONIG; ADAMS III, 1986; NAOUM, 1997).

As mutações que afetam a expressão dos genes da Hb normal humana levam às hemoglobinopatias. Estas alterações, de forma geral, podem originar as hemoglobinas variantes, que alteram a estrutura da proteína, ou as talassemias que ocasionam um desequilíbrio quantitativo nas cadeias globínicas (BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

As hemoglobinopatias hereditárias representam um grupo de alterações autossômicas e monogênicas que estão entre as doenças mais comumente encontradas nas populações (OLD, 2007). Atualmente, 1.423 diferentes alelos mutantes caracterizados em nível molecular já foram descritos, mas a maioria não apresenta fenótipos com repercussões clínicas. Para

aqueles mutantes que possuem fisiopatologia, os efeitos são diversos, dependentes do tipo de herança, homo ou heterozigota, e também das interações genéticas ou ambientais, com consequências que vão de imperceptíveis às letais (LEONELI et al., 2000; HUISMAN et al., 2010).

A distribuição mundial das hemoglobinopatias está bem definida, porém dúvidas existem sobre a sua frequência (WEATHERALL, 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem estimado que cerca de 7% da população mundial sejam portadores para uma alteração de Hb, cerca de 270 milhões de indivíduos. Baseado nesta estimativa, aproximadamente 0,5 milhões de crianças nascem por ano com algum tipo de alteração grave nas cadeias globínicas (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

1.2 Hemoglobinas Variantes

As Hb variantes ou hemoglobinopatias estruturais são, geralmente, originadas por mutações pontuais, nas quais, substituições simples de nucleotídeos, pequenas inserções ou deleções de bases afetam as regiões codificantes dos genes e resultam na substituição de aminoácidos na cadeia polipeptídica (BONINI-DOMINGOS, 1993).

As alterações estruturais associadas a manifestações clínicas e/ou hematológicas têm seu grau de expressão intimamente relacionado ao local e à extensão da mutação. As substituições de aminoácidos que ocorrem na porção externa da molécula de Hb, não resultam em alterações significativas no comportamento funcional da molécula, com exceção da Hb S; as mutações que alteram os resíduos de aminoácidos nas porções internas envolvendo a região em torno do grupo heme causam instabilidade da molécula, geralmente, iniciada pela oxidação do grupo heme. Outras substituições em resíduos que participam dos contatos alfa1 beta1, das ligações químicas com o 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) e do resíduo histidina C-terminal da cadeia beta, provocam a formação de Hb com alterações na afinidade pelo oxigênio (WEATHERALL; CLEGG, 2001b; ONDEI, 2005).

Portanto, as hemoglobinas variantes podem ser classificadas com base em suas características funcionais em: hemoglobinas sem alterações fisiológicas – maioria das variantes; hemoglobinas de agregação, como Hb S e Hb C; hemoglobinas instáveis; hemoglobinas com alterações funcionais; hemoglobinas variantes com fenótipo talassêmico, como as Hb Lepore e Constant Spring (INTERNACIONAL HEMOGLOBIN INFORMATION CENTER, 1997).

Um grande número de Hb variantes tem sido descoberto devido às melhorias nas metodologias de análises. A maioria delas não apresenta alterações fisiológicas quando em heterozigose, no entanto podem apresentar sintomas graves em homozigose ou quando associadas à outra hemoglobinopatia (WACJMAN et al., 2001)

No Brasil, a Hb variante mais frequente é a Hb S, que dependendo dos grupos étnicos formadores de cada região, apresenta prevalência variável nas diferentes regiões do Brasil (ZAGO; COSTA, 1985).

1.3 Hemoglobina S

A Hb S é resultado de uma mutação pontual do tipo transversão, em que há a troca de uma base purínica (adenina) por uma pirimídica (timina) no códon seis do gene β globina que corresponde ao sexto aminoácido. Devido a esta mutação, o aminoácido ácido glutâmico é substituído por uma valina na cadeia beta globina, originando uma Hb com características físicas e bioquímicas alteradas (STEINBERG, 1998).

Em condições de hipóxia, desidratação ou acidose a Hb S polimeriza e caracteriza o primeiro evento indispensável na patogênese molecular da anemia falciforme (STEINBERG, 1999). As moléculas de Hb S se agregam e formam longos filamentos organizados paralelamente. Estes feixes de polímeros alongam-se e rompem a ligação da membrana do eritrócito com proteínas do citoesqueleto resultando em protrusões na membrana (VEKLOV, 2007; ZAGO; PINTO, 2007). Com isso, a polimerização da Hb S dentro das hemácias tem como consequência múltiplas alterações da célula: efluxo de íons monovalentes como o potássio, desidratação celular, aumento da densidade dos eritrócitos, oxidação da Hb (formação de metehemoglobina e superóxido), desnaturação da Hb (formação de hemicromos, heme livre e ferro livre), exposição de epítomos protéicos e lipídicos (por exemplo: banda 3, espectrina, fosfatilserina, CD36, CD47) e por fim a hemólise (Figura 1) (ZAGO; PINTO, 2007; FRENETE; ATWEH, 2007).

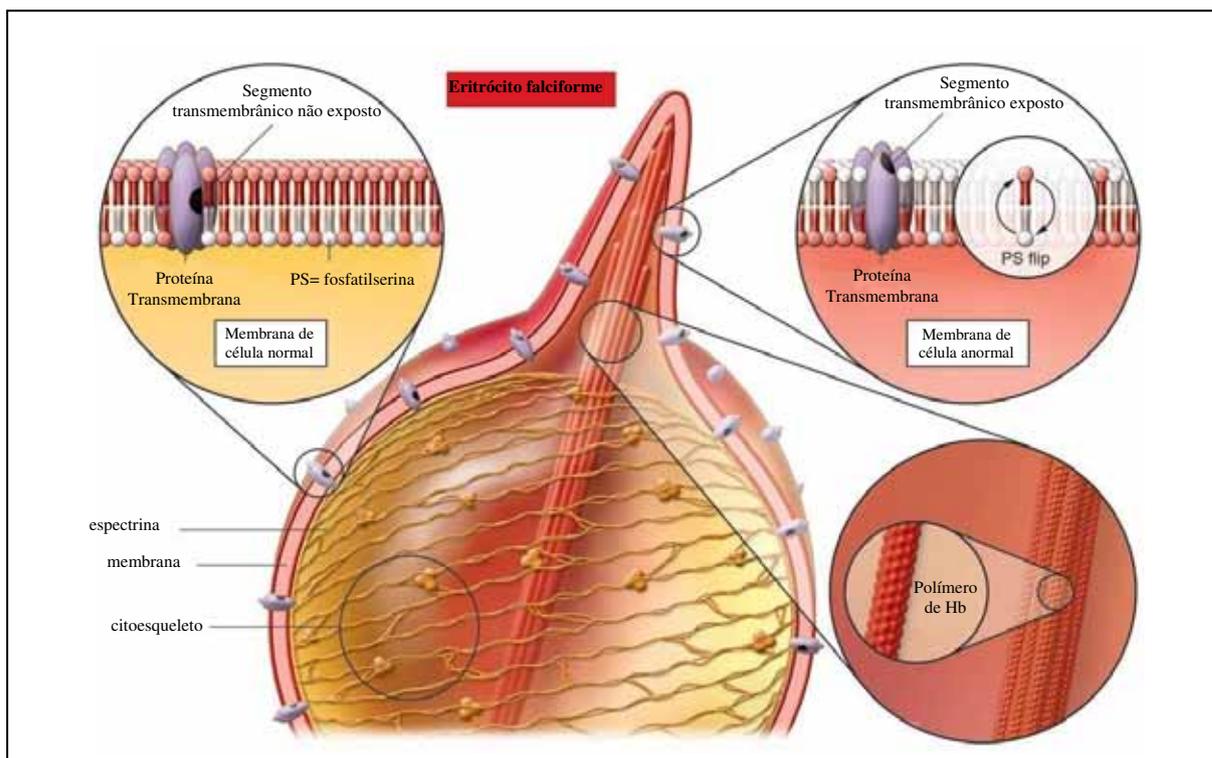


Figura 1. Alteração na membrana eritrocitária por polímeros de hemoglobina falcêmica. A desoxigenação induz uma mudança na conformação estrutural da proteína em que as cadeias globínicas β mutante se ligam ao sítio hidrofóbico complementar originado pela substituição do ácido glutâmico pela valina. Os feixes de polímeros de Hb S alongam-se e rompem a ligação da membrana do eritrócito com proteínas do citoesqueleto resultando em protrusões na membrana e exposição de proteínas e lipídios (modificado de FRENETE; ATWEH, 2007).

Estudos recentes têm revelado que a fisiopatologia da anemia falciforme é complexa e estão envolvidos processos recorrentes de vaso-oclusão, ativação de leucócitos, de células endoteliais, de plaquetas, indução de mediadores inflamatórios, diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e estresse oxidativo. Desta forma, há uma diminuição do fluxo sanguíneo e obstrução da microcirculação acarretando aos portadores manifestações clínicas como: anemia, episódios de crises de dor, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral, insuficiência de múltiplos órgãos e menor expectativa de vida (WOOD; GRANGER, 2007; CONRAM; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009).

Algumas das vias ativadas na doença falciforme podem ser observadas na Figura 2 que demonstram a relação da hemólise com a disfunção endotelial e suas implicações na manifestação clínica do portador.

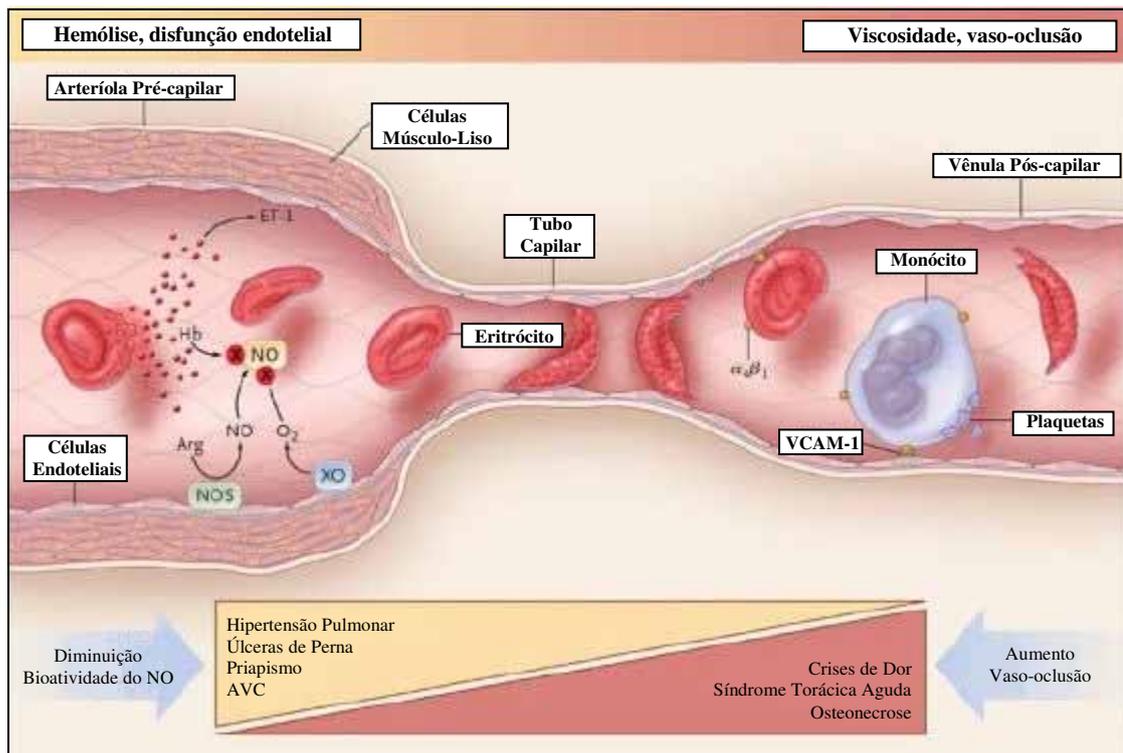


Figura 2. Relação da hemólise com a disfunção endotelial na doença falciforme. Algumas das vias incluem: a hemólise intravascular, o consumo de óxido nítrico (NO), a ativação endotelial, oclusão microvascular, ativação de moléculas de adesão ao endotélio, recrutamento de leucócitos e plaquetas. Portanto, quanto mais grave a anemia hemolítica maior chance do portador desenvolver hipertensão pulmonar, úlceras de perna, priapismo e acidente vascular cerebral e, aqueles com anemia hemolítica de menor intensidade possuem maior risco de desenvolver crises dolorosas, síndrome torácica aguda e osteonecrose (modificado de KATO et al., 2009). AVC; acidente vascular cerebral.

No Brasil, a anemia falciforme tem significativa importância epidemiológica em virtude da prevalência, da morbidade e da mortalidade e, por isso, tem sido apontada como uma questão de saúde pública (BANDEIRA et al., 2007). A distribuição do gene β^S no Brasil é bastante heterogênea, dependendo da composição negróide ou caucasóide da população. Estima-se que mais de sete milhões de indivíduos possuam o traço falciforme e 25.000 a 30.000 apresentam a anemia falciforme (Hb SS) (ANVISA, 2002; CANÇADO; JESUS, 2007).

1.4 Doença Falciforme

A doença das células falciformes é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. Sua distribuição é ampla, abrangendo todos os continentes, notadamente África, América do Norte, América Latina e parte da Ásia (NAOUM, 1997). O termo doença falciforme (DF) se aplica a um grupo de anemias

hemolíticas hereditárias que têm em comum a presença de hemoglobina S (LOBO; MARRA, SILVA, 2007). Inclui a anemia falciforme (Hb SS), as interações com talassemias (S/Beta talassemia), e associações com outras variantes de hemoglobina formando os duplos heterozigotos, como Hb SC (BONINI-DOMINGOS, 1993).

1.5 Talassemias

As talassemias são caracterizadas por uma redução ou ausência na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas que formam o tetrâmero de hemoglobina. As cadeias em excesso são instáveis e precipitam, levando a alterações da membrana eritrocitária e à destruição precoce das células. Além disso, a hemoglobinizacão deficiente dos eritrócitos resulta em hipocromia e microcitose, anormalidades características deste grupo de doenças. As talassemias são classificadas em: alfa, beta, delta, delta-beta e gama-delta-beta, conforme o(s) tipo(s) de cadeia cuja produção está reduzida (THEIN, 2005). As mais conhecidas são as alfa e beta talassemias, pela frequência e manifestações clínicas de considerável importância nos portadores, enquanto as primeiras são majoritariamente causadas por deleções gênicas, as beta talassemias são geralmente resultantes de substituições de bases nos éxons, íntrons e regiões promotoras dos genes β (SONATI; COSTA, 2008).

No Brasil, tanto a alfa quanto a beta talassemias têm alta incidência, que se deve à intensa miscigenação da população brasileira devido a grande imigração ocorrida no final do século XIX e início do século XX (BONINI-DOMINGOS et al., 2000; ORLANDO; NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 2000).

As beta talassemias são um grupo de alterações moleculares causadas por redução parcial ou completa da síntese de uma ou mais cadeias beta globina. Dos quase 200 alelos mutantes caracterizados, 125 representam mutações pontuais em regiões funcionalmente importantes ou em regiões flangeadoras do gene (THEIN, 2004).

Algumas mutações são específicas de determinados grupos étnicos. As mutações predominantes na população da região Mediterrânea, incluindo italianos, espanhóis e portugueses, são comumente encontradas na população brasileira (BONINI-DOMINGOS, 2004). As mutações CD39 (C→T), IVS-I-110 (G→A), IVS-I-6 (T→C) e IVS-I-1 (G→A) são responsáveis, pela quase totalidade, dos casos nas Regiões Sul e Sudeste (SONATI, COSTA, 2008), enquanto na região Nordeste a mutação IVS-I-6 (T→C) é a mais encontrada (ARAÚJO et al., 2003).

A beta talassemia apresenta heterogeneidade molecular e expressão fenotípica variável. A forma heterozigota, com raras exceções, leva o indivíduo a uma anemia leve e assintomática denominada talassemia beta menor, mutações em homozigose, dependendo do grau de impedimento da síntese de globina, podem provocar anemia sintomática moderada (talassemia beta intermediária), que pode exigir transfusões de eritrócitos apenas esporadicamente; ou formas graves (talassemia beta maior) que são sintomáticas e exigem regime transfusional mensal, na maioria dos casos (THEIN, 1998; BANK, 2005).

1.6 Interação S/ β talassemia

A interação entre Hb S/Beta talassemia envolve os gene β^S associado aos da beta talassemia, e dependendo da mutação pode provocar respostas clínicas variáveis, resultantes das diferentes quantidades de Hb S, Hb F e Hb A (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

O resultado das mutações que suprimem totalmente a síntese das cadeias beta globina é chamado de beta zero talassemia (β^0). Na mutação no códon 39 (CD39), por exemplo, ocorre uma substituição de uma adenina por timina na posição 39 no segundo éxon do gene β produzindo cadeias polipeptídicas truncadas e instáveis que são rapidamente degradadas (THEIN, 1998; FORGET, 2001); na mutação IVS-I-1, uma troca de guanina por adenina no primeiro nucleotídeo do primeiro íntron do gene β , faz com que o *splicing* de RNA seja suprimido. Mutações em que existe alguma síntese de cadeia de globina beta são chamadas de beta mais talassemia (β^+), dentre elas, a mutação IVS-I-6 resulta de uma substituição de uma timina por uma citosina na posição seis do primeiro íntron do gene β , reduzindo a eficácia do *splicing* de RNA e, a IVS-I-110, que produz somente de 10 a 20% de RNAm, é causada pela substituição de uma adenina por guanina na posição 110 do primeiro íntron do gene β (FORGET, 2001; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Portanto, os indivíduos portadores de doença falciforme resultantes da interação entre Hb S e beta talassemia, podem apresentar genótipos S/Beta⁰ talassemia (CD39 ou IVS-I-1), com um fenótipo mais grave, quando comparados aos S/Beta⁺ talassemia (IVS-I-6 ou IVS-I-110).

1.7 Haplótipos β^S e β^{Tal}

O tipo de variabilidade mais comum no complexo gênico das globinas alfa ou beta é aquele produzido por polimorfismos em determinadas sequências. Estas alterações ocorrem aproximadamente a cada cem bases ao longo do genoma. O padrão de combinação dos sítios polimórficos em uma única cromátide, para qualquer tipo cromossomo, é chamado de haplótipo. Dessa maneira, pode-se dizer que uma mutação, presente em indivíduos aparentemente não relacionados, tem a mesma origem se, ao realizar um estudo de haplótipos, o haplótipo relacionado com a mutação em dos indivíduos é igual ao relacionado com a mutação em outro indivíduo (ANTONARAKIS et al., 1984).

No grupamento beta globina, situado no braço curto do cromossomo 11, há sítios polimórficos, localizados entre os genes ϵ e β , bem como nas sequências flangeadoras. O conjunto dessas regiões polimórficas em um cromossomo constitui o haplótipo (STRACHAN; READ, 2002; NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A., 2004).

A descoberta dos haplótipos do gene β^S apresentou-se como importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como elemento de estudo clínico, que pode fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e de seu nível de gravidade (POWARS, 1991). Têm sido associados a cinco diferentes haplótipos, de acordo com a região de origem e onde predominam: o haplótipo Benin tem sido associado à África Ocidental; o Bantu ou República Centro Africana (CAR) à África Oriental Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico Ocidental, o Índia-Arábia Saudita (SAUDI) à Índia e Península Arábica Oriental e, um com menos frequência, o Camarões (CAM), que é restrito à África e ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana (PAGNIER et al., 1984; NAGEL, 1984; SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989, LAPOUMÉROULIE et al., 1992).

Esses haplótipos também estão associados a um quadro clínico e níveis de Hb F variados, sendo que o haplótipo Senegal apresenta níveis elevados de Hb F (>15%) e curso clínico menos grave da doença; o Benin níveis medianos de Hb F (5 a 15%) e curso clínico intermediário e o CAR níveis diminuídos de Hb F (< 5%) e quadro clínico mais grave. Os portadores do haplótipo Saudi apresentam níveis elevados de Hb F e curso clínico heterogêneo (NAGEL, 1984; POWARS, 1991, RAHGOZAR et al., 2000).

A classificação dos haplótipos β^S com os sítios polimórficos, segundo Sutton, Bouhassira, Nagel (1989), estão representados na Figura 3.

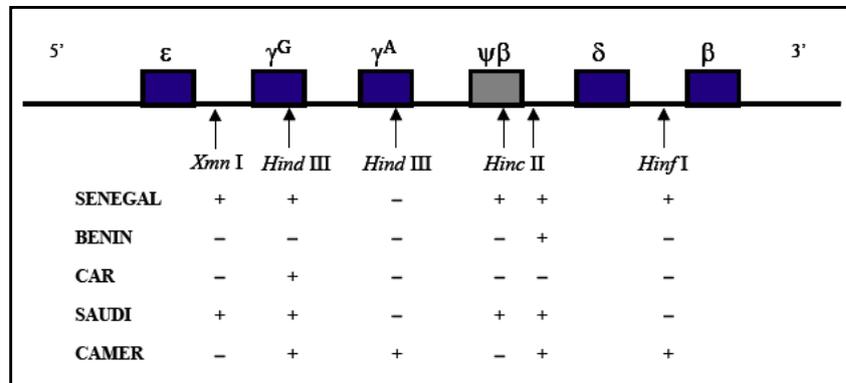


Figura 3. Cluster β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S segundo Sutton, Bouhassira, Nagel (1989).

Os haplótipos β^{Tal} podem refletir a presença de alelos específicos na beta talassemia numa população. Vários tipos de mutações de beta talassemia podem ser encontrados em cada tipo de cromossomo, indicando a relação entre haplótipos e mutações específicas (ORKIN et al., 1982). Exemplo dessa relação é a associação do haplótipo II com a mutação no códon 39 (CD39), o haplótipo I com a mutação IVS-I-110 e o haplótipo V com a IVS-I-1, como é encontrado nas populações mediterrâneas (ORKIN et al., 1982; BEZERRA, 2007).

A classificação dos haplótipos β^{Tal} com os sítios polimórficos, segundo Orkin et al., 1982, estão representados na Figura 4.

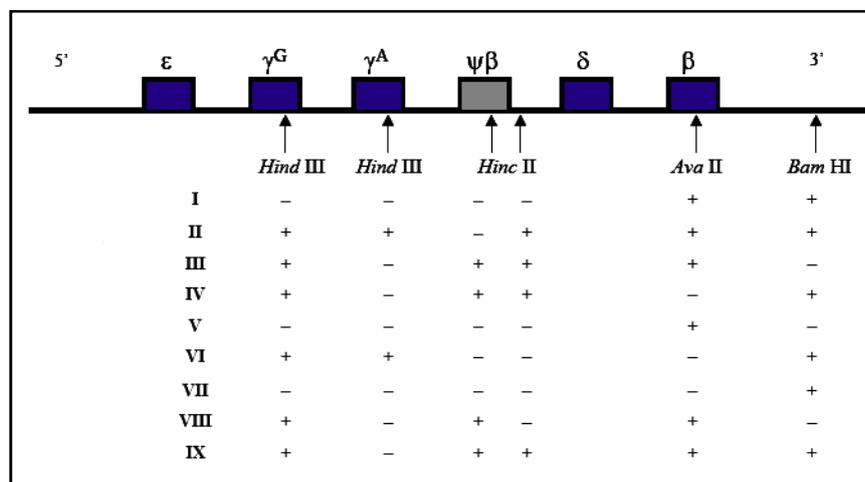


Figura 4. Cluster β mostrando os sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^{Tal} segundo Orkin et al. (1982).

1.8 Complicações clínicas na doença falciforme

As complicações agudas e crônicas na doença falciforme são dependentes, além da própria fisiopatologia da doença, da idade dos portadores, da condição sócio-econômica, nutrição, diagnóstico e acompanhamento terapêutico precoce, estresse psicossocial, etc. Portanto, as bases fundamentais de todo o curso clínico da doença deve-se aos processos decorrentes de hemólise dos eritrócitos falcêmicos ou como fenômenos secundários aos episódios de vaso-oclusão. Dentre eles podemos destacar:

Crises de Dor

A dor é o resultado da obstrução da microcirculação causada pelo afoiçamento das hemácias. Este é o mais dramático quadro da doença, pois as crises álgicas ocorrem inesperadamente, muitas vezes sem sintomas preliminares e impactam diretamente a qualidade de vida do paciente. Esse desconforto localiza-se, em extremidades, região lombar, abdome ou tórax e acomete os pacientes de todas as idades. A crise dolorosa ocorre, às vezes, após episódio infeccioso, sugerindo que febre, desidratação e acidose podem desencadear a vaso-oclusão. A dor também pode se instalar após resfriamento súbito da pele ou exposição a estresse físico ou emocional (SERJEANT et al., 1994).

Entre os pacientes, o número, gravidade e frequência dos episódios de dor são bastante variáveis. Em média, indivíduos Hb SC e Hb S/Beta mais talassemia tem a metade do número de crises de dor em relação aos pacientes com Hb SS (STEINBERG, 2008).

A dor aguda é mais comum, caracterizada por um início abrupto e com intensidade que varia de leve até muito intensa. A dor aguda sem complicações é autolimitada e geralmente dura algumas horas ou alguns dias. Pode ser contínua ou recidivante e pode migrar para outra região. A dor aguda, quando acompanhada de complicações infecciosas ou psicossomáticas profundas, pode perdurar por várias semanas. As crises dolorosas apresentam intervalos variáveis, dependendo de cada paciente (SHAPIRO, 1989; POWARS, 1990).

A dor crônica geralmente é definida como uma dor persistente por três a seis meses, ou mais, sem qualquer outra condição co-mórbida. A dor crônica pode debilitar o paciente tanto física quanto psiquicamente. Os pacientes com dores crônicas necessitam de visitas periódicas ao médico e planos de intervenção terapêutica. Devem ser avaliados por uma equipe multidisciplinar que possa oferecer apoio médico hematológico, psicológico, farmacológico e de assistência social (POWARS, 1990).

O uso de antiinflamatórios, analgésicos opióides, intensa hidratação, complementadas por medidas não farmacológicas contribuem para diminuir a frequência das crises de dor (NISCOLA et al., 2009).

Acidente Vascular Cerebral (AVC)

O acidente vascular cerebral é a mais dramática intercorrência na doença falciforme e a segunda causa de mortalidade. A oclusão, parcial ou completa, ocorre nos grandes vasos cerebrais e parece ser devida à estenose progressiva, superposta à formação de trombo no local (SWITZER et al., 2006).

Os pacientes com AVC normalmente apresentam sinais clínicos evidentes. O sintoma neurológico mais comum é a hemiparesia, seguido por afasia ou disfasia, convulsões e monoparesias. Cefaléia foi achada comum, porém, isoladamente, não é fator preditivo de AVC. Raros pacientes podem apresentar como manifestação inicial, quadro de Acidente Isquêmico Transitório ou até mesmo um coma (OHENE-FREMPONG, 1991).

O risco de o doente falciforme ter o primeiro AVC é de 11% até 20 anos de idade, 15% em até 30 anos e 24% até 45 anos. Entretanto, com a suspeita clínica de AVC o paciente deve ser submetido à transfusão sanguínea imediata para aumentar a oxigenação e reduzir o risco de nova vaso-oclusão. Deve-se cuidar para que a transfusão não eleve muito o hematócrito basal, pois o aumento da viscosidade pode ampliar a extensão da área afetada (OHENE-FREMPONG, 1991; ADAMS et al., 1992).

Além da transfusão sanguínea, outras medidas de tratamento durante o episódio agudo dependem da manifestação clínica: ventilação assistida, agentes farmacológicos anti-edema cerebral, terapia anticonvulsivante, etc. Portanto, é importante a avaliação e seguimento de um neurologista (SWITZER et al., 2006).

Com a utilização do Doppler transcraniano (DTC) pode-se prever a possibilidade do paciente com doença falciforme apresentar um AVC isquêmico e mudar a história natural da doença. O DTC mede a velocidade do fluxo nas artérias cerebrais e, crianças que apresentam medidas acima de 200 cm/s têm 40% de chances de desenvolver AVC nos próximos três anos (ADAMS et al., 1992).

Síndrome Torácica Aguda (STA)

A síndrome torácica aguda é uma causa frequente de morte tanto em crianças quanto em adultos com a doença falciforme e a segunda causa mais comum de hospitalização; é caracterizada pelo aparecimento de um infiltrado pulmonar, sem etiologia definida, febre, dor torácica pleurítica, dor abdominal, tosse e hipóxia. Sabe-se que 50% de todos os pacientes, maiores de 10 anos, com anemia falciforme terão pelo menos um episódio de STA e a probabilidade de recidiva é em torno de 40% (BALLAS, 1998).

O tratamento inclui broncodilatadores, antimicrobianos, incentivo a espirometria, contínuo ou frequente monitoramento da saturação de oxigênio no sangue, transfusão sanguínea e uso de analgésicos opióides (STEINBERG, 2008).

Um dos aspectos mais importantes a ser considerado na abordagem da STA é a possibilidade de prevenção. Exercícios respiratórios em pacientes internados por dor abdominal ou torácica, ou ainda em pacientes durante o período pós-operatório, diminuem a hipóxia e devem ser instituídos rotineiramente (BELLET et al., 1995).

Osteonecroses

Osteonecrose, do quadril e das articulações do ombro, afeta cerca da metade dos pacientes com anemia falciforme e Hb SC. Seu início é insidioso, mas progressivo, e a maioria dos pacientes com doença na fase inicial irá avançar para o colapso da cabeça femoral dentro de dois anos. Normalmente, apresenta-se com dor e em torno da articulação afetada, às vezes com espasmos nos músculos que a rodeiam. Pode ser detectada precocemente em sua evolução, por ressonância magnética, enquanto a doença em estado avançado é radiograficamente visível (OHENE-FREMPONG; STEINBERG, 2001).

Nos casos mais brandos, repouso, uso de bengalas para reduzir a carga na articulação e de antiinflamatórios não-esteróides, fisioterapia e hidroterapia podem retardar a evolução da lesão. Contudo, se houver progressão, a artroplastia pode ser muito bem sucedida, mas por quatro ou cinco anos após a cirurgia, cerca de um terço das próteses falharam (NEUMAYR et al., 2006).

Úlcera de Perna

A úlcera de perna afeta aproximadamente 20% dos pacientes adultos com doença falciforme, sendo prevalente nos pacientes com Hb SS e com Hb S/Beta⁰ talassemia. As lesões ocorrem, de preferência, nos maléolos medial e lateral, uni ou bilateralmente. O início pode ser espontâneo, ou subseqüente a trauma, por vezes leve como picada de mosquito, pele ressecada ou pequenas fissuras (KOSHY et al., 1989; ECKMAN, 1996; SERJEANT et al., 2005).

Tipicamente, as úlceras formam uma depressão central, cercada por uma margem com suave elevação das bordas e edema ao redor. Pode haver exsudação, formação de crostas e tecido de granulação na base. Algumas úlceras são profundas com envolvimento dos tecidos subcutâneos, por vezes acompanhadas de reação periostal que pode ser visível ao exame radiológico. Úlceras crônicas podem apresentar margens nodulares e irregulares. Variações em sua aparência são influenciadas pela cronicidade, presença de infecção secundária e terapia prévia (ECKMAN, 1996).

O tratamento da úlcera de perna inclui a utilização de câmara hiperbárica, bota de Unna, enxertos de pele, zinco oral e medicamentos tópicos variados. A multiplicidade de opções reflete a ineficácia de todos esses métodos em prevenir a recorrência da lesão. A realização de transfusão de troca, em pacientes com lesões muito extensas ou dolorosas, pode contribuir para a cicatrização da ferida e a diminuição da utilização de analgésicos (KOSHY et al., 1989; ECKMAN, 1996).

Priapismo

O priapismo é resultado da vaso-oclusão dentro dos sinusóides e do corpo cavernoso peniano, pode ser definido como uma falha na detumescência do pênis acompanhada de dor. Ocorre em 40% dos homens com anemia falciforme, os episódios podem ter curta duração ou podem durar várias horas. Aquelas com duração maior que 24 horas estão associadas ao aparecimento de impotência sexual (HAMRE et al., 1991; NOLAN et al., 2005).

O tratamento conservador inclui analgésicos, hidratação, aspiração e irrigação dos órgãos corporais. Transfusões têm sido utilizadas, mas a sua eficácia não está provada. O tratamento operativo inclui a criação de desvios entre o corpo cavernoso e esponjoso. A administração oral ou intracavernosa de agonistas α -adrenérgicos pode ajudar a reverter o

priapismo e estão sob estudo. Novas abordagens para a prevenção incluem o uso de inibidores PDE5A como sildenafil (CHAMPION et al., 2005; BURNETT et al., 2006).

O número de estratégias descritas reflete a dificuldade na abordagem terapêutica e apesar de todo o esforço mais de 25% dos pacientes desenvolvem algum grau de impotência e são candidatos à colocação de prótese peniana (BERTAM; CARSON; WEBTER, 1985).

Colecistectomia

A elevada excreção constante de bilirrubina nas anemias hemolíticas faz com que ocorra a formação frequente de cálculos biliares. A colecistite crônica calculosa é uma complicação frequente da doença falciforme e geralmente requer procedimento cirúrgico – a colecistectomia (HABERKEN et al., 1997; TRAINA; SAAD, 2007).

A colelitíase é mais frequente em indivíduos homocigotos para anemia falciforme (58%) se comparados a indivíduos com hemoglobinopatia SC ou S/Beta talassemia (17%) e a prevalência aumenta com a idade (TRAINA; SAAD, 2007).

A colecistectomia está indicada em pacientes sintomáticos, no entanto, naqueles casos assintomáticos não há indicação formal da cirurgia. Estudos prospectivos estimam que 30% dos casos de colecistopatia assintomática desenvolverão sintomas em um período de três meses. A cirurgia laparoscópica, uma técnica segura e eficaz, traz a vantagem de redução de 40% do período de hospitalização e permite uma recuperação mais rápida do paciente. O preparo cirúrgico transfusional é realizado e contra-indicado em caso de: doença hemorrágica, cirurgia abdominal anterior e gravidez avançada (HABERKEN et al., 1997; ANVISA 2002).

1.9 Estresse Oxidativo

O estado oxidativo das células é determinado pelo equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Durante o metabolismo celular as espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integral do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas como no controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose e na fagocitose de agentes patogênicos como na fagocitose (SHAFER; BUETTNER, GROW; ISCHIROPOULOS, 2001).

As EROs não incluem somente os radicais de oxigênio, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$), o radical peroxil (RO_2^{\cdot}) e o radical alcoxil (RO^{\cdot}), mas também

abrangem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), o ozônio (O_3), peróxidos orgânicos, etc. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008).

Para proteger o organismo do ataque destas ERO existem sistemas de defesa antioxidante, com enzimas específicas que inativam algumas das ERO como a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona S-transferase (GSTs), e superóxido dismutase (SOD), enzimas que controlam a disponibilidade de metais na célula, sistema antioxidante não enzimático como a glutathiona, ubiquinona e ácido úrico, e compostos obtidos da dieta como vitaminas E, C, beta-caroteno dentre outros. (THOMAS et al., 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Quando ocorre um aumento das EROs e/ou uma diminuição da capacidade antioxidante, as EROs são capazes de lesar componentes celulares direta ou indiretamente, modificando sua estrutura e/ou função e gerando o estresse oxidativo. Diversos estudos têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio participam no mecanismo de instalação de várias doenças como Alzheimer, Parkinson, Diabetes, Esclerose Múltipla, Cirrose Hepática, desenvolvimento da Arteriosclerose e alguns tipos de Câncer (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHULZ; ANTER; KEANEY JUNIOR, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Na doença falciforme o estresse oxidativo é também um fator que modula o fenótipo da doença uma vez que atua nos processos vaso-oclusivos aumentando as propriedades adesivas dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio (SULTANA et al., 1998, KATO et al., 2009).

1.10 Processo oxidativo na doença falciforme

Um dos fatores que predispõe ao processo hemolítico das células falciformes, induzindo-o às múltiplas consequências patológicas da doença falciforme, deve-se à degradação oxidativa da Hb S (DAS et al., 1991; STEINBERG, 1998; SOUZA, 1999). Com a desoxigenação, a afinidade ao oxigênio pela Hb S cai e, dessa forma, qualquer fator que estabilize o estado desoxi reduzirá a afinidade pelo oxigênio, perpetuando este estado e a polimerização, como por exemplo, a diminuição do pH (via efeito Bohr) e o aumento da concentração de 2,3 bifosfoglicerato (2,3 BPG) (BEUTLER, 1984).

A desoxigenação da Hb S favorece a sua meta-hemoglobinização (meta-Hb S) e a consequente elevação desse pigmento dentro do eritrócito. Quando a concentração de meta-Hb S supera a ação da enzima meta-Hb redutase, é desencadeada a degradação da meta-Hb S,

com formação de hemicromos ou subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina S, oxidada sob forma de corpos de Heinz (WINTERBOURN, 1990; NAOUM, 1996).

Durante a transformação do eritrócito discóide com Hb S em eritrócito afoiçado, dentre os eventos bioquímicos e polimerizantes da célula, ocorre a degradação oxidativa da Hb S, com liberação dos seus produtos de degradação da Hb S (complexos de Fe^{2+} e Fe^{3+}), que atacam a membrana eritrocitária formando os hidroperóxidos lipídicos originando radicais alcóxil e peróxil (BECKER et al., 2004). A geração destes radicais amplia as lesões devido aos processos contínuos de novos ciclos de peroxidação lipídica, resultando na liberação de aldeídos como o malondialdeído (MDA) (DAILLY et al., 1998; CESQUINI et al., 2003).

As alterações de membrana resultantes da polimerização, levam à falência parcial da bomba de sódio/potássio/APTase, com consequente perda de potássio e água pela hemácia, aumentando a concentração de HbS e favorecendo a polimerização. Ocorre ainda, aumento na concentração de cálcio intracelular por alteração da bomba de cálcio/APTase e aumento da permeabilidade da membrana a esse íon (NAGEL et al 1991; MORRIS; RUCKNAGEL; JOINER, 1993; NAOUM, 1997).

1.11 Terapia para as doenças falciformes

Exceto o transplante de células tronco hematopoiéticas, as terapias atualmente disponíveis para a doença falciforme não são curativas ao ponto de substituir uma eritropoiese falcêmica por uma normal, no entanto, o que tem sido buscado, são alvos terapêuticos que atuam na fisiopatologia da doença minimizando as complicações clínicas dos portadores.

Terapia farmacológica com Hidroxiureia (HU)

A HU, desde 1960, é uma droga utilizada para o tratamento das neoplasias hematológicas e vem sendo administrada como alternativa ao tratamento convencional das doenças falciformes por induzir o aumento da síntese de Hb F e por não causar efeitos adversos graves em adultos (SCHNOG et al., 2004).

Foi observado que a HU aumenta o nível de Hb F dos pacientes tratados em cerca de 60%, eleva a taxa de hemoglobina, aumentando o Volume Corpuscular Médio (VCM), e reduz o número de reticulócitos (KINNEY et al., 1999; COVAS et al., 2004). A redução da taxa de Hb F e a acentuada reticulocitose caracterizam o grave quadro da anemia, de forma

que uma redução no nível de reticulócitos significa uma diminuição na hemólise (ANDRADE, 2001).

Estudos têm demonstrado que a HU, além de reduzir a expressão de moléculas de adesão na superfície dos eritrócitos, também é capaz de reduzir o número de granulócitos, monócitos e plaquetas. Essas células em quantidades elevadas são fatores de risco para a oclusão vascular, uma vez que permitem interações adesivas entre as células falciformes, endoteliais e leucócitos e estimulam plaquetas a liberarem citocinas que contribuem para a adesão (KINNEY et al.; STEINBERG, 1999; HILLERY et al., 2000; HALSEY, ROBERTS, 2003). Apesar de seus efeitos benéficos, a hidroxiureia também é considerada um agente citotóxico e carcinogênico. Desta forma, investigações vêm sendo realizadas para avaliar as mutações e outros danos causados ao DNA somático (BUCHANAN et al., 2004).

Terapia transfusional associada à quelação do ferro

De forma geral, a transfusão regular de hemácias em portadores da DF tem como finalidade manter a concentração de Hb S abaixo dos 30%, com isso, a Hb S fica diluída, diminui a interação de células anormais e aumenta a oxigenação. Os resultados obtidos com os estudos clínicos (STOP I e II) mostraram redução do risco de evento isquêmico cerebral, redução do número e intensidade de crises vaso-oclusivas (crises dolorosas), síndrome torácica aguda e hospitalização, com consequente melhora da qualidade de vida dos pacientes com transfusões regulares de hemácias (MILLER et al., 2001; CANÇADO, 2007).

Pacientes dependentes de transfusão sanguínea estão sujeitos a sobrecarga de ferro e, por esse motivo, o uso de agentes quelantes torna-se indispensável para a sobrevivência desses pacientes. A quelação tem como objetivo prevenir o acúmulo de ferro no organismo e os danos teciduais resultantes desse acúmulo uma vez que aumenta a morbidade e mortalidade (CANÇADO, 2007).

A desferroxamina (DFO), introduzida no início da década de 70, é o agente quelante mais utilizado para o tratamento de pacientes com sobrecarga de ferro transfusional. O uso de DFO, associado às transfusões regulares, reduz as complicações hepáticas e endócrinas, normaliza o crescimento, previne doenças cardíacas e melhora a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes. No entanto, a sua eficácia depende de vários fatores, tais como: dose, via e duração da administração, grau de sobrecarga corpórea de ferro e concentração de vitamina C (EHLERS et al., 1991; GARY et al. 1994; OLIVIERI; BRITTENHAM, 1997; BORGNA-PIGNATTI et al., 1998; PORTTER, 2001).

A deferiprona (DFP) foi o primeiro quelante oral a ser introduzido na terapia ferroquelante, possui meia vida plasmática maior, é capaz de promover aumento na excreção de ferro, diminuição dos valores séricos de ferritina e redução da quantidade de ferro no fígado e no coração. No entanto, esse medicamento só foi aprovado para o uso em pacientes com talassemia beta maior (GARY et al. 1994; OLIVIERI; BRITTENHAM, 1997; COHEN et al., 2003).

O deferasirox (DFX) é um agente quelante que apresenta certa vantagem em relação aos demais, pois tem meia vida plasmática prolongada, sendo capaz, de promover quelação eficaz por 24 horas, mesmo com baixas doses, permitindo a sua administração apenas uma vez por dia. Tais propriedades possibilitam: maior adesão ao tratamento, melhor controle da quantidade de ferro no organismo e em pouco tempo, melhor qualidade de vida, menor ocorrência de doenças cardíacas e melhora da sobrevida de pacientes dependentes de transfusão de hemácias (NISBET-BROWN et al., 2003).

A doença falciforme é caracterizada por episódios vaso-oclusivos, hemólise, ativação de mediadores inflamatórios e disfunção das células endoteliais. Com isso, há uma diminuição do fluxo sanguíneo e obstrução da microcirculação acarretando aos portadores, anemia, crises de dor e insuficiência de múltiplos órgãos (WOOD; GRANGER, 2007).

No entanto, essas manifestações, complexas e diversificadas são influenciadas por fatores que modulam a gravidade da doença. Dentre elas, a característica genética que determina a concentração intracelular de hemoglobina S, os haplótipos, à co-herança de outros genes, fatores ambientais (ZAGO; PINTO, 2007) e o estresse oxidativo (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008).

Visto que o excesso de espécies reativas de oxigênio é citotóxico e promove a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, modificando vários mecanismos celulares levando a célula a apoptose e, conseqüentemente, danos aos órgãos; é também um modulador da doença falciforme uma vez que atua nos processos vaso-oclusivos aumentando as propriedades adesivas dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio (SULTANA et al., 1998).

Estudos prévios no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas - UNESP mostraram diferença significativa nos valores de avaliação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante entre portadores heterozigotos para a hemoglobina S e doentes falciformes (TUKAMOTO-JUNIOR, 2008, BARACIOLI, 2009). Assim, avaliar a relação do estresse oxidativo com haplótipos do gene β^S , interações dos genótipos de hemoglobina e o uso de medicação específica para o tratamento da doença

falciforme, pode trazer informações relevantes sobre a capacidade antioxidante e sobre a ação dos radicais livres nas anemias hemolíticas, como a anemia falciforme.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Em doentes falciformes analisar a capacidade antioxidante e o estresse oxidativo por métodos bioquímicos, correlacionando os valores encontrados com os genótipos da doença falciforme, haplótipos do *cluster* β mutante e o uso de medicação específica, em dois tempos distintos de análise.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o grupo de portadores da doença falciforme clinicamente e segundo seu genótipo: Hb SS (homozigotos para a hemoglobina S), Hb SC (duplo heterozigotos para a hemoglobina S e C) e os Hb S/beta - talassêmicos (interações entre hemoglobina S e beta – talassemia);
- Identificar os haplótipos do *cluster* β^S e β^{Tal} para cada conjunto de genótipos;
- Avaliar o estresse oxidativo, em cada grupo, por meio da peroxidação lipídica (TBARS) e a capacidade antioxidante (TEAC);
- Relacionar os resultados obtidos com o uso de medicação específica em dois tempos distintos, T1 e T2.

3. Material e Método

3. Material e Método

3.1 Casuística

O estudo compreendeu dois tempos de análises distintos. Para o tempo um (T1), foram utilizadas 69 amostras de sangue de portadores da Doença Falciforme (DF) em acompanhamento clínico nos ambulatórios do Hemocentro de São José do Rio Preto/SP e Hemocentro da Santa Casa de São Paulo/SP. No grupo de São Paulo (SP), dos 40 pacientes, 11 (27,5%) eram do gênero masculino e 29 (72,5%) do gênero feminino, com a média de idade de $26,3 \pm 12$ anos, quanto à etnia, seis (15%) eram caucasóides e 34 (85%) negróides, segundo auto declaração. No grupo de São José do Rio Preto (SJRP), dos 29 portadores da DF, 12 (41,4%) eram do gênero masculino e 17 (58,6%) do gênero feminino, com a média de idade de $26,2 \pm 8,8$ anos e, quatro (13,8%) eram caucasóides e 25 (86,2%) negróides.

O tempo dois (T2) de análise constituiu de 55 doentes falciformes. Após uma média de $51,3 \pm 8,8$ semanas, dos 40 pacientes de SP foram recoletadas 33 amostras e, após $90,2 \pm 8,3$ semanas, dos 29 doentes falciformes de SJRP foram recoletadas 22 amostras. Das 14 amostras não recoletadas, 13 pacientes os hemocentros perderam seguimento do tratamento e um doente de SJRP veio a óbito em decorrência das complicações da DF.

Os dados hematológicos, perfil do ferro, informações sobre medicação em uso, exposição a interferentes ambientais, eventos clínicos e transfusões sanguíneas, foram obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos, ao banco de dados dos hemocentros e pela aplicação de questionários no momento da coleta.

De acordo com as manifestações clínicas da doença, para o grupo de SP, 57,5% apresentaram de 0 a 2 crises de dor/ano dentro de três anos anteriores à pesquisa, 25,0% de 3 a 5 e 17,5% com seis ou mais crises de dor; 20,0% tiveram úlceras isquêmicas, 17,5% osteonecrose, 18,2% dos homens com priapismo, 20,0% retiraram a vesícula biliar, 35,0% tiveram a ocorrência de AVC e 2,5% a síndrome torácica aguda. No grupo de SJRP, 41,3% dos pacientes tiveram seis ou mais crises de dor, 38,0% de 0 a 2 crises e 20,7% de 3 a 5 crises; 31,0% tiveram úlceras isquêmicas, 13,8% osteonecrose, 41,6% dos homens com priapismo, 17,3% retiraram a vesícula biliar, 10,3% tiveram AVC e 3,5% a síndrome torácica aguda.

Em relação ao medicamento/tratamento, todos os doentes dos dois grupos usavam o ácido fólico. Em SP, 75,0% dos pacientes estavam em regime transfusional sob o uso de

quelante de ferro, 22,5% usavam hidroxiureia e quelante, 5,0% usavam hidroxiureia e 20,0% somente o ácido fólico. Em SJRP, 65,5% dos pacientes não recebiam medicação/tratamento específico, somente o ácido fólico, 24,1% utilizavam a hidroxiureia e 10,5% estavam sob regime transfusional associado a quelação de ferro.

Para esse estudo, as amostras de sangue foram coletadas, após consentimento informado, por punção venosa em tubos com EDTA a 5%, para o diagnóstico de hemoglobinopatias e biologia molecular, e em tubos com heparina para os testes bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo.

Para minimizar as variáveis que influenciam no estado oxidativo dos pacientes, coletamos as amostras, tanto no T1 como no T2, na mesma estação do ano e no mesmo período do dia. Os pacientes que apresentaram processos vaso-oclusivos, crises hemolíticas e estado febril nos últimos 40 dias antes da coleta foram excluídos das análises. O transporte das amostras, dos hemocentros para o laboratório foi realizado sob refrigeração e o armazenamento em 4°C para as amostras com EDTA e a -80°C para o plasma.

3.2 Considerações Éticas

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) sob o protocolo número 44/08 e CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 0005.0.229.000-08, obedecendo aos princípios estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

3.3 Análises Estatísticas

As amostras foram avaliadas quanto à normalidade e a homoscedasticidade pelo *teste Shapiro-Wilk* e *teste de Levene*, respectivamente. Para os dados que atenderam as premissas para a utilização de testes paramétricos foram empregados: *Teste t independente* e a Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey; para os dados não paramétricos foram utilizados o teste *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* complementado pelo *teste de Dunn*. Para as análises de correlações foi utilizado o *teste de correlação de Pearson*; para dados paramétricos, e *correlação de Spearman*, para dados não paramétricos, com a seguinte classificação: correlação perfeita (=1), forte (>75), média

(>0,5), fraca (<0,5) e inexistente (=0). O teste de regressão linear simples foi aplicado para a avaliação de causa e efeito entre as variáveis dependentes e independentes (FILHO; ZAR 1999). Para a comparação dos dados obtidos no T1 e no T2 foi utilizado *Teste t pareado*. O software utilizado nas análises foi o Statistica, versão 8.0 e o alfa fixado de 5%.

3.4 Método

3.4.1 Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias

Foram realizadas as metodologias de triagem de hemoglobinopatias para a identificação das Hb anormais, as quais serão listadas a seguir:

Preparação de hemolisados:

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e testes bioquímicos as células foram lisadas para a obtenção da solução de Hb utilizando duas metodologias:

- Hemolisado Rápido - com saponina (NAOUM, 1990).
- Solução de Hb - com clorofórmio (NAOUM, 1990).

Hemolisado Rápido: com saponina

Reativo hemolisante:

- | | |
|------------------|--------|
| - Saponina P.A. | 1 g |
| - Água destilada | 100 mL |

Procedimento:

- Em placa de Kline foi colocado 1 volume de sangue com 1 volume de reativo hemolisante, com posterior homogeneização até a hemólise completa da mistura;
- O hemolisado pôde ser utilizado após 5 minutos e, no máximo, até 4 horas depois da sua preparação.

Solução de Hb: com Clorofórmio

Procedimento:

- Para lavar os eritrócitos, centrifugou-se 1 mL de sangue colhido com anticoagulante com solução salina a 0,85%, a 1.500 rpm, durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante. O processo foi realizado três vezes, no mínimo.

- Ao volume de eritrócitos lavados, adicionou-se outro de água destilada, homogeneizando a solução. A seguir, adicionou-se um volume de clorofórmio idêntico ao do hemolisado formado. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000 rpm, por 20 minutos.

- A solução de Hb sobrenadante, ou hemolisado, foi retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo limpo com identificação da amostra. A concentração do hemolisado, preparado conforme a metodologia apresentada, variou de 10 a 15 g/dL.

3.4.1.2 Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)

Princípio:

Técnica utilizada para detectar talassemias do tipo beta, principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e em outras hemoglobinopatias, como nos heterozigotos para Hb C.

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

- NaCl	9,0 g
- Na ₂ HPO ₄	1,36 g
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,28 g
- Água destilada q.s.p	100 mL

Solução trabalho

- NaCl 10%	36 mL
- Água destilada q.s.p	1000 mL

Procedimento:

Em tubo de hemólise colocou-se 2 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total, agitando por inversão, suavemente. A leitura foi feita após 10 minutos.

Interpretação:

O tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% foi colocado a 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras. O teste foi interpretado como positivo quando não se visualiza as linhas negras, pois a resistência aumentada à hemólise do eritrócito, tornava a amostra opaca. Em amostras com resistência normal à hemólise visualizam-se facilmente as linhas através da solução.

3.4.1.3 Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados ao microscópio óptico, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos. Os resultados foram divulgados da seguinte maneira, segundo padronização do LHGDH para cada um dos parâmetros avaliados.

- alterações discretas: (+)
- alterações moderadas: (++)
- alterações acentuadas: (+++)
- células normais: (N)

3.4.1.4 Eletroforese em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965)*Princípio:*

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

- Tris hidroximetil aminometano 10,2 g
- Ácido etilenodiaminotetracético 0,6 g
- Ácido Bórico 3,2 g
- Água destilada q.s.p 1000 mL

Conservado em geladeira

Corante Ponceau

- Ponceau S	0,5 g
- Ácido tricloroacético	5,0 g
- Água destilada q.s.p	100 mL

Solução descorante:

- Ácido acético glacial	100 mL
- Metanol	50 mL
- Água destilada q.s.p	1000mL

Procedimento:

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão TEB por 15 minutos, no mínimo, e seis horas, no máximo.

- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multi-uso).

- A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.

- Passaram-se 300 volts por 30 minutos.

- As frações foram analisadas, primeiramente, sem coloração e posteriormente coradas com Ponceau. Para corá-las, as fitas foram colocadas no corante por cinco minutos e, depois, em solução descorante por 30 minutos.

3.4.1.5 Eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968)

Princípio:

Técnica utilizada para diferenciar alguns tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino e caracterização semiquantitativa de Hb Fetal.

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2 - Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel:

- Na ₂ HPO ₄	2,02 g
- NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	7,66 g
- Água destilada q.s.p	1000 mL

Conservar em geladeira

Gel de Ágar-Fosfato

- Ágar-agar	500 mg
- Tampão fosfato pH 6,2	25 mL

Procedimento:

- Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer de 250 mL e levados ao forno micro-ondas até completa dissolução, tomando cuidado para a mistura não ferver.

- Foram pipetados 5,0 mL do gel em lâminas de microscópio que gelificaram à temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel.

- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos foi utilizado tecido absorvente (pano multi-uso).

- Passaram-se 100 volts por 30 minutos.

- As frações foram analisadas sem corar e coradas com Ponceau.

3.4.1.6 Cromatografia líquida de alta performance (BONINI-DOMINGOS, 2006)*Princípio:*

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. O equipamento consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da

absorbância versus tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb. Cada Hb tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Para o Kit Beta Talassemia Heterozigota:

Em um tubo de 1,5 mL, fornecido pelo fabricante, foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Após a hemólise total, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento para realização dos procedimentos de leitura e análise das frações.

Interpretação:

A quantificação das diferentes frações de Hb em uma amostra foi realizada a partir dos valores percentuais e de tempo de retenção fornecidos pela calibração específica, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Aos valores de Hb A₀ obtidos pela HPLC foram incluídas as subfrações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas P2 e P3 respectivamente, identificadas separadamente pelo aparelho. Os valores de Hb A₂ considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

3.4.2 Metodologias moleculares para análise dos polimorfismos

Extração do DNA (PENA et al. 1991).

Princípio:

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de sangue total. Os tampões de lise rompem os eritrócito e glóbulos brancos. O fenol é utilizado para a remoção de proteínas e enzimas contaminantes. O DNA é precipitado com etanol.

Reagentes:

1. Solução de lise 1 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células vermelhas)

- Sacarose 0,32M	10,95 g
- Tris HCl 10mM	1 mL
- MgCl ₂ 5mM	0,5 mL
- Triton 1% 100x	1 mL
- Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

2. Solução de lise 2 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células brancas)

- 0,075 M de NaCl	2,19 g
- 0,02 M de EDTA	20 mL
- Água mili-Q q. s. p.	500 mL

3. Proteinase K (20 mg/mL)

- Proteinase K	20 mg
- Água mili-Q q.s.p.	1 mL

Conservar em freezer.

4. Fenol

5. Clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)

6. Etanol 70%

7. KCl 2M

Procedimento:

Amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA, foram colocadas em microtubos e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após 10 minutos de agitação, foi centrifugado por cinco minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foram acrescentados 1,0 mL de solução de lise 1, esse passo foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 450µL de solução de lise 2; 25µL de SDS à 10% e 5 µL de proteinase K 20 mg/mL. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por três horas a 42°C.

Após esse período de incubação, foram adicionados 500µL de fenol, o material foi homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Após centrifugação, a fase superior foi transferida para outro microtubo e adicionados 500µL da solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1.

O material foi homogeneizado e, novamente, centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Esse último passo foi repetido por mais uma vez. O sobrenadante foi colocado em tubo com 50µL de solução de KCl 2M gelada e acrescentado 500µL etanol 100% bem gelado. O tubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA.

O material foi novamente centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm e o sobrenadante desprezado. O DNA no fundo do tubo foi lavado com 200µL etanol 70% (gelado), para iniciar a hidratação, o sobrenadante, após centrifugação, foi desprezado. Após a evaporação do etanol, o DNA foi solubilizado com 50µL de água ultra pura e conservado em freezer -20°C.

Confirmação molecular das Hb variantes, Hb S e Hb C.

Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP (SAIKI et al., 1985)

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação que envolve o códon 6 foram: o *primer* P 277 (sense): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e o *primer* P 278 (antisense): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'

Para a mistura da reação foi preparado um volume final de 25,0µL, destes 13,0µL foram de H₂O, 1,0µL de cada *primer* a uma concentração de 10,0µM, 1,0µL de dNTP a 1,25mM cada, 1,5µL de *Taq* Polimerase de 1U, 2,5µL de tampão sem MgCl₂, 3,0µL de MgCl₂ a 50mM e 2,0µL de DNA a 100ng/µL. A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: um ciclo com 35 repetições de 30 segundos a 94°C para desnaturação inicial, anelamento durante 30 segundos a 55°C, extensão de 1 minuto a 72°C e 1 ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido a 37 °C por 3 horas; no “mix” continha 13,1µL de H₂O, 1,0µL da enzima *Dde* I (C↓TNAG), 2,1µL de tampão e 10,0µL do produto da PCR. A mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição; assim após a digestão o alelo normal gerou 3 fragmentos de 201 pb, 88 pb e 87 pb o alelo mutante gera dois, um de 288 pb e outro de 88 pb, como pode ser observado na Figura 5.

A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 6).

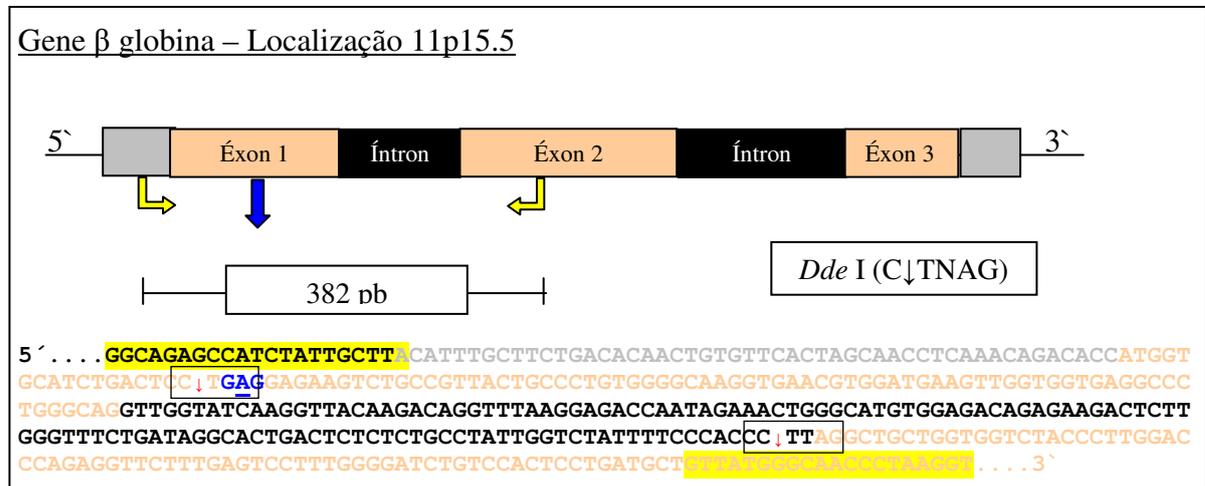


Figura 5. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene β globina e dos sítios específicos para a enzima *Dde I* (seta vermelha). Os *primers* (P277 e P278) estão representados pela cor amarela, o sítio CAP em cinza, os íntrons em preto e negrito, os éxons em marrom claro e em azul o códon 6.

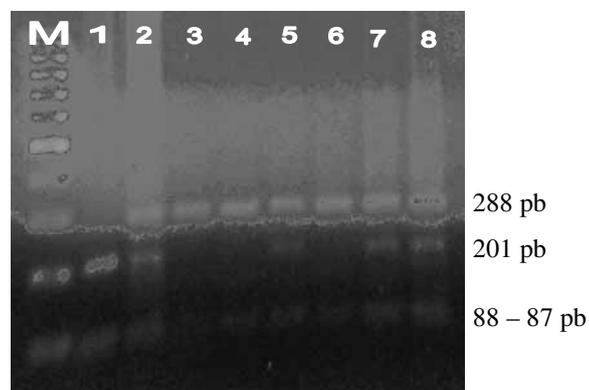


Figura 6. Foto de um gel de agarose a 1,5%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para Hb S. Amostras 2, 5, 7 e 8 - heterozigotos para mutação Hb S; Amostras 3, 4 e 6 - homozigotos para a mutação Hb S; 1 - Ausência da mutação para Hb S. M = marcador molecular de 100pb.

PCR-AE para Hb S e Hb C (FISCHEL-GHODISIAN; HIRSCH; BOHLMAN, 1990)

As amostras que apresentaram perfil eletroforético e cromatográfico compatível com Hb SC foram submetidas à amplificação gênica alelo-específica (PCR-AE). Nesta técnica foram utilizados 3 tubos para cada amostra de DNA, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* controles (B5a e B5b) e o *primer* específico do alelo normal (BA); no tubo 2 os *primers*

controles (B5a e B5b) e o *primer* específico do alelo mutante (BS) e no tubo 3 os *primers* controles (B5a e B5b) mais o *primer* específico (BC). As sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR-AE e o tamanho dos fragmentos amplificados estão listados na Tabela 1 e na Figura 7.

Para cada “mix” foi preparado um volume final de 25,0µL, destes 10,0µL foram de H₂O, 2,5µL dos *primers* controles a 3,0µM, 0,32µL do *primer* específico a 3,0 µM, 3,2µL de dNTP a 1,25mM cada, 0,5µL de *Taq* Polimerase de 1U, 2,5µL de tampão sem MgCl₂, 1,5µL de MgCl₂ a 50mM, 1,0 µL de DMSO a 30% e 1,0 µL de DNA a 100ng/µL. A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: um ciclo com uma repetição de 3 minutos a 94°C para desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições, desnaturação a 45 segundos a 94°C, anelamento durante 60 segundos a 60°C, extensão de 30 segundos a 72°C e 1 ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, analisou-se o comportamento dos fragmentos presentes no gel de agarose a 1,5%. A presença das bandas controles de 660 pb nos três tubos significou sucesso na amplificação, pois os *primers* de controle interno da reação funcionou corretamente, em seguida observou-se a amplificação do fragmento específico de 216 pb para cada “mix”.

O indivíduo com o genótipo normal apresentou o fragmento de 216 pb na posição correspondente a posição A, indivíduo Hb SS na posição S, Hb CC na posição C, Hb AS nas posições A e S, Hb AC nas posições A e C, Hb SC nas posições S e C (Figura 8).

Tabela 1. Sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos amplificados na reação de PCR-AE para a identificação da Hb S e Hb C.

<i>Primers</i> controles	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Fragmentos
B5a	GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A	659 pb
B5b	AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A	659 pb
<i>Primers</i> específicos	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Fragmentos
β ^A	CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCT C	216 pb
B ^S	CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCA	216 pb
B ^C	CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCC	216 pb

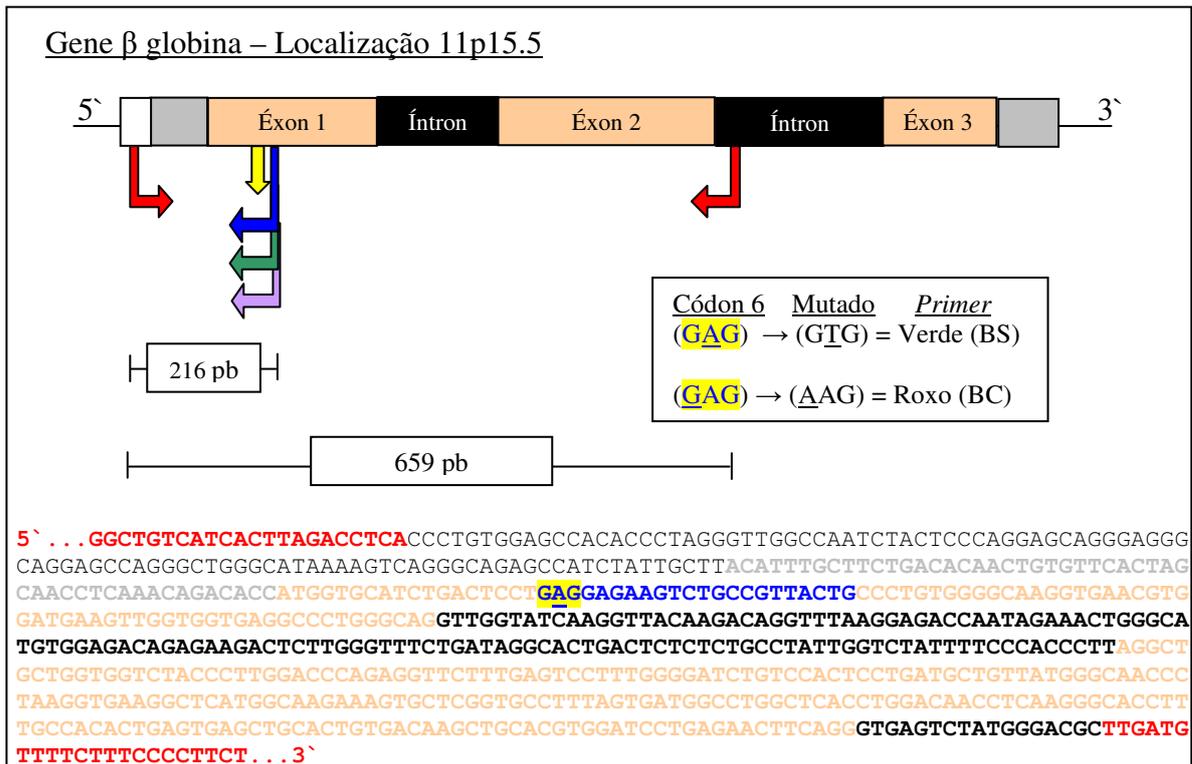


Figura 7. Representação esquemática da localização dos iniciadores no gene β globina para a mutação S e/ou C. Os *primers* controles estão representados pela cor vermelha, o *primer* específico β^A em azul, o sítio CAP em cinza, os íntrons em preto e negrito, os éxons em marrom claro e em azul com o fundo amarelo o códon 6. Se houver a mutação o *primer* específico reconhece a região afetada.

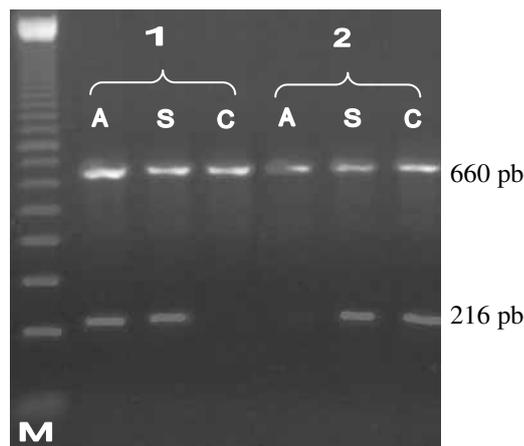


Figura 8. Foto de um gel de agarose a 2,0%, com iluminação UV. PCR-AE para Hb S e Hb C. M= marcador molecular de 100pb; A - “mix” para o alelo da Hb A; S – “mix” para o alelo da Hb S e C – “mix” para o alelo da Hb C. O Paciente 1 é heterozigoto para a Hb S e o Paciente 2 é duplo heterozigoto para a Hb S e Hb C.

Identificação dos genótipos de beta talassemia (BERTHOLO, 2006).

Para os casos com Hb S/Beta talassemia foram investigadas as mutações mais freqüentes na população brasileira como segue:

Mutação no Códon 39 (C → T)

Para a mutação CD39, o DNA foi amplificado a partir de dois “mix” com três *primers* para cada “mix”. No primeiro foi inserido o par de *primers* controle interno da reação (B5a e B5b), para o segmento de interesse, e o *primer* específico para o alelo normal (PS39W). No segundo “mix” foram inseridos os mesmos *primers* controles e o *primer* específico (PS39M) para o alelo mutante. As sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR-AE e o tamanho dos fragmentos amplificados estão listados na Tabela 2.

As concentrações e quantidades dos reagentes utilizados em cada “mix” de reação para detectar a mutação CD 39 para a beta - talassemia estão mencionadas na Tabela 3.

No termociclador os tubos foram submetidos às seguintes condições: 1 ciclo de 7 minutos à 95 °C; 32 ciclos de 50 segundos à 94°C, anelamento durante 50 segundos à 54°C e 50 segundos de extensão à 72°C; extensão final de sete minutos à 72°C.

A interpretação dos fragmentos pode ser compreendida conforme ilustra a Figura 9.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sobre luz ultravioleta (Figura 10).

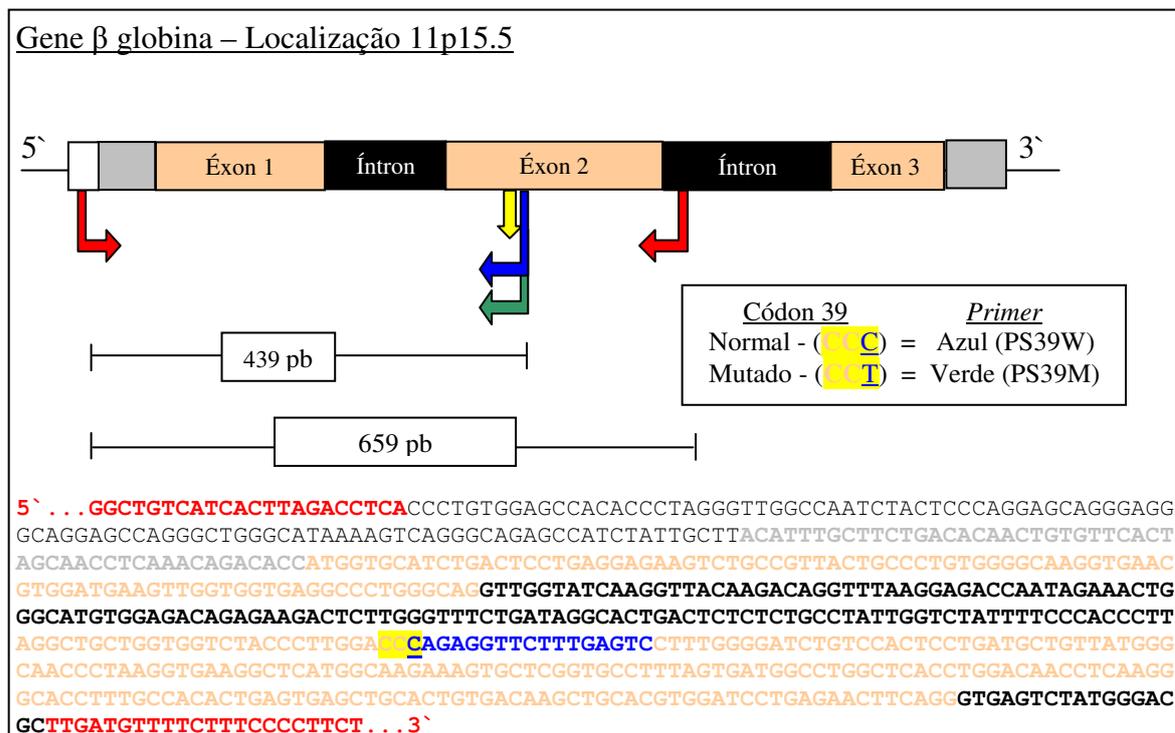
As bandas de tamanho 659 pb representam os fragmentos resultantes do controle interno da reação, já as de 439 pb referem-se a produtos de amplificação específica. Se o produto do “mix” do alelo normal apresentar fragmentos de 659 e 439 pb indica que o individuo possui o alelo normal; se o produto do “mix” do alelo mutante apresentar os dois fragmentos, indica a presença do alelo mutante para a mutação CD39.

Tabela 2. Sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos amplificados na reação de PCR-AE para a identificação da mutação CD39.

<i>Primers</i> controles	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Fragmentos
B5a	GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A	659 pb
B5b	AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A	659 pb
<i>Primers</i> específicos	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Fragmentos
PS39W	GAC TCA AAG AAC CTC TG	439 pb
PS39M	GAC TCA AAG AAC CTC TA	439 pb

Tabela 3. Componentes das reações com as concentrações dos reagentes utilizadas em cada “mix” para a mutação CD39.

“mix” I – Alelo Normal		“mix” – Alelo Mutante	
Componentes	µL	Componentes	µL
Tampão (10 X)	2,5	Tampão (10 X)	2,5
MgCl ₂ (2 mM)	0,75	MgCl ₂ (2 mM)	0,75
dNTP's (1,25 mM)	4,0	dNTP's (1,25 mM)	4,0
DMSO puro	1,0	DMSO puro	1,0
Primer B5a (2 µM)	2,5	Primer B5a (2 µM)	2,5
Primer B5b (2 µM)	2,5	Primer B5b (2 µM)	2,5
Primer PS39W (10 µM)	2,5	Primer PS39M (10 µM)	2,5
Taq Polimerase (5U/µL)	0,25	Taq Polimerase (5U/µL)	0,25
DNA (100 ng)	1,0	DNA (100 ng)	1,0
H ₂ O	8,0	H ₂ O	8,0
Volume Final (µL)	25,0	Volume Final (µL)	25,0

**Figura 9.** Representação esquemática da localização dos *primers* no gene β globina para a mutação CD39. Os *primers* controles estão representados pela cor vermelha, o *primer* específico PS39W em azul, o sítio CAP em cinza, os íntrons em preto e negrito, os éxons em marrom claro e com o fundo amarelo o códon 39. Se houver a mutação o *primer* específico reconhece a região afetada.

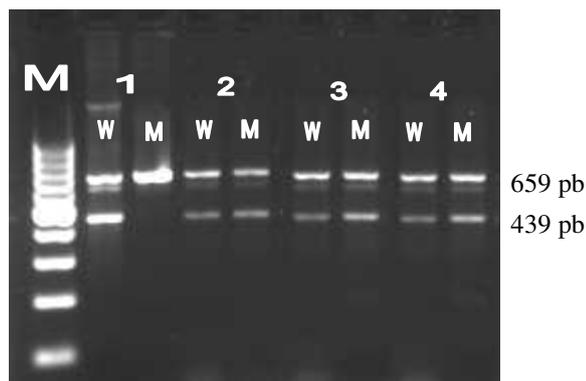


Figura 10. Foto de um gel de agarose a 2,0 %, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-AE para detecção da mutação CD39. Amostra 1 – ausência para a mutação, Amostras 2, 3 e 4 - heterozigotos para mutação. M = marcador molecular de 100pb. W – alelo normal, M – alelo mutante.

Mutação IVS-I-110 (G → A)

Para a mutação IVS-I-110, o DNA foi amplificado a partir de dois “mix”, utilizou-se três *primers* para cada “mix”. No primeiro foi inserido o par de *primers* controles internos da reação (B5a e B5b), para o segmento de interesse, e o *primer* específico para o alelo normal (TB110W). No segundo “mix” foram inseridos os mesmos *primers* controles e o *primer* específico (TB110M) para o alelo mutante. As sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR-AE e o tamanho dos fragmentos amplificados estão listados na Tabela 4.

As concentrações e quantidades dos reagentes utilizados em cada “mix” de reação para detectar a mutação IVS-I-110 para a beta - talassemia estão mencionadas na Tabela 5.

No termociclador os tubos foram submetidos às seguintes condições: 1 ciclo de 7 minutos à 95 °C; 32 ciclos de 50 segundos à 94°C, anelamento durante 60 segundos à 58°C e 50 segundos de extensão à 72°C; extensão final de sete minutos à 72°C.

A interpretação dos fragmentos pode ser compreendida conforme ilustra a Figura 11.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sobre luz ultravioleta, Figura 12

Tabela 4. Sequências dos *primers* e o tamanho dos fragmentos amplificados na reação de PCR-AE para a identificação da mutação IVS-I-110.

<i>Primers</i> controles	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Fragmentos
B5a	GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A	659 pb
B5b	AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A	659 pb
<i>Primers</i> específicos	Sequência do <i>primer</i> (5' – 3')	Fragmentos
TB110W	GGG TGG GAA AAT AGA CC	337 pb
TB110M	GGG TGG GAA AAT AGA CT	337 pb

Tabela 5. Componentes das reações com as concentrações dos reagentes utilizadas em cada “mix” para a mutação IVS-I-110..

“mix” I – Alelo Normal		“mix” – Alelo Mutante	
Componentes	µL	Componentes	µL
Tampão (10 X)	2,5	Tampão (10 X)	2,5
MgCl ₂ (2 mM)	1,5	MgCl ₂ (2 mM)	1,5
dNTP's (1,25 mM)	3,5	dNTP's (1,25 mM)	3,5
DMSO 30%	1,0	DMSO 30%	1,0
Primer B5a (2 µM)	2,0	Primer B5a (2 µM)	2,0
Primer B5b (2 µM)	2,0	Primer B5b (2 µM)	2,0
Primer TB110W (5 µM)	2,0	Primer TB110M (5 µM)	2,0
Taq Polimerase (5U/µl)	0,25	Taq Polimerase (5U/µl)	0,25
DNA (100 ng)	1,0	DNA (100 ng)	1,0
H ₂ O	9,0	H ₂ O	9,0
Volume Final (µL)	25,0	Volume Final (µL)	25,0

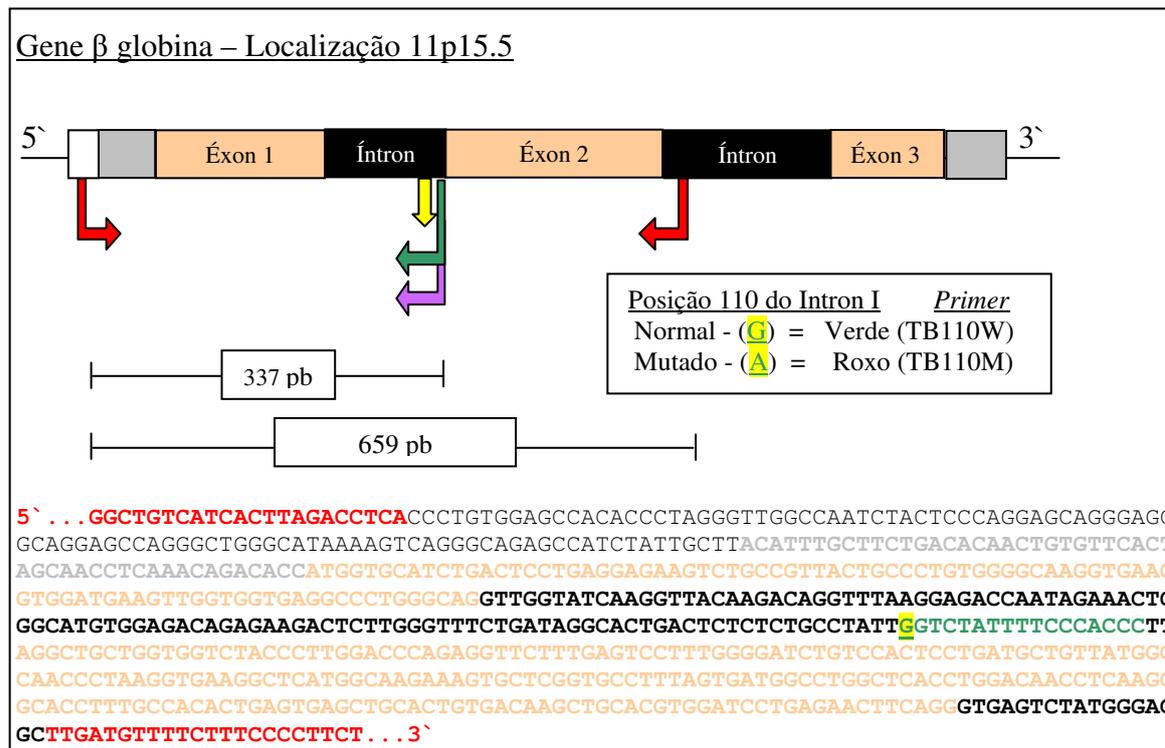


Figura 11. Representação esquemática da localização dos *primers* no gene β globina para a mutação IVS-I-110. Os *primers* controles estão representados pela cor vermelha, o *primer* específico TB110W em verde, o sítio CAP em cinza, os íntrons em preto e negrito, os éxons em marrom claro, letra verde com o fundo amarelo o local de mutação no nucleotídeo 110 no Íntron I.

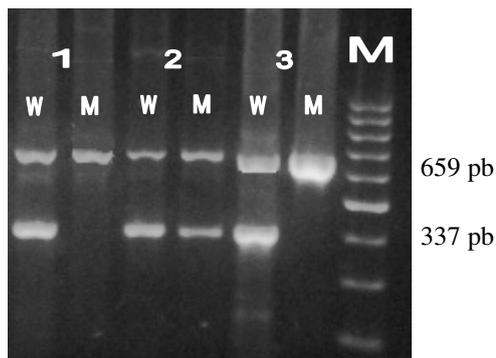


Figura 12. Foto de um gel de agarose a 2,0 %, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-AE para detecção da mutação IVS-I-110. Amostra 1 e 3 – ausência da mutação, Amostra 2 - heterozigotos para mutação. M = marcador molecular de 100pb. W – alelo normal, M – alelo mutante.

Mutação IVS-I-6 (T → C)

Para a mutação IVS-I-6, o DNA foi amplificado a partir de dois “mix”, utilizou-se três *primers* para cada “mix”. No primeiro foi inserido o par de *primers* controles internos da reação (B5a e B5b), para o segmento de interesse, mostrado anteriormente, e o *primer* específico para o alelo normal (IVSI6W-5’GTCTTGTAACCTTGATA-3’). No segundo “mix” foram inseridos os mesmos *primers* controles e o *primer* específico (IVSI6M 5’-GTCTTGTAACCTTGATG-3’) para o alelo mutante.

Na Figura 13, estão representadas as regiões específicas que os *primers* controles e específicos se anelam no gene β globina.

As concentrações e quantidades dos reagentes utilizados em cada “mix” de reação para detectar a mutação IVS-I-6 para a beta talassemia estão mencionadas na Tabela 6.

Após a preparação do “mix”, os tubos foram submetidos nas seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 7 minutos à 95 °C; 32 ciclos de 50 segundos à 94°C, anelamento durante 50 segundos à 54°C e 50 segundos de extensão à 72°C; extensão final de sete minutos à 72°C.

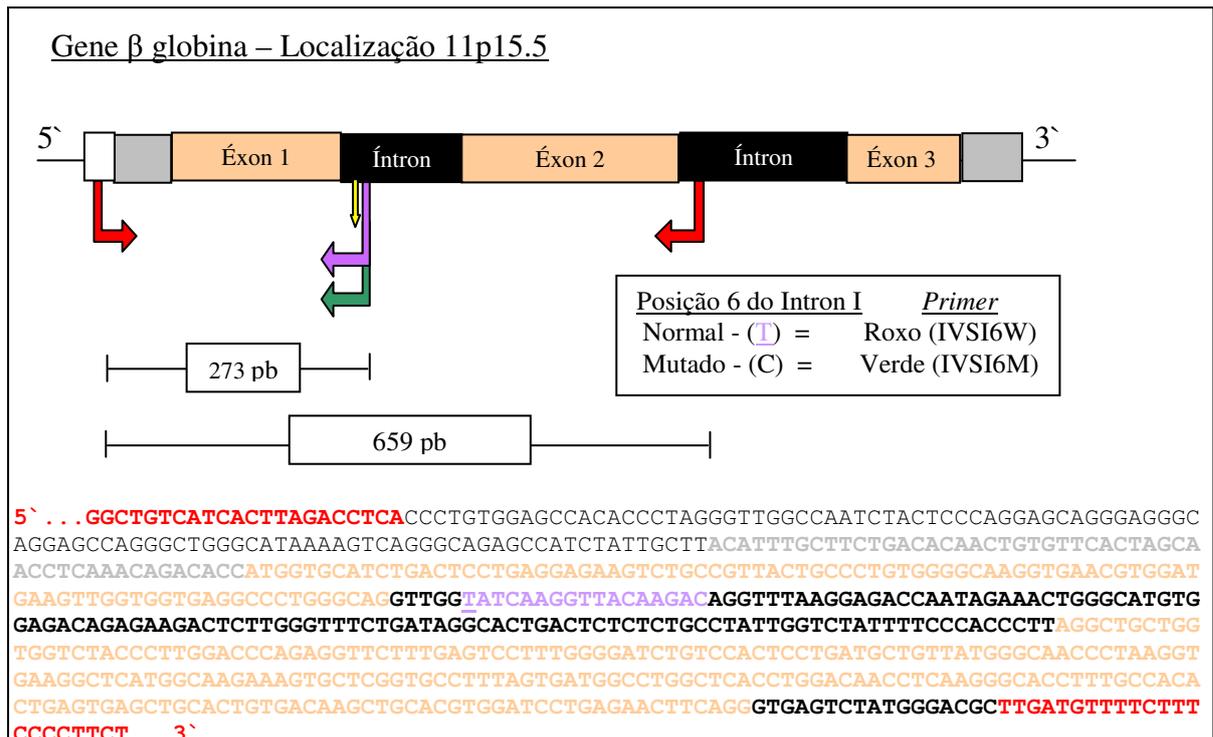


Figura 13. Representação esquemática da localização dos *primers* no gene β globina para a mutação IVS-I-6. Os *primers* controles estão representados pela cor vermelha, o *primer* específico IVSI6W em roxo, o sítio CAP em cinza, os íntrons em preto e negrito, os éxons em marrom claro, letra T local de mutação no nucleotídeo 6 no Íntron I.

Tabela 6. Componentes das reações com as concentrações dos reagentes utilizadas em cada “mix” para a mutação IVS-I-6.

“mix” I – Alelo Normal		“mix” – Alelo Mutante	
Componentes	μL	Componentes	μL
Tampão (10X)	2,5	Tampão (10X)	2,5
MgCl ₂ (2 mM)	0,75	MgCl ₂ (2 mM)	0,75
dNTP’s (1,25 mM)	4,0	dNTP’s (1,25 mM)	4,0
DMSO puro	1,0	DMSO puro	1,0
<i>Primer</i> B5a (2 μM)	2,5	<i>Primer</i> B5a (2 μM)	2,5
<i>Primer</i> B5b (2 μM)	2,5	<i>Primer</i> B5b (2 μM)	2,5
<i>Primer</i> IVSI6W (10 μM)	2,5	<i>Primer</i> IVSI6W (10 μM)	2,5
<i>Taq</i> Polimerase (5U/ μl)	0,4	<i>Taq</i> Polimerase (5U/ μl)	0,4
DNA (100 ng)	1,0	DNA (100 ng)	1,0
H ₂ O	7,85	H ₂ O	7,85
Volume Final (μL)	25,0	Volume Final (μL)	25,0

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sobre luz ultravioleta, os possíveis genótipos estão representados abaixo:

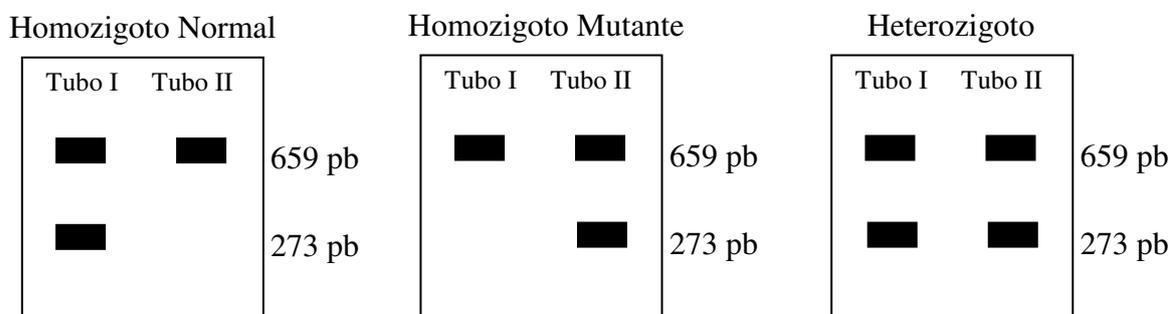


Figura 14. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR –AE para a mutação IVS-I-6.

Mutação IVS-I-1 (G → A)

Para a mutação IVS-I-1, o DNA foi amplificado a partir de dois “mix”, utilizou-se três iniciadores para cada “mix”. No primeiro foi inserido o par de *primers* controles internos da reação (B5a e B5b), para o segmento de interesse, mostrados anteriormente, e o *primer* específico para o alelo normal (IVSIIW - 5' GTG ACC TTG ATA CCA AC 3'). No segundo “mix” foram inseridos os mesmos *primers* controles e o *primer* específico (IVSIIM - 5' GTG ACC TTG ATA CCA AA 3') para o alelo mutante.

Na Figura 15, estão representadas as regiões específicas que os *primers* controles e específicos se anelam no gene β globina.

As concentrações e quantidades dos reagentes utilizados em cada “mix” de reação para detectar a mutação IVS-I-1 para a beta talassemia estão mencionadas na Tabela 7.

Após a preparação do “mix”, os tubos foram submetidos nas seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 7 minutos à 95 °C; 32 ciclos de 50 segundos à 94°C, anelamento durante 50 segundos à 54°C e 50 segundos de extensão à 72°C; extensão final de sete minutos à 72°C.

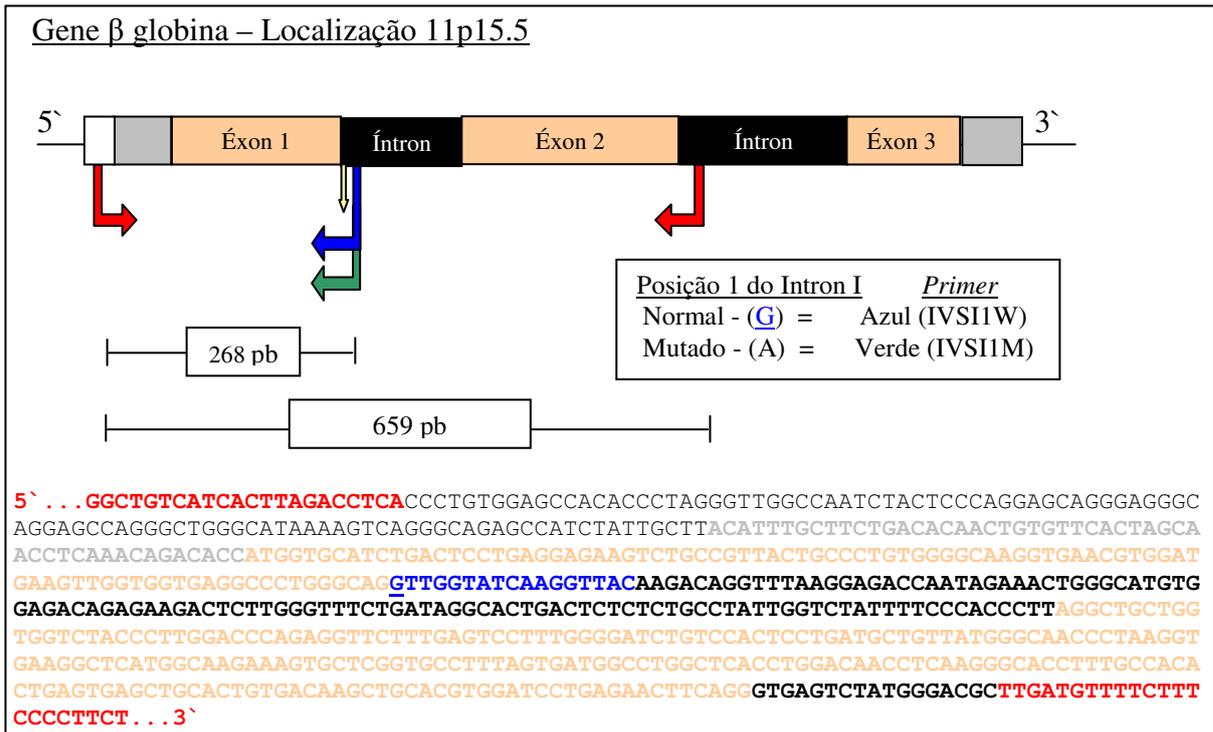


Figura 15. Representação da localização dos *primers* no gene β globina para a mutação IVS-I-1. Os *primers* controles estão representados pela cor vermelha, o *primer* específico IVSIIW em azul, o sítio CAP em cinza, os íntrons em preto e negrito, os éxons em marrom claro, letra G local de mutação no nucleotídeo 6 no Íntron I.

Tabela 7. Componentes das reações com as concentrações dos reagentes utilizadas em cada “mix” para a mutação IVS-I-1.

“mix” I – Alelo Normal		“mix” – Alelo Mutante	
Componentes	μL	Componentes	μL
Tampão (10 X)	2,5	Tampão (10 X)	2,5
MgCl ₂ (2 mM)	0,75	MgCl ₂ (2 mM)	0,75
dNTP’s (1,25 mM)	4,0	dNTP’s (1,25 mM)	4,0
DMSO puro	1,0	DMSO puro	1,0
<i>Primer</i> B5a (2 μM)	2,5	<i>Primer</i> B5a (2 μM)	2,5
<i>Primer</i> B5b (2 μM)	2,5	<i>Primer</i> B5b (2 μM)	2,5
<i>Primer</i> IVSIIW (10 μM)	2,5	<i>Primer</i> IVSIIW (10 μM)	2,5
<i>Taq</i> Polimerase (5U/ μl)	0,25	<i>Taq</i> Polimerase (5U/ μl)	0,25
DNA (100 ng)	1,0	DNA (100 ng)	1,0
H ₂ O	8,0	H ₂ O	8,0
Volume Final (μL)	25,0	Volume Final (μL)	25,0

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sobre luz ultravioleta, os possíveis genótipos estão representados abaixo:

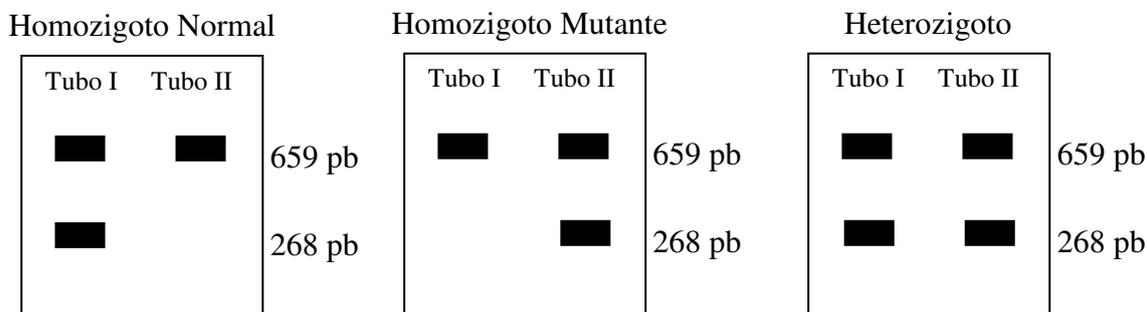


Figura 16. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR –AE para a mutação IVS-I-1.

Análise dos Haplótipos β^S (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989) e Haplótipos β^{Tal} (ORKIN et al. 1982)

A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR – RFLP. Para os haplótipos β^S foram analisados seis sítios polimórficos, segundo Sutton, Bouhassira, Nagel (1989); e para os haplótipos β^{Tal} foram analisados seis sítios polimórficos, conforme Orkin et al., (1982).

Os pacientes com a interação S/Beta talassemia (β^S/β^{Tal}) foram analisados oito sítios polimórficos: 5' γ^G -*Xmn*I, γ^G -*Hind*III, γ^A -*Hind*III, $\psi\beta$ - *Hinc*II, 3' $\psi\beta$ -*Hinc*II, 5' β -*Hinf* I, β -*Ava* II e 3' *Bam*H I.

As sequências dos “*primers*” para análise dos polimorfismos do *cluster* β foram descritas por Sutton, Bouhassira, Nagel (1989) e Miranda et al., (1997), e estão listadas na Tabela 8.

Tabela 10. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina β .

Região	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão Final	
	35 ciclos									
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
5' γ^G	94	5'	94	45''	60	45''	72	1'30''	72	7'
γ^G	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
γ^A	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
$\Psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
3' $\Psi\beta$	94	5'	94	30''	55	1'	72	1'	72	7'
5' β	94	5'	94	45''	57	45''	72	1'30''	72	7'
β	96	2'	96	30''	58	1'	72	1'	72	7'
3' β	96	2'	96	30''	58	1'	72	1'	72	7'

O produto da PCR foi digerido, a 37°C durante 3 horas, com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. A identificação dos padrões de restrição que determinam os haplótipos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

Primer	Enzima	Região	Fragmento amplificado	Fragmento após a clivagem
H0 e H1	<i>Xmn</i> I	5' γ^G	657 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>Hind</i> III	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>Hind</i> III	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>Hinc</i> II	$\Psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>Hinc</i> II	3' $\Psi\beta$	590 p b	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf</i> I	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb
P1 e P5	<i>Ava</i> II	β	763 pb	449 pb + 214 pb + 103 pb
SF1 e SF2	<i>Bam</i> HI	3' β	1520 pb	1228 pb + 292 pb

De acordo com perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da globina β , é possível definir os haplótipos β^S e β^{Tal} .

3.4.3 Dosagem de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (UCHIYAMA; MIHARA, 1978, modificado por PERCÁRIO et al, 2004)

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica das amostras. O método é baseado na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535 nm. Valores até 440 ng/mL são considerados normais.

Reagentes:

- Água ultrapura (deionizada e destilada) ou Água destilada (H₂O_d)
- Cloreto de Potássio (KCl) 1,15%
- Fosfato Monobásico de Potássio (KH₂PO₄) – Tampão fosfato 75 Mm (pH 2,5)
- Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10 nM
- Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20µM
- Álcool n-Butílico

Preparo do Plasma

- As amostras de sangue foram coletadas em tubo heparinizado e permaneceram por um período de 20 minutos em descanso, sob Banho Maria a 38°C.
- Foram centrifugadas a 1500rpm, durante 20 min e separadas em recipiente (tudo de Eppendorf de 3mL) devidamente identificado (quantidade mínima aceitável 800 µL).

Procedimentos:

Preparo final dos controles e amostras

- O TBA foi preparado no mesmo dia da leitura.
- Foi separado 2 tubos de ensaio para cada amostras (ensaio em duplicata)
- Pipetou-se 1 mL do reagente TBA para cada tubo
- Os tubos de número 1 receberam 500 µL de Água destilada – controle branco, e os tubos de número 2 receberam 500 µL de solução padrão TBARS – controle padrão TBA.
- A partir dos tubos de número 3 foram adicionadas 500 ul das amostras a serem analisadas
- Os tubos forma colocados em banho Maria a 94°C durante 1h
- Após 1h resfriamos os tubos a temperatura ambiente por 15 minutos

- Pipetou-se 4 mL de álcool n Butílico em cada tubo
- Tampamos os tubos com rolhas apropriadas e homogeneizamos as amostras com um vórtex
- Centrifugamos os tubos 2500 rpm durante 10 minutos

Leitura em Espectrofotômetro

- Horas antes da leitura, colocamos as cubetas em solução desincrustante
- Ajustamos o espectrofotômetro em 535 nm.
- Zeramos o aparelho com o CONTROLE BRANCO (tubo 1)
- Dosamos os tubos de número 2 e anotamos na folha de dosagem do TBARS

Cálculo do valor de TBARS da amostra

O valor final de TBARS da amostra, em ng/mL (ou nmol/mL) é obtido pelo emprego da seguinte fórmula:

TBARS = A média x F, no qual:

A média = (A1+A2)/2

(lembrar que amostras com diferenças entre A1 e A2 superiores a 10% devem ser desconsideradas).

F = ([padrão TBARS] x 440,61) / A padrão TBARS, como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10nM temos:

F = 10 x 440,61 / A padrão TBARS,

F = 4406,1/A padrão TBARS

(lembrando que A padrão TBARS é a média, ou seja (A1+A2)/2 referente às amostras 2).

3.4.5 Dosagem da Capacidade Anti-oxidante Total em Equivalência ao Trolox (TEAC) modificado (modificado de Re et al. 1999).

A dosagem objetiva-se a capacidade anti-oxidante total de amostras biológicas. O potencial anti-oxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente anti-oxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. O método proposto por Miller et al. (1993), modificado por Re et al. (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções

relativas dos reagentes e tempo de mensuração. É uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), produzindo diretamente o radical cátion $ABTS^{*+}$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815 nm.

A adição de anti-oxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade anti-oxidante, concentração de anti-oxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734 nm, durante um determinado intervalo de tempo. Assim a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion $ABTS^{*+}$, é determinada como a atividade anti-oxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições.

Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro (mM/L) correspondente a concentração do trolox com capacidade anti-oxidante equivalente à da amostra que foi estudada, padrão de medida este denominado TEAC (trolox equivalente antioxidant capacity). Os valores de referência para atividade anti-oxidante do plasma e soro humano por este método têm sido considerados, para a população da nossa região e sob as condições laboratoriais existentes foram de 2,02 a 2,22 mM/L ($1,46 \pm 0,14$ mM/L).

Reagentes:

PBS pH 7.2

Solução Salina Isotônica com pH 7.2 foi usada como solvente no preparo de reagentes e diluição de amostras.

- 1,48g de Na_2HPO_4 (Fosfato de Sódio Dibásico)
- 0,43g de NaH_2PO_4 (Fosfato de Sódio Monobásico)
- 7g de NaCl
- H_2O destilada ----- 1 litro

Ajustar em Phmêtro para pH 7.2, acrescentar mais Na_2HPO_4 ou Ácido Acético se necessário. Volume final: 1L.

Solução de estoque $ABTS^{*+}$

Sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) – ABTS: Sigma-Aldrich® (A1888).

A solução de estoque ABTS^{•+} foi preparada de 12 a 16h antes das dosagens. Misturou-se uma solução do sal diamônio ABTS a 7 mM com uma solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈ – Sigma-Aldrich P5592) cuja concentração final foi de 2,45 mM.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$140\text{mM} \times 352\mu\text{L} = C \times 20.000\mu\text{L}$$

$$C \approx 2,45\text{mM}$$

(A) ABTS 7 mM: 0,0768g ----- 20 mL de PBS

(B) K₂S₂O₈ 140 mM: 0,7560g ----- 20 mL de PBS

▪ Retirar com pipeta automática 352μL da solução (A) e misturar a esta 352μL da solução (B):

19,648 ml de (A) + 352 μL* de (B) **

* pipetar 176 μL + 176 μL

** A concentração final de (B) nessa mistura será 2.45 mM

▪ Foram preparados 20 mL da solução de estoque ABTS^{•+}.
▪ A mesma deve permanecer no escuro, em temperatura ambiente (em bancada) durante 12-16h para formar o radical cátion ABTS^{•+}

▪ O radical é estável por cerca de dois dias estocado desta forma, no escuro, à temperatura ambiente².

Solução de Trabalho de ABTS^{•+}

▪ Misturar a solução de estoque ABTS a PBS até que a absorbância a 734 nm seja de 0.7 ± 0.02 (concentração de ABTS $\pm 47 \mu\text{M}$), equilibrada a 30°C.

A expectativa é diluir 2289 μL da solução de estoque ABTS em 200 mL de PBS.

▪ Calibrar espectrofotômetro na leitura de 734 nm, zerando com PBS.
▪ Preparar Erlenmeyer com 200 mL de PBS.
▪ Começar com 1800 μL da solução de estoque ABTS, misturar ao PBS, homogenizar e ler o espectro. Subir ou diluir até atingir valor de leitura de 0.7 ± 0.02 a 30°C, ou seja, de 0,680 a 0,720.

Atingido esse valor está pronta a solução de trabalho ABTS^{•+}

Solução de estoque de TROLOX (2.5 mM)

Trolox (Aldrich Chemical Co 23,881-3), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico.

- Cálculo base: 0,647g de TROLOX (Aldrich 23,881-3) em 1L de PBS. S.
- Logo, para 200 mL – 0,1294g de Trolox
para 100 mL – 0,0647g de Trolox
- Esta solução é estável por uma semana quando estocada a 4°C ou 6 meses se estocada a -20°C.

Preparo do plasma

- Colher o sangue usando anticoagulante (heparina).
- Centrifugar a 1500 rpm durante 20 minutos.
- Pipetar a camada superficial amarela (correspondente ao plasma) cuidadosamente.
- Estocar em freezer a -20°C ou em gelo caso seja prontamente analisado.

Dosagem

- Adequamos o método para leitura em espectrofotômetro em temperatura ambiente: 25°C.
- O volume final de cada amostragem para leitura será de 3 mL (3000 µL).
- Se a capacidade anti-oxidante da amostra que se pretende estudar não é conhecida ou se espera que ela seja superior a escala estabelecida na curva padrão (0 a 2,5 mM), é prudente realizar as dosagens da mesma sob diversas diluições.
- Convém que sejam feitas amostragens para leitura em duplicatas (A1 e A2) para termos maior certeza dos resultados, nesse caso aceitar diferenças de até 10% entre a média das leituras A1 e A2. Para a realização da curva padrão, convém que sejam feitas triplicatas.
- A leitura foi feita em espectrofotômetro, a 734 nm.

Leitura

- Em uma cubeta colocar com pipeta automática 2970 µL da solução de trabalho ABTS^{•+} outrora preparada. Realizar leitura da absorbância a 734 nm e anotar o valor (correspondente a T0).

- Retirar a cubeta e imediatamente acrescentar 30 µL da solução de trolox acionando neste exato momento o cronômetro.
- Homogenizar a mistura manualmente por 20 segundos e re-iniciar leitura (734nm) anotando o valor decorridos exatos 5 minutos (corresponderá a T5).
- Repetir o procedimento para cada solução de trolox (tubos de A-F).
- Fazer em triplicata anotando os resultados na tabela do protocolo curva padrão da atividade anti-oxidante do trolox. Aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.
- Fazer o mesmo procedimento com as amostras biológicas a serem estudadas. Fazer também um controle branco (com 30 µL de PBS) e um padrão (com 30µL de Trolox 1mM – feito conforme tubo D no quadro 1). Realizar a dosagem das mesmas em duplicatas anotando os valores referentes de T0 e T5 na tabela do protocolo de dosagem da capacidade anti-oxidante total em equivalência ao trolox. Aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.

Obs: para que se evite a realização da curva padrão da atividade anti-oxidante do trolox todas as vezes que forem quantificadas amostras biológicas, utilizar-se-á um fator de correção para a curva padrão original, conforme será visto adiante.

Cálculo dos resultados

- Defina o Valor Médio da absorbância em T5 conforme descrito no item anterior.
- Calcule a Atividade Anti-oxidante Total (TAA) de cada amostra usando a seguinte fórmula:

$$\text{TAA} = \frac{\text{T0} - \text{T5}}{\text{T0}}$$

- Calcule o valor corrigido da Atividade Anti-oxidante total de cada amostra (TAAc) de cada amostra subtraindo o valor de TAA das amostras biológicas e do Padrão do valor de TAA encontrado para o Branco:

$$\text{TAAc} = \text{TAA} - \text{TAA do Branco}$$

Obs.: No caso das amostras de trolox em diferentes concentrações na construção da curva padrão aplicar: **TAAc = TAA – TAA do tubo F**

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Genotipagem do grupo de Doentes Falciformes

Para detectar as mutações presentes no gene β , analisamos 138 alelos não aparentados e encontramos seis diferentes genótipos para a DF. Destes, 51 pacientes (74,0%) foram homocigotos para a Hb S, cinco (7,3%) com a interação S/Beta⁰ talassemia (CD39), quatro (5,8%) com S/Beta⁺ talassemia (IVS-I-6), três (4,3%) S/Beta⁺ talassemia (IVS-I-110), três (4,3%) com a interação de S/Beta talassemia, com mutante beta talassêmico não identificado dentre as quatro mutações avaliadas e três (4,3%) com a dupla heterozigose SC (Tabela 12).

De acordo com a frequência alélica, dos 138 alelos mutantes avaliados, 120 (86,9%) foram de alelos β^S , 15 (10,9%) de alelos β^{Tal} e três (2,2%) de alelos β^C . A distribuição dos alelos mutantes dentro de cada grupo de DF está demonstrada na Tabela 13 e verificamos que os alelos β^S foram mais frequentes no grupo de SP (93,7%) do que em SJRP (77,6%), e os alelos beta talassêmicos tiveram maior frequência em SJRP (20,6%) do que em SP (3,7%).

Tabela 12. Caracterização genotípica dos portadores para a DF no grupo de estudo.

Genótipo	São Paulo	S. J. do Rio Preto	Total
SS	35 (87,5%)	16 (55,2%)	51 (74%)
S/ β^0 tal CD39	0 (0,0%)	5 (17,2%)	5 (7,3%)
S/ β^+ tal IVS-I-6	2 (5,0%)	2 (7,0%)	4 (5,8%)
S/ β^+ tal IVS-I-110	0 (0,0%)	3 (10,3%)	3 (4,3%)
S/ β não identificado	2 (5,0%)	1 (3,5%)	3 (4,3%)
SC	1 (2,5%)	2 (7,0%)	3 (4,3%)
Total	40	29	69

Tabela 13. Distribuição dos alelos mutantes encontrados no grupo de estudo.

Alelos	Frequência Alélica		Total
	São Paulo	S. J. do Rio Preto	
β^S	75 (93,75%)	45 (77,6%)	120 (86,9%)
β^{Tal} CD39	0	5 (8,6%)	5 (3,6%)
β^{Tal} IVS-I-110	0	2 (3,4%)	4 (2,9%)
β^{Tal} IVS-I-6	2 (2,5%)	3 (5,2%)	3 (2,2%)
β^{Tal} não identificado	1 (1,25%)	2 (3,4%)	3 (2,2%)
β^C	2 (2,5%)	1 (1,7%)	3 (2,2%)
Total	80	58	138

Para as próximas etapas do estudo, os DF que apresentaram as mutações S/Beta⁺ talassemia (IVS-I-6) e S/Beta⁺ talassemia (IVS-I-110) de SJRP, foram agrupados em “S/Beta⁺” para melhor eficiência das análises estatísticas. Os S/Beta⁺ talassemia (IVS-I-6) de SP, os S/Beta talassemia, com mutante não identificado, e os Hb SC de SP e de SJRP foram excluídos do grupo de estudo, exceto para a identificação dos haplótipos, por apresentarem número pequeno de pacientes e impossibilitar as comparações estatísticas.

Após a caracterização genotípica dos DF, foram avaliados dentro de cada genótipo e localidade, alguns dados laboratoriais como: concentração de Hb F, de Hb A, de Hb S, número de leucócitos e de plaquetas. Esses parâmetros podem estar relacionados com o estado oxidativo dos DF, portanto, de acordo com o genótipo e localidade, esses índices estão demonstrados na Tabela 14 e comparados estatisticamente na Tabela 15.

As concentrações de Hb F, independente do genótipo e localidade, estavam acima da normalidade e, na comparação entre os grupos não apresentaram diferença significativa. Os níveis de Hb S estavam na faixa de 65,4 a 73,0%, e os valores de Hb A, mesmo não apresentando diferença significativa, tiveram média nos SS de SP e SJRP maior do que nos outros grupos, sendo essa decorrente de processos transfusionais.

O perfil leucocitário dos DF mostrou que no grupo de SP os valores médios de leucócitos estavam dentro da normalidade e nos de SJRP verificou-se aumento do número total de leucócitos. A comparação entre os grupos apresentou diferença significativa, em que os S/ Beta⁰ tal. e SS de SJRP tiveram maiores valores de leucócitos do que os SS de SP.

O número de plaquetas dos pacientes SS de SP e dos S/Beta⁰ tal. de SJRP estavam acima dos valores de referência. Comparando entre os grupos, os S/Beta⁰ tal. de SJRP apresentaram maiores índices do que os SS de SP e S/Beta⁺ tal. de SJRP.

Tabela 14. Dados hematológicos distribuídos por localidade e pelo genótipo da doença falciforme.

	São Paulo		São José do Rio Peto		Valores de Referência
	SS n=35	SS n=16	S/β ⁰ n=5	S/β ⁺ n=5	
HbF (%)	6,4 ± 6,6 (1,1 – 34,2)	5,6 ± 4,5 (0,6 – 13,3)	11,8 ± 5,4 (6,0 - 19,1)	5,9 ± 8,0 (0,0 – 20,0)	0,0 - 1,5*
HbS (%)	66,0 ± 20,8 (30,4 – 94,1)	65,4 ± 23,8 (25,6 – 92,3)	73,0 ± 11,9 (53,6 – 83,6)	70,6 ± 17,2 (40,0 – 79,7)	0,0*
HbA (%)	22,7 ± 21,2 (1,1 – 61,7)	21,1 ± 22,5 (1,5 – 60,6)	7,5 ± 10,6 (2,0 – 26,5)	16,4 ± 18,6 (3,5 – 49,3)	96 – 98*
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	9,9 ± 2,4 (5,3 – 15,6)	14,6 ± 5,3 (7,1 – 23,7)	16,8 ± 5,7 (7,3 – 21,5)	12,6 ± 2,9 (9,7 – 16,9)	4,6 – 10,2**
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	461,0 ± 132,4 (24,03 – 794,0)	333,6 ± 173,4 (86,0 – 720,0)	540,2 ± 121,4 (414,0 – 712,0)	283,0 ± 58,8 (206,0 – 365,0)	142 – 424**

Dados representados: média ± desvio padrão (mínimo e máximo). **M:** masculino, **F:** feminino. * valores de referência: **Hemocentro da Santa Casa de São Paulo. * valores de referência: BONINI – DOMINGOS, 2006.

Tabela 15. Comparação dos dados hematológicos entre os genótipos da doença falciforme e localidade.

Índices	SP (SS) X	SP (SS) X	SP (SS) X	SJRP (SS) X	SJRP (SS) X	SJRP (S/β ⁺) X
	SJRP (SS)	SJRP (S/β ⁰)	SJRP (S/β ⁺)	SJRP (S/β ⁰)	SJRP (S/β ⁺)	SJRP (S/β ⁰)
HbF	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HbS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
HbA	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Leucócitos	p<0,01	p<0,05	NS	NS	NS	NS
Plaquetas	p<0,05	NS	NS	p<0,05	NS	p<0,05

SP: São Paulo, **SJRP:** São José do Rio Preto, **SS:** homozigotos para a Hb S. **S/β⁰:** Interação Hb S/Beta⁰ talassemia, **S/β⁺:** Interação Hb S/Beta⁺ talassemia. Valor de p significativo (p<0,05). * teste ANOVA 1 critério para dados paramétricos e teste Kruskal-wallis para não paramétricos.

Para análises comparativas futuras entre o estado oxidativo e o perfil leucocitário, foram levantados os dados da contagem diferencial de leucócitos no grupo de DF de SP e comparados entre os genótipos. Nos pacientes SS e S/Beta tal., os valores de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos estavam dentro da faixa de referência e não apresentaram diferença significativa entre os genótipos ($p=0,4$), ($p=0,5$) e ($p=0,88$), respectivamente. Os monócitos apresentaram a média acima dos valores de referência, mas não houve diferença significativa entre eles ($p=0,43$) (Tabela 16). Para o grupo de SJRP estas informações não foram demonstradas, pois não constavam nos prontuários tais dados.

Tabela 16. Contagem diferencial de leucócitos em doentes falciformes de São Paulo.

Leucócitos	SS n=35	S/ β^+ tal IVS-I-6 n=2	Valor de Referência
Neutrófilos (%)	53,9 \pm 10,2 (30,0 - 74,7)	49,1 \pm 2,9 (47,0 - 51,1)	37 - 80
Linfócitos (%)	31,1 \pm 9,1 (14,6 - 58,0)	35,5 \pm 4,3 (32,4 - 38,5)	10 - 50
Monócitos (%)	9,2 \pm 4,1 (2,9 - 21,0)	10,3 \pm 1,6 (9,1 - 11,4)	1 - 3
Eosinófilo (%)	4,9 \pm 3,6 (0,7 - 15,7)	4,4 \pm 0,5 (4,0 - 4,7)	1 - 7

Dados representados: média \pm desvio padrão (mínimo - máximo). Valor de referência: Hemocentro da Santa Casa de São Paulo.

Com o intuito de relacionarmos os parâmetros do ferro com o estresse oxidativo, avaliamos o perfil do ferro nos genótipos da DF e localidade, com e sem a influência do processo transfusional. Para avaliar a influência da transfusão sanguínea foi calculada a diferença entre a data de coleta das amostras e a data da última transfusão, ficando assim, duas categorias: dentro de 60 dias e após 60 dias da última transfusão.

Para a caracterização do perfil do ferro, no grupo de SP, foi avaliado o índice de saturação de transferrina (IST), capacidade total de ligação do ferro (CTCF), ferro sérico e ferritina sérica. Nos pacientes de SJRP só foi possível levantar os valores de ferritina sérica porque não havia informações sobre os outros parâmetros laboratoriais.

Os doentes falciformes que receberam transfusão sanguínea dentro de 60 dias apresentaram valores médios de ferritina acima da normalidade. Houve diferença significativa entre os pacientes SS de SP e de SJRP ($p=0,02$), com os pacientes de SJRP apresentando níveis de ferritina maiores do que os de SP. Observamos valores acima da normalidade para o índice de saturação de transferrina (IST) e valores do ferro nos SS de SP. Para a capacidade total de ligação do ferro (CTCF) os valores estavam na faixa de normalidade. Dos 24 SS de SP, 18 (70,0%) pacientes utilizavam a quelação do ferro, e dos sete SS de SJRP, três (42,8%) fazia o uso de quelante de ferro.

No grupo de pacientes que receberam a última transfusão em período superior a 60 dias, os SS de SP apresentaram valores do IST e CTCF dentro dos valores de referência. Os valores de ferritina de todos os doentes estavam acima da normalidade e somente houve diferença significativa entre os SS de SP e os S/Beta⁺ tal. de SJRP ($p=0,02$), na qual os valores de ferritina dos SS de SP foram maiores do que os S/Beta⁺ tal. de SJRP. Dos 11 SS de SP, oito (72,7%) doentes utilizavam quelantes de ferro e, nenhum dos pacientes de SJRP

utilizava quelação do ferro. Como não houve diferença estatística nos valores de ferritina entre os pacientes SS, S/Beta⁺ tal. e S/Beta⁰ tal. de SJRP o consideramos um único grupo com 17 pacientes.

Após as análises do perfil do ferro dentro das categorias do período de transfusão, avaliamos o perfil do ferro entre os genótipos, com e sem a influência do processo transfusional. No grupo de SP houve diferença estatística nas médias do índice de saturação de transferrina, do valor do ferro e da ferritina dos pacientes transfundidos dentro e acima dos 60 dias. No grupo de SJRP o valor de ferritina teve diferença estatística entre os pacientes transfundidos dentro e acima dos 60 dias. (Tabela 17).

Além dos parâmetros do ferro, no grupo de SP, avaliamos os valores da proteína C reativa para verificar a interferência de processos inflamatórios/infecciosos no perfil do ferro, especialmente nos valores de ferritina, e verificamos que os valores médios para proteína C reativa médios estavam dentro do valor de referência, $1,0 \pm 0,6$ mg/dL (valor de referência: até 1 mg/dL).

Tabela 17. Comparação do perfil do ferro dentro e após o intervalo de 60 dias da data da última transfusão.

São Paulo			
Parâmetros	Dentro de 60 dias	Acima 60 dias	Valor de p
	SS n=24	SS n=11	
IST (%)	59,9 ± 17,7	45,8 ± 18,8	p=0,01
Ferro (mcg/dL)	174,4 ± 75,2	116,8 ± 52,7	p=0,01
Ferritina (ng/mL)	2644,4 ± 1886,8	1744,8 ± 926,6	p=0,03
CTCF (mcg/dL)	293,5 ± 101,6	287,6 ± 88,3	p=0,44
Média de dias	30,3	863,0	
São José do Rio Preto			
Parâmetros	Dentro de 60 dias	Acima 60 dias	Valor de p
	SS n=7	SS+ S/Beta n=17	
Ferritina (ng/mL)	4467,6 ± 2527,1	783,3 ± 603,4	p=2 X 10⁻⁴
Média de dias	36,0	623,6	

Dados representados: média ± desvio padrão. Valor de p significativo ($p < 0,05$).
 *Valor de referência: IST (20-50%), Ferro (65-170 mcg/dL Masc. e 50-170 mcg/dL Fem.) Ferritina (28-397 ng/mL Masc. e 6-159 ng/mL Fem.), CTCF (250-410 mcg/dL).
 Hemocentro da Santa Casa de São Paulo. IST: índice de saturação de transferrina, CTCF: capacidade total de ligação do ferro.

4.2 Identificação dos Haplótipos do *cluster* β

A análise dos haplótipos nos indivíduos duplo heterozigotos, Hb SC, não foi realizada devido ao número pequeno de pacientes e também por seguir outro critério de classificação diferente das utilizadas para os alelos β^S e β^{Tal} . No entanto, após a exclusão dos Hb SC, o número de pacientes avaliados diminuiu ficando 39 para São Paulo e 27 para São José do Rio Preto.

Foram encontrados para o alelo β^S 10 tipos de haplótipos diferentes: bantu, benin, camarões, e cinco atípicos com diferentes padrões de digestão. Para o alelo β^{Tal} foram identificados cinco tipos diferentes: os haplótipos I, II, V e dois atípicos com padrões distintos de digestão. Os sítios polimórficos dos haplótipos atípicos estão representados na Tabela 18, e foram denominados pelos números 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, pois cada um deles possui uma combinação de sítios polimórficos únicos e não se enquadram em nenhuma classificação estudada.

Tabela 18. Caracterização dos alelos atípicos dos haplótipos β^S e β^{Tal} .

Haplótipo β^S	<i>Xmn I</i>		<i>Hind III</i>		<i>Hinc II</i>		<i>Hinf I</i>
	5' γ^G	γ^G	γ^A	$\Psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β	
Atípico 1	-	-	-	-	+	+	
Atípico 2	-	+	+	-	-	-	
Atípico 3	-	+	-	+	+	-	
Atípico 4	+	-	-	+	+	-	
Atípico 5	-	-	-	-	-	-	

Haplótipo β^{Tal}	<i>Hind III</i>		<i>Hinc II</i>		<i>Ava II</i>	<i>BamH I</i>
	γ^G	γ^A	$\Psi\beta$	3' $\psi\beta$	β	3' β
Atípico 6	+	-	-	-	+	+
Atípico 7	+	-	-	+	+	+

A distribuição genotípica dos haplótipos β^S / β^S , de acordo com a localidade, está representada na Tabela 19. Foram identificados 28 (42,4%) Bantu/Bantu, 12 (18,2%) Bantu/Benin, quatro (6,0%) Benin/Benin, quatro (6,0%) Bantu/Atípico e dois (2,0%) Benin/Atípico.

A Tabela 20 mostra os genótipos dos haplótipos β^S / β^{Tal} encontrados nos indivíduos com interação S/Beta talassemia. Nos S/Beta⁺ tal a combinação genotípica Bantu/Atp6 foi a mais frequente, o haplótipo Benin/I, Camarões/Atp7, Bantu/Atp6, Bantu/I e Benin/I tiveram

um representante de cada. Nos S/Beta⁰ tal o haplótipo Benin/II foi encontrado em quatro representantes e o haplótipo Bantu/II em apenas um.

Tabela 19. Frequência dos haplótipos β^S / β^S por localidade e no total dos pacientes.

Genótipos	Haplótipos	São Paulo	S. J. do Rio Preto	Total
SS	Bantu/Bantu	18 (46,2%)	10 (37,0%)	28 (42,4%)
SS	Bantu/Benin	8 (20,5%)	4 (14,8%)	12 (18,2%)
SS	Benin/Benin	4 (10,2%)	-	4 (6,0%)
SS	Bantu/Atp1	2 (5,1%)	-	2 (2,0%)
SS	Bantu/Atp2	1 (2,6%)	-	1 (1,0%)
SS	Bantu/Atp3	1 (2,6%)	-	1 (1,0%)
SS	Benin/Atp4	1 (2,6%)	-	1 (1,0%)
SS	Benin/Atp5	-	2 (7,4%)	2 (2,0%)
				66 (100%)

Atp: atípico. Atp 1, 2, 3, 4 e 5: haplótipos atípicos com diferentes sítios polimórficos.

Tabela 20. Frequência dos haplótipos $\beta^S / \beta^{\text{Tal}}$

Genótipos	Haplótipos		São Paulo	S. J. do Rio Preto	Total
	β^S	β^{Tal}			
S/ β^+ tal IVS-I-6	Bantu	Atp6	1 (2,6%)	1 (3,7%)	2 (3,0%)
S/ β^+ tal IVS-I-6	Benin	I	1 (2,6%)	-	1 (1,5%)
S/ β^+ tal IVS-I-6	Cam	Atp7	-	1 (3,7%)	1 (1,5%)
S/ β^+ tal IVS-I-110	Bantu	Atp6	-	1 (3,7%)	1 (1,5%)
S/ β^+ tal IVS-I-110	Bantu	I	-	1 (3,7%)	1 (1,5%)
S/ β^+ tal IVS-I-110	Benin	I	-	1 (3,7%)	1 (1,5%)
S/ β^0 tal CD39	Benin	II	-	4 (14,8%)	4 (6,0%)
S/ β^0 tal CD39	Bantu	II	-	1 (3,7%)	1 (1,5%)
S/ β não identificado	Bantu	Atp6	1 (2,6%)	1 (3,7%)	2 (3,0%)
S/ β não identificado	Bantu	V	1 (2,6%)	-	1 (1,5%)
					66 (100%)

Atp: atípico. **Cam:** Camarões. Atp 6 e 7: haplótipos atípicos com diferentes padrões polimórficos.

Do total de 132 cromossomos analisados foram identificados, para os haplótipos β^S , 80 (60,6%) alelos Bantu, 29 (22,0%) Benin, um (0,75%) Camarões e sete (5,3%) atípicos, dois com o mesmo padrão e cinco com padrões polimórficos diferentes. Para os haplótipos β^{Tal} , cinco (3,8%) foram do tipo II, um (0,75%) do tipo I, um (0,75%) do tipo V e seis (4,5%) atípicos, cinco com o mesmo padrão e dois com padrões diferentes, estes resultados estão representados na Tabela 21.

A relação entre a expressão de Hb F correspondente ao haplótipo gene β^S e/ou β^{Tal} herdado e os pacientes que utilizam a hidroxiureia no tratamento da DF independente da localidade, pode ser observada na Tabela 22.

Tabela 21. Frequência dos alelos β^S e β^{Tal} encontrados no grupo de estudo.

Haplótipo β^S	São Paulo	S. J. do Rio Preto	Total
Bantu	51 (65,4%)	29 (53,7%)	80 (60,6%)
Benin	18 (23,1%)	11 (20,4%)	29 (22,0%)
Camarões	-	1 (1,8%)	1 (0,75%)
Atípico 1	2 (2,6%)	-	2 (1,5%)
Atípico 2	1 (1,3%)	-	1 (0,75%)
Atípico 3	1 (1,3%)	-	1 (0,75%)
Atípico 4	1 (1,3%)	-	1 (0,75%)
Atípico 5	-	2 (3,7%)	2 (1,5%)
Haplótipo β^{Tal}			
I	1 (1,3%)	2 (3,7%)	1 (0,75%)
II	-	5 (9,2%)	5 (3,8%)
V	1 (1,3%)	-	1 (0,75%)
Atípico 6	2 (2,6%)	3 (5,5%)	5 (3,8%)
Atípico 7	-	1 (1,8%)	1 (0,75%)
Total	78	54	132

Tabela 22. Concentração de Hb F de acordo com os haplótipos e uso de hidroxiureia, nos DF de ambas as localidades.

Genótipos	Haplótipos		N	Hb F com HU	N	Hb F sem HU
SS	Bantu/Bantu		7	5,6 ± 4,2 (1,2 – 12,7)	21	3,9 ± 2,7 (0,6 – 10,8)
SS	Bantu/Benin		4	10,2 ± 6,2 (1,4 – 15,7)	8	8,8 ± 11,4 (1,1 – 34,2)
SS	Benin/Benin		2	7,7 ± 7,7 (2,2 – 13,2)	2	2,7 ± 0,3 (2,5 – 3,0)
SS	Bantu/Atp1		-	-	2	9,2 ± 6,4 (4,7 – 13,7)
SS	Bantu/Atp2		1	7,7	-	-
SS	Bantu/Atp3		1	3,9	-	-
SS	Benin/Atp4		-	-	1	15,8
SS	Benin/Atp5		-	-	2	7,4 ± 8,4 (1,4 – 13,3)
Genótipos	β^S	β^{Tal}	N	Hb F com HU	N	Hb F sem HU
S/β ⁺ tal	Bantu	Atp6	-	-	3	9,6 ± 9,0 (4,2 – 20,0)
S/β ⁺ tal	Benin	I	-	-	2	2,5 ± 0,1 (2,4 – 2,6)
S/β ⁺ tal	Cam	Atp7	-	-	1	0,0
S/β ⁺ tal	Bantu	I	-	-	1	3,1
S/β ⁰ tal	Benin	II	3	12,4 ± 5,8 (8,6 – 19,1)	1	15,8
S/β ⁰ tal	Bantu	II	1	6,0	-	-
S/β não identificados	Bantu	Atp6	-	-	2	8,3 ± 1,4 (7,3 – 9,3)
S/β não identificados	Bantu	II	-	-	1	3,3
S/β não identificados	Bantu	V	-	-	1	1,5

Dados apresentados: Média ± Desvio Padrão (Mínimo - Máximo)

Com os subgrupos formados (haplótipo e uso de hidroxiureia) e (haplótipo e sem o uso de hidroxiureia), aqueles que tinham o número de pacientes maior que dois, tiveram os valores de Hb F comparados dentro e entre cada subgrupo.

Para analisar a interferência dos haplótipos na concentração de Hb F comparamos os valores de Hb F entre os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin que faziam o uso da hidroxiureia, e entre os que não usavam hidroxiureia (Tabela 23). No entanto, não houve diferença significativa entre eles, ($p=0,15$) ($p=0,33$), respectivamente.

Apesar de não termos observado diferença significativa na comparação entre os grupos com e sem o uso de HU dentro dos mesmos haplótipos, houve um acréscimo nas médias de Hb F nos pacientes que usam a HU do que aqueles que não usam a HU (Tabela 24).

Na caracterização dos haplótipos encontramos uma paciente de 20 anos de idade, homocigota para a Hb S e com concentração de Hb F de 15,8%. Ela não usava hidroxiureia e nem estava sob regime regular transfusional. Nunca apresentou manifestações crônicas da anemia falciforme, somente crises de dor de intensidade leve. Analisando os sítios polimórficos do gene β verificou-se a presença do haplótipo Bantu/Atp4, em que o alelo atípico apresentou o sítio Xmn I na região 5' γ^G .

Tabela 23. Análise da interferência dos haplótipos na expressão da Hb F.

Genótipos	Haplótipos	N	Hb F com HU	Genótipos	Haplótipos	N	Hb F sem HU
SS	Bantu/Bantu	7	5,6 ± 4,2	SS	Bantu/Bantu	21	3,9 ± 2,7
SS	Bantu/Benin	4	10,2 ± 6,2	SS	Bantu/Benin	8	8,8 ± 11,4
S/ β^0 tal	Benin/II	3	12,4 ± 5,8	S/ β^+ tal	Bantu/Atp6	3	9,6 ± 9,0
	<i>Valor de p</i>		$p=0,15$		<i>Valor de p</i>		$p=0,33$

Dados apresentados: Média ± Desvio Padrão. *Valor de p significativo* ($p<0,05$).

Tabela 24. Análise da interferência da hidroxiureia na expressão de Hb F entre os haplótipos

Genótipos	Haplótipos	N	Hb F com HU	N	Hb F sem HU	<i>Valor de p</i>
SS	Bantu/Bantu	7	5,6 ± 4,2	21	3,9 ± 2,7	$p=0,12$
SS	Bantu/Benin	4	10,2 ± 6,2	8	8,8 ± 11,4	$p=0,41$

Dados apresentados: Média ± Desvio Padrão (Mínimo - Máximo). *Valor de p significativo* ($p<0,05$).

4.3 Avaliação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante

4.3.1 Tempo 1 (T1) de análise

Para avaliar a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante nos doentes falciformes, primeiramente verificamos se a idade e o gênero influenciariam nos valores de TBARS e TEAC entre os doentes. Para tanto, classificamos os indivíduos em três faixas etárias (9-20, 21-30 e 31-50 anos), correlacionamos com o gênero e valor de TBARS pelo teste ANOVA Fatorial, e verificamos que não houve diferença estatística significativa entre os doentes, tanto para SP quanto SJRP, ($p=0,18$) e ($p=0,58$) respectivamente. Para os valores de TEAC também correlacionamos com a idade e gênero e não observamos diferença estatisticamente significativa dentro dos grupos de pacientes de cada localidade, ($p=0,22$) para SP e ($p=0,40$) para SJRP.

Após verificar que os valores de TBARS e TEAC não apresentaram diferenças estatísticas conforme a idade e gênero, analisamos se havia diferença entre os genótipos e os valores de TBARS e TEAC, separados por localidade.

Para a peroxidação lipídica verificamos que todos os valores médios de TBARS estavam acima da normalidade, no entanto, houve diferença significativa ($p=0,03$), em que a peroxidação lipídica foi maior nos SS de SJRP quando comparados com os SS de SP e os S/Beta⁰ tal. de SJRP (Figura 17).

Para a capacidade antioxidante, os DF de SJRP apresentaram os valores de TEAC dentro do intervalo de referência, e os SS de SP média de $2,25 \pm 0,08$. Comparando os valores de TEAC entre os genótipos, encontramos diferença significativa ($p=0,006$), em que os SS de SP apresentaram maior capacidade antioxidante em relação aos SS de SJRP (Figura 18).

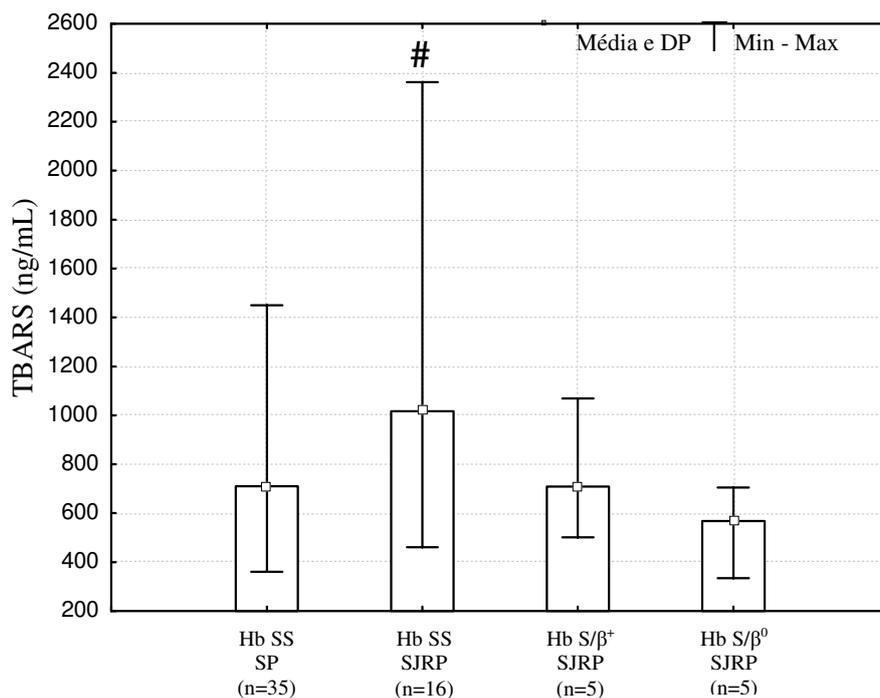


Figura 17. Comparação dos valores de TBARS entre os genótipos e localidade dos doentes falciformes no Tempo 1 de análise. # $p < 0,05$ comparado com Hb SS de SP e Hb S/β⁰ de SJRP. Valor de referência: 0-440ng/mL

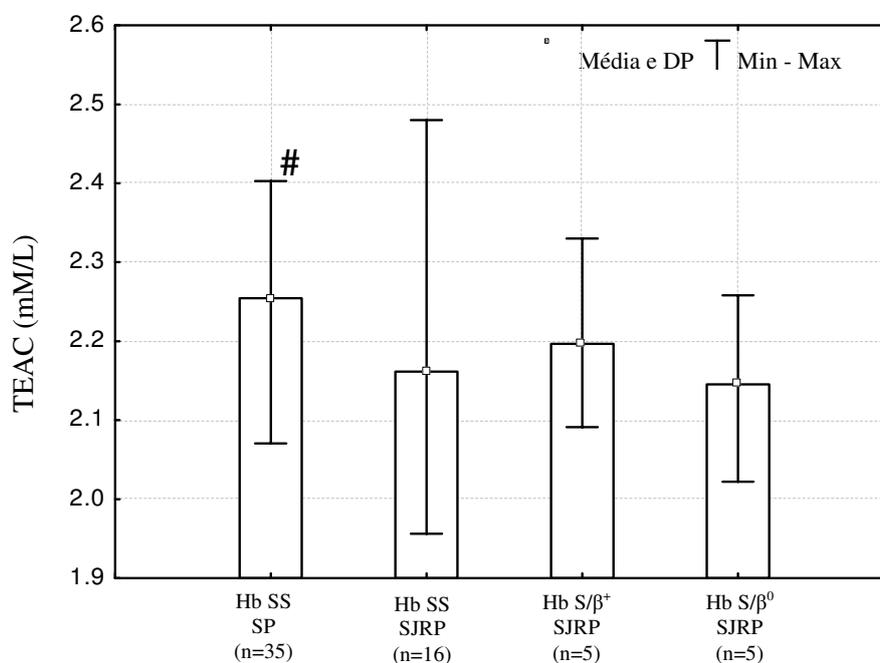


Figura 18. Comparação dos valores de TEAC entre os genótipos e localidade dos doentes falciformes no Tempo 1 de análise. # $p < 0,05$ comparado com Hb SS de SJRP. Valor de referência: 2,02-2,22 mM/L (TUKAMOTO-JUNIOR, 2008).

A relação do ferro com o estado oxidativo nos DF foi avaliada em dois grupos com quantidade de ferro diferente devido ao processo transfusional. Os pacientes foram separados em: pacientes transfundidos dentro de 60 dias e pacientes transfundidos acima de 60 dias. Para os pacientes de SP, encontramos diferença significativa no perfil do ferro para os parâmetros IST ($p=0,01$), ferro sérico ($p=0,01$) e ferritina ($p=0,03$). Para os pacientes de SJRP, em que foram avaliados somente a ferritina o valor de p foi 2×10^{-4} . Visando relacionar o perfil do ferro ao estresse oxidativo em cada grupo, não observamos diferença significativa entre os diferentes períodos transfusionais, tanto para TBARS ($p=0,28$) quanto para TEAC ($p=0,08$), em pacientes de SP. Para o grupo de SJRP encontramos diferença para os valores de TEAC ($p=0,01$), em que a capacidade antioxidante foi maior no grupo com transfusões há mais de 60 dias comparado com os que receberam transfusão dentro de 60 dias. Para verificar se existia uma relação de causa e efeito entre o perfil do ferro e os valores de TBARS e TEAC, utilizamos a análise de regressão linear simples, dentro de cada parâmetro do ferro, distribuídos nos dois períodos transfusionais. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 25 e 26.

No grupo de SP, houve uma relação de causa e efeito do valor do ferro sérico e TBARS do grupo de pacientes transfundidos dentro de 60 dias, e no grupo de SJRP, a relação existente foi entre os valores de TEAC e os níveis de ferritina sérica nos pacientes transfundidos acima de 60 dias.

Os pacientes SS, S/Beta⁺ tal. e S/Beta⁰ tal., de SJRP, foram colocados em um único grupo devido a não diferença estatística encontrada nos valores de ferritina entre os doentes transfundidos acima de 60 dias ($n=17$).

Tabela 25. Análise de regressão linear simples entre os valores de ferritina e os índices do estado oxidativo em doentes falciformes de SJRP.

Parâmetros	Dentro de 60 dias		Acima 60 dias	
	SS (n=7)		SS+ S/Beta (n=17)	
	TBARS	TEAC	TBARS	TEAC
	1049 ± 592 (576 – 2362)	2,09 ± 0,07 (1,96 – 2,14)	802 ± 400 (335– 1930)	2,19 ± 0,11 (2,02–2,48)
Ferritina			Ferritina	
4467,6 ± 2527,1 (1380,0 – 7805,0)	$p= 0,23$ $R^2=0,263$	$p= 0,67$ $R^2=0,038$	783,3 ± 603,4 (148,0–2632,0)	$p= 0,59$ $R^2=0,019$
				$p=0,03$ $R^2=0,265$

Dados representados: média ± desvio padrão (mínimo e máximo). Valor de p significativo ($p<0,05$), R^2 : coeficiente de determinação.

Tabela 26. Análise de regressão linear simples entre os parâmetros de ferro e os índices do estado oxidativo em doentes falciformes de SP.

SS (n=24) Dentro de 60 dias			
	IST	Ferro	Ferritina
	59,9 ± 17,7 (24,0 - 84,0)	174,4 ± 75,2 (72,0- 423,0)	2644,4 ± 1886,8 (344,0 - 7885,0)
TBARS 726 ± 253	<i>p</i> = 0,78 <i>R</i> ² = 0,003	<i>p</i> = 0,02 <i>R</i> ² = 0,210	<i>p</i> = 0,16 <i>R</i> ² = 0,086
TEAC 2,24 ± 0,09	<i>p</i> = 0,53 <i>R</i> ² = 0,018	<i>p</i> = 0,58 <i>R</i> ² = 0,014	<i>p</i> = 0,74 <i>R</i> ² = 0,005
SS (n=11) Acima 60 dias			
	IST	Ferro	Ferritina
	45,8 ± 18,8 (14,0 - 78,0)	116,8 ± 52,7 (33,0 - 215,0)	1744,8 ± 926,6 (149,0 - 2600,0)
TBARS 678 ± 170	<i>p</i> = 0,34 <i>R</i> ² = 0,101	<i>p</i> = 0,61 <i>R</i> ² = 0,087	<i>p</i> = 0,12 <i>R</i> ² = 0,237
TEAC 2,28 ± 0,02	<i>p</i> = 0,15 <i>R</i> ² = 0,210	<i>p</i> = 0,93 <i>R</i> ² = 0,001	<i>p</i> = 0,91 <i>R</i> ² = 0,001

Dados representados: média ± desvio padrão (mínimo e máximo). Valor de *p* significativo (*p* < 0,05), *R*²: coeficiente de determinação. Valor de referência: IST (20-50%), Ferro (65-170 mcg/dL Masc. e 50-170 mcg/dL Fem.) Ferritina (28-397 ng/mL Masc. e 6-159 ng/mL Fem.), CTCF (250-410 mcg/dL). *Hemocentro da Santa Casa de São Paulo.

Na relação da medicação específica/tratamento com o estado oxidativo dos pacientes, separamos os DF por genótipo e localidade, uma vez que estas variáveis apresentam diferença significativa nos valores de TBARS e TEAC, e formamos os seguintes grupos:

Para o grupo de SP, como não houve diferença significativa nos valores de TBARS e TEAC entre os pacientes transfundidos dentro e acima de 60 dias e por ter a maior parte de indivíduos SS, o grupo ficou representado por 35 doentes. Destes, 17 estavam em regime transfusional sob o uso do quelante de ferro deferasirox com média de 56,1 ± 35,5 dias de exposição ao medicamento, nove estavam sob o uso do deferasirox (DFX) e de hidroxiiureia (HU), sete sem o uso de medicação específica (SME) e dois sob o uso de HU.

Para o grupo de SJRP, entre os genótipos SS e S/Beta⁰ tal. houve diferença estatística nos valores de TBARS e TEAC, assim, após essa análise, o grupo, de acordo com a medicação específica e genótipo, ficou representado por 15 doentes (SS e S/Beta⁺ tal.) sem o uso de medicação específica, cinco S/Beta⁰ tal. sob o uso de HU e três SS com o uso de HU. Devido ao número pequeno de pacientes nos subgrupos assim formados, genótipo e medicação/tratamento, alguns pacientes ficaram fora dessas análises sendo de SJRP dois SS que usavam desferroxamina e hidroxiiureia e um SS que usava o DFX.

A avaliação dos valores de TBARS e TEAC com a medicação/tratamento específico dentro de cada localidade está representado na Tabela 27.

No grupo de DF de SP, entre os diferentes tipos de medicação/tratamento, houve diferença estatística nos valores de TBARS ($p=0,02$), mostrando menor peroxidação lipídica nos indivíduos que utilizavam o DFX e HU. Entre o grupo que usava o DFX e o grupo SME não encontramos diferença significativa. Os valores de TEAC não apresentaram diferença significativa entre os grupos segundo os tratamentos, porém todos os valores médios de TEAC estavam acima da normalidade ($p=0,58$).

No grupo de SJRP, os valores de TBARS e TEAC não apresentaram diferença estatística entre os subgrupos segundo a medicação/tratamento, ($p=0,15$) e ($p=0,77$), respectivamente.

Após a comparação dentro de cada localidade, avaliamos entre as duas localidades e o tipo de medicação/tratamento os valores de TBARS e TEAC. Observamos diferença estatisticamente significante entre os grupos de SP e de SJRP ($p=0,03$), em que os pacientes de SP que estavam sob o uso de DFX e HU apresentaram menor peroxidação lipídica em comparação com os doentes SME de SP e de SJRP, e aqueles doentes de SP que só utilizavam o DFX. Outra diferença encontrada foi nos SS de SJRP sem medicação específica que tiveram os valores médios de TBARS acima dos S/Beta⁰ tal. de SJRP sob o uso de HU (Figura 19).

A avaliação estatística para os valores de TEAC entre as localidades e os tipos de medicação/tratamento demonstrou que o grupo com uso de DFX de SP apresentou maior capacidade antioxidante em relação ao grupo SME de SJRP. O grupo SME de SP apresentou maior capacidade antioxidante em relação ao grupo SME de SJRP ($p=0,03$) (Figura 20).

Tabela 27. Avaliação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante nos doentes falciformes de acordo com a medição/tratamento e localidade.

Medicação Tratamento	SP (n=35)			SJRP (n=23)		
	N	TBARS	TEAC	N	TBARS	TEAC
Hidroxiureia	(2)	776 ± 344	2,28 ± 0,01	(3)*	885 ± 426	2,19 ± 0,11
Deferasirox	(17)	756 ± 269	2,26 ± 0,09	(5)**	569 ± 141	2,15 ± 2,08
Deferasirox + HU	(9)	559 ± 128	2,22 ± 0,07	-	-	-
SME	(7)	775 ± 122	2,27 ± 0,05	15	968 ± 556	2,18 ± 0,12
Valor de p		$p=0,02$	$p=0,58$		$p=0,15$	$p=0,77$

Dados representados: média ± desvio padrão. Valor de p significativo ($p<0,05$). Valores de normalidade: TBARS (0-440ng/mL) e #TEAC (2,02-2,22 mM/L). HU: hidroxiureia, SME: sem medicação específica. * Hb SS de SJRP. **Hb S/Beta⁰ de SJRP. # TUKAMOTO-JUNIOR, 2008

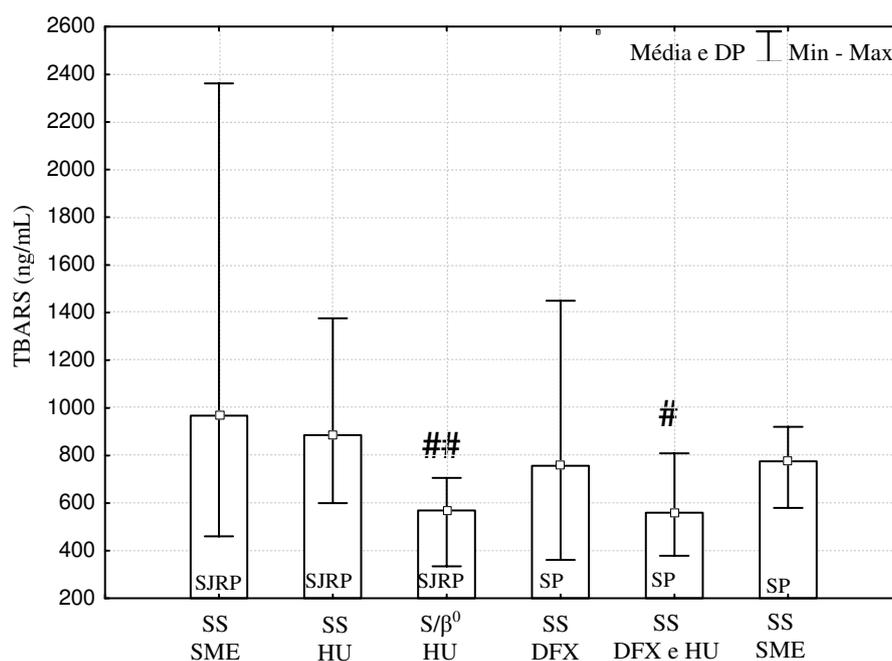


Figura 19. Valores médios de TBARS entre as localidades e tipo de medicação/tratamento no Tempo 1 de análise. # $p < 0,05$ comparado com SS de SJRP (SME), SS de SP (DFX) e SS de SP (SME). ## $p < 0,05$ comparado com SS de SJRP (SME). SME= sem medicação específica, DFX= deferassirox, HU= hidroxiureia, SP= São Paulo, SJRP= São José do Rio Preto.

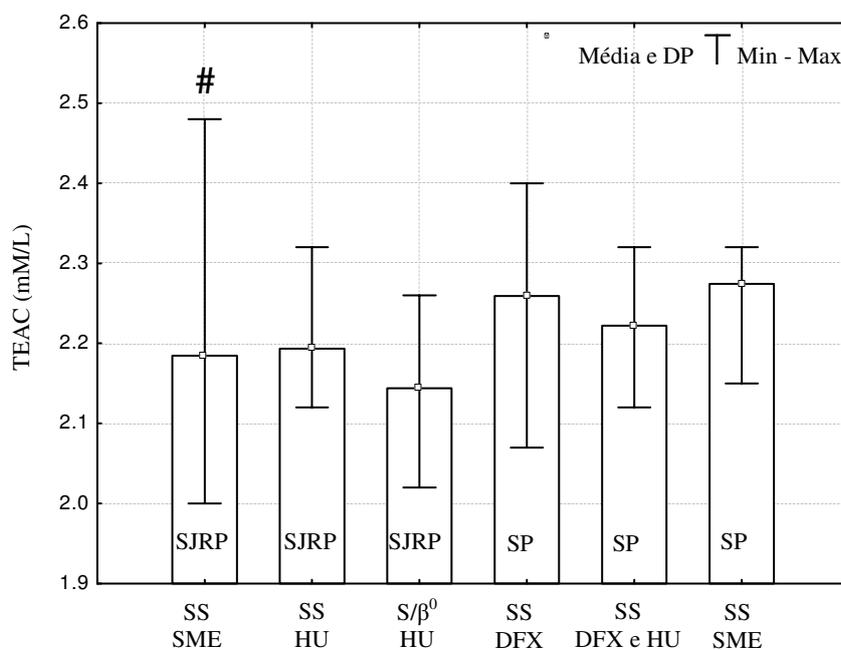


Figura 20. Valores médios de TEAC entre as localidades e tipo de medicação/tratamento no Tempo 1 de análise. # $p < 0,05$ comparado com DFX (SP) e SME (SP). SME= sem medicação específica, DFX= deferassirox, HU= hidroxiureia, SP= São Paulo, SJRP= São José do Rio Preto. Valor de referência: 2,02-2,22 mM/L (TUKAMOTO-JUNIOR, 2008).

Após a avaliação do estresse oxidativo para a variável medicação/tratamento entre as localidades, levantamos o número total de leucócitos em cada subgrupo e correlacionamos com os valores de TBARS e TEAC, com o intuito de verificar se esses parâmetros têm influência no aumento destas células, uma vez que o estresse oxidativo é um fator que pode estar envolvido no recrutamento de leucócitos. Os SS de SJRP que usavam a HU não foram correlacionados com o número de leucócitos porque apresentaram três indivíduos, impossibilitando esta análise estatística. A única correlação com diferença estatisticamente significativa foi no grupo de doentes falciformes de SJRP sem medicação específica, com correlação significativa ($p=0,04$) e ($r=0,54$), entre o número de leucócitos totais e a capacidade antioxidante (Tabela 28 e Figura 21).

Tabela 28. Correlação entre o número de leucócitos totais e TBARS e TEAC dentro de cada subgrupo.

	São Paulo			São José do Rio Preto	
	DFX (N=17)	DFX + HU (N=9)	SME (N=7)	HU (N=5)	SME (N=15)
TBARS (ng/mL)	756 ± 269	559 ± 128	775 ± 122	569 ± 141	968 ± 556
Leucócitos ($10^3 \cdot \text{mm}^3$)	10,83 ± 2,16	8,90 ± 2,74	10,53 ± 2,47	16,80 ± 5,69	14,02 ± 4,93
Valor de p	<i>p=0,62</i>	<i>p=0,62</i>	<i>p=0,96</i>	<i>p=0,56</i>	<i>p=0,23</i>
Valor de r	<i>r=0,11</i>	<i>r=0,21</i>	<i>r=0,01</i>	<i>r=-0,34</i>	<i>r=0,32</i>
TEAC (mM/L)	2,26 ± 0,09	2,22 ± 0,07	2,28 ± 0,03	2,15 ± 0,10	2,18 ± 0,12
Leucócitos ($10^3 \cdot \text{mm}^3$)	10,83 ± 2,16	8,90 ± 2,74	10,53 ± 2,47	16,80 ± 5,69	14,02 ± 4,93
Valor de p	<i>p=0,62</i>	<i>p=0,95</i>	<i>p=0,99</i>	<i>p=0,17</i>	<i>p=0,04</i>
Valor de r	<i>r=-0,02</i>	<i>r=0,02</i>	<i>r=0,01</i>	<i>r=0,71</i>	<i>r=0,54</i>

Dados representados: média ± desvio padrão. *Valor de p significativo* ($p < 0,05$). Valores de normalidade: TBARS (0-440ng/mL), #TEAC (2,02-2,22 mM/L) e Leucócitos totais (4,6-10,2 $10^3 \cdot \text{mm}^3$). HU: hidroxiureia, SME: sem medicação específica, DFX: deferasirox. r: coeficiente de correlação, *Pearson* para dados paramétricos e *Sperman* para dados não-paramétricos. TUKAMOTO-JUNIOR, 2008

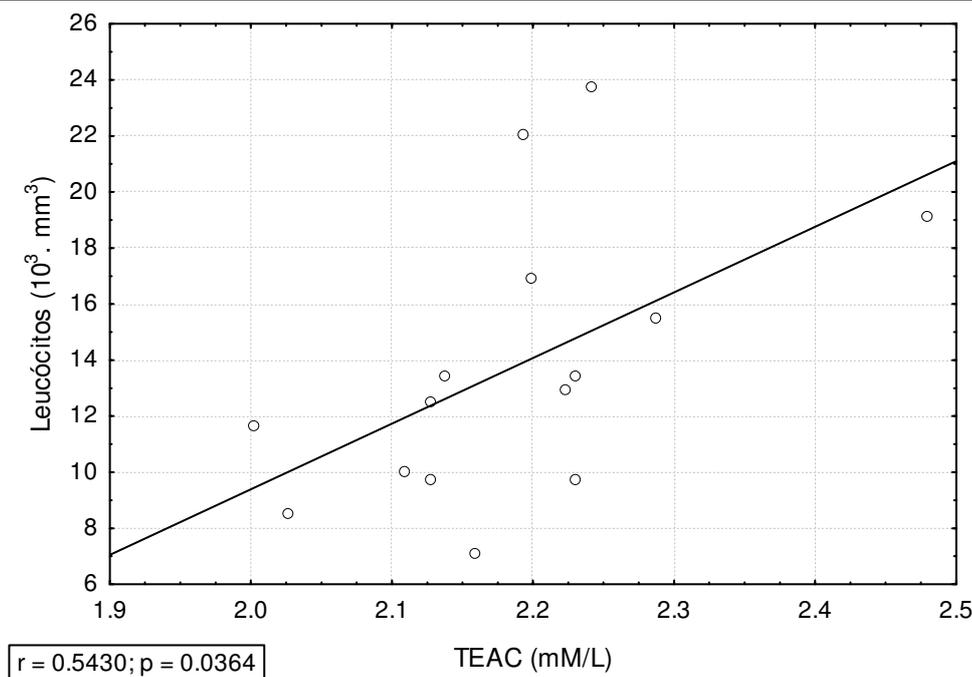


Figura 21. Correlação entre o número total de leucócitos e capacidade antioxidante nos doentes falciformes sem medicação específica de São José do Rio Preto. *r*: coeficiente de correlação.

Para o grupo de SP, considerando a contagem diferencial de leucócitos, analisamos as células do perfil leucocitário que estavam acima do valor de normalidade e as correlacionamos com os valores de TBARS e TEAC. Somente os valores de monócitos estavam acima da faixa de normalidade em todos os subgrupos segundo o uso de medicação/tratamento. No entanto, aplicando o teste de correlação linear, verificamos que os valores de TBARS, nos pacientes sem medicação/tratamento específico, e a porcentagem de monócitos apresentaram uma correlação linear forte, demonstrando que o aumento da porcentagem de monócitos é proporcional ao aumento de TBARS (Tabela 29 e Figura 22).

Tabela 29. Correlação entre a porcentagem de monócitos, TBARS e TEAC nos pacientes de SP.

	TBARS	Monócitos	<i>p</i>	<i>r</i>	TEAC	Monócitos	<i>p</i>	<i>r</i>
DFX (N=17)	756 ± 269 (361-1450)	7,9 ± 4,2 (2,9-21,0)	<i>p</i> =0,14	<i>r</i> =0,36	2,26 ± 0,09 (2,07-2,40)	7,9 ± 4,2 (2,9-21,0)	<i>p</i> =0,15	<i>r</i> =0,36
DFX + HU (N=9)	559 ± 128 (379-809)	8,0 ± 3,2 (4,0-15,0)	<i>p</i> =0,58,	<i>r</i> =0,21	2,22 ± 0,07 (2,12-2,32)	8,0 ± 3,2 (4,0-15,0)	<i>p</i> =0,11	<i>r</i> =0,55
SME (N=7)	775 ± 122 (580-920)	10,9 ± 2,4 (7,0-15,2)	<i>p</i> =0,02	<i>r</i> =0,80	2,28 ± 0,03 (2,22-2,32)	10,9 ± 2,4 (7,0-15,2)	<i>p</i> =0,43	<i>r</i> =-0,35

Dados representados: média ± desvio padrão (mínimo e máximo). Valor de *p* significativo (*p*<0,05). Valores de normalidade: TBARS (0-440ng/mL), #TEAC (2,02-2,22 mM/L) e Monócitos (1-3 %). HU: hidroxiureia, SME: sem medicação específica, DFX: deferasirox. *r*: coeficiente de correlação, Pearson para dados paramétricos e *Sperman* para dados não-paramétricos. # TUKAMOTO-JUNIOR, 2008.

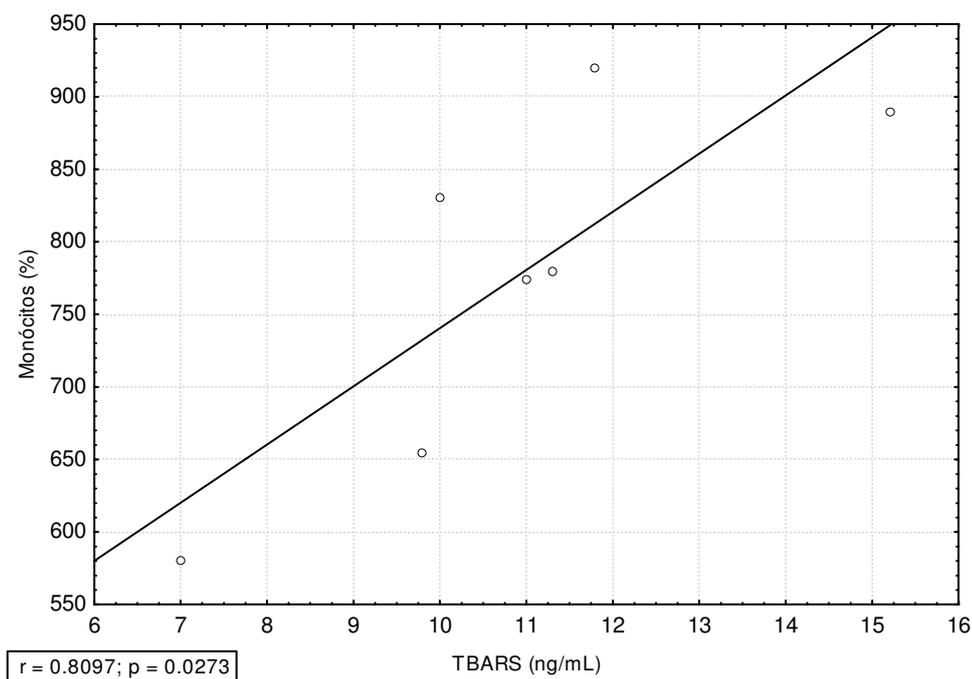


Figura 22. Correlação entre a porcentagem de monócitos e peroxidação lipídica nos doentes falciformes sem medicação específica de São Paulo. r: coeficiente de correlação.

Os pacientes SS de SP e S/Beta⁰ tal. de SJRP que apresentaram o número de plaquetas acima da normalidade foram separados, de acordo com o uso de medicamento/tratamento, e correlacionamos com os valores de TBARS e TEAC. Porém, após as análises estatísticas não encontramos nenhuma correlação significativa entre número de plaquetas, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante (Tabela 30).

Tabela 30. Correlação entre o número de plaquetas e TBARS e TEAC dentro de cada subgrupo para uso de medicação.

	São Paulo SS		São José do Rio Preto S/Beta ⁰	
	DFX (N=17)	DFX + HU (N=9)	SME (N=7)	HU (N=5)
TBARS (ng/mL)	756 ± 269 (361-1450)	559 ± 128 (379-809)	775 ± 122 (580-930)	569 ± 141 (335-706)
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	487,1 ± 124,1 (289,0-794,0)	434,1 ± 159,3 (243,0-778,0)	413,0 ± 130,5 (317,0-649,0)	540,2 ± 121,4 (414,0-712,0)
Valor de p	<i>p</i> =0,22	<i>p</i> =0,77	<i>p</i> =0,37	<i>p</i> =0,65
Valor de r	<i>r</i> =-0,31	<i>r</i> =0,11	<i>r</i> =-0,40	<i>r</i> =-0,270
TEAC (mM/L)	2,26 ± 0,09 (2,07-2,40)	2,22 ± 0,07 (2,12-2,32)	2,28 ± 0,03 (2,22-2,32)	2,14 ± 0,09 (2,02-2,26)
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	487,1 ± 124,1 (289,0-794,0)	434,1 ± 159,3 (243,0-778,0)	413,0 ± 130,5 (317,0-649,0)	540,2 ± 121,4 (414,0-712,0)
Valor de p	<i>p</i> =0,43	<i>p</i> =0,32	<i>p</i> =0,11	<i>p</i> =0,74
Valor de r	<i>r</i> =0,20	<i>r</i> =0,36	<i>r</i> =-0,65	<i>r</i> =-0,19

Dados representados: média ± desvio padrão (mínimo e máximo). *Valor de p* significativo (*p*<0,05). Valores de normalidade: TBARS (0-440ng/mL), TEAC (2,02-2,22 mM/L) e Plaquetas (142-424 10³/mm³). HU: hidroxiiureia, SME: sem medicação específica, DFX: deferassirox. *r*: coeficiente de correlação, *Pearson* para dados paramétricos e *Sperman* para dados não-paramétricos.

Nas análises envolvendo os haplótipos e o estado oxidativo, comparamos os valores de TBARS e TEAC dos doentes com o mesmo haplótipo, com e sem o efeito da hidroxiiureia, e entre os diferentes haplótipos com e sem o uso de hidroxiiureia (Tabela 31 e Tabela 32). Apesar do resultado das análises não apresentarem diferenças significativas, tanto o haplótipo Bantu/Bantu quanto Bantu/Benin apresentaram valores médios de TBARS acima dos valores de normalidade, independente do uso de hidroxiiureia, demonstrando, assim, uma maior peroxidação lipídica nesses indivíduos.

Tabela 31. Análise do TBARS entre os haplótipos, com e sem o uso de hidroxiiureia, e dentro do mesmo haplótipo com e sem o uso da hidroxiiureia.

Genótipos	Haplótipos	com HU		sem HU		Valor de <i>p</i>
		N	TBARS	N	TBARS	
SS	Bantu/Bantu	7	710 ± 339 (379-1376)	21	889 ± 343 (361-1930)	<i>p</i> =0,12
SS	Bantu/Benin	4	557 ± 55 (478-600)	8	940 ± 607 (478-2362)	<i>p</i> =0,08
	Valor de <i>p</i>		<i>p</i> =0,17		<i>p</i> =0,38	-

Dados representados: média ± desvio padrão (mínimo e máximo). *Valor de p* significativo (*p*≤0,05). Valores de normalidade: TBARS (0-440ng/mL), #TEAC (2,02-2,22 mM/L). # TUKAMOTO-JUNIOR, 2008.

Tabela 32. Análise do TEAC entre os haplótipos, com e sem o uso de hidroxiureia, e dentro do mesmo haplótipo com e sem o uso da hidroxiureia.

Genótipos	Haplótipos	N	com HU		sem HU		Valor de <i>p</i>
			TEAC	N	TEAC	N	
SS	Bantu/Bantu	7	2,17 ± 0,12 (1,96 – 2,32)	21	2,25 ± 0,11 (2,07–2,48)	<i>p</i> =0,06	
SS	Bantu/Benin	4	2,25 ± 0,09 (2,12-2,32)	8	2,19 ± 0,09 (2,03–2,30)	<i>p</i> =0,16	
	Valor de <i>p</i>		<i>p</i> =0,14		<i>p</i> =0,09	-	

Dados representados: média ± desvio padrão (mínimo e máximo). Valor de *p* significativo (*p*≤0,05). Valores de normalidade: TBARS (0-440ng/mL), #TEAC (2,02-2,22 mM/L). Grupos com o número de pacientes ≤ 2 não foram demonstrados. #TUKAMOTO-JUNIOR, 2008.

4.3.2 Tempo 2 (T2) de análise

O Tempo dois (T2) de análise, como descrito na casuística, foi constituído de 55 doentes falciformes. No entanto, para o grupo de SP, dos 40 pacientes, foram recoletadas 33 amostras e dos 29 DF de SJRP foram recoletadas 22 amostras. De acordo com o genótipos da DF o T2 foi constituído dos seguintes doentes falciformes (Tabela 33).

Tabela 33. Caracterização do número de doentes falciformes envolvidos no T1 e no T2, reparados pelo genótipo e localidade.

Genótipo	São Paulo		São José do Rio Preto	
	T1	T2	T1	T2
SS	35	29	16	13
S/β ⁰ tal CD39	-	-	5	4
S/β ⁺ tal IVS-I-6	2	2	2	1
S/β ⁺ tal IVS-I-110	-	-	3	3
S/β não identificado	2	2	1	1
SC	1	0	2	0
Total	40	33	29	22

Para as próximas etapas do estudo, como realizado no T1, os S/Beta⁺ tal. (IVS-I-6) e S/Beta⁺ tal. (IVS-I-110) de SJRP, foram agrupados em “S/Beta⁺” para o auxílio das análises estatísticas. Os S/Beta tal., com mutante Beta tal não identificado, de SP e de SJRP foram excluídos do grupo de estudo, por apresentarem número pequeno de pacientes e também pela não caracterização do alelo Beta tal. mutante.

Em relação ao número de leucócitos e de plaquetas foram avaliados os valores médios dentro de cada genótipo e localidade, para verificar se estes dados diferiram do T1 de análise.

No entanto, o perfil leucocitário dos DF mostrou que no grupo de SP os valores médios de leucócitos estavam dentro da normalidade e nos de SJRP, independente do genótipo, apresentou os valores acima da referência. A comparação entre os grupos mostrou diferença significativa ($p=0,0003$), em que todos os DF de SJRP tiveram números de leucócitos maiores do que os SS de SP.

O número de plaquetas dos pacientes SS de SP e dos S/Beta⁰ tal. de SJRP estavam acima dos valores de referência. Comparando entre os grupos, a diferença estatística ($p=0,01$) observada foi nos valores médios dos SS de SP e SS de SJRP, em que os SS de SP apresentaram maiores índices do que os SS de SJRP (Tabela 34 e 35).

No grupo de SP também foi avaliada a contagem diferencial de leucócitos e verificamos que a média da porcentagem de monócitos ($6,4 \pm 2,9$) estava acima dos valores de referência (1-3%).

Tabela 34. Número de leucócitos e de plaquetas distribuídos por localidade e pelo genótipo da doença falciforme

	São Paulo	São José do Rio Preto			Valores de Referência
	SS n=29	SS n=13	S/β ⁰ n=4	S/β ⁺ n=4	
Leucócitos (10 ³ .mm ³)	10,8 ± 2,5	14,7 ± 4,8	18,3 ± 3,0	15,2 ± 3,7	4,6 – 10,2
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	475,8 ± 169,2	327,2 ± 121,0	475,3 ± 115,3	294,0 ± 81,4	142 - 424

Dados representados: média ± desvio padrão (mínimo e máximo). **M:** masculino, **F:** feminino.
Valores de referência: Hemocentro da Santa Casa de São Paulo

Tabela 35. Comparação do número de leucócitos e de plaquetas entre os genótipos da doença falciforme e localidade.

Índices	SP (SS) X SJRP (SS)	SP (SS) X SJRP (S/β ⁰)	SP (SS) X SJRP (S/β ⁺)	SJRP (SS) X SJRP (S/β ⁰)	SJRP (SS) X SJRP (S/β ⁺)	SJRP (S/β ⁺) X SJRP (S/β ⁰)
	Leucócitos	p<0,01	p<0,05	p<0,01	NS	NS
Plaquetas	p<0,05	NS	NS	NS	NS	NS

SP: São Paulo, **SJRP:** São José do Rio Preto, **SS:** homozigotos para a Hb S. **S/β⁰:** Interação Hb S/Beta⁰ talassemia, **S/β⁺:** Interação Hb S/Beta⁺ talassemia. Valor de p significativo ($p<0,05$). * teste ANOVA 1 critério para dados paramétricos e teste Kruskal-wallis para não paramétricos.

Em relação ao perfil do ferro, processo transfusional e estado oxidativo, foram realizadas as mesmas análises para o T2. Para tal, separamos os doentes nas duas categorias: dentro de 60 dias e após 60 dias da última transfusão e verificamos que para o grupo de SP a

única diferença encontrada foi na concentração de ferritina, em que os pacientes transfundidos dentro de 60 dias apresentaram maior valor do que o outro grupo. Para SJRP houve diferença entre os valores de TEAC e da concentração e ferritina, em que os pacientes transfundidos acima de 60 dias apresentaram menor concentração de ferritina e maior capacidade antioxidante (Tabela 36).

Tabela 36. Análise do perfil do ferro e estado oxidativo dos pacientes transfundidos dentro e acima de 60 dias.

	São Paulo			São José do Rio Preto		
	Dentro de 60 dias	Acima 60 dias	<i>p</i>	Dentro de 60 dias	Acima 60 dias	<i>p</i>
	SS n=15	SS n=14		SS n=5	SS+ S/Beta n=15	
IST (%)	50,5 ± 17,3	45,4 ± 16,3	<i>p</i> =0,42	-	-	-
Ferro (mcg/dL)	148,6 ± 101,8	138,4 ± 45,3	<i>p</i> =0,89	-	-	-
Ferritina (ng/mL)	2589,5 ± 1156,7	1650,4 ± 1231,7	<i>p</i> =0,04	2391,2 ± 958,9	1427,5 ± 871,1	<i>p</i> =0,02
CTCF (mcg/dL)	247,5 ± 53,9	294,5 ± 86,2	<i>p</i> =0,08	-	-	-
TBARS (ng/mL)	690 ± 192	805 ± 334	<i>p</i> =0,26	1378 ± 670	1489 ± 793	<i>p</i> =0,90
TEAC (mM/L)	2,09 ± 0,11	2,07 ± 0,13	<i>p</i> =0,76	2,03 ± 0,10	2,12 ± 0,05	<i>p</i> =0,02
Média de dias	30,6	381,6		37,0	672,0	

Dados representados: média ± desvio padrão. Valor de *p* significativo (*p*<0,05). *Valor de referência: IST (20-50%), Ferro (65-170 mcg/dL Masc. e 50-170 mcg/dL Fem.) Ferritina (28-397 ng/mL Masc. e 6-159 ng/mL Fem.), CTCF (250-410 mcg/dL). *Hemocentro da Santa Casa de São Paulo.

Após a caracterização do perfil do ferro nos dois diferentes períodos de transfusão, avaliamos se os parâmetros do ferro, nos doentes falciformes, ocasionariam alguma influência no aumento dos valores de TBARS e TEAC, logo, verificamos nos pacientes transfundidos dentro de 60 dias de SP que novamente o ferro teve uma relação de causa e efeito nos valores de TBARS, como visto no T1, (*p*=0,03 e *R*²=0,49). Os outros parâmetros não mostraram uma relação significativa.

Para o parâmetro tratamento/medicação específica analisamos se as mesmas diferenças encontradas no T1 estavam presentes no T2. Assim, separamos os grupos de acordo com o genótipo e tratamento/medicação, para o grupo de SP, 14 doentes com o

genótipo SS estavam sob o uso do DFX e com exposição ao medicamento de $381,9 \pm 47,9$ dias, nove SS estavam sob o uso do DFX e HU e com exposição ao DFX de $398,7 \pm 63,9$ dias, e sete SS sem medicação específica. Ficou de fora dessas análises um paciente SS que usava somente a hidroxiureia. Comparando os valores de TBARS dentro desse grupo verificamos que houve diferença estatística ($p=0,008$), em que o grupo sem uso de medicação específica apresentou maior peroxidação lipídica quando comparado com o grupo que usava DFX e com o grupo que usava DFX e HU. Não houve diferença estatística para os valores de TEAC dentro do grupo de SP.

Para o grupo de SJRP, 11 DF (SS + S/Beta⁺ tal.) estavam sem o uso de medicação específica e seis sob o uso de hidroxiureia. Dois SS que usavam desferroxamina e hidroxiureia e um SS que usava o DFX foram excluídos dessa análise. Os doentes que usavam HU tiveram menor peroxidação lipídica e maior capacidade antioxidante em relação aos que estavam sem o uso de medicação específica (Tabela 37).

Após a avaliação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante dentro de cada localidade, comparamos os valores de TEAC e TBARS entre as duas localidades e o tipo de tratamento/medicação. Para os valores de TBARS a análise mostrou diferença estatisticamente significativa. Os pacientes de SP que estavam sob o uso de DFX e HU e aqueles que só usavam o DFX, apresentaram menor peroxidação lipídica em comparação com os doentes sem o uso de medicação específica de SP e de SJRP (Figura 23).

A comparação entre os valores de TEAC, as localidades e os tipos de medicação/tratamento no T 2, demonstraram que o grupo em uso de DFX de SP e os HU de SJRP apresentaram maior capacidade antioxidante em relação ao SME de SP ($p=0,02$) (Figura 24).

Tabela 37. Avaliação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante nos doentes falciformes de acordo com a medição/tratamento e localidade do Tempo 2 (T2) de análise.

Medicação Tratamento	SP (n=28)			SJRP (n=15)		
	N	TBARS	TEAC	N	TBARS	TEAC
Hidroxiureia	-	-	-	(6)	652 ± 251	2,16 ± 0,06
Deferasirox	(14)	665 ± 204	2,14 ± 0,06	-	-	-
Deferasirox + HU	(9)	539 ± 122	2,01 ± 0,03	-	-	-
SME	(7)	956 ± 183	1,98 ± 0,16	(11)	1486 ± 809	2,04 ± 0,09
<i>Valor de p</i>		<i>p=0,008</i>	<i>p=0,114</i>		<i>p=0,009</i>	<i>p=0,01</i>

Dados representados: média ± desvio padrão. *Valor de p significativo* ($p < 0,05$). Valores de normalidade: TBARS (0-440ng/mL) e #TEAC (2,02-2,22). HU: hidroxiureia, SME: sem medicação específica. # TUKAMOTO-JUNIOR, 2008.

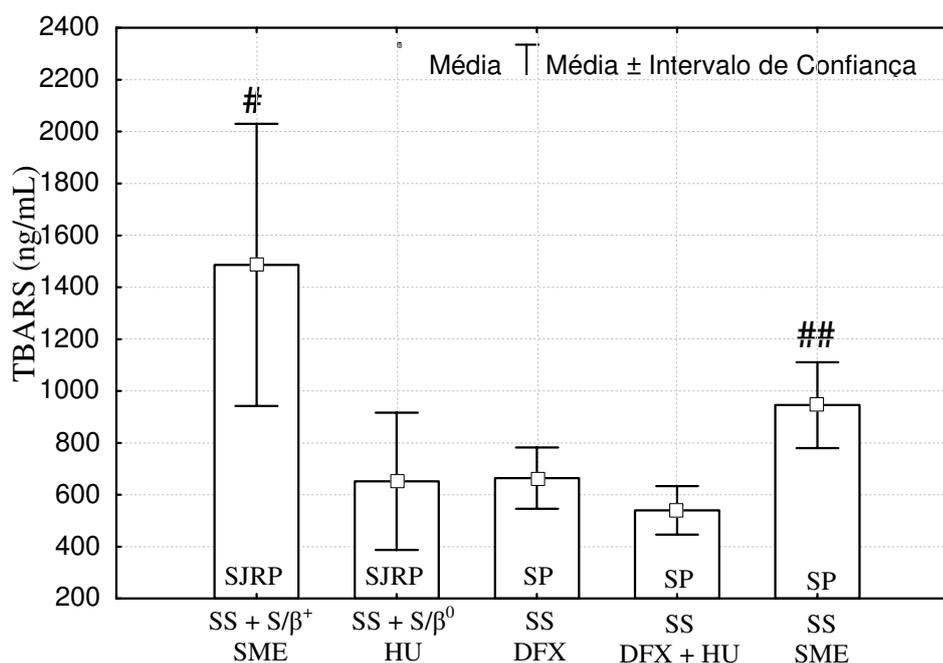


Figura 23. Valores médios de TBARS entre as localidades e tipo de medicação/tratamento no Tempo 2 (T2) de análise. # $p < 0,05$ comparado com DFX + HU (SP), DFX (SP), HU (SJRP). ## $p < 0,05$ comparado com DFX + HU (SP) e DFX (SP). SME= sem medicação específica, DFX= deferasirox, HU= hidroxiureia, SP= São Paulo, SJRP= São José do Rio Preto.

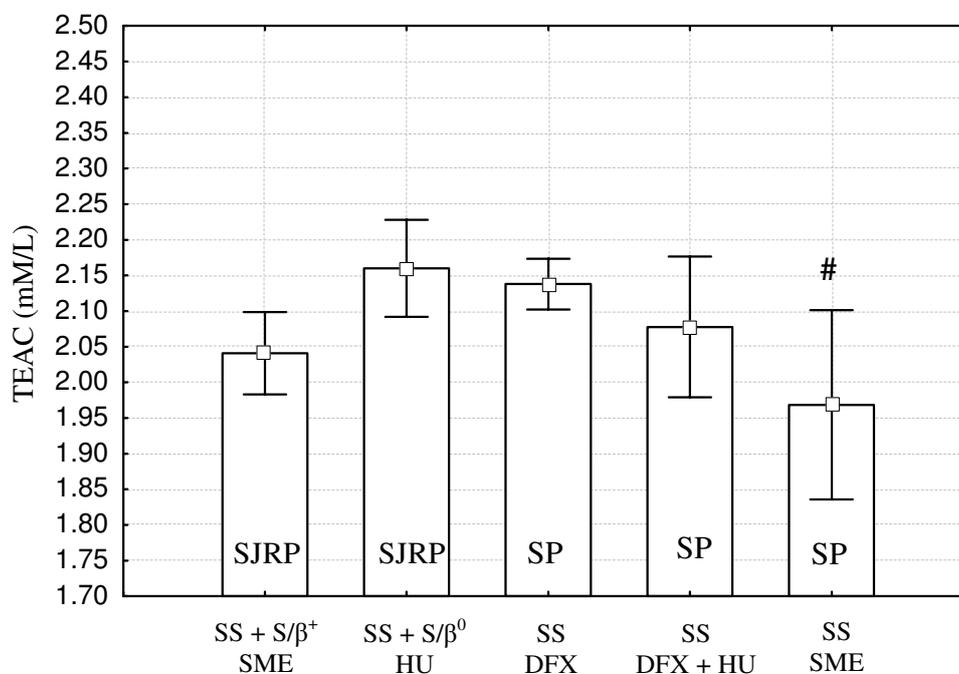


Figura 24. Valores médios de TEAC entre as localidades e tipo de medicação/tratamento no Tempo 2 (T2). # $p < 0,05$ comparado com DFX (SP) e HU (SJRP). SME= sem medicação específica, DFX= deferasirox, HU= hidroxiureia, SP= São Paulo, SJRP= São José do Rio Preto.

Ainda com relação ao parâmetro de uso de medicação/tratamento específico e localidade, avaliamos o número total de leucócitos e verificamos que todas as médias estavam acima dos valores de referência. No entanto, correlacionamos esses dados com TBARS e TEAC (Tabela 38) e verificamos que a única correlação significativa foi no grupo de doentes falciformes de SJRP sem o uso de medicação específica, no qual houve uma correlação média entre o número de leucócitos totais e a capacidade antioxidante (Figura 25).

Tabela 38. Correlação entre o número de leucócitos totais e TBARS e TEAC dentro de cada subgrupo no Tempo 2 (T2).

	São Paulo			São José do Rio Preto	
	DFX (N=14)	DFX + HU (N=9)	SME (N=7)	HU (N=6)	SME (N=11)
TBARS	665 ± 204	539 ± 122	956 ± 183	652 ± 251	1486 ± 809
Leucócitos	11,80 ± 3,40	10,15 ± 2,52	11,48 ± 2,21	16,83 ± 4,03	13,96 ± 4,41
<i>Valor de p</i>	<i>p=0,55</i>	<i>p=0,60</i>	<i>p=0,58</i>	<i>p=0,12</i>	<i>p=0,54</i>
<i>Valor de r</i>	<i>r=-0,17</i>	<i>r=-0,20</i>	<i>r=0,33</i>	<i>r=-0,69</i>	<i>r=-0,20</i>
TEAC	2,14 ± 0,06	2,00 ± 0,03	1,98 ± 0,16	2,09 ± 0,07	2,01 ± 0,08
Leucócitos	11,80 ± 3,40	10,15 ± 2,52	11,48 ± 2,21	16,83 ± 4,03	13,96 ± 4,41
<i>Valor de p</i>	<i>p=0,11</i>	<i>p=0,50</i>	<i>p=0,22</i>	<i>p=0,45</i>	<i>p=0,02</i>
<i>Valor de r</i>	<i>r=-0,43</i>	<i>r=0,25</i>	<i>r=0,65</i>	<i>r=0,38</i>	<i>r=0,67</i>

Dados representados: média ± desvio padrão. *Valor de p significativo* ($p < 0,05$). Valores de normalidade: TBARS (0-440 ng/mL), TEAC (2,02-2,22 mM/L) e Leucócitos totais (4,6-10,2 $10^3 \cdot \text{mm}^3$). *r*: coeficiente de correlação, *Pearson* para dados paramétricos e *Sperman* para dados não-paramétricos.

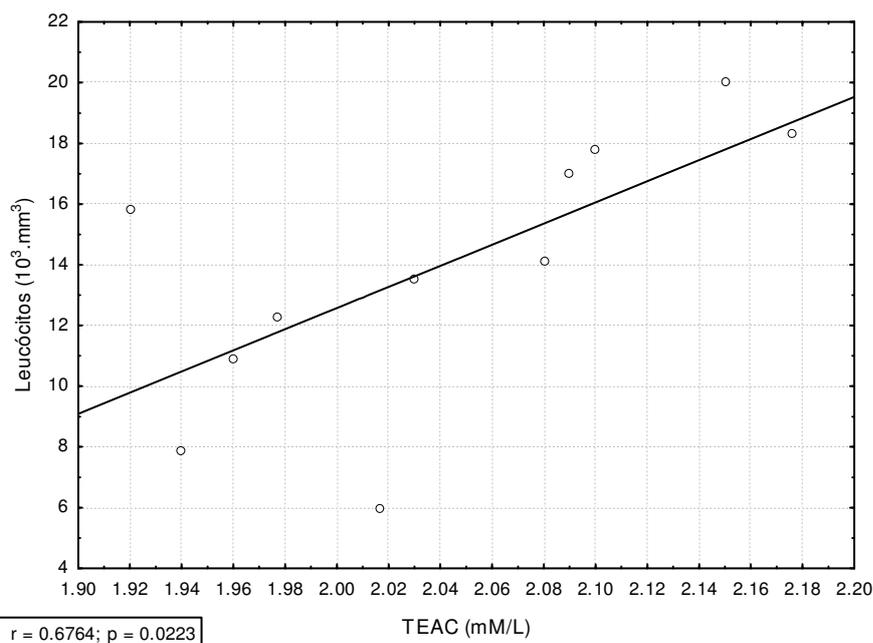


Figura 25. Correlação entre o número total de leucócitos e capacidade antioxidante nos doentes falciformes sem medicação específica do Tempo 2 (T2) de São José do Rio Preto. *r*: coeficiente de correlação.

Na contagem diferencial de leucócitos, no grupo de SP, também observamos a porcentagem de monócitos acima da normalidade, assim, separamos esses valores por medicação/tratamento e aplicamos o teste de correlação linear (Tabela 39). Verificamos que os valores de TBARS, nos pacientes sem medicação/tratamento específico, e a porcentagem de monócitos apresentaram uma correlação linear forte, mostrando a mesma situação que encontramos no T1, em que o aumento dos valores de TBARS é proporcional a porcentagem de monócitos (Figura 26).

O número de plaquetas dentro de cada subgrupo também foi correlacionado com os valores de TBARS e TEAC e verificamos que não houve nenhuma correlação significativa.

Tabela 39. Correlação entre a porcentagem de monócitos, TBARS e TEAC nos pacientes de SP do Tempo 2.

	TBARS	Monócitos	<i>p</i>	<i>r</i>	TEAC	Monócitos	<i>p</i>	<i>r</i>
DFX (N=14)	665 ± 204	6,5 ± 2,8	<i>p</i> =0,77	<i>r</i> =0,08	2,14 ± 0,06	6,5 ± 2,8	<i>p</i> =0,55	<i>r</i> =0,17
DFX + HU (N=9)	539 ± 122	6,2 ± 1,6	<i>p</i> =0,57	<i>r</i> =0,21	2,00 ± 0,03	6,2 ± 1,6	<i>p</i> =0,49	<i>r</i> =0,26
SME (N=7)	956 ± 183	9,6 ± 3,5	<i>p</i> =0,02	<i>r</i> =0,82	1,98 ± 0,16	9,6 ± 3,5	<i>p</i> =0,54	<i>r</i> =0,27

Dados representados: média ± desvio padrão. *Valor de p significativo* ($p < 0,05$). Valores de referência: TBARS (0-440ng/mL), TEAC (2,02-2,22 mM/L) e Monócitos (1-3 %). *r*: coeficiente de correlação, *Pearson* para dados paramétricos e *Sperman* para dados não-paramétricos

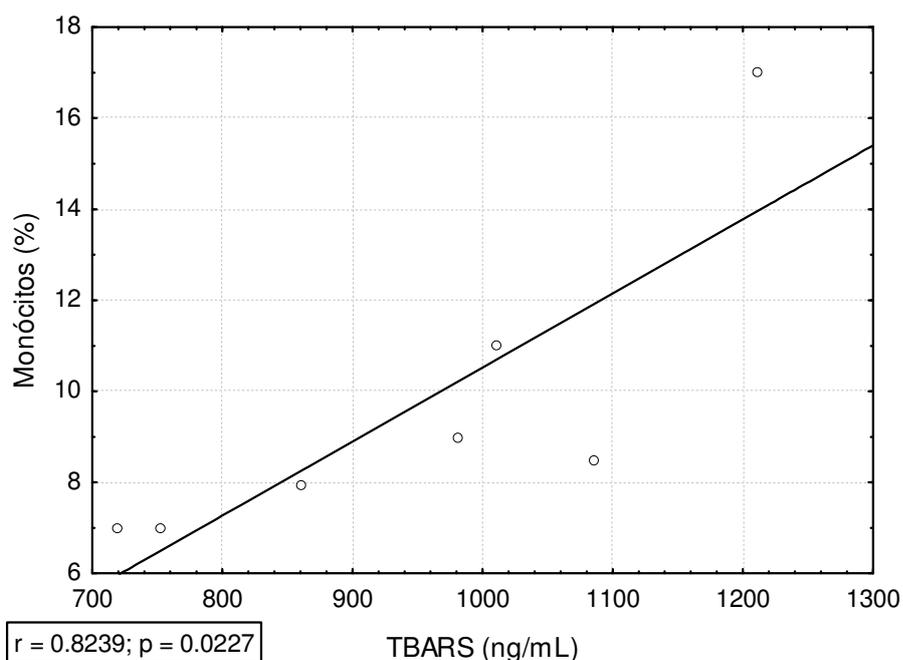


Figura 26. Correlação entre a porcentagem de monócitos e peroxidação lipídica nos doentes falciformes sem medicação específica de São Paulo do Tempo 2 (T2) de análise. *r*: coeficiente de correlação.

4.4 Comparação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante entre o Tempo 1 (T1) e Tempo 2 (T2) de análise

Devido à participação das espécies reativas de oxigênio no mecanismo de instalação de várias doenças, inicialmente caracterizamos as complicações clínicas agudas e crônicas da doença falciforme, nos dois grupos de estudo, e aquelas que apresentaram diferença estatística entre SP e SJRP foram correlacionadas com os valores de TBARS e TEAC. Os eventos clínicos avaliados foram: número de crises de dor/ano nos três anos anteriores da data do início da pesquisa, úlceras isquêmicas, necrose avascular do fêmur ou do úmero, priapismo, colecistectomia, acidente vascular cerebral (AVC) e síndrome torácica aguda (STA). Comparando os eventos clínicos entre os dois grupos verificamos que em SJRP um número maior de pacientes apresentou seis ou mais crises de dor do que em SP ($p=0,02$). Outra diferença significativa foi na ocorrência AVC ($p=0,02$), na qual os doentes falciformes de SP apresentaram um maior número desses eventos (Tabela 40).

Em relação aos episódios de dor, verificamos que os doentes de SP com episódios de dor ≥ 6 apresentaram uma maior peroxidação lipídica em relação aos de 0-2 e 3-5 episódios de dor (Figura 27-A). Apesar, da avaliação da capacidade antioxidante não ter apresentado diferença significativa entre as categorias separadas para o número de crises de dor, os valores de TEAC estavam todos acima da referência.

No grupo de SJRP os pacientes classificados de 3-5 e ≥ 6 crises de dor, apresentaram uma maior peroxidação lipídica em comparação aos com 0-2 crises de dor/ano nos últimos 3 anos (Figura 27-B). Entretanto, a capacidade antioxidante estava abaixo dos valores de referência e entre as categorias não houve diferença estatística significante.

Para a ocorrência de acidente vascular cerebral, avaliamos os valores de TBARS e TEAC nos pacientes que já tiveram e os que não tiveram AVC e, observamos que não houve diferença estatística entre eles ($p=0,54$) e ($p=0,65$), respectivamente.

Tabela 40. Aspectos clínicos da Doença Falciforme nos pacientes de São Paulo e São José do Rio Preto.

Eventos Clínicos		SP n=39	SJRP n=27	Valor p	Total
Crises de dor (crises/ano nos últimos 3 anos)	0 - 2	23 (57,5%)	09 (38,0%)	$p=0,11$	33 (47,8%)
	3 - 5	10 (25,0%)	6 (20,7%)	$p=0,67$	16 (23,2%)
	≥ 6	7 (17,5%)	12 (41,3%)	$p=0,02$	20 (29%)
Úlceras		8 (20,0%)	9 (31,0%)	$p=0,29$	17 (24,6%)
Osteonecrose		7 (17,5%)	4 (13,8%)	$p=0,67$	11 (15,9%)
Priapismo		*2 (18,2%)	*5 (41,6%)	$p=0,22$	*7 (30,4%)
Colecistectomia		8 (20,0%)	5 (17,3%)	$p=0,77$	13 (18,8%)
AVC		14 (35,0%)	3 (10,3%)	$p=0,02$	17 (24,6%)
STA		1 (2,5%)	1 (3,5%)	$p=0,82$	2 (2,9%)

* porcentagem calculada entre os indivíduos masculinos. *Valor de p significativo ($p < 0,05$)* **SP:** São Paulo, **SJRP:** São José do Rio Preto, **AVC:** Acidente Vascular Cerebral, **STA:** Síndrome Torácica Aguda.

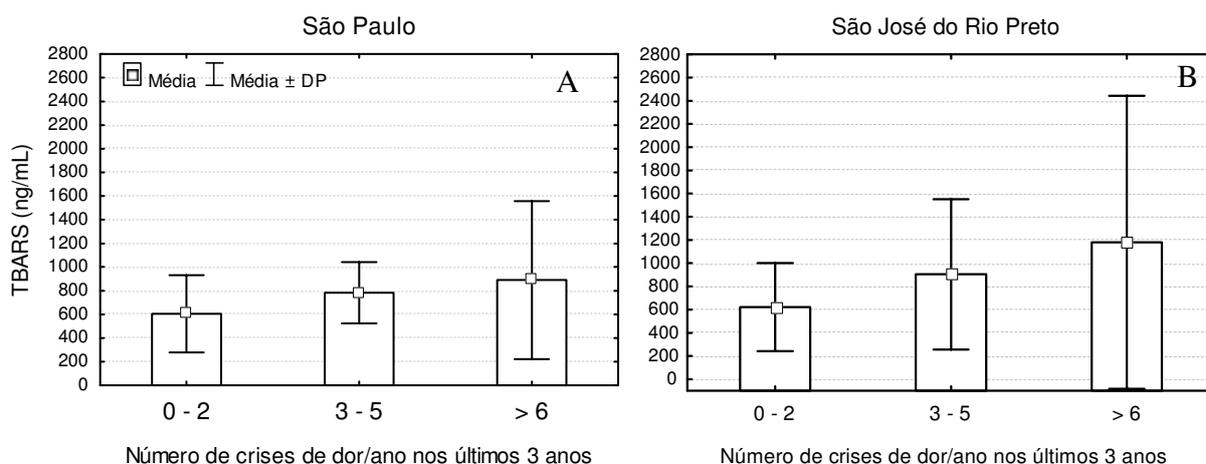


Figura 27. Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) em doentes falciformes classificados de acordo com o número de episódios de dor/ano nos últimos 3 anos. **A** – Doentes falciformes de São Paulo, **B** – Doentes falciformes de São José do Rio Preto. **EP:** erro padrão, **DP:** desvio padrão.

Após a avaliação da peroxidação lipídica e da capacidade antioxidante nos DF dentro e entre as localidades, no T1 e no T2, objetivamos, a partir das próximas análises, avaliar o estado oxidativo, o perfil leucocitário e plaquetário e o perfil do ferro nos DF sob o uso a exposição de um tratamento/medicação específico. Pareamos os pacientes do T1 com o T2, separados pelo tipo de tratamento/medicação específica e realizamos as análises.

Para a peroxidação lipídica em todos os grupos, de acordo com o tratamento, observamos diferença significativa entre o T1 e o T2. No grupo de SP, os pacientes sob o uso de DFX, os que usavam DFX e HU, e os HU de SJRP, tiveram diminuição dos valores de TBARS, demonstrando menor peroxidação lipídica no T2 do que no T1. Por outro lado, os DF sem o uso de medicação específica, de SP e de SJRP, tiveram aumento nos valores de TBARS (Figura 28).

Para a capacidade antioxidante, todos os grupos separados por tratamento/medicação específica apresentaram diferença significativa entre o T1 e T2. No entanto, o único grupo que apresentou capacidade antioxidante maior no T2 comparado com o T1, foi os DF de SJRP que usavam a hidroxiureia. Nos outros grupos houve redução nos valores médios de TEAC (Figura 29).

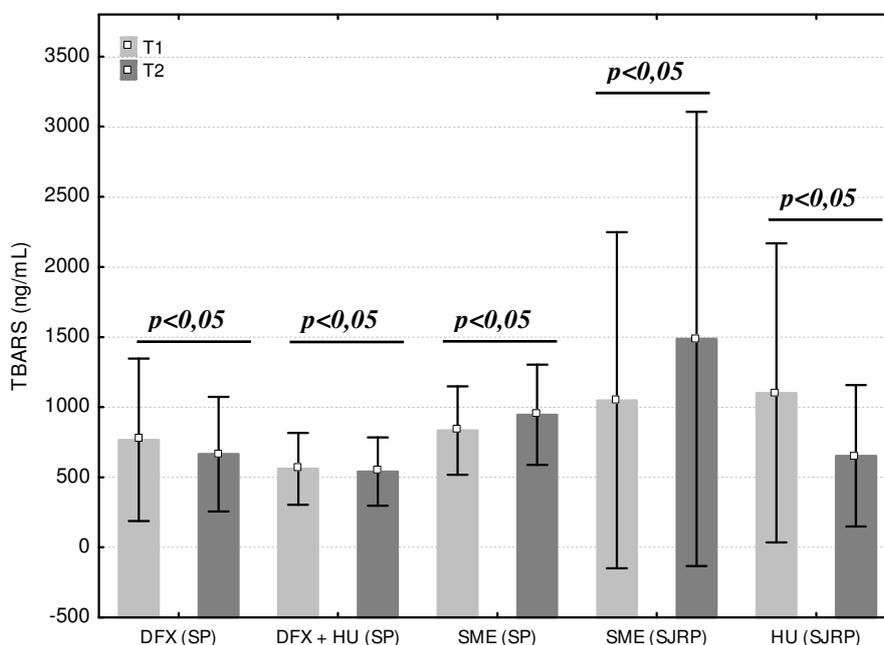


Figura 28. Avaliação da peroxidação lipídica entre os dois períodos de estudo, T1 e T2. DFX; deferasirox, SME: sem medicação específica, HU: hidroxiureia, T1: tempo 1, T2: tempo 2, SP: São Paulo, SJRP: São José do Rio Preto.

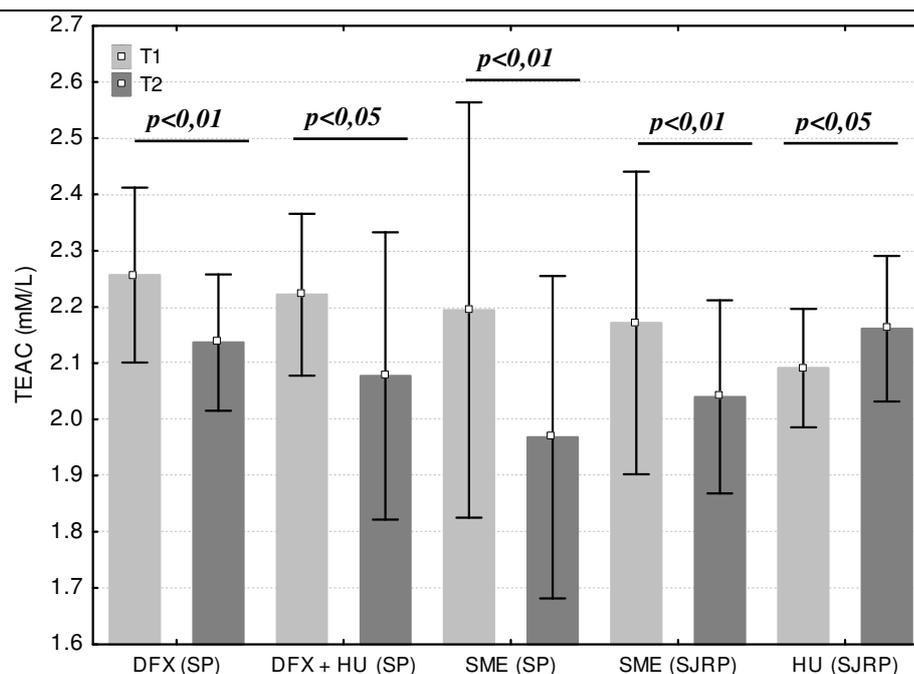


Figura 29. Avaliação da capacidade antioxidante entre os dois períodos de estudo, T1 e T2. DFX; deferassirox, SME: sem medicação específica, HU: hidroxiureia, T1: tempo 1, T2: tempo 2, SP: São Paulo, SJRP: São José do Rio Preto

De acordo com o perfil leucocitário, as diferenças encontradas, entre o T1 e o T2, foram no grupo de DF sem o uso de medicação específica de SP, em que a porcentagem de linfócitos aumentou no T2 e de eosinófilos diminuiu. O grupo de DF de SP sob o uso de deferassirox apresentou menor porcentagem de monócitos no T2 comparado com o T1 (Figura 30).

O número de plaquetas dentro de cada tipo de tratamento/medicação comparado entre os dois tempos de análise não mostrou diferença significativa em nenhum deles.

No perfil do ferro, os doentes falciformes que estavam sob o uso de deferassirox apresentaram uma redução significativa nos valores da capacidade total de ligação do ferro, índice de saturação de transferrina e do ferro sérico comparados com o T1. O grupo que utilizava o deferassirox e hidroxiureia apresentou redução nos valores de ferritina sérica. As diferenças dentro dos períodos de análise de acordo com a medicação estão demonstradas na Figura 31.

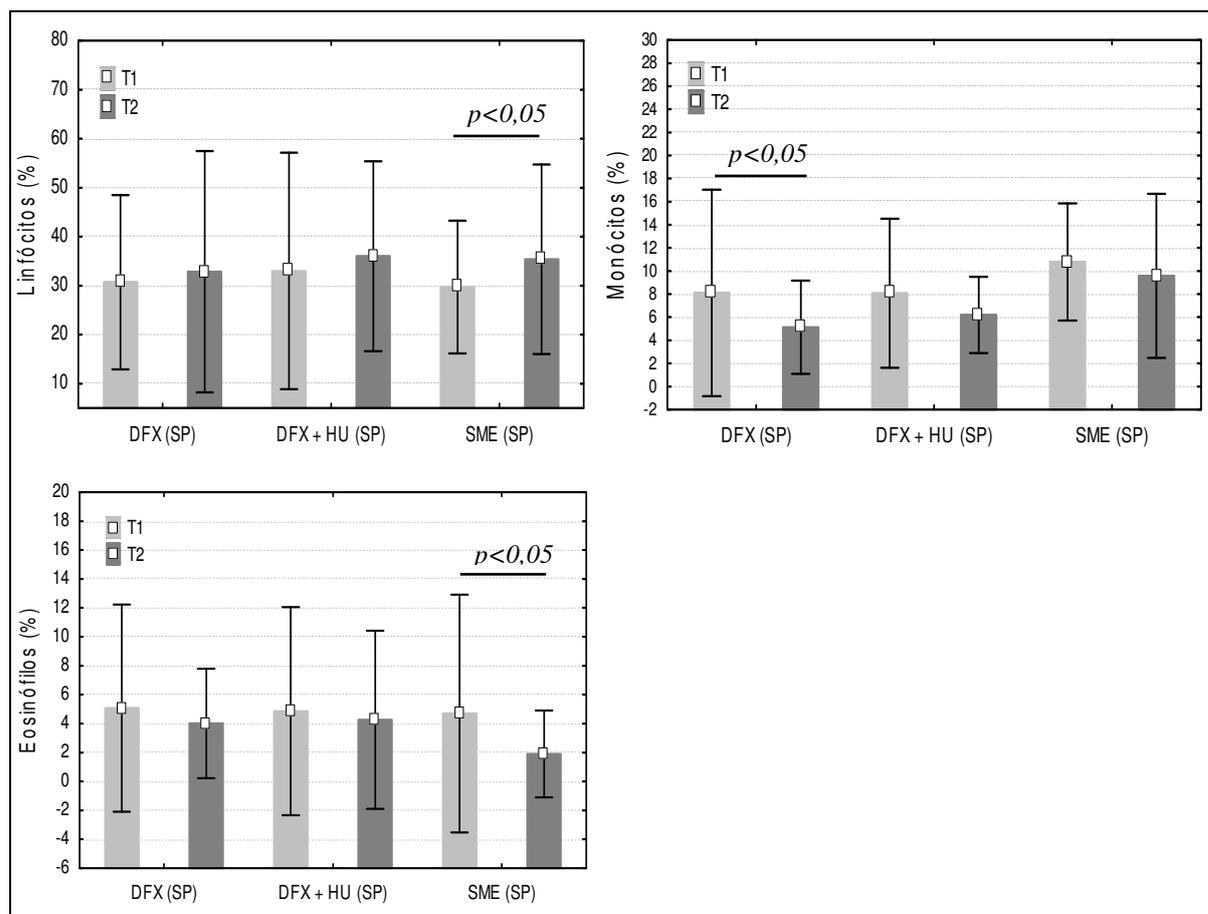


Figura 30. Perfil leucocitário dos doentes falciformes no T1 e no T2 separados de acordo com o tipo de tratamento/medicação específica. DFX: deferasirox, HU: hidroxiureia, SME: sem medicação específica, SP: São Paulo, SJRP: São José do Rio Preto, NS: não significativo, T1: Tempo 1, T2: Tempo 2.

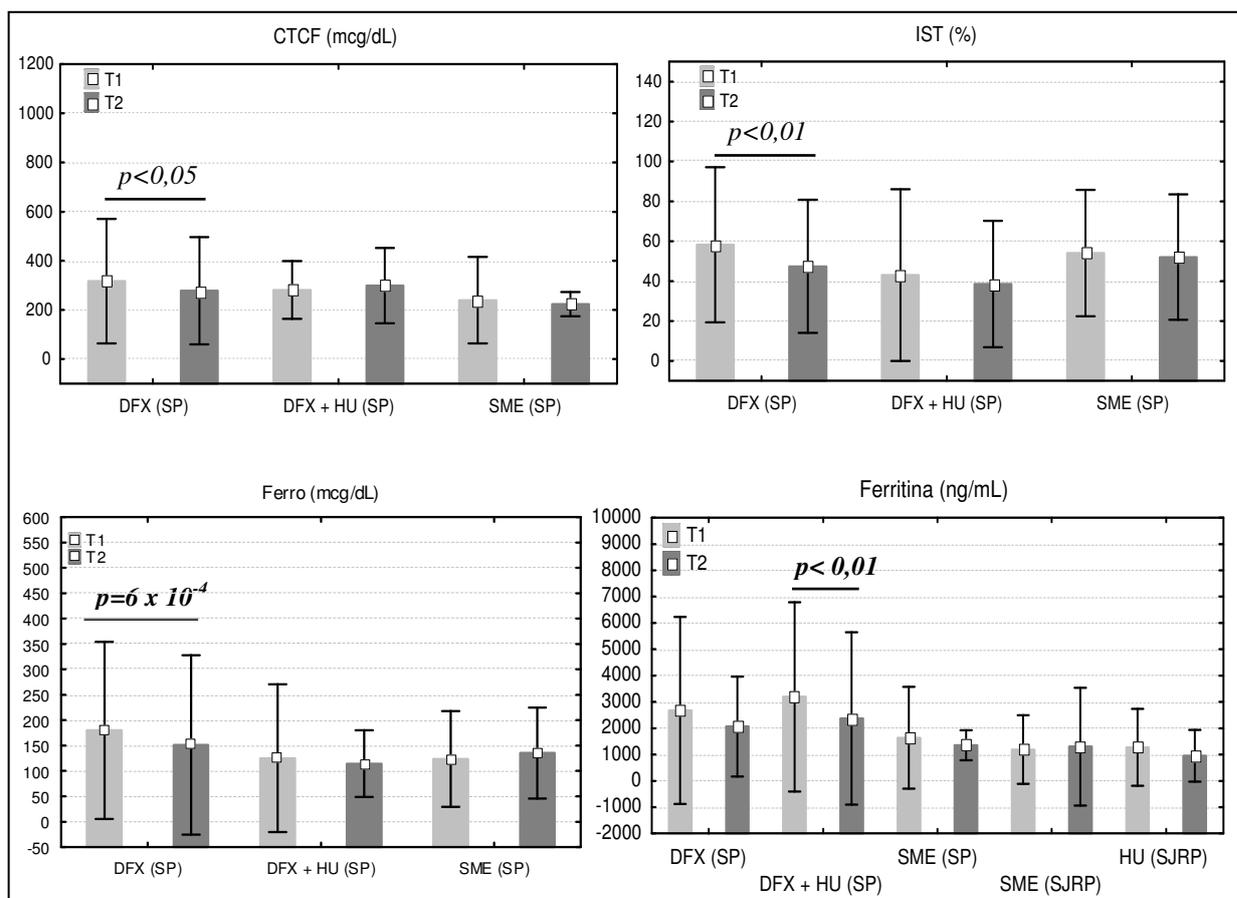


Figura 31. Perfil do ferro nos doentes falciformes comparado dentro e entre os dois períodos de estudo. DFX; deferasirox, SME: sem medicação específica, HU: hidroxiureia, T1: tempo 1, T2: tempo 2, SP: São Paulo, SJRP: São José do Rio Preto. *Valor de referência: IST (20-50%), Ferro (65-170 mcg/dL Masc. e 50-170 mcg/dL Fem.) Ferritina (28-397 ng/mL Masc. e 6-159 ng/mL Fem.), CTCF (250-410 mcg/dL). *Hemocentro da Santa Casa de São Paulo.

5. Discussão

5. Discussão

A doença falciforme é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias no homem, atinge uma parcela significativa na população mundial e acarreta ao portador manifestações clínicas diversificadas. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, existem, aproximadamente, sete milhões de portadores para o traço falciforme e estima-se de 25.000 a 30.000 homozigotos por ano (CANÇADO; JESUS, 2007). Devido a esta alta incidência e às complicações que a doença acarreta, estudos ligados a esta afecção trazem informações para melhor entendimento de eventos clínicos e permitir tratamento individualizado aos pacientes. É necessário estabelecer relações entre o perfil genético do portador com outros fatores associados à fisiopatologia da doença, como os haplótipos do *cluster* β , a resposta ao tratamento específico utilizado e o estresse oxidativo. Visto que estes fatores são potenciais modificadores na manifestação fenotípica da doença, decidimos avaliar, em um estudo longitudinal, o estresse oxidativo relacionado aos genótipos da doença, interferência de haplótipos e uso de medicação/tratamento específico.

Para correlacionar o perfil oxidativo com o padrão genético dos pacientes, foi inicialmente necessário caracterizar as mutações que conferem o genótipo da DF. Encontramos um maior número de homozigotos para a Hb S, tanto em SP quanto em SJRP, sendo este o genótipo mais grave do ponto de vista clínico. No grupo de SJRP, houve maior frequência da interação S/Beta talassemia, em que as mutações CD39, IVS-I-110 e IVS-I-6 estiveram presentes. Esses achados refletem a composição gênica e o processo de colonização característico desta região, que sofreu grande influência de imigrantes de países Mediterrâneos, como italianos e portugueses (COSTA; TAVELA; ZAGO, 1990; MARTINS et al., 1993; BERTUZZO; SONATI; COSTA, 1997; FONSECA et al., 1998; BONINI-DOMINGOS, 2004).

Além dessas mutações envolvendo os genes da beta globina, os haplótipos do *cluster* β nos fornecem informações sobre a origem dos genes β^S e β^{Tal} e podem ser utilizados como marcadores para explicar as diferenças genéticas na expressão clínica da doença falciforme, assim como as respostas variáveis a drogas (NAGEL et al., 1985; ZAGO et al., 2000). Os haplótipos do *cluster* beta globina, têm papel importante na determinação da gravidade da doença, em parte por influenciar o nível de Hb F, assim, aqueles associados com níveis mais altos de Hb F são acompanhados de doença menos grave. Há evidências de que a presença do haplótipo Senegal, que tem maior nível de Hb F, esteja relacionado com a diminuição de

crises dolorosas, de infartos ósseos e de insuficiência de órgãos, enquanto pacientes portadores do haplótipo Bantu, com baixos níveis de Hb F, apresentam manifestações clínicas mais graves e iniciam crises vaso-oclusivas mais precocemente (POWARS; CHAN; SCHOREDER, 1990; STEINBERG 1994).

Na região de São José do Rio Preto, é a primeira vez que um estudo caracteriza os haplótipos β^S e β^{Tal} . Para os doentes (Hb SS), encontramos maior frequência do haplótipo Bantu/Bantu, seguido pelo Bantu/Benin e Benin/Benin. Estes, segundo a literatura, representam uma maior gravidade clínica comparados com os outros haplótipos como o Senegal e Árabe-Indiano. Relatos evidenciaram que no Brasil, existem aproximadamente mil cromossomos mapeados para os haplótipos do *cluster* β^S . Os estudos evidenciaram o predomínio do haplótipo Bantu, seguido do haplótipo Benin, sendo raros os exemplos de Camarões e Senegal. Essa distribuição reflete muito bem a proporção de escravos africanos de diferentes etnias trazidos ao Brasil durante o período de tráfico de escravos, e a frequência dos haplótipos encontrados na nossa região não difere das encontradas por outros autores (ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992; LEMOS; GUERREIRO, 2006; PINTO; ZAGO, 2007).

Nas interações S/Beta talassemia, para o alelo β^{Tal} , o haplótipo II esteve fortemente associado à mutação CD39, enquanto a mutação IVS-I-110 com o haplótipo I, assim como encontrado nas populações mediterrâneas, na qual o haplótipo I é o mais frequente, seguido pelos haplótipos II, V, III, VI, VII, IX, IV e VIII (ORKIN et al., 1982; RAHIMI et al., 2009). Desta forma, os haplótipos β^{Tal} marcam fortemente a origem mediterrânea de nossa região. Foi encontrado em nosso estudo, em um doente falciforme com interação S/Beta⁺ talassemia (IVS-I-6), o haplótipo Camarões/Atípico [+ - - + +], sendo raro em nossa população, e com manifestação clínica benigna.

A maioria dos cromossomos β^S e β^{Tal} avaliados obedecem aos critérios de classificação de haplótipos existentes na literatura. Portanto, existe uma minoria de cromossomos que possuem uma combinação de sítios polimórficos únicos e não se enquadram nas classificações pré-existentes. Esses haplótipos são denominados “atípicos” e representam cerca de 5 a 10% dos cromossomos avaliados em estudos envolvendo haplótipos. No nosso estudo encontramos 9,8% de haplótipos atípicos e um deles, com a presença do sítio polimórfico *Xmn* I, substituição de uma C→T na posição – 158 no gene γ^G . A presença deste sítio em um paciente Hb SS com o haplótipo Bantu/atípico, proporcionou uma concentração de Hb F de 15,8% sem o uso de hidroxiureia. Há evidências de que este polimorfismo está

associado ao aumento de expressão do gene γ^G e, conseqüentemente, à maior síntese de Hb F, e melhora clínica (GARNIER et al., 2002; NEMATI; RAHIMI; BAHRAMI, 2009).

Após a caracterização do perfil genético dos pacientes envolvidos em nosso estudo, o próximo passo foi avaliar o estado oxidativo nestes doentes. Sabemos que em condições fisiológicas normais, a produção de espécies reativas de oxigênio é compensada pelo sistema de defesa antioxidante, que assegura o fluxo basal de EROs sem prejudicar o organismo. O estresse oxidativo resulta da produção de EROs que esgotam os antioxidantes endógenos, danificando alvos moleculares (lipídios, proteínas, carboidratos, etc.) e resultando em disfunção e/ou morte celular (WOOD; GRANGER, 2007). O excesso de EROs já foi associado a vários tipos de doenças como o Alzheimer, Parkinson, Diabetes, Esclerose Múltipla, Cirrose Hepática, Arteriosclerose e alguns tipos de Câncer (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHULZ; ANTER; KEANEY JUNIOR, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Nos eritrócitos falcêmicos, o estresse oxidativo é decorrente da alta taxa de meta Hb S, menos estáveis do que a meta Hb A, resultando na formação de hemicromos e hemólise com a liberação do heme e do ferro (RE et al., 1999; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Portanto, a auto-oxidação leva a formação de radicais superóxido (O_2^-) e hidroxil ($\cdot OH$) que, juntamente com o grupo heme, iniciam uma via de oxidação da Hb que resulta em danos aos eritrócitos falcêmicos. A membrana celular sofre peroxidação lipídica, e dessa forma, a dosagem de TBARS é um bom indicador de estímulos pró-oxidantes, uma vez que quantifica as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico como o MDA e outros aldeídos (HEBBEL et al., 1982; CIGHETTI et al., 2002; SCOTT, 2006; WOOD; GRANGER, 2007).

O aumento da peroxidação lipídica (TBARS) já foi evidenciado em outros estudos envolvendo doentes falciformes (JAIN et al., 1990; SERTAC et al., 1997; WALTER et al., 2006), mas nenhum deles correlacionou este aumento com o genótipo da doença falciforme, os haplótipos do *cluster* β e uso de tratamento/medicação específica como aqui realizado. Por outro lado, a capacidade antioxidante do indivíduo pode ser avaliada por várias técnicas. Ao contrário de outros estudos que medem antioxidantes isoladamente, o presente estudo utilizou um método que avalia globalmente os antioxidantes solúveis presentes no plasma (TEAC), podendo ser um valioso biomarcador de estímulos oxidantes em processos patológicos ou em resposta farmacológica (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1993, ZWART et al., 1999, FASOLA et al., 2007).

A avaliação do estresse oxidativo nesse estudo, as variáveis gênero e idade não interferiram nos valores de TBARS e TEAC, deixando assim, o grupo mais homogêneo.

Estudos anteriores do mesmo grupo, avaliando a idade como uma variável nos valores de TBARS e TEAC, encontraram uma menor peroxidação lipídica em indivíduos com idade entre seis meses a 17 anos, em relação a indivíduos com idade entre 18 a 65 anos (TUKAMOTO-JÚNIOR, 2008).

Entre os genótipos da DF a única diferença encontrada foi nos valores de TBARS, em que os S/Beta⁰ talassemia de SJRP apresentaram uma menor peroxidação lipídica quando comparados aos SS da mesma localidade. Esta diferença pode ser decorrente dos melhores índices hematimétricos encontrado em S/Beta⁰ talassemia, nos quais o número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito e Hb F estavam maiores. Desta forma, acredita-se que estes fatores fazem com que ocorra diminuição na polimerização da Hb S e na hemólise, e conseqüentemente, menor liberação de agentes oxidantes (STEINBERG, 2009). Estudos envolvendo camundongos falcêmicos nocautes, evidenciaram a diminuição de processos de falcização intravascular, aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico e diminuição da peroxidação lipídica nos animais em que havia aumento de Hb F (DASGUPTA; FABRY; KAUL, 2010).

Comparando os valores de TBARS e TEAC entre as localidades, observamos maior peroxidação lipídica nos SS de SJRP, em relação aos SS de SP. Esse evento pode ser reflexo do tratamento. Ressaltamos também o maior número de leucócitos tanto no T1 como no T2, e a baixa quantidade de agentes antioxidantes para o grupo de SJRP. Os pacientes apresentaram maior número de complicações clínicas. Para compensar à ação dos agentes agressores, a capacidade antioxidante, dos pacientes SS de SP, estava maior do que os valores de referência. Ao contrário, os SS de SJRP, além de apresentarem uma maior peroxidação lipídica, a capacidade antioxidante estava menor do que no grupo de SP, demonstrando assim um agravante adicional para esses pacientes.

Na comparação dos haplótipos com o estado oxidativo, apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas entre eles, o haplótipo Bantu/Bantu foi o que apresentou valor médio de TBARS maior do que o haplótipo Bantu/Benin, independente do uso de hidroxiureia. A maior peroxidação lipídica neste haplótipo é mais um fator desfavorável na manifestação clínica destes doentes, uma vez que, o haplótipo Bantu/Bantu, comparado com os outros haplótipos, apresenta um quadro clínico mais grave.

Na avaliação dos valores de TBARS com relação ao uso de medicação/tratamento específica, no T1 de análise, a peroxidação lipídica foi maior nos pacientes sem o uso de medicação específica, de SP e de SJRP, e naqueles que usavam o DFX. A combinação do uso de HU com a terapia transfusional e quelação do ferro com DFX, e os S/Beta⁰ talassêmicos

sob o uso de HU apresentaram melhor resposta na peroxidação lipídica. Para responder a ação dos agentes oxidantes, mesmo que os mecanismos de defesa sejam afetados por níveis mais baixos de antioxidantes não enzimáticos (vitamina A, C e E) e enzimáticos (glutathione peroxidase e superóxido dismutase) (SCHACTER et al., 1988; AMER et al., 2006), o grupo sob o uso de DFX e os sem o uso de medicação específica de SP apresentaram os valores de TEAC aumentados, conferindo assim, maior capacidade antioxidante.

A hidroxiureia é uma droga doadora de óxido nítrico, que impede a vasoconstrição, diminui a expressão de moléculas de adesão, reduz o número de leucócitos (COVAS et al., 2004; STEIBERG, 2008) e, conseqüentemente, diminui os processos de vaso-oclusão, de isquemia/reperfusão na microcirculação (HEBBEL et al., 1982; XIA et al., 1996; WOOD; GRANGER, 2007). Esses eventos diversos, quando ocorrem, resultam na produção de espécies reativas de oxigênio e, a diminuição dos mesmos, leva a menor produção de agentes pró-oxidantes. Portanto, esta droga pode ser considerada um agente antioxidante, como observado em nosso estudo e, também demonstrado por experimentos *in vitro* de Agil e Sadrzadeh (2000), em que a HU protegeu a membrana eritrocitária, quando exposta a agentes oxidantes, diminuindo a peroxidação lipídica.

Alguns dos pacientes faziam o uso do deferasirox associado à hidroxiureia que, por ser um quelante de ferro, potencializou a diminuição de agentes oxidativos agressores. A ação do deferasirox em estudos com doença falciforme e beta talassêmicos maior, tem demonstrado redução progressiva do ferro tóxico (ferro não ligado à transferrina) após múltiplas doses (XIA et al., 1996). Em estudo experimental, Glickstein et al. (2006) demonstraram a rápida capacidade de acesso do deferasirox no interior de cardiomiócitos e conseqüente eficácia ferro-quelante. Wood et al. (2004) demonstraram efeito cardioprotetor do deferasirox tanto em pacientes com talassemia beta maior quanto em pacientes com doença falciforme, que apresentavam sobrecarga de ferro transfusional, demonstrando assim, boa resposta ao processo oxidativo em doentes falciformes submetidos a processos transfusionais.

Nos casos com uso de DFX, sem a associação da HU, não encontramos diminuição nos valores de TBARS, como visto no grupo com uso associado. A possível explicação para este fato pode ser o tempo de exposição ao DFX a que os doentes estavam submetidos. No T1, a média de dias para o uso do medicamento foi de 56,1 dias, e foi evidenciada valores de ferro sérico, índice de saturação de transferrina e ferritina acima da referência. Assim a sobrecarga de ferro podia ser inferida, e com ela uma alta produção de radicais reativos, avaliados indiretamente pelos valores de TBARS e TEAC, mais altos. A exposição do quelante no T2, com média de 381,8 dias de uso, mostrou melhor eficácia ferro-quelante, com

diminuição, estatisticamente significativa no valor de índice de saturação de transferrina, capacidade total de ligação do ferro e ferro sérico e, conseqüentemente, menor peroxidação lipídica e, também, diminuição da porcentagem de monócitos. Os valores de ferritina não apresentaram redução significativa no T2 de análise, possivelmente pelos níveis séricos serem influenciados por mediadores inflamatórios, como a IL-6, característico da DF. Outros estudos envolvendo DF em regime transfusional, também demonstraram que não houve redução significativa nos valores de ferritina após um ano de uso do deferasirox (CAPELLINI et al., 2009).

Ainda no T2 de estudo, os pacientes sem o uso de medicação específica continuaram apresentando maior peroxidação lipídica comparado com os outros grupos. O mesmo resultado foi encontrado quando os pacientes foram pareados e, tanto os de SP quanto de SJRP, apresentaram aumento dos valores de TBARS. Esse aumento de radicais reativos refletiu no perfil leucocitário destes pacientes. No grupo de SJRP, tanto em T1 como em T2, observamos correlação significativa entre o número total de leucócitos e os valores de TEAC. Como TBARS é um biomarcador de dano oxidativo, possivelmente a quantidade de agentes oxidantes produzidas fez com que os leucócitos fossem ativados e, conseqüentemente, os mecanismos de defesa antioxidante. A aderência de leucócitos e plaquetas ao endotélio já tem sido descrita em camundongos falcêmicos, em que a produção de EROs é aumentada (WOOD; HEBBEL; GRANGER, 2005).

Para o grupo de SP, na contagem diferencial de leucócitos, a porcentagem de monócitos, tanto no T1 como quanto no T2, estavam acima do valor de referência. Aplicando o teste de correlação entre o TBARS e monócitos, verificamos que houve correlação forte, demonstrando que quanto maior a peroxidação lipídica maior a porcentagem de monócitos. Outros estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo aumenta as propriedades adesivas de hemácias, plaquetas e leucócitos (KAUL et al., 2004). Sultana et al. (1998) em cultura de células endoteliais de veia humana, em interação com eritrócitos falcêmicos estimuladas por agentes oxidantes, verificaram o aumento da expressão de moléculas de adesão celular (ICAM-1, E-selectina e VCAM-1). Além disso, observaram aumento da migração transendotelial de monócitos, e aumento na fosforilação da PECAM-1. Esses resultados sugerem que a aderência dos eritrócitos falcêmicos às células endoteliais gera estresse oxidativo levando ao aumento da adesão de monócitos e reticulócitos falcêmicos, o que pode contribuir para o desenvolvimento de processos vaso-oclusivos.

A sobrecarga de ferro em doentes falciformes, geralmente, está associada aos recorrentes processos de hemólise, frequentes transfusões sanguíneas e pela dieta. O ferro é

um importante catalisador de reações de oxidação de biomoléculas, como observado nas reações de Fenton e de Haber-Weiss, nas quais são formados diferentes tipos de EROs, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, em excesso, causam o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Com o intuito de avaliar a influência do ferro na peroxidação lipídica e na capacidade antioxidante, analisamos os parâmetros de ferro usuais como ferritina, ferro sérico, índice de saturação de transferrina e capacidade total de ligação do ferro, sobre os valores de TBARS e TEAC. Para isto minimizamos a interferência da variável transfusão e verificamos que, tanto no T1 como no T2, os valores de ferro sérico, nos pacientes de SP transfundidos dentro de 60 dias, apresentaram relação de causa e efeito com os valores de TBARS. Os valores do ferro estão associados a 35% no aumento da peroxidação lipídica, tanto no T1 como T2. Ondei (2009), avaliando a influência do ferro sobre os valores de TBARS e TEAC em beta talassêmicos heterozigotos, não encontrou relação entre o perfil de ferro e o estado oxidativo. No entanto, os valores do ferro estavam dentro da faixa de normalidade o que difere do nosso grupo. Walter et al. (2006), avaliando DF sob regime transfusional com sobrecarga de ferro, encontrou associação entre a alta concentração de ferro hepático e o aumento dos níveis de TBARS, demonstrando assim, o mesmo resultado por nós encontrado.

Os parâmetros usuais de avaliação do ferro não são medidas que quantificam o metal livre. No entanto, índices como a ferritina, por exemplo, sofrem interferência da presença de processos infeccioso-inflamatórios e disfunção hepática. O LPI (ferro lábil no plasma) e o NTBI (ferro não ligado a transferrina) são quantificações diretas para a detecção do ferro livre, tóxico, e fornecem informações precisas sobre a interferência no estado oxidativo (KOLB et al., 2008; KOREN et al., 2009). O perfil de ferro avaliado em nosso estudo, mesmo sendo medida indireta do ferro tóxico, mostraram sobrecarga nos pacientes. Quando avaliamos o estresse oxidativo e o perfil do ferro obtivemos resultados satisfatórios, principalmente no grupo de doentes sob o uso de DFX, que no T2, apresentaram diminuição nos parâmetros do ferro e conseqüentemente diminuição significativa nos valores de TBARS.

A análise das complicações agudas e crônicas na doença falciforme entre as duas localidades mostraram diferença estatística significativa no número de crises de dor e no número de pacientes que sofreram acidente vascular cerebral (AVC). No grupo de SP o maior número de doentes com AVC pode ser explicado pelo uso de regime transfusional de hemácias e, por esta terapia ser aplicada para pacientes que já tiveram AVC, diminuindo assim o risco de um segundo evento (LUSHER et al., 1976; WANG; KAVAR; TONKIN, 1991; SCOTHORN et al., 2002).

No grupo de SJRP maior número de crises de dor foi observada nos últimos três anos. Outras complicações clínicas como úlcera de perna e priapismo também apresentaram-se com frequências maiores que os estudos relatados na literatura (KOSHY et al., 1989; HAMRE et al., 1991; ECKMAN, 1996, SERJEANT et al., 2005; STEINBERG, 2008). Portanto, essas complicações podem estar ligadas ao tipo de tratamento, pois 62,0% dos pacientes não recebiam medicação/tratamento específico, apenas o ácido fólico e transfusões quando necessárias.

O aumento do número de leucócitos evidenciada nos doentes de SJRP, tanto no T1 como no T2, pode estar relacionada a condições inflamatórias agravando a fisiopatologia da doença falciforme. (WALTER et al., 2006). Essa condição pode ser decorrente da ação de agentes oxidantes atuando no recrutamento de leucócitos e na adesão ao endotélio, uma vez que a peroxidação lipídica deste grupo estava aumentada (FRENETTE; TURHAN et al., 2002).

Entre a peroxidação lipídica e as complicações clínicas da doença falciforme, a única relação observada foi entre os pacientes que apresentaram maior número de crises de dor/ano e os valores de TBARS. Esta relação foi encontrada nos dois grupos de estudo (SP e SJRP) e demonstrou que quanto maior a peroxidação lipídica maior o número de crises de dor. A relação entre dor e peroxidação lipídica pode ser explicada pelo processo fisiopatológico da doença. A auto-oxidação da Hb S, o consumo do óxido nítrico, os processos de isquemia/reperfusão, o aumento da homocisteína, os processos de hemólise, etc., fazem com que seja liberada grande quantidade de radicais livres que atuam na peroxidação lipídica e contribuem para a vaso-oclusão, surgindo assim os episódios de dor (WOOD; GRANGER, 2007; CONRAN et al., 2009).

De forma geral, o estudo do estresse oxidativo envolvendo o perfil genético e a influência do ambiente, como a medicação/tratamento, no portador da doença falciforme, contribuiu para a avaliação das condutas terapêuticas tendo como alvo minimizar o excesso de EROs e melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

6. Conclusões

6. Conclusões

De acordo com os objetivos propostos, nós concluímos que:

- O genótipo da doença falciforme mais frequente em nosso grupo foi o homozigoto para a Hb S, sendo este o mais grave para a DF e, especificamente em SJRP, destacamos maior frequência dos Hb S/Beta tal. com a presença de mutações características de países Mediterrâneos, quando comparados com o grupo de SP.

- As frequências dos haplótipos, para os alelos β^S , estavam de acordo com outros estudos brasileiros, sendo o haplótipo Bantu o mais frequente seguido pelo Benin. Para os alelos β^{Tal} , o haplótipo II foi associado à mutação CD39 e o haplótipo I associado à mutação IVS-I-110. Encontramos 9,8% de haplótipos atípicos e destes um com a presença do sítio *XmnI*.

- Os Hb SS apresentaram maior peroxidação lipídica que os Hb S/Beta⁰ talassemia, e os haplótipos não influenciaram nos valores de TBARS e TEAC.

- A melhor resposta ao uso de medicação/tratamento específico no processo oxidativo dos pacientes com DF foi o uso de HU associado ao DFX. Após maior período de exposição ao quelante de ferro verificamos diminuição nos parâmetros de ferro e, como consequência, diminuição da peroxidação lipídica. Os pacientes sem o uso de medicação específica apresentaram maior valor de TBARS e menor TEAC, resultando no aumento da porcentagem de monócitos e no número de leucócitos.

- Os DF de SJRP apresentaram maior peroxidação lipídica e menor capacidade antioxidante que os de SP, com maior número de complicações clínicas.

Este estudo representa a primeira avaliação longitudinal do perfil oxidativo em doentes falciformes considerando o genótipo, haplótipos e diferentes medidas terapêuticas para o tratamento da doença, no Brasil. Estas informações são úteis do ponto de vista genético e ambiental e refletem na manifestação fenotípica do portador, permitindo melhor entendimento da ação de agentes oxidantes na doença falciforme

7. Referências

7. Referências

Segundo Normas da ABNT 6023:2002

ADAMS, R. et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 9, p. 605-610, 1992.

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

AMER J, GHOTI H, RACHMILEWITZ E, KOREN A, LEVIN C, FIBACH E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **British Journal of Haematology**, v. 132, n. 1, p. 108-113, 2006.

ANDRADE, S. R. Características hematológicas e bioquímicas da doença falciforme no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 33, p. 205-210, 2001.

ANTONARAKIS, S. E. et al. Origin of the β^s -globin gene in Blacks: The contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, V.81, n. 3, p. 853-856, 1984.

ANVISA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**. Brasília, DF, 2002. 142 p.

ARAÚJO, A. S. et al. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. **Hemoglobin**, v. 27, p. 211-7, 2003.

BALLAS, S. K. Sickle cell disease: clinical management. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 11, n. 1, p. 185-214, 1998.

BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.

BANK, A. Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's as simple as α , β , γ , δ . **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, p. 1470-1473, 2005.

BARACIOLI, L. M. S. V. **Processo oxidativo em doadores de sangue portadores de Hemoglobina S e mutantes no gene HFE**. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

BECKER, K. et al. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 163-189, 2004.

BELLET, P. S. et al., Incentive spirometry to prevent acute pulmonary complications in sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 699-703, 1995.

BERTAM, R. A.; CARSON III, C. C.; WEBSTER, G. D. Implantation of penile prostheses in patients impotent after priapism. **Urology**, v. 26, n. 4, p. 325-327, 1985.

BERTHOLO, L. C. **Amplificação gênica alelo específica e multiplex no diagnóstico laboratorial de hemoglobinas anormais**. 2005. 92 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA H. W. Focalização isoelétrica na identificação das hemoglobinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 42 n. 3, p. 163-168, 2006.

BERTUZZO, C. S.; SONATI, M.; COSTA, F. F. Hematological phenotype and the type of β thalassemia mutation in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 2, p. 319-321, 1997.

BEUTLER E. Red Cell Metabolism. **A manual of Biochemical Methods**. 3 ed. London: Grune & Stratton, Inc; 1984.

BEZERRA, M. A. C. **Aspectos Clínicos, Bioquímicos e Moleculares das Síndromes Talassêmicas em População do Estado de Pernambuco**. 2007. 114 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial**. 1993. 232 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1993.

BONINI-DOMINGOS, C. R. et al. Estudo de hemoglobinas anormais em doadores de sangue e recém-nascidos de São José do Rio Preto, SP. **News Lab**, 41. ed, p. 92-98, 2000.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Thalassemia screening in Brazil – Results for 20 years. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 288-289, 2004.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias**. São José do Rio Preto, SP: HN Editora, 2006.

BORGNA-PIGNATTI, C. et al. Survival and disease complications in thalassemia major. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.850, p. 227-231, 1998.

BUCHANAN, G. R. et al. Sickle Cell Disease. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 35-47, 2004.

BUNN, H.F.; FORGET, B. G. **Hemoglobin: Molecular Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia, PE: Saunders, 1986.

BURNETT, A. L. et al. Feasibility of the use of phosphodiesterase type 5 inhibitors in a pharmacologic prevention program for recurrent priapism. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 3, p. 1077-1084, 2006.

CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 316-326, 2007.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n.3, 2007.

CAPELLINI M. D. Tailoring iron chelation by iron intake and serum ferritin: prospective EPIC study of deferasirox in 1744 patients with transfusion-dependent anemias. **Haematologica**, 30 nov, 2009. In press.

CESQUINI, M. et al., t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 3-4, p. 124-129, 2003.

CHAMPION, H. C. et al. Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 1661-1666, 2005.

CIGHETTI, G. et al., Oxidative status and malondialdehyde in β -thalassemia patients. **European Journal of Clinical Investigation**. V. 32, p. 55-60, 2002.

COHEN, A. R. et al. Safety and effectiveness of long-term therapy with the oral chelator deferoxamine. **Blood**, v. 102, p.1283-1287, 2003.

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

COSTA, F.F.; TAVELA, M.H.; ZAGO, M.A. Molecular basis of beta-thalassemia in Brazil. **Blood**. v. 76, n. 10, 1990.

COVAS, D. T. et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, n. 3, p. 273-280, 2004.

DAILLY, E. et al., Role of Bilirubin in the Regulation of the Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Activity of Plasma in Sick Cell Disease. **Biochemical and Biophysical Communications**, v. 248, p. 303-306, 1998.

DAS, D. K. et al., Oxygen radicals: systemic events and disease processes. **Free Radical Research**, v. 11, n. 6, p. 349-350, 1991.

DASGUPTA, T.; FABRY, M. E.; KAUL, D. K. Antisickling property of fetal hemoglobin enhances nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout sickle mice. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, n. 2, p. R394-402, 2010.

ECKMAN, J. R. Leg ulcer in sickle cell disease. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 10, p. 1321-1332, 1996.

EHLERS, K. H. et al. Prolonged survival in patients with beta-thalassemia major treated with deferoxamine. **The Journal of Pediatrics**, v. 118, p. 540-545, 1991.

FASOLA, F. et al., Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. **Journal of the National Medical Association**, v.99, p. 891-894, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

FILHO, U. D. **Introdução a bioestatística para simples mortais**. São Paulo, SP: Negócio, 1997.

FISCHEL-GHODISIAN, N.; HIRSCH, P.C.; BOHLMAN, M.C. Rapid detection of the hemoglobin C mutation by allelespecific polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 47, p. 1023-4, 1990.

FONSECA, S.F. et al. Genetic Analysis of β -Thalassemia Major and β -Thalassemia Intermedia in Brazil. **Hemoglobin**. v. 22, n. 3, p. 197-207, 1998

FORGET, B. G. Molecular Mechanisms of β Thalassemia. In: STEINBERG, M.H. et al. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management**. New York: Cambridge University Press, 2001, p. 252-276.

FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, n. 2, p. 101-106, 2002.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.

GARNER, C. et al. Evidence of genetic interaction between the β -globin complex and chromosome 8q in the expression of fetal hemoglobin. **American Journal of Human Genetics**, v. 70, n. 3, p. 793-799, 2002.

GARY, M. et al. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major, **The New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 567-573, 1994.

GLICKSTEIN, H. et al. Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 3195-3203, 2006.

GROW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. J. Nitric Oxide Chemistry and Cellular Signaling. **Journal of Cellular Physiology**, v. 187, n.3, p. 277-282, 2001.

GUTTERIDGE, J. M. C; HALLIWELL, B. Invited Review Free Radicals in Disease Processes: A Compilation of Cause and Consequence. **Free Radical Research**, v. 19, p.141-158, 1993.

HABERKEN, C. M. et al. Cholecystectomy in Sickle Cell Anemia Patients: Preoperative Outcome of 364 Cases from the National Preoperative Transfusion Study. **Blood**, v. 89, p. 1533-1542, 1997.

HALLIWELL, R. E. W.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007. 704 p.

HALSEY, C.; ROBERTS, I. A. G. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 120, p. 177-186, 2003.

HAMRE, M. R. et al. Priapism as a complication of sickle cell disease. **The Journal of Urology**, v. 145, n. 1, p. 1-5, 1991.

HEBBEL, R.P. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 70, p. 1253-1259, 1982.

HILLERY, C. A. et al. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminina. **British Journal of Haematology**, v. 109, p. 322-327, 2000.

HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. **Human Hemoglobin Genetics**. New York:Springer-Verlag Wien, 1986. 236 p.

HUISMAN H, J. et al. HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 1996. Disponível em <<http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em: 11 jan. 2010.

INTERNATIONAL HEMOGLOBIN INFORMATION CENTER. **Hemoglobin**. v. 21, n. 6, p. 507-602, 1997.

JAIN, S.K. et al. The effect of malonyldialdehyde on viscosity of normal and sickle red blood cells. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**. V. 44, n. 1, p. 37-41, 1990.

KATO, G. J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **American Journal of Hematology**, v. 24, n. 9, p. 618-625, 2009.

KAUL, D.K. et al. Anti inflammatory therapy ameliorates leukocyte adhesion and microvascular flow abnormalities in transgenic sickle mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 1, p. H293-H301, 2004.

KINNEY, T. R. et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: Results of the HUG - KIDS Study, a Phase I/II Trial. **Blood**, v. 94, n. 5, p. 1.550-1.555, 1999.

KOLB, A.M. et al. Non-transferrin bound iron measurement is influenced by chelator concentration. **Analytical Biochemistry**, v. 385, n. 1, p. 13-19, 2008.

KOREN, A. et al. Non Transferrin Bound Labile Plasma Iron and Iron Overload in Sickle Cell Disease: a comparative study between Sickle Cell Disease and beta Thalassemic patients. **European Journal of Haematology**, sep., 2009. In press.

KOSHY, M. et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1403-1408, 1989.

LAPOUMÉROULIE, C. et al. A novel sickle gene of yet another origin in Africa: the cameroon type. **Human Genetics**. v. 89, p. 333-337, 1992.

LEMOS C. G.; GUERREIRO, F. J. African gene flow to North Brazil as revealed by HBB*S gene haplotype analysis. **American journal of human biology: the official journal of the Human Biology Council**, v. 18, n. 1, p. 93-98, 2006.

LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 3, 2000.

LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R.M.G.. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, 2007.

LUSHER, J.M.; HAGHIGHAT, H.; KHALIFA, A.S. A prophylactic transfusion program for children with sickle cell anemia complicated by CNS infarction. **American Journal of Hematology**, v. 1, p. 265-273, 1976.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**, v. 18, n. 6, p. 790-792, 1965.

MARTINS, C.S.B. et al. Molecular characterisation of β thalassaemia heterozygotes in Brazil. **Journal of Medical Genetics**, v. 30, p. 797-798, 1993.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MILLER, S. T., et al. Impact of chronic transfusion on incidence of pain and acute chest syndrome during the Stroke Prevention Trial (STOP) in sickle-cell anemia. **The Journal of Pediatrics**, v. 139, n. 6, p. 785-789, 2001.

MORRIS, C.L.; RUCKNAGEL, D. L.; JOINER, C. H. Deoxygenation-Induced Changes in Sickle Cell-sickle Cell Adhesion. **Blood**, v. 81, p. 3138-3145, 1993.

NAGEL, R.L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic, and anthropological consequences. **Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine**. v. 2, p. 53-62, 1984

NAGEL, R.L. et al. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 880-884, 1985.

NAGEL, R. L. et al. The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African American sickle cell anemia patients. **Blood**, v. 77, p. 1371-1375, 1991.

NAOUM, P. C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**. São Paulo: Santos, 1990.

NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 18, p. 75-81, 1996.

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

NAOUM, P. C; NAOUM, F. A. **Doença das células falciformes**. São Paulo: Ed Sarvier, 2004. p.224.

NEMATI, H.; RAHIMI, Z.; BAHRAMI, G. The Xmn1 polymorphic site 5' to the $G\gamma$ gene and its correlation to the $G\gamma:A\gamma$ ratio, age at first blood transfusion and clinical features in β -Thalassemia patients from Western Iran. **Molecular Biology Reports**, may., 2009. In Press.

NEUMAYR, L. D. et al. Physical therapy alone compared with core decompression and physical therapy for femoral head osteonecrosis in sickle cell disease. Results of a multicenter study at a mean of three years after treatment. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume**, v. 88, n. 12, p. 2573-2582, 2006.

NISBET-BROWN, E. et al. Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassemia: a randomised, doubleblind, placebo-controlled, dose-escalation Trial. **Lancet**, v. 361, p. 1579-1602, 2003.

NISCOLA, P. et al. Pain syndromes in sickle cell disease: an update. **Pain Medicine**, v. 10, n. 3, p. 470-480, 2009.

NOLAN, V. G. et al. Hemolysis- associated priapism in sickle cell disease. **Blood**, v. 106, p. 3264-3267, 2005.

OHENE-FREMPOG, K. Stroke in sickle cell disease: demographic, clinical, and therapeutic considerations. **Seminars in Hematology**, v. 28, p. 213-219, 1991.

OHENE-FREMPOG, K.; STEINBERG, M. H. Clinical aspects of sickle cell anemia in adults and children. In: STEINBERG, M. H et al. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management**. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 611-710.

OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 67, n. 1, p. 71-86, 2007.

OLIVIERI, N. F.; BRITTENHAM, G. M. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. **Blood**, v. 89, p. 739-761, 1997.

ONDEI, L. S. **Perfil eletroforético e cromatográfico das hemoglobinas “S-like”**. 2005. 154 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2005.

ONDEI, L. S. **Estresse oxidativo em pacientes beta talassêmicos e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase**. 2009. 135 f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

ORKIN, S.H. et al. Linkage of β -thalassemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human β -globin gene *cluster*. **Nature**. v. 296, p. 627-631, 1982.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, p. 111-121, 2000.

PAGNIER, J. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in África. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 1771-1773, 1984.

PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v. 12, n. 2-3, p. 146-152, 1991.

PERCARIO, S. et al. Dosagem do malondialdeído (TBARS). **News lab**, v. 6, p. 46-50, p. 2004.

PORTTER, J. B. Practical management of iron overload. **British Journal of Haematology**, v.115, p. 239-252, 2001.

POWARS, D.R.; CHAN, L.; SCHOREDER, W.A. β^S gene *cluster* haplotypes in sickle cell anemia: clinical implications. **The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 12, n. 3, p. 367-374, 1990.

POWARS, D. R. Sickle cell anemia and major organ failure. **Hemoglobin**, v. 14, p. 573-598, 1990.

POWARS, D.R. β^S gene *cluster* haplotypes in sickle cell anemia: clinical and hematologic features. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 5, p. 475-493, 1991.

RAHGOZAR, S. et al. β^S gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. **American Journal of Hematology**, v. 65, p.192-195, 2000.

RAHIMI, Z. et al. Haplotype analysis of beta thalassemia patients in Western Iran. **Blood Cells, Molecules & Disease**, v.42, n. 2, p. 140-143, 2009.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals Biology Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SCHACTER, L. et al. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 2, n. 3, p. 237-243, 1988.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox state of the cell as viewed through the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v.30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SCHNOG, J. B. et al. Sickle cell disease; a general overview. **The Journal of Medicine**, v. 62, n. 10, p. 364-374, 2004.

SCHULZ, E.; ANTER, E.; KEANEY JUNIOR, J.F. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. **Current Medicinal Chemistry**, v.11, n. 9, p. 1093-1104, 2004.

SCOTHORN, D.J. et al. Risk of recurrent stroke in children with sickle cell disease receiving blood transfusion therapy for at least five years after initial stroke. **The Journal of Pediatrics**, v. 140, n. 3, p. 348-354, 2002.

SCOTT, M.D. H₂O₂ injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. **Free radical biology & medicine**, v. 40, n. 7, p. 1264-1272, 2006.

SERJEANT, G. R. et al. The painful crisis of homozygous sickle cell disease: clinical features. **British Journal of Haematology**, v. 87, n. 3, p. 586-591, 1994.

SERJEANT, G. R. et al. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 943-956, 2005.

SERTAC, A. et al., Peroxidative damage in sickle-cell erythrocyte ghosts: protective effect of allopurinol. **General. Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 427-428, 1997.

SHAPIRO, B. S. The management of pain in sickle cell disease. **Pediatric Clinics of North America**, v. 36, p. 1029-1045, 1989.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analyses of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics**, v. 27, n. 2, p. 198-212, 1975.

SONATI, M. F., COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **The Journal of Pediatrics**, Rio de Janeiro, v. 84 n. 4, suppl., p. S40-S51, 2008.

SOUZA, P. C. **Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da hemoglobina S em eritrócitos de doentes falcêmicos**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1999.

STEINBERG, M.H. Sickle Cell Anemia and Fetal Hemoglobin. **The American Journal of Medical Sciences**, v. 308, n. 5, p. 259-265, 1994.

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

STEINBERG, M. H. Management of sickle cell disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 13, p. 1021-1030, 1999.

STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **The Scientific World Journal**, v. 8, p. 1295-1324, 2008.

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **The Scientific World Journal**, v.9, p. 46-67, 2009.

STRACHAN, T.; READ, A. P. Mapeamento genético de caracteres mendelianos. In _____. **Genética Molecular Humana**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. p.269-282.

SULTANA, C. et al. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. **Blood**, v. 10, p. 3924-3935, 1998.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R.L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene *cluster* haplotypes. **American Journal of Hematology**, v. 32, p. 66-69, 1989.

SWITZER, J. A. et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle cell disease: present and future. **Lancet Neurology**, v. 5, p. 501-512, 2006.

THEIN, S. L. β -Thalassaemia. In: RODGERS, G.P. **Baillière's Clinical Haematology**. London: Bailliere Tindall, v.11, p. 91-126, 1998.

THEIN, S. L. Genetic insights into the clinical diversity of β thalassaemia. **British Journal of Haematology**, v. 124, p. 264-274, 2004.

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

THOMAS, S. et al., Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. **Mutation Research**, v. 402, p. 77-84, 1998.

TRAINA, F.; SAAD, S. T. O. Complicações hepáticas na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, 2007.

TUKAMOTO-JUNIOR, N. C. **Influência do polimorfismo de GST e peroxidação lipídica no fenótipo de Hb S e mutantes no gene HFE**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

TURHAN, A. et al. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 3047-3051, 2002.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Biochemistry**, v.89, p. 271-178, 1978.

VEKLOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? **British Journal of Haematology**, v. 139, p. 173-184, 2007.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.

WAJCMAN, H. et al. Abnormal Hemoglobins: Laboratory Methods. **Hemoglobin**, v. 25, n. 2, p. 169-181, 2001.

WALTER, P. B. et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 135, n. 2, p. 254-263, 2006.

WANG, W. C.; KAVAR, E. H.; TONKIN, I. C. High risk of recurrent stroke after discontinuance of five to twelve years of transfusion therapy in patients with sickle cell disease. **The Journal of Pediatrics**, v. 96, p. 205-208, 1991.

WEATHERALL, D. J. Hemoglobinopathies Worldwide: Present and Future. **Current Molecular Medicine**, v. 8, p. 592-599, 2008.

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

WINTERBOURN, C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Seminars in Hematology**, v. 27, p. 41-50, 1990.

WOOD, J. C. et al. Myocardial iron loading in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease. **Blood**, v. 103, p. 1934-1936, 2004.

WOOD, K. C., HEBBEL, R. P., GRANGER, D. N. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p. 989-991, 2005.

WOOD, K. C.; GRANGER, N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 926-932, 2007.

XIA, Y. et al. Reactive species in sickle cell disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 93, n. 13, p. 6770-6774, 1996.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 385-388, 1985.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu beta s *cluster* haplotype predominates among Brazilian blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 88, n. 3, p. 295-298, 1992.

ZAGO, M. A. et al. Atypical β S Haplotypes Are Generated by Diverse Genetic Mechanisms. **American Journal of Hematology**, v. 63, p. 79-84, 2000.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2004.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. New Jersey:Prentice Hall, 1999. 663p.

ZWART, L. L. et al, Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology & Medical**, v. 26, p.202-226, 1999.

8. Apêndice

APÊNDICE A- ARTIGOS

Artigo aceito pela revista: Archives of Medical Science

Fator de Impacto: 0,77

Qualis: B3

The *XmnI* Polymorphic Site 5' to the Gene $G\gamma$ in a Brazilian Patient with Sickle Cell Anemia: Fetal hemoglobin concentration, hematology and clinical features

Édis Belini Júnior¹, Rodolfo Delfini Cançado², Cláudia Regina Bonini Domingos¹

¹ UNESP-São Paulo State University, Department of Biology, Genetic Hemoglobin and Hematological Diseases Laboratory, 2265 Cristóvão Colombo Street, 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo State (SP), Brazil. Tel.: (55-17) 3221-2392; Fax: (55-17) 3221-2390. e-mail: belini.unesp@yahoo.com.br

² Santa Casa Medical School, São Paulo, Brazil.

Running title: *XmnI* Polymorphic Site-Sickle Cell Anemia

Abstract

We report a 20-year-old female with sickle cell anemia and with an HbF concentration of 15.8%. The patient was not using hydroxyurea and was not receiving regular blood transfusions. The patient never had chronic manifestations of sickle cell anemia, only pain crises of a mild intensity. After laboratory tests, we found that she was homozygous for Hb S with the Bantu/ Atypical haplotype, and was heterozygous for the *XmnI* site. The influence of the *XmnI* site on the expression of HbF can explain the amelioration in clinical features in this haplotype association in a case of sickle cell anemia.

Key Words: sickle cell disease, HbF expression, clinical manifestation

Introduction

Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disorder characterized by a multifaceted pathophysiology that involves changes in erythrocytes, vaso-occlusive processes, chronic inflammatory states, oxidative stress and endothelial dysfunction. Therefore, there is decreased blood flow and obstruction of the microcirculation, which leads to a variety of clinical complications [1].

The reasons for this heterogeneity are not fully understood; however, Fetal hemoglobin (HbF) is the best-known and most frequently studied genetic regulator of SCA, because it inhibits HbS polymerization. The individual variation in HbF levels is probably one of the main factors that contributes to the clinical heterogeneity observed in these patients [2].

The variability of Hb F in patients with SCA involves the Hereditary Persistence of HbF (HPFH), which is characterized by deletions and point mutations of Mendelian inheritance; the quantitative trait locus (QTLs), HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23, SNPs (single nucleotide polymorphisms) located in the BCL11A gene on chromosome 2p16; β -globin cluster haplotypes and XmnI polymorphic site 5' to the G_γ gene. In addition to genetic factors, drugs such as hydroxyurea, decitabine butyrate, arginine and deacetylase inhibitors also induce an increase in HbF [3].

We considered the genotype of sickle cell disease and the haplotypes of the beta globin gene cluster in 50 patients with clinical features of sickle cell disease from the state of São Paulo, southeastern Brazil. We found one patient with HbF levels above the expected and reported values. The presence of the Xmn1 polymorphic site in the 5' G_γ gene influences HbF expression, and few studies have been conducted to explain the genetic factors involved in Hb F levels in genetically mixed populations, such as that of Brazil. We evaluated the XmnI site and correlated it with HbF values, haplotype and hematological data, and clinical features from a patient with sickle cell anemia.

Case Report

This study analyzes a 20-year-old woman of African descent, diagnosed with sickle cell anemia through *electrophoresis* tests. She was receiving clinical follow-up care at the Blood Center of the Santa Casa Medical School in São Paulo, Brazil. She was not receiving hydroxyurea, or any other drug that induces the expression of HbF. She was not receiving regular blood transfusions, and the only medication in use was folic acid.

According the hematological data of the patient, she presented with: RBC ($2.6 \times 10^6/\mu\text{l}$), Hb (7.8 g/dL), Hct (24 %), MCV (94.1 fL), MCH (28.9 pg), WBC ($8.3 \times 10^3.\text{mm}^3$),

Neutrophil (61.3 %), Lymphocyte (19.0 %), Monocyte (3.0 %), Eosinophil (2.2 %), Platelet ($539 \times 10^3 \text{.mm}^3$), Reticulocyte (10.8 %).

The patient never had any chronic manifestations of sickle cell disease, such as leg ulcers, osteonecrosis, retinopathy, stroke, colectomy or acute chest syndrome. But in the 3 years prior to our study, she had 5 painful crises with mild intensity that did not require hospitalization.

After the patient gave her consent to participate in this study, we collected blood samples and performed tests.

In order to characterize the genotype of sickle cell disease, we performed cytological tests (globular osmotic resistance, red blood cell morphology, HbH and Heinz bodies identification, sickling and solubility tests), electrophoresis in alkaline pH, acidic pH and neutral pH, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (VARIANT™, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) and molecular analysis using PCR-RFLP (primer sense 5' GGCAGAGCCATCTATTGCTTA 3' and antisense 5' ACCTTAGGGTTGCCATAAC 3'). Next, the amplification fragment was digested using the FastDigest™ DdeI restriction enzyme (Fermentas, ON, CA) [4]. Haplotypes were determined through the analysis of the following polymorphic restriction sites: γ G (*Hind* III), γ A (*Hind* III), $\psi\beta$ (*Hinc* II), 3' $\psi\beta$ (*Hinc* II) e 5' β (*Hinf* I), following Sutton et al. [5].

The identification of the polymorphic XmnI site in ^G (rs7482144) was performed through PCR using the sense primer 5' AACTGTTGCTTTATAGGATTTT 3' and antisense 5' AGGAGCTTATTGATAACCTCAG 3', followed by restriction analysis using the XmnI enzyme (New England Biolabs) [5].

The test results are shown in Table 1. According to the genotype of sickle cell disease, the patient was homozygous for HbS, and she had not inherited the α -thalassemia gene. Her HbF concentration was 15.8%. Because the presence of the XmnI site was observed in only one allele, we investigated other polymorphic sites to verify whether the SNP patterns presented were related to haplotypes listed in the literature.

Based on these findings, we concluded that the patient was positive Hb SS with the Bantu/atypical haplotype (+ - - + + -). The atypical allele has a combination of individual polymorphic sites that do not fit the classification described in the literature, 5'^G γ (*Xmn* I)= +, ^G γ (*Hind* III)= -, ^A γ (*Hind* III)= -, $\psi\beta$ (*Hinc* II)= +, 3' $\psi\beta$ (*Hinc* II)= +, 5' β (*Hinf* I)= -.

Discussion

The association between the *XmnI* polymorphism (rs7482144) in the proximal promoter of the γ -globin gene and HbF levels is well documented in sickle cell disease patients. In 1985, a polymorphism (C/T at position -158 of γ -globin, later named *XmnI*-HBG2 or rs7482144), was identified and proven to promote the expression of γ -chain and to contribute to HbF variability [6]. Other studies in the same decade characterized SNP patterns in and around β -globin cluster genes, and found the S chromosome to be associated with five major haplotypes originating from different geographical regions of Africa, the Middle East, and the Indian subcontinent [7].

Of the main haplotypes, the one carrying the Senegal and Arab-Indian characteristics exhibits the polymorphism *XmnI*, and this is strongly associated with increased levels of Hb F and, consequently, more minimal clinical manifestations, unlike the Bantu haplotype, which is associated with low levels of HbF and hematocrit, and which is clinically more severe [8].

In our study, the sickle cell anemia patient carried a Bantu allele and an atypical allele (+ - - + + -). She also had an *XmnI* site, and an HbF concentration of 15.8%. Even with the low hematocrit values, the clinical complications were minimal when compared to other SCA patients and to those with the Bantu haplotype.

An increase in HbF has been associated with minimal clinical manifestations in sickle cell anemia patients. Leg ulcers are less common in patients who have high levels of HbF [9]; the occurrence of acute chest syndrome and the frequency of painful crises are inversely proportional to HbF levels. Buchanan *et al.* [10] suggested an association between high HbF levels and a low frequency of leg ulcers. Powars and Hiti [11] and Nagel and Steinberg [12] showed that high levels of HbF were associated with milder SCA symptoms. They also found that a higher expression of HbF in adulthood improves the rates of morbidity and mortality in SCA patients [13, 14, 15]. These results support our observation once findings, in which the patient has high level of HbF and a milder phenotype, therefore requiring fewer blood transfusions.

We would like to highlight that the *XmnI* site's contribution to the variation in HbF levels in sickle cell patients is low when compared in isolation; however, Lettre *et al.* [16] showed that the rs7482144 polymorphism in homozygote accounted for 2.2% of the variation in levels of HbF in 1275 sickle cell disease patients from the African American Cooperative Study of Sickle Cell Disease. However, the sum of five different SNPs, the (rs4671393) in the *BCL11A* gene, the (rs28384513, rs9399137, and rs4895441) in the intergenic region between *HBSL1* and *MYB* on chromosome 6, and (rs7482144) in the 5' gene γ explain 20% of the

variation of HbF in sickle cell anemia patients. In this study, it was not possible to evaluate the effect of the polymorphism in the group of patients in Brazil, because the Senegal and Arabic-Indian haplotypes are rare in the Brazilian population.

The polymorphism rs7482144 acts to increase the expression of HbF. Carriers that have the XmnI site also respond better to treatment with hydroxyurea [17], and this shows that new drugs can act in this region in search of different therapies for the treatment of sickle cell anemia.

Conclusion

The presence of the XmnI polymorphic site (rs7482144) in patients that are heterozygous for the 5' gene β^G , was responsible for the increased expression of Hb F. Although one of the alleles was of the Bantu haplotype, the clinical manifestation was minimal. These results reveal the importance of investigating factors that regulate HbF in sickle cell patients in a genetically mixed population such as that of Brazil.

Acknowledgements

Financial support was received from Brazilian Ministry of Health (Grant MS 3072/2007) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil (Grant 132573/2008-3).

References

1. Conram N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 2009;33:1-16.
2. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *ScientificWorldJournal* 2009;9:46-67.
3. Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications *Hum Mol Genet* 2009;18:R216-23.
4. Bonini-Domingos CR. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias. 1st ed. São José do Rio Preto (SP): HN Publisher; 2006.
5. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 1989;32:66-9.

6. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal* 2008;8:1295-324.
7. Nagel RL. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic, and anthropological consequences. *Einstein Q J Biol Med* 1984;2:53-62.
8. Nagel RL, Fabry ME, Pagnier J, Zohoun I, Wajcman H, Baudin V, Labie D. Hematologically and genetically distinct forms of sickle cell anemia in Africa. The Senegal type and the Benin type. *N Engl J Med* 1985;312:880-4.
9. Koshy M, Entsuaah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, Flournoy-Gill Z, Levy P. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood*. 1989;74:1403-8.
10. Buchanan GR, Debaun MR, Quinn CT, Steinberg MH. Sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004:35-47.
11. Powars D, Hiti A. Sickle cell anemia. Beta S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child* 1993;147:1197-202.
12. Nagel RL, Steinberg MH. Role of epistatic (modifier) genes in the modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia *Pediatr Pathol Mol Med* 2001;20:123-36.
13. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, Vera JC, Levy PS. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *Blood* 1994;84: 643-49.
14. Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, Kinney TR. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*. 1991;325:11-6.
15. Mashon RS, Dash PM, Khalkho J, Dash L, Mohanty PK, Patel S, Mohanty RC, Das BS, Das UK, Das PK, Patel DK. Higher fetal hemoglobin concentration in patients with sickle cell disease in eastern India reduces frequency of painful crisis. *Eur J Haematol*. 2009;83:383-4.
16. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN, Orkin SH. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and γ -globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:11869-74.

17. Nemati H, Rahimi Z, Bahrami G. The *XmnI* polymorphic site 5' to the $G\gamma$ gene and its correlation to the $G\gamma:A\gamma$ ratio, age at first blood transfusion and clinical features in β -Thalassemia patients from Western Iran. *Mol Biol Rep* 2009;[Epub ahead of print]

Table 1 – Laboratory tests performed to characterize the hemoglobin profile.

Test	Result	Normal Values	Method
Chromatography analysis	SF	AA	Eastman
Alkaline pH electrophoresis	SF	AA	Marengo & Rowe
Acid pH electrophoresis	SF	AA	Vella
Neutral pH electrophoresis	Absent	Absent	Dacie & Lewis
Erythrocyte morphology	++	Normocytosis	Bonini-Domingos
Heinz Inclusions bodies	Absent	Absent	Papayannopoulos
HbH Inclusions bodies	Absent	Absent	Papayannopoulos
Quantification of HbA ₂	2.30%	2.5 – 3.5%	HPLC
Quantification of HbF	15.80%	0 – 1.0%	HPLC
Quantification of HbS	83.80%	0%	HPLC
Osmotic Resistance	Negative	Negative	Silverstoni & Bianco
Sickling Test	Presente	Absent	Dacie & Lewis
Solubility Test (HbS)	Positive	Negative	Itano
Molecular Analysis HbS	SS	absence of mutation	PCR-RFLP
-158 (C → T) 5' G (<i>XmnI</i>)	(+/-)	-	PCR-RFLP

Artigo será submetido à revista: Blood Cells, Molecules and Diseases
Fator de Impacto: 2,749
Qualis: B1

Estresse oxidativo em portadores de Anemia Falciforme: perfil leucocitário e relação com uso de medicação específica

1. Edis Belini Junior, 1. Lidiane de Souza Torres, 1. Danilo Grünig Humberto da Silva, 2. Rodolfo Delfini Cançado, 1. Claudia Regina Bonini-Domingos

1. Unesp/Ibilce, Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas

2. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo-SP

Resumo

O estresse oxidativo é um dos processos envolvidos na fisiopatologia da Anemia Falciforme (AF). Avaliamos a relação do estresse oxidativo com o perfil leucocitário e o tratamento utilizado para AF, em 35 pacientes. O estresse oxidativo foi avaliado pela dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e *trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* STATISTICA 7.0. Os pacientes foram separados em quatro categorias: 1-pacientes sob quelação de ferro por deferassirox – DFX; 2-pacientes em uso de DFX e hidroxiuréia (HU); 3-pacientes sem uso de medicação específica e 4-pacientes sob o uso de HU. Os valores de TBARS estavam acima da faixa de normalidade e, entre os grupos, houve diferença significativa ($p=0,028$), sendo a peroxidação lipídica maior no grupo sem uso de medicação específica. Os valores de TEAC não apresentaram diferença significativa entre os grupos, porém os valores médios estavam acima dos valores de referência. Não houve diferença entre os grupos no número de leucócitos totais, mas os valores estavam acima da normalidade nos grupos 1 e 4. A porcentagem de monócitos estava acima dos valores de referência em todos os grupos e houve diferença entre eles ($p=0,003$), sendo os valores mais elevados nos pacientes do grupo 3. Portadores da AF apresentam aumento do estado oxidativo e melhor resposta ao tratamento foi observada na associação da terapia transfusional com a quelação de ferro e o uso de HU. O aumento de pró-oxidantes pode explicar o aumento das células de defesa, como os monócitos. Já a capacidade antioxidante nesses pacientes não foi

suficiente para neutralizar as espécies reativas de oxigênio que geram peroxidação lipídica. A resposta observada no grupo sem uso de tratamento específico evidencia o estresse adicional ao quadro clínico da doença.

Palavras – chave: Peroxidação lipídica, estresse oxidativo, anemia falciforme.

Introdução

A anemia falciforme (AF) é uma afecção genética que envolve os genes que codificam as cadeias beta globina; a mutação pontual no sexto códon do gene beta (*GTG* → *GAG*) leva à substituição de um aminoácido da superfície da proteína, ácido glutâmico por valina, originando uma Hb com características físicas e bioquímicas alteradas, denominada Hb S (1). Em condições de hipóxia, desidratação ou acidose, a Hb S polimeriza (2,3), levando a múltiplas alterações da célula, que culminam em hemólise (4,5). Estudos recentes têm revelado que a fisiopatologia da anemia falciforme é complexa e estão envolvidos processos recorrentes de vaso oclusão, ativação de leucócitos, de células endoteliais, de plaquetas, indução de mediadores inflamatórios, diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e estresse oxidativo (6,7). Os portadores apresentam manifestações clínicas complexas e diversificadas influenciadas pela característica genética, que determina a concentração intracelular de hemoglobina S, pelos haplótipos, co-herança de outros genes, fatores ambientais e o estresse oxidativo (4, 7, 8, 9).

O estado oxidativo das células é determinado pelo balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes. Quando ocorre um aumento das Espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou diminuição da capacidade antioxidante, as EROs são capazes de lesar componentes celulares direta ou indiretamente, modificando sua estrutura e/ou função e gerando o estresse oxidativo (9,10). Os eritrócitos falcizados estão em constante estresse oxidativo e, assim, liberam produtos de degradação da Hb S (complexos de Fe^{2+} e Fe^{3+} , e EROs O_2^{\bullet} , H_2O_2 , OH), que atacam a membrana eritrocitária e catalisam a destruição de hidroperóxidos lipídicos com a formação de radicais alcóxil e peróxil (11), que dão continuidade ao processo, com resultante liberação de alcanos como o malondialdeído (12,13). Promovem também a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA, afetando vários mecanismos celulares, além de influenciar no fenótipo da doença falciforme, nos processos vaso oclusivos e aumentando as propriedades adesivas dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio (14).

A Hidroxiuréia (HU) vem sendo administrada no tratamento convencional das doenças falciformes por induzir o aumento da síntese de Hb F em cerca de 60% dos pacientes;

eleva a taxa de hemoglobina, do VCM (Volume Corpuscular Médio), e reduz o número de reticulócitos (15, 16, 17). Estudos recentes têm demonstrado que a HU, além de reduzir a expressão de moléculas de adesão na superfície dos eritrócitos, também é capaz de reduzir o número de granulócitos, monócitos e plaquetas que, quando aumentados, são fatores de risco para a vaso-oclusão (2, 16, 19, 20). A transfusão regular de hemácias em portadores da AF tem como finalidade manter a concentração de Hb S abaixo dos 30%, diminuindo a interação de células anormais e aumentando a oxigenação. Pacientes dependentes de transfusão sanguínea estão sujeitos a sobrecarga de ferro e, o uso de agentes quelantes, que previnem o acúmulo de ferro e os danos resultantes, torna-se indispensável para a sobrevida desses pacientes (22, 23). O deferasirox (DFX) é um agente quelante com meia-vida plasmática prolongada, sendo capaz, de promover quelação eficaz por mais tempo. Possibilita maior adesão ao tratamento, melhor controle da quantidade de ferro no organismo e melhor qualidade de vida, com menor ocorrência de doenças cardíacas e maior sobrevida desses pacientes (24).

Diante da diversidade fenotípica em doentes falciformes no Brasil, objetivou-se avaliar eventos que interferem no fenótipo destes pacientes para melhor compreensão da fisiopatologia da doença. Portanto, neste trabalho avaliou-se a relação do estresse oxidativo com o perfil leucocitário, e o uso de medicação específica utilizada para o tratamento da doença falciforme.

Métodos

Pacientes e amostras

As amostras de sangue dos portadores da anemia falciforme foram coletadas em dois tubos estéreis contendo EDTA e heparina, respectivamente, após consentimento livre e informado. Participaram do estudo 35 pacientes em acompanhamento clínico no ambulatório do Hemocentro da Faculdade da Santa Casa de São Paulo, destes 27 (77,2%) eram do gênero feminino e oito (22,8%) do gênero masculino e a média de idade foi de $28,2 \pm 12,2$ anos. Foram excluídos do grupo de estudo pacientes que apresentaram eventos vaso-oclusivos e receberam transfusão de hemácias dentro do período de 60 dias. Todos os pacientes estavam sob o uso de ácido fólico, no entanto, 26 (74,3%) pacientes estavam sob regime transfusional regular de hemácias, e 17 (48,6%) usavam o quelante de ferro deferasirox e 9 (25,7%) usavam deferasirox e a hidroxiuréia; 7 (20,0%) só recebiam o ácido fólico e dois (5,7%) utilizavam somente hidroxiuréia.

Para avaliar o efeito da medicação específica nos índices hematológicos, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante os paciente foram separados em quatro categorias: 1-pacientes sob quelação de ferro por deferassirox – DFX; 2-pacientes em uso de DFX e HU; 3-pacientes sem uso de medicação específica e 4-pacientes sob o uso de HU.

Para estabelecermos os valores de normalidade para o método de TEAC, uma vez que os resultados encontrados diferiram do intervalo estabelecido pela literatura (1,32 a 1,58 mM/L), avaliamos 81 indivíduos, randomizados, com Hemoglobinas normais e com os valores de TBARS dentro do intervalo de normalidade (0 a 440 ng/mL), assim, estabelecemos os valores de normalidade para o TEAC de 1,85 mM/L a 2,31 mM/L.

Estudo das Hemoglobinas

As amostras foram submetidas a procedimentos eletroforéticos e cromatográficas pela Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) pelo equipamento VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota (25). O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico, segundo a técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol, com modificações (26). A confirmação do alelo β^S foi realizada por PCR–RFLP. Os *primers* utilizados foram: o *primer* P277 (sense): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e P278 (antisense): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'.

Para a mistura utilizou-se um volume final de 25,0 μ L de reação, cada *primer* a uma concentração de 10,0 μ M, dNTP a 1,25 mM cada, *Taq* Polimerase de 5U (Invitrogen), $MgCl_2$ a 50 mM e 2,0 μ L de DNA a 100 ng/ μ L. A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições de temperatura: 94°C para desnaturação inicial, 55°C de anelamento e 72°C de extensão. Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido pela enzima de restrição FastDigest™ DdeI (Fermentas) a 37° C por 5 minutos. Como a mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição; após a digestão o alelo normal gera 3 fragmentos, de 201 pb, 88 pb e 87 pb, e o alelo mutante gera dois fragmentos, um de 288 pb e outro de 88 pb (27).

Dosagem de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica das amostras. O método é baseado na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535nm. Valores até 440 ng/mL são considerados normais (28, 29).

Determinação da Capacidade Antioxidante Total em Equivalência ao Trolox (TEAC)

A capacidade antioxidante das amostras foi determinada segundo a sua equivalência ao trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico), um antioxidante análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. A capacidade antioxidante (TEAC) foi quantificada por meio de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (SIGMA, A1888) (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínaácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) que produz o radical cation $ABTS^{\bullet+}$, cromóforo de coloração verde/azul. A adição de um antioxidante a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS e a descoloração é avaliada em 734nm para a determinação da capacidade antioxidante total da amostra (30, 31).

Dados hematológicos e medicação específica

Os dados hematológicos e informações da medicação/tratamento foram obtidos por consulta aos prontuários médicos, banco de dados do hospital e da aplicação de questionários. O número total de leucócitos e a contagem diferencial de leucócitos foram realizados pelo contador automatizado de células Cell-Dyn®, modelo 3000, (Abbot Diagnostics).

Análises Estatísticas

As amostras foram avaliadas quanto à normalidade e a homoscedasticidade pelo *teste Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. Os dados que atenderam as premissas para a utilização de testes paramétricos foram submetidos aos testes: *Teste t independente* e a Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Para os dados não paramétricos foram utilizados o teste *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* complementado pelo *teste de Dunn*. Para as análises de correlações foi utilizado o *teste de correlação de Pearson*; para dados paramétricos, e *correlação de Spearman*, para dados não paramétricos, com a seguinte classificação: correlação perfeita (=1), forte (>75), média (>0,5), fraca (<0,5) e inexistente (=0). O teste de regressão linear simples foi aplicado para a avaliação de causa e efeito entre as variáveis dependentes e independentes (32, 33). O software utilizado nas análises foi o Statistica 7 e o alfa fixado de 5%.

Resultado

O perfil leucocitário, plaquetário, índices de peroxidação lipídica (TBARS) e da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) dos portadores da AF separados pelo tipo de tratamento/medicação específica, conforme agrupamento previamente realizado, estão representados na Tabela 1. Os valores estão expressos em Média \pm Desvio Padrão. Devido ao número pequeno de pacientes que utilizavam somente a hidroxiuréia (n=2), estes não foram incluídos nas comparações entre os outros tratamentos.

Tabela 1 – Parâmetros hematológicos e bioquímicos de estresse avaliados nos doentes falciformes separados segundo o tipo de medicação específica em uso.

Índices	(DFX) n=17	(DFX / HU) n=9	(SME) n=7	Valores de Referência	
Leucócitos (10^3 .mm ³)	10,8 \pm 2,2	8,9 \pm 2,7	9,1 \pm 2,5	4,6 – 10,2*	<i>p</i> =0,13
Neutrófilos (%)	56,3 \pm 8,5	53,2 \pm 13,1	49,4 \pm 11,1	37 – 80*	<i>p</i> =0,34
Linfócitos (%)	30,1 \pm 8,5	33,0 \pm 12,1	30,0 \pm 7,8	10 – 50*	<i>p</i> =0,74
Monócitos (%)	7,9 \pm 4,2	8,0 \pm 3,2	10,9 \pm 2,4	1 – 3*	<i>p</i>=0,03
Eosinófilos (%)	4,8 \pm 3,3	4,8 \pm 3,6	5,8 \pm 4,9	1 – 7*	<i>p</i> =0,68
TBARS (ng/mL)	756 \pm 269	559 \pm 128	775 \pm 122	0 – 440**	<i>p</i>=0,02
TEAC (mM/l)	2,26 \pm 0,09	2,22 \pm 0,07	2,28 \pm 0,03	2,12 \pm 0,10	<i>p</i> =0,58

Dados representados: Média \pm Desvio Padrão

Valores de Referência: *Hemocentro da Santa Casa de São Paulo, ** PERCARIO, 2004.

Na análise da peroxidação lipídica e da capacidade antioxidante verificamos se a idade e o gênero influenciaram nos valores de TBARS e TEAC. Para tanto classificamos os DF em três faixas etárias: (1) 9 a 20 anos, (2) 21 a 30 anos e (3) 31 a 50 anos, correlacionamos com o gênero, TBARS e TEAC pelo teste ANOVA Fatorial e verificamos que não houve diferença estatística significativa entre os doentes tanto para TBARS (*p*=0,18) quanto para TEAC (*p*=0,22) para essas variáveis, idade e gênero.

Os valores de TBARS nos DF estavam acima da faixa de normalidade e entre os grupos, separados de acordo com a medicação, houve diferença significativa (*p*=0,02). O grupo 2 apresentou menor peroxidação lipídica comparado com o grupo 1 e 3, Figura 1.

A avaliação da capacidade antioxidante entre os grupos não apresentaram diferença significativa. Comparando com o grupo de indivíduos sem hemoglobinopatias (Hb AA -

controle interno para esse parâmetro), os DF apresentaram maior capacidade antioxidante com diferença significativa ($p < 0,001$), Figura 2.

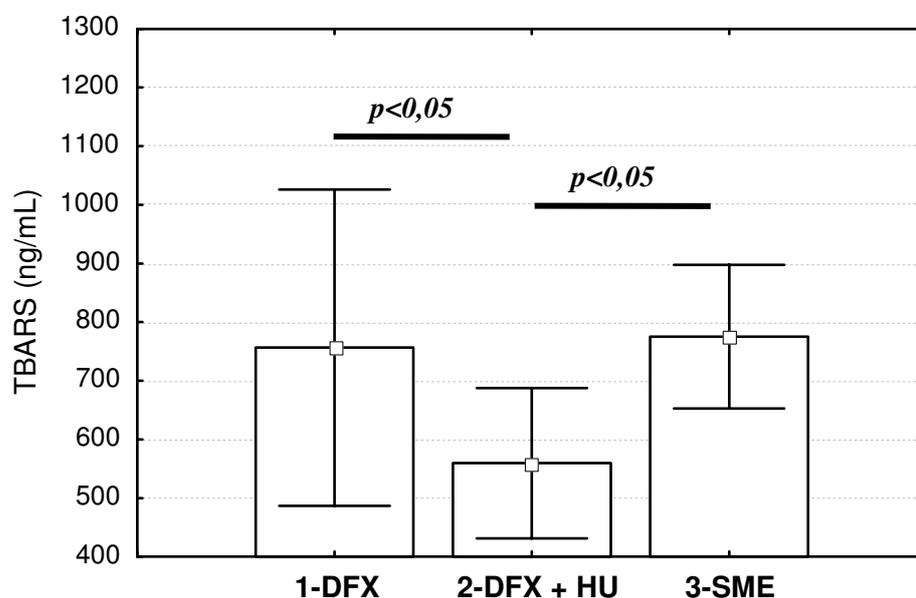


Figura 1. Valores de TBARS (ng/mL) nos pacientes com anemia falciforme sob diferentes tipos de tratamento/medicação específica. $p < 0,05$ teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste Dunn.

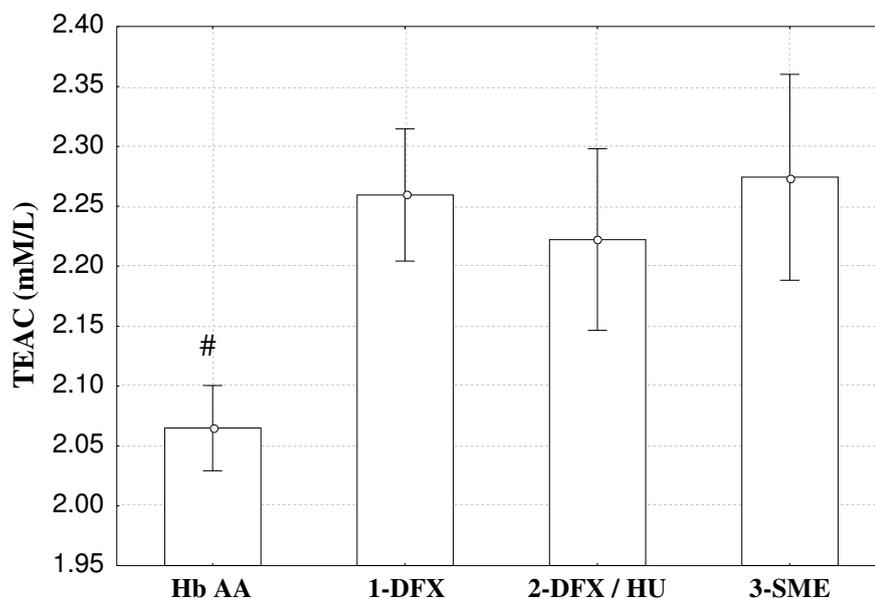


Figura 2. Valores de TEAC (mM/L) nos pacientes com anemia falciforme sob diferentes tipos de tratamento/medicação específica, comparado com os indivíduos sem hemoglobinopatias (AA). # $p < 0,001$ comparado com os grupos 1, 2 e 3, teste ANOVAum critério, seguido pelo teste de Tukey.

Na série branca, a média do número total de leucócitos, entre os grupos, não apresentou diferença significativa, porém, os pacientes do grupo 1 estavam com os valores acima do valor de referência.

Na contagem diferencial de leucócitos, os neutrófilos, linfócitos e eosinófilos, de todos os grupos avaliados estavam dentro da faixa de normalidade e não apresentaram diferença significativa. Porém, a porcentagem de monócitos estava acima da normalidade em todos os grupos e houve diferença significativa entre eles ($p=0,03$). Os pacientes do grupo 3 apresentaram uma maior porcentagem de monócitos em relação aos outros pacientes avaliados. .

Com o intuito de verificar se a peroxidação lipídica teve alguma relação com o aumento do número de monócitos nos doentes falciformes, foi aplicado o teste de correlação linear entre os grupos e porcentagem média de monócitos. Somente, no grupo 3 houve uma correlação linear significativa e forte ($p=0,02$, $r=0,80$) (Figura 3).

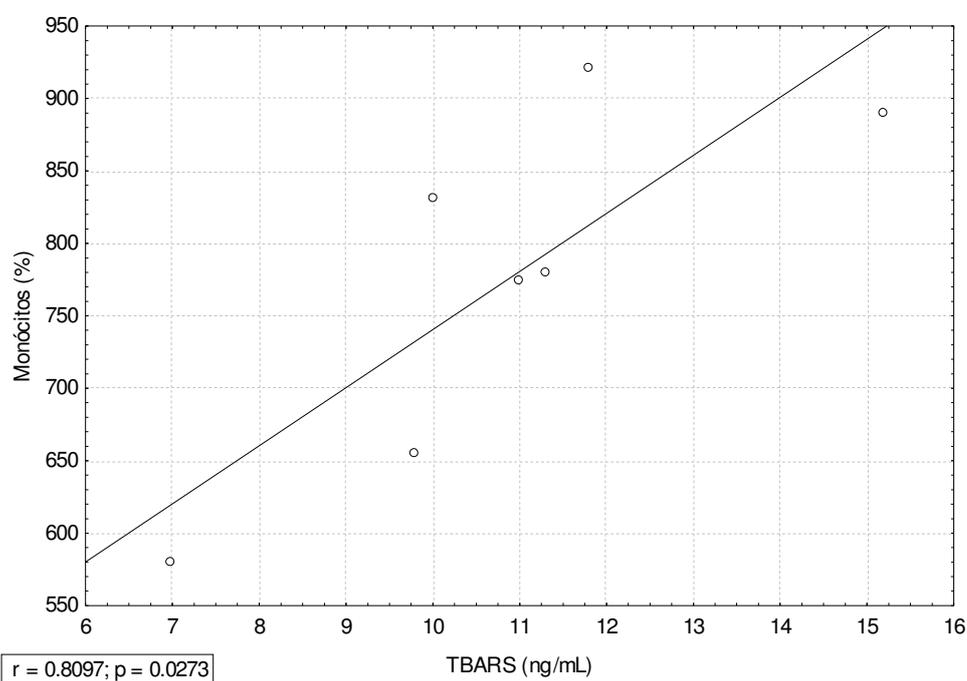


Figura 3. Comparação da porcentagem média de monócitos nos pacientes sem o uso de medicação/tratamento específico.

Discussão

Em condições fisiológicas normais, a produção de espécies reativas de oxigênio é compensada pelo sistema de defesa antioxidante que assegura o fluxo basal de EROs sem prejudicar o organismo. O estresse oxidativo resulta quando a produção de EROs esgota os limites de antioxidantes endógenos produzidos pelos mecanismos de defesa, danificando alvos moleculares (lipídeos, proteínas, carboidratos, etc.) resultando em disfunção e/ou morte celular (8).

Nos eritrócitos falcêmicos, o estresse oxidativo é decorrente da alta taxa de meta Hb S, menos estáveis do que a meta Hb A, resultando na formação de hemicromos com liberação do grupo heme e de ferro (9, 34). A auto-oxidação da Hb leva a formação de radicais superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^*) que, juntamente com o grupo heme, iniciam uma via de oxidação da Hb que resulta em danos aos eritrócitos falcêmicos, principalmente, na membrana celular, tais como oxidação dos tióis de proteínas e peroxidação lipídica, dessa forma, a dosagem de TBARS é bom indicador de estímulos pró-oxidantes (35-37, 8).

A avaliação do estresse oxidativo nesse estudo, as variáveis gênero e idade não interferiram nos valores de TBARS e TEAC, deixando assim, o grupo mais homogêneo. Estudos anteriores do mesmo grupo, avaliando a idade como uma variável nos valores de TBARS e TEAC, encontraram uma menor peroxidação lipídica em indivíduos com idade entre seis meses a 17 anos, em relação a indivíduos com idade entre 18 a 65 anos (38).

A hidroxiuréia é uma droga doadora de óxido nítrico, impede a vasoconstrição, diminui a expressão de moléculas de adesão, reduz o número de leucócitos (17, 39) e, conseqüentemente, diminui os processos de vaso oclusão, de isquemia/reperfusão na microcirculação e hiperhomocisteína (35, 40, 8). Esses eventos clínicos resultam na produção de espécies reativas de oxigênio e, com a diminuição dos mesmos pelo uso da hidroxiuréia há menor produção de agentes pró-oxidantes e conseqüentemente peroxidação lipídica nos DF.

Nos pacientes que faziam uso de deferasirox, observamos uma potencialização da diminuição de agentes agressores. A ação do deferasirox em DF e beta talassemia aliados a regime transfusional regular de hemácias, promove redução progressiva do ferro tóxico (ferro não ligado à transferrina) – NTBI após múltiplas doses (41). Glickstein *et al.* (42) demonstraram a rápida capacidade de acesso do deferasirox no interior de cardiomiócitos e conseqüente eficácia ferroquelante, e Wood *et al.* (43) demonstraram efeito cardioprotetor do deferasirox tanto em pacientes com talassemia beta maior quanto em pacientes com doença falciforme que apresentavam sobrecarga de ferro transfusional. Portanto, os pacientes avaliados que usavam deferasirox sem a associação com a hidroxiuréia, apesar de diferença

estaticamente significativa, apresentaram peroxidação lipídica menor do que no grupo sem o uso de medicação específica, indicando um efeito protetor do uso contínuo da droga.

Mesmo que os mecanismos de defesa sejam afetados na doença falciforme, como níveis baixos de antioxidantes não enzimáticos (vitamina A, C e E) e enzimáticos (glutathione peroxidase e superóxido dismutase) (44, 45), uma maior capacidade antioxidante foi observada nos doentes. Esse aumento pode ser explicada pela resposta ao grande número de pró-oxidantes gerados na doença falciforme.

O perfil leucocitário dos pacientes estava, em sua maioria, dentro dos padrões de normalidade, exceto para os valores percentuais de monócitos que estavam acima da faixa de normalidade. Os testes estatísticos mostraram que quanto maior os valores de TBARS maior a porcentagem de monócitos. Conforme demonstrado na literatura que o estresse oxidativo aumenta as propriedades adesivas de hemácias, plaquetas e leucócitos (46). Sultana et al. (1998), avaliando cultura de células endoteliais de veia humana, em interação com eritrócitos falcêmicos estimulados por agentes oxidantes, verificaram o aumento da expressão de moléculas de adesão celular (ICAM-1, E-selectina e VCAM-1), e aumento da migração transendotelial de monócitos humano e da fosforilação da PECAM-1. Estes resultados sugerem que a aderência dos eritrócitos falcêmicos nas células endoteliais gera estresse oxidativo local levando o aumento da adesão de monócitos e reticulócitos falcêmicos, o que pode contribuir para a vaso-oclusão (14).

Os resultados encontrados no presente estudo confirmam o estado oxidante aumentado em portadores da AF e a melhor resposta ao tratamento/medicação utilizado quanto ao estresse oxidativo foi a associação da terapia transfusional com a quelação do ferro por DFX e o uso de hidroxiuréia. O aumento das células de defesa como os monócitos pode ser explicado pelo aumento dos agentes pró-oxidantes, evidenciado nos pacientes que não faziam uso de terapia química específica e a capacidade antioxidante inata não foi suficiente para neutralizar as espécies reativas de oxigênio gerados pela doença.

Referências Bibliográficas

1. STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. *Clinical Haematology*, v. 11, p. 163-184, 1998.
2. STEINBERG, M. H. Management of sickle cell disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 340, n. 13, p. 1021-1030, 1999.
3. VEKLOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *British Journal of Haematology*, v. 139, p. 173-184, 2007.
4. ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.
5. FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.
6. CHIANG EY, FRENETTE PS. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005.
7. CONRAM, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009.
8. WOOD, K. C.; GRANGER, N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 34, p. 926-932, 2007.
9. FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current Molecular Medicine*, v. 8, n. 7, p. 609-619, 2008.
10. MANFREDINI V. Perfil oxidativo e bioquímico em pacientes que apresentam anemia falciforme ou traço falciforme. Tese de doutorado. 2008.
11. BECKER, K. et al. Oxidative stress in malaria parasite-infected erthrocytes: host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology*, v. 34, p. 163-189, 2004.
12. DAILLY, E. et al., Role of Bilirubin in the Regulation of the Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Activity of Plasmain Sickle Cell Disease. *Biochemical and Biophysical Communications*, v. 248, p. 303-306, 1998.

13. CESQUINI, M. et al., t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 57, n. 3-4, p. 124-129, 2003.
14. SULTANA, C. et al. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood*, v. 10, p. 3924-3935, 1998.
15. SCHNOG, J. B. et al. Sickle cell disease; a general overview. *The Journal of Medicine*, v. 62, n. 10, p. 364-374, 2004.
16. KINNEY, T. R. et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: Results of the HUG - KIDS Study, a Phase I/II Trial. *Blood*, v. 94, n. 5, p. 1.550-1.555, 1999.
17. COVAS, D. T. et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica*, v. 89, n. 3, p. 273-280, 2004.
19. HILLERY, C. A. et al. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminina. *British Journal of Haematology*, v. 109, p. 322-327, 2000.
20. HALSEY, C.; ROBERTS, I. A. G. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, v. 120, p. 177-186, 2003.
22. MILLER, S. T., et al. Impact of chronic transfusion on incidence of pain and acute chest syndrome during the Stroke Prevention Trial (STOP) in sickle-cell anemia. *The Journal of Pediatrics*, v. 139, n. 6, p. 785-789, 2001.
23. CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 3, p. 316-326, 2007.
- 24- NISBET-BROWN, E. et al. Effectiveness and safety of ICL670 in iron-loaded patients with thalassemia: a randomised, doubleblind, placebo-controlled, dose-escalation Trial. *Lancet*, v. 361, p. 1579-1602, 2003.
- 25- BONINI-DOMINGOS, C. R. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias. São José do Rio Preto, SP: HN Editora, 2006.

26- PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis*, v. 12, n. 2-3, p. 146-152, 1991.

27- SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

28- MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, v. 86, p. 271-278, 1978

29- PERCARIO, S. et al. Dosagem do malondialdeído (TBARS). *News lab*, v. 6, p. 46-50, p. 2004.

30- MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, v. 84, p. 407-412, 1993.

31- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals Biology Medicine*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

32- ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. 4.ed. New Jersey:Prentice Hall, 1999. 663p

33- FILHO, U. D. *Introdução a bioestatística para simples mortais*. São Paulo, SP: Negócio, 1997.

34- WINTERBOURNE, S. S. Oxidative reactions of hemoglobin. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 265-72, 1990.

35- HEBBEL, R.P. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 70, p. 1253-1259, 1982.

36- SCOTT, M.D. H₂O₂ injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. *Free radical biology & medicine*, v. 40, n. 7, p. 1264-1272, 2006.

37- CIGHETTI, G. et al., Oxidative status and malondialdehyde in β -thalassemia patients. *European Journal of Clinical Investigation*. V. 32, p. 55-60, 2002.

- 38 - TUKAMOTO-JUNIOR, N. C. Influência do polimorfismo de GST e peroxidação lipídica no fenótipo de Hb S e mutantes no gene HFE. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.
- 39- STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Scientific World Journal*, v. 8, p. 1295-1324, 2008.
- 40- XIA, Y. et al. Reactive species in sickle cell disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 93, n. 13, p. 6770-6774, 1996.
- 41- GALANELLO, R. et al., Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ICL670, a new orally active iron-chelating agent in patients with transfusion-dependent iron overload due to beta-thalassemia. *Journal Clinical Pharmacology*, v. 43, p. 565-572, 2003.
- 42- GLICKSTEIN, H. et al. Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. *Blood*, v. 108, n. 9, p. 3195-3203, 2006.
- 43- WOOD, J. C. et al. Myocardial iron loading in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease. *Blood*, v. 103, p. 1934-1936, 2004.
- 44- SCHACTER. L. et al. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 2, n. 3, p. 237-243, 1988.
- 45- AMER J, GHOTI H, RACHMILEWITZ E, KOREN A, LEVIN C, FIBACH E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *British Journal of Haematology*, v. 132, n. 1, p. 108-113, 2006.
- 46- KAUL, D.K. et al. Anti inflammatory therapy ameliorates leukocyte adhesion and microvascular flow abnormalities in transgenic sickle mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 287, n. 1, p. H293-H301, 2004.

APÊNDICE B-PLANILHAS

Planilha 1. Resultado dos testes laboratoriais e informações coletadas dos prontuários/questionários dos doentes falciformes do hemocentro de São Paulo – Tempo 1 de análise (T1).

ID	Data T1	Gênero	Idade	Etnia	Eletroforese					HPLC					Biologia Molecular					Estado Oxidativo	
					pH 8,6	pH 6,2	HbA2	HbF	HbA	HbS	HbS	HbS	CD39	IVSI - 110	IVSI-6	IVSI-1	Haplótipos	Conclusão	TBARS	TEAC	
SPHBS-1	30/11/2007	F	20	A	AS+F	AS+F	2.3	4.7	61.7	30.4	Homo	----	----	----	Bantu/Atp1	SS	614	2.32			
SPHBS-2	30/11/2007	F	40	A	AS+F	AS+F	2.4	2.5	52.6	41.7	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	598	2.27			
SPHBS-3	30/11/2007	F	27	A	SS+F	SS+F	2	5.4	2.7	89.2	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	598	2.28			
SPHBS-4	30/11/2007	F	38	C	SS+F	SS+F	2.1	5.3	4.2	90.9	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	920	2.27			
SPHBS-5	30/11/2007	F	48	A	SS+F	SS+F	2.7	15.7	2.2	79.3	Homo	----	----	----	Bantu/Benin	SS	478	2.29			
SPHBS-6	30/11/2007	M	17	C	S A	S A	2.5	1.3	29.4	66	Homo	----	----	----	Bantu/Benin	SS	478	2.22			
SPHBS-7	30/11/2007	F	50	A	S/A	S/A	3.5	3.1	23.4	70.3	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	1450	2.35			
SPHBS-8	30/11/2007	F	19	A	SS+F	SS+F	2.3	14.2	1.5	82.8	Homo	----	----	----	Bantu/atp4	SS	580	2.32			
SPHBS-9	30/11/2007	F	23	A	S A	S A	2.3	3	25.2	61.8	Homo	----	----	----	Benin/Benin	SS	888	2.35			
SPHBS-10	30/11/2007	F	21	C	S A+F	S A+F	3	10.5	24.4	62.4	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	529	2.40			
SPHBS-12	14/12/2007	F	13	A	AS	AS+F	2.5	1.9	51.4	36.5	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	780	2.15			
SPHBS-13	14/12/2007	F	24	A	S A+F	S A+F	3.2	7.7	27.6	57.6	Homo	----	----	----	Bantu/Atp2	SS	809	2.21			
SPHBS-15	14/12/2007	F	25	A	SS	SS+F	2.7	3.9	10.3	80.2	Homo	----	----	----	Benin/Atp3	SS	568	2.17			
SPHBS-16	14/12/2007	M	18	A	SS	SS+F	2.8	2.5	9.8	82.8	Homo	----	----	----	Benin/Benin	SS	890	2.27			
SPHBS-17	14/12/2007	F	46	A	AS	AS+F	2.6	1.6	51.1	35.5	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	826	2.17			
SPHBS-18	14/12/2007	M	14	A	S A	S A+F	2.8	4.4	30.4	58.2	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	722	2.26			
SPHBS-19	14/12/2007	F	9	A	AS	AS	2.4	3.3	54.9	32.1	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	361	2.09			
SPHBS-20	14/12/2007	M	18	A	S A	S A	1.6	2	27.8	38.6	Hetero	Normal	Normal	Hetero	Benin/I	S/Beta IVSI-6	602	2.30			
SPHBS-21	14/12/2007	M	13	A	S A	S A+F	2.5	2.6	36.8	52.9	Homo	----	----	----	Bantu/Benin	SS	1020	2.17			
SPHBS-22	14/12/2007	F	42	A	SF	SF	2	34.2	4.1	63.6	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	379	2.13			
SPHBS-23	14/12/2007	M	29	A	SS+F	SS+F	3.1	8.6	4.7	84.6	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	637	2.12			
SPHBS-24	14/12/2007	F	13	A	AS	AS	2.7	1.2	45.9	44.1	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	722	2.07			
SPHBS-25	21/12/2007	M	31	C	SC	SC	3.3	3.2	C=41	49.8	Hetero	----	----	----	----	SC	----	----			
SPHBS-26	21/12/2007	F	42	A	AS	AS	2.8	1.4	53.7	34.2	Homo	----	----	----	Bantu/Benin	SS	585	2.32			
SPHBS-27	21/12/2007	F	24	A	SS	SS	2.2	6.4	1.1	90.6	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	654	2.29			
SPHBS-28	21/12/2007	F	28	A	SS	SF	2.7	10.9	2	84.8	Homo	----	----	----	Bantu/Benin	SS	568	2.25			
SPHBS-29	21/12/2007	F	24	A	SS	SS	0	16.7	2.3	81.4	Homo	----	----	----	Bantu/Benin	SS	568	2.28			
SPHBS-30	21/12/2007	F	30	A	SS	SAF	0	4.5	1.5	94.1	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	830	2.32			
SPHBS-31	21/12/2007	M	25	A	SS	SS	2.9	4.7	1.4	91.3	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	654	2.29			
SPHBS-32	21/12/2007	F	19	A	AS	AS	3.1	2	51.7	36.5	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	1094	2.39			
SPHBS-33	21/12/2007	F	45	A	SS+A	SAF	3.7	3.4	12.2	78.3	Homo	----	----	----	Bantu/Benin	SS	614	2.32			
SPHBS-34	21/12/2007	F	33	A	SS	SS	2.5	13.7	1.9	82.5	Homo	----	----	----	Bantu/Atp1	SS	585	2.25			
SPHBS-35	21/12/2007	F	9	A	AS	AS	3.3	4.6	37.9	47.2	Hetero	Normal	Normal	Hetero	Bantu/atp6	S/Beta IVSI-6	602	2.30			

Legenda ID: identificação, F, feminino, M: masculino, A: afro-descendente, C: caucasóide, Homo: homozigoto para a mutação, Hetero: heterozigoto para a mutação, TBARS: dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em ng/mL, TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox em mM/L. Data T1: data da coleta do T1.

Continuação da Planilha 1.

ID	Dados hematológicos													Perfil do Ferro					Medicamentos					
	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	GB	Plq.	Neut	Linf	Eosi.	Mon	CTCF	IST	Ferro	Ferritina	PCR	HU	DFO	DFP	DFX	Exp.DFX	Acid. Fol.		
SPHBS-1	3.03	9.10	26.90	88.90	30.00	9.00	480.00	56.70	31.80	4.30	6.30	320.00	61.00	196.00	2512.00	1.00	N	N	N	S	S	28	S	
SPHBS-2	2.35	7.27	20.40	86.80	29.93	10.20	474.00	56.00	30.00	4.00	9.00	252.00	30.00	76.00	2307.00	0.90	N	N	N	S	S	28	S	
SPHBS-3	1.98	6.05	18.20	91.91	28.55	8.85	778.00	54.00	25.00	4.00	15.00	222.00	39.00	87.00	2600.00	1.50	S	N	N	S	S	2	S	
SPHBS-4	2.64	8.10	23.30	88.10	30.50	10.90	338.00	52.20	33.50	11.80	11.80	220.00	63.00	139.00	2600.00	1.30	N	N	N	N	N	-----	S	
SPHBS-5	1.72	7.00	20.10	116.86	34.69	5.35	362.00	67.00	23.00	2.00	8.00	215.00	35.00	76.00	2600.00	0.70	S	N	N	S	S	2	S	
SPHBS-6	2.90	9.20	26.70	92.06	31.72	8.30	547.00	54.20	30.60	6.00	8.48	176.00	64.00	112.00	2600.00	1.30	N	N	N	S	S	28	S	
SPHBS-7	2.51	7.61	23.70	94.42	30.31	8.43	393.00	50.00	29.00	1.00	21.00	679.00	62.00	423.00	7885.00	0.50	N	N	N	S	S	33	S	
SPHBS-8	2.55	7.36	24.00	94.11	28.86	8.30	539.00	61.30	19.00	7.00	7.00	205.00	60.00	70.00	2600.00	0.60	N	N	N	N	N	-----	S	
SPHBS-9	2.85	8.94	26.50	92.98	31.36	12.00	374.00	54.80	34.90	2.40	6.40	203.0	79.0	161.0	2600.0	0.9	N	N	S	S	S	28	S	
SPHBS-10	3.0	9.5	30.9	102.7	31.6	11.0	594.00	66.00	20.00	5.00	8.00	204.0	81.0	166.0	562	0.9	N	N	S	S	S	2	S	
SPHBS-12	2.51	7.73	23.50	93.62	30.79	5.65	649.00	26.50	2.00	8.39	11.30	235.0	35.0	82.0	2381.0	1.0	N	S	N	N	N	-----	S	
SPHBS-13	2.51	7.73	23.50	93.62	30.79	5.65	320.00	62.30	26.50	2.00	8.40	235.0	35.0	82.0	2381.0	1.0	S	N	N	S	S	110	S	
SPHBS-15	1.94	6.89	19.80	102.06	35.51	9.10	132.00	35.70	8.70	7.36	7.36	332.0	60.0	200.0	3278.0	1.9	S	N	N	S	S	57	S	
SPHBS-16	3.16	9.00	27.20	86.00	28.40	10.90	317.00	22.20	15.20	6.30	6.30	289.0	61.0	176.0	344.0	0.4	N	N	N	N	N	-----	S	
SPHBS-17	2.39	7.30	20.80	87.02	30.54	13.70	415.00	14.60	1.60	6.44	7.90	290.0	76.0	221.0	3824.0	1.8	N	N	N	S	S	109	S	
SPHBS-18	3.11	10.00	29.10	93.56	32.15	15.60	604.00	22.80	4.40	3.15	6.09	280.0	37.0	103.0	960.0	0.4	N	N	N	S	S	90	S	
SPHBS-19	2.93	8.56	25.30	86.34	29.21	10.50	613.00	23.80	7.30	8.48	7.85	256.0	73.0	188.0	3117.0	0.6	N	N	N	S	S	90	S	
SPHBS-20	3.1	9.9	28.7	91.4	31.4	10.2	329.00	51.10	32.40	4.00	11.40	272.0	71.0	194.0	2611.0	0.50	N	N	N	S	S	90	S	
SPHBS-21	2.63	8.39	24.10	91.63	30.90	12.00	366.00	21.30	15.70	6.30	3.15	229.0	48.0	110.0	3380.0	0.5	N	N	N	S	S	90	S	
SPHBS-22	1.82	8.12	22.50	123.62	33.61	5.99	243.00	58.00	4.00	4.00	4.00	278.0	84.0	233.0	3719.0	1.1	S	N	N	S	S	0	S	
SPHBS-23	2.74	9.90	29.40	107.29	30.13	12.70	510.00	28.70	11.40	6.22	6.20	368.0	35.0	127.0	1696.0	2.1	S	N	N	S	S	109	S	
SPHBS-24	2.63	8.17	23.70	90.10	31.06	11.20	398.00	55.10	26.60	3.30	12.80	401.0	59.0	238.0	1704.0	0.40	N	N	N	S	S	90	S	
SPHBS-25	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
SPHBS-26	2.36	7.09	21.10	89.40	30.04	12.10	477.00	29.10	1.60	9.17	9.17	352.0	61.0	215.0	7719.0	1.1	S	N	N	S	S	54	S	
SPHBS-27	2.10	7.92	21.90	104.28	33.71	13.50	561.00	32.20	5.50	5.11	2.96	277.0	78.0	215.0	1560.0	1.0	N	N	N	S	S	97	S	
SPHBS-28	2.75	8.60	25.50	92.72	31.27	10.80	374.00	23.70	2.10	4.80	4.80	234.0	14.0	33.0	2143.0	3.0	S	N	N	S	S	37	S	
SPHBS-29	2.61	8.82	25.90	99.23	33.79	10.80	394.00	29.00	3.76	12.80	4.12	467.0	21.0	99.0	2390.0	2.3	N	N	N	S	S	28	S	
SPHBS-30	2.9	10.8	35.2	120	34	6	330.00	30.30	10.00	2.00	10.00	110	52	105	952	1.2	N	N	N	N	N	----	S	
SPHBS-31	2	5.6	16.6	70	22	13.00	320.00	54.50	30.30	4.80	9.80	235.0	58	180	1012	0.80	N	N	N	N	N	----	S	
SPHBS-32	2.91	9.20	27.20	93.50	31.70	11.50	445.00	43.10	2.50	7.94	8.30	252.0	77.0	193.0	2318.0	0.5	N	N	N	S	S	24	S	
SPHBS-33	2.1	7.2	21.0	99.1	34.2	9.0	289.00	49.00	7.20	2.96	5.10	236.0	83.0	196.0	1004.0	1.1	N	N	N	S	S	28	S	
SPHBS-34	2.11	7.74	22.40	106.16	33.68	8.20	539.00	35.00	4.70	8.00	6.04	357.0	43.0	153.0	587.0	0.6	N	N	N	S	S	65	S	
SPHBS-35	2.9	8.7	25.6	89.5	30.4	9.80	503.00	47.00	38.50	4.70	9.13	389.0	22.0	87.0	1498.0	0.80	N	N	N	S	S	90	S	

Legenda ID: identificação, GV: eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$), Hb: hemoglobina (g/dL), Ht: hematócrito (%), VCM: volume corpuscular médio (femtolitro), HCM: hemoglobina corpuscular média (pg), GB: leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$), Plq: plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$), Neut: neutrófilo (%), Linf: linfócito (%), Eosi: eosinófilo (%), Mon: monócito (%), CTCF: capacidade total de ligação do ferro (mcg/dL), IST: índice de saturação de transferrina (%), PCR: proteína C reativa (MG/dL), HU: hidroxietilureia, DFO: desferroxamina, DFP: deferiprona, DFX: deferasirox, Exp. DFX: exposição ao deferasirox (dias), Acid. Fol.: ácido fólico.

Continuação da Planilha 1.

ID	Manifestações clínicas									
	Última Trans.	Dias	Úlcera	Osteone	Priapism	Colecis	Retino	AVC	STA	Dor
SPHBS-1		25	N	N	N	N	N	S	N	0-2
SPHBS-2		28	S	N	N	N	N	S	N	≥ 6
SPHBS-3		120	N	S	N	S	N	N	N	3-5
SPHBS-4		2880	N	N	N	S	N	N	N	0-2
SPHBS-5		360	S	N	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-6		42	N	N	N	N	N	S	N	0-2
SPHBS-7		5	S	N	N	S	S	N	N	≥ 6
SPHBS-8		300	N	N	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-9		60	N	N	N	N	N	S	N	3-5
SPHBS-10		4	N	N	N	N	N	S	N	0-2
SPHBS-12		23	N	N	N	N	N	S	N	3-5
SPHBS-13		15	N	S	N	S	N	N	N	≥ 6
SPHBS-15		30	S	N	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-16		60	N	N	N	N	N	N	N	3-5
SPHBS-17		26	N	N	N	N	N	N	N	3-5
SPHBS-18		22	N	N	N	N	N	S	N	3-5
SPHBS-19		8	N	N	N	N	N	S	N	0-2
SPHBS-20		38	N	N	N	S	N	S	N	0-2
SPHBS-21		38	N	N	N	N	N	S	N	3-5
SPHBS-22		60	N	N	N	S	N	N	N	0-2
SPHBS-23		61	S	S	S	N	N	N	N	0-2
SPHBS-24		1	N	N	N	N	N	S	N	3-5
SPHBS-25		----	----	----	----	----	----	----	----	----
SPHBS-26		28	S	S	N	N	S	N	N	0-2
SPHBS-27		360	N	N	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-28		330	N	S	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-29		90	N	N	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-30		90	N	S	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-31		4320	N	N	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-32		22	N	N	N	N	N	S	N	0-2
SPHBS-33		60	S	N	N	S	N	N	S	3-5
SPHBS-34		360	N	S	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-35		40	N	N	N	N	N	S	N	0-2

Legenda ID: identificação, Última Trans.: última transfusão sanguínea (Data da coleta – data da transfusão), Osteone: osteonecrose, Priapism: priapismo, Colecis.: colecistectomia, Retino.: retinopatia, AVC: acidente vascular cerebral, STA: síndrome torácica aguda, Dor: crises de dor

Continuação da Planilha 1.

ID	Data T1	Gênero	Idade	Etnia	Eletroforese				HPLC				Biologia Molecular						Estado Oxidativo	
					pH 8,6	pH 6,2	HbA2	HbA	HbF	HbA	HbS	HbS	CD39	IVSI-110	IVSI-6	IVSI-1	Haplótipos	Conclusão	TBARS	TEAC
SPHBS-36	21/12/2007	F	44	C	SS+A	SS	0	4.7	9	84.3	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	1015	2.29		
SPHBS-37	28/12/2007	M	17	A	S A	S A	4.1	1.1	22.5	68.6	Homo	----	----	----	Bantu/Benin	SS	774	2.30		
SPHBS-38	28/12/2007	F	13	A	AS	AS	3.1	2.2	42.2	46.1	Hetero	Normal	Normal	Bantu/atp6	S/B?	533	2.14			
SPHBS-39	28/12/2007	M	42	C	S A	S A	3.8	9.3	19.9	64.6	Homo	----	----	----	Benin/Benin	SS	533	2.27		
SPHBS-40	28/12/2007	F	13	A	AS	AS	2.9	2	61.2	33.6	Homo	----	----	----	Bantu/Bantu	SS	413	2.23		
SPHBS-42	28/12/2007	M	18	A	S A	S A	6	1.5	16.3	73.9	Hetero	Normal	Normal	Bantu/V	S/B?	930	2.22			
SPHBS-43	28/12/2007	F	21	A	SS	SS	2.9	13.2	1.3	82.8	Homo	----	----	Benin/Benin	SS	1020	2.29			

Legenda ID: identificação, F; feminino, M; masculino, A: afro-descendente, C: caucasóide, Homo: homocigoto para a mutação, Hetero: heterocigoto para a mutação, TBARS: dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em ng/mL, TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox em mM/L, Data T1: data da coleta do T1.

Dados hematológicos

ID	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	GB	Plq.	Perfil do Ferro						Medicamentos										
								Neut	Linf	Eos.	Mon	CTCF	IST	Ferro	Ferritina	PCR	HU	DFO	DFF	DFX	Exp.DFX	Acid. Fol.		
SPHBS-36	1.93	6.23	17.73	91.70	32.27	7.68	794.00	38.00	3.00	6.04	10.00	374.0	62.0	233.0	3097.0	0.6	N	N	N	S	S	97	S	
SPHBS-37	1.77	5.68	16.60	93.78	32.09	7.21	398.00	32.00	11.00	13.00	11.00	195.0	49.0	95.0	837.0	0.7	N	N	N	N	N	----	----	S
SPHBS-38	2.7	8.2	24.0	90.6	31.0	14.0	538.00	44.50	32.80	11.00	9.44	289.0	55.0	155.0	1828.0	0.40	N	N	N	S	S	30	S	
SPHBS-39	2.51	9.21	26.70	106.37	36.69	9.30	439.00	53.00	33.00	3.00	10.00	313.0	65.0	202.0	601.0	2.10	S	N	N	N	N	----	----	S
SPHBS-40	3.86	9.21	35.20	91.30	30.80	9.60	518.00	47.40	8.00	9.70	9.70	295.0	24.0	72.0	2600.0	0.7	S	N	N	S	N	101	S	
SPHBS-42	4.9	10.8	32.6	66.0	21.9	10.20	462.00	56.00	32.00	6.00	5.00	333.0	40.0	132.0	1905.0	2.70	N	N	N	N	N	----	----	S
SPHBS-43	2.10	7.51	21.10	100.47	33.76	11.80	366.00	35.90	2.10	10.40	3.15	309.0	41.0	128.0	149.0	0.7	S	N	N	N	N	----	----	S

Legenda ID: identificação, GV: eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$), Hb: hemoglobina (g/dL), Ht: hematócrito (%), VCM: volume corpuscular médio (femtolitro), HCM: hemoglobina corpuscular média (pg), GB: leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$), Plq: plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$), Neut: neutrófilo (%), Linf: linfócito (%), Eosi: eosinófilo (%), Mon: monócito (%), CTCF: capacidade total de ligação do ferro (mcg/dL), IST: índice de saturação de transferrina (%), PCR: proteína C reativa (MG/dL), HU: hidroxuureia, DFO: desferroxamina, DFF: deferiprona, DFX: deferasirox, Exp. DFX: exposição ao deferasirox (dias), Acid. Fol.: ácido fólico.

Última Trans.

ID	Dias	Úlcera	Osteone	Priapism	Manifestações clínicas				Dor
					Colecis	Retino	AVC	STA	
SPHBS-36	60	S	N	N	S	N	N	N	0-2
SPHBS-37	30	N	N	N	N	N	N	N	≥ 6
SPHBS-38	30	N	N	N	N	N	N	N	0-2
SPHBS-39	19	N	N	S	N	N	N	N	0-2
SPHBS-40	1	N	N	N	N	N	S	N	0-2
SPHBS-42	23	N	N	N	N	N	N	N	≥ 6
SPHBS-43	120	N	N	N	N	N	N	N	0-2

Legenda ID: identificação, Última Trans.: última transfusão sanguínea (Data da coleta - data da transfusão), Osteone: osteonecrose, Priapism: priapismo, Colecis.: colecistectomia, Retino.: retinopatia, AVC: acidente vascular cerebral, STA: síndrome torácica aguda, Dor: crises de dor.

Planilha 2. Resultado dos testes laboratoriais e informações coletadas dos prontuários/questionários dos doentes falciformes do hemocentro de São Paulo – Tempo 2 de análise (T2).

ID	Data T2	Estado Oxidativo										Dados hematológicos										Perfil do Ferro					Últ. Trans.
		TBARS	TEAC	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	GB	Neut	Linf	Mon	Eosi.	Plq.	CTCF	IST	Ferro	Ferritina	Dias	ExpoDFX							
SPHBS-1	17/10/2008	500	2.11	2.80	8.55	24.20	86.42	30.53	8.75	49.4	36.1	8.90	4.00	611	243.5	44	143	2269.0	46	340							
SPHBS-2	17/10/2008	517	2.24	2.21	7.95	22.20	100.45	35.97	10.40	66.1	29.8	2.48	0.60	429	246	73	179	2200.0	45	340							
SPHBS-3	28/10/2008	739	2.28	2.91	8.01	26.40	90.72	27.52	8.02	52.0	29.0	5.1	5	324	268	24	125	2193.0	28	325							
SPHBS-4	6/3/2009	1010	1.77	2.61	8.03	22.80	87.35	30.76	8.61	47.0	36.0	11.00	0.00	267	202	78	158	1200.0	1879	-----							
SPHBS-5	6/3/2009	530	1.88	2.96	9.44	27.90	94.25	31.89	7.48	58.7	33.0	4.69	3.00	369	393	32	127	2148.0	640	453							
SPHBS-6	17/10/2008	790	2.09	3.12	9.78	28.70	91.98	31.34	19.70	51.2	37.3	4.90	5.70	513	243.5	44	143	4863.0	76	340							
SPHBS-7	14/11/2008	1100	2.17	2.88	8.60	25.80	89.58	29.86	8.70	33.5	59.9	4.46	4.00	320	1073	44	233	3387.0	30	372							
SPHBS-8	6/3/2009	720	1.85	2.67	8.99	27.70	103.74	33.67	11.30	71.0	21.0	7.00	1.00	571	243.5	39	112	980.0	-----	-----							
SPHBS-9	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----						
SPHBS-10	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----						
SPHBS-11	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----						
SPHBS-12	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----						
SPHBS-13	17/10/2008	900	2.17	2.59	8.31	24.70	95.36	32.08	7.95	57.3	32.1	5.02	4.70	180	240	34	82	1245.0	158	413							
SPHBS-14	28/10/2008	572	2.06	2.33	8.39	23.50	100.85	36.00	12.80	63.3	28.2	6.06	1.00	324	420	38	161	2790.0	39	371							
SPHBS-15	28/10/2008	1211	2.12	2.66	7.28	22.50	84.58	27.36	13.30	59.9	24.8	17.00	3.10	361	243.5	40	115	1500	90	-----							
SPHBS-16	6/3/2009	743	2.19	2.12	5.92	17.30	81.60	27.92	13.90	69.0	18.0	11.00	2.00	411	534	42	223	3738.0	74	423							
SPHBS-17	28/10/2008	590	1.96	3.37	10.10	29.30	86.90	30.10	13.50	56.4	28.6	8.30	6.00	672	314	60	187	1056.0	70	410							
SPHBS-18	4/11/2008	350	2.05	2.91	8.37	25.10	86.25	28.76	9.56	72.0	19.0	4.00	5.00	694	241	65	80	2690.0	31	404							
SPHBS-19	28/10/2008	1086	1.84	3.4	10.5	30.9	91.96	31.25	13	55.1	34.4	8.05	1.7	513	202	38	76	1481.0	2	0							
SPHBS-20	6/3/2009	636	2.10	3.79	10.30	32.10	84.69	27.17	16.00	70.0	17.0	9.00	4.00	589	224	38	86	2994.0	30	404							
SPHBS-21	28/10/2008	739	2.15	1.96	7.16	21.00	107.14	36.53	7.08	46.5	44.2	5.47	3.00	391	269	38	85	3395.0	10	358							
SPHBS-22	12/12/2008	650	2.02	2.80	9.79	28.70	102.50	34.96	10.40	36.9	45.7	5.44	10.70	933	349	24	85	382.0	381	429							
SPHBS-23	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----						
SPHBS-24	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----						
SPHBS-25	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----						

Legenda ID: identificação, GV: eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$), Hb: hemoglobina (g/dL), Ht: hematócrito (%), VCM: volume corpuscular médio (femtolitro), HCM: hemoglobina corpuscular média (pg), GB: leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$), Plq: plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$), Neut: neutrófilo (%), Linf: linfócito (%), Eosi: eosinófilo (%), Mon: monócito (%), CTCF: capacidade total de ligação do ferro (mcg/dL), IST: índice de saturação de transferrina (%), PCR: proteína C reativa (MG/dL), Exp. DFX: exposição ao deferasirox (dias), Última Trans.: última transfusão sanguínea (Data da coleta – data da transfusão)

Planilha 3. Resultado dos testes laboratoriais e informações coletadas dos prontuários/questionários dos doentes falciformes do hemocentro de São José do Rio Preto – Tempo 1 de análise (T1).

ID	Data T1	Gênero	Idade	Etnia	Eletroforese					HPLC					Biologia Molecular					Estado Oxidativo	
					pH 8,6	pH 6,2	HbA2	HbF	HbA	HbS	HbS	CD39	IVSI-110	IVSI-6	IVSI-1	Haplótipos	Conclusão	TBARS	TEAC		
SS 01	14/5/2007	M	34	C	SS A ↓	SS A ↓	6,3	3,1	8,8	78,9	Hetero	Normal	Hetero	----	----	bantu/I	S/Beta IVS-110	651,00	2,09		
SS 04	21/8/2007	F	43	Afro	AS	AS	2,6	2,3	48,3	37,1	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	818,00	2,13			
SS 06	21/5/2007	F	47	Afro	SS	SS	4	3,7	1,5	89	Homo	----	----	----	benim/bantu	SS	1004,00	2,03			
SS 07	21/5/2007	F	33	Afro	S A	S A	2,8	5,7	36,8	47,9	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	948,00	2,13			
SS 08	21/5/2007	F	41	Afro	AS	AS	2,8	0,6	46,2	40,3	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	948,00	2,12			
SS 09	28/5/2007	F	15	Afro	SS F	SS F	6,9	6	2	83,6	Hetero	Hetero	----	----	bantu/II	S/Beta CD39	706,00	2,15			
SS 10	28/5/2007	F	25	Afro	AS F	AS F	2,6	2,3	60,6	25,8	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	892,00	1,96			
SS 11	28/5/2007	F	24	C	AS F	AS F	2,7	4,8	56,1	25,6	Homo	----	----	----	benim/bantu	SS	576,00	2,14			
SS 12	6/6/2007	M	29	Afro	S A	S A	3,3	5,2	35,6	51	Homo	----	----	----	benim/bantu	SS	2362,00	2,13			
SS 13	11/6/2007	F	35	Afro	SS	SS	5,1	4,2	9,6	78,9	Hetero	Normal	Hetero	----	bantu/Atp6	S/Beta IVS-110	502,00	2,11			
SS 14	11/6/2007	M	28	Afro	S A	SAF	5,3	9,4	26,5	53,6	Hetero	Hetero	----	----	benim/II	S/Beta CD39	613,00	2,08			
SS 15	11/6/2007	F	20	Afro	SS F	SS F	3,7	7	2,2	84,8	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	1376,00	2,14			
SS 16	11/6/2007	F	27	Afro	SS F	SS F	3,6	7,3	1,8	85,2	Hetero	Normal	Normal	Normal	bantu/Atp6	S/beta ?	1524,00	2,20			
SS 17	18/6/2007	F	27	Afro	SS	SS	1,5	3,4	2,5	92,3	Homo	N	----	----	bantu/bantu	SS	837,00	2,29			
SS 18	18/6/2007	M	18	Afro	SS F	SS F	4,5	12,7	3	78,3	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	680,00	2,32			
SS 19	25/6/2007	M	23	C	S A ↓	S A ↓	6,3	2,4	10,7	79,7	Hetero	Normal	Hetero	----	benim/I	S/Beta IVS-110	725,00	2,23			
SS 20	25/6/2007	M	20	Afro	SF	SF	6,6	8,6	2,8	81,4	Hetero	Hetero	----	----	benim/II	S/Beta CD39	335,00	2,26			
SS 21	25/6/2007	M	17	Afro	SF	SF	5,7	19,1	2,8	71,6	Hetero	Hetero	----	----	benim/II	S/Beta CD39	558,00	2,21			
SS 22	27/7/2007	M	27	Afro	SS F AJ	SS F	3	12,8	2,8	74,5	Homo	----	----	----	benim/bantu	SS	600,00	2,12			
SS 23	27/7/2007	F	36	Afro	SC	SC	3,2	0,2	3,4	48,8	Hetero	----	----	----	-----	SC	----	----			
SS 24	6/8/2007	F	16	C	SS F	SS F	6,2	15,8	3,6	74,7	Hetero	Hetero	----	----	benim/II	S/Beta CD39	632,00	2,02			
SS 25	6/8/2007	F	24	Afro	SC	SC	3,4	0,9	2,5	49,7	Hetero	----	----	----	-----	SC	----	----			
SS 27	13/8/2007	M	24	Afro	SS	SS	3,6	1,9	2,1	91,1	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	725,00	2,19			
SS 28	13/8/2007	M	17	Afro	AS	AS	4	0	49,3	40	Hetero	Normal	Normal	Hetero	came/atp7	S/beta IVSI-6	2070,00	2,33			
SS 29	27/8/2007	M	34	Afro	S A	S A	4,8	1	7,9	83,5	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	1316,00	2,48			
SS 30	27/8/2007	F	19	Afro	SS F	SS F	3	10,8	2,8	83	Homo	----	----	----	bantu/bantu	SS	1930,00	2,24			
SS 31	27/8/2007	M	18	Afro	S A	S A	3,5	1,4	26,1	62,6	Homo	----	----	----	benim/atp5	SS	803,00	2,00			
SS 34	10/9/2007	F	25	Afro	SF	SF	2,9	13,3	3,2	79,5	Homo	----	----	----	benim/atp5	SS	461,00	2,16			
SS 35	8/10/2007	M	16	Afro	SF	SS F	2,5	20	3,5	75,3	Hetero	Normal	Hetero	Hetero	bantu/Atp6	S/beta IVSI-6	598,00	2,22			

Legenda ID: identificação, F; feminino, M: masculino, A: afro-descendente, C: caucasóide, Homo: homocigoto para a mutação, Hetero: heterocigoto para a mutação, TBARS: dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico em ng/mL, TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox em mM/L. Data T1: data da coleta do T1.

Planilha 4. Resultado dos testes laboratoriais e informações coletadas dos prontuários/questionários dos doentes falciformes do hemocentro de São José do Rio Preto – tempo 2 de análise (t2).

ID	Data T2	T2 - T1	Estado Oxidativo										Dados Hematológicos										Últ. Tran.
			TBARS	TEAC	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	GB	Plq	Ferritina	Últ. Tran.	TBARS	TEAC	GV	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	
SS 01	22/6/2009	108.29	925.00	1.96	4.75	12.00	36.00	76.30	25.20	33.00	17.00	245.00	Há 4 anos										
SS 04	8/3/2009	79.571	2046.00	2.06	1.62	6.60	19.00	120.10	40.70	33.90	23.90	237.00	Há 4 meses										
SS 06	16/2/2009	89.286	2109.00	1.98	2.49	8.70	25.00	100.00	34.90	34.90	2140.00	Há 30 dias											
SS 07	2/3/2009	91.571	1712.00	2.02	2.10	7.90	23.00	108.70	37.30	34.30	15.80	267.00	Há 2 meses										
SS 08	16/2/2009	89.286	1712.00	2.15	1.97	6.60	19.00	96.70	33.40	34.60	12.80	234.00	Há 30 dias										
SS 09	13/4/2009	96.429	706.00	2.15	3.82	8.90	27.00	71.30	23.30	32.60	20.40	488.00	Há 2 anos										
SS 10	30/3/2009	94.571	1608.00	1.98	1.95	8.00	23.00	118.70	41.30	34.80	15.70	252.00	Há 4 meses										
SS 11	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----										
SS 12	30/3/2009	93.429	3174.00	2.08	2.04	8.00	23.00	112.30	39.40	35.10	1026.00	Há 7 anos											
SS 13	27/4/2009	96.571	647.00	1.92	3.47	8.40	26.00	75.10	24.30	32.30	10.90	249.00	Há 6 anos										
SS 14	16/2/2009	86.429	613.00	2.08	3.43	10.30	31.00	91.10	30.00	33.00	18.70	414.00	Há 35 dias										
SS 15	11/5/2009	98.571	1100.00	2.14	2.40	9.00	26.00	107.80	37.50	34.80	11.40	245.00	Há 9 meses										
SS 16	27/4/2009	96.571	564.00	2.07	----	----	----	----	----	----	----	----	Há 8 meses										
SS 17	16/2/2009	85.429	2506.00	2.09	1.88	7.00	21.00	110.10	37.30	33.80	13.50	458.00	Há 8 meses										
SS 18	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----										
SS 19	29/6/2009	103.43	850.00	2.10	4.70	11.30	34.00	73.30	23.90	32.70	17.80	388.00	Há 7 meses										
SS 20	30/3/2009	90.714	335.00	2.26	4.05	9.40	30.00	73.20	23.10	31.60	21.50	617.00	Há 4 meses										
SS 21	16/2/2009	84.429	558.00	2.21	4.15	11.10	33.00	80.30	26.70	33.20	16.10	470.00	Há 1 ano										
SS 22	4/5/2009	94.571	600.00	2.12	2.70	10.60	31.00	111.00	38.10	34.30	13.20	323.00	Há 3 anos										
SS23	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----										
SS 24	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----										
SS25	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----										
SS 27	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----										
SS 28	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----										
SS 29	16/2/2009	75.571	856.00	2.15	2.45	8.10	23.00	95.60	2.90	34.50	1800.00	581.00	1800.00	Há 30 dias									
SS 30	30/3/2009	81.857	1504.00	2.18	2.50	8.70	26.00	100.40	34.20	34.10	560.00	144.00	560.00	Há 2 Anos									
SS 31	25/5/2009	89.714	1027.00	2.03	1.68	6.10	17.00	99.70	36.40	36.50	14.10	388.00	1200.00	Há 1 ano									
SS 34	23/3/2009	79	1040.00	1.94	2.28	7.40	22.00	97.20	32.80	33.70	6.00	471.00	890.00	Há 1 ano									
SS 35	27/4/2009	79.857	710.00	2.04	3.67	8.40	22.26	76.46	24.39	31.60	12.82	292.72	234.00	Há 3 anos									

Legenda ID: identificação, GV: eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$), Hb: hemoglobina (g/dL), Ht: hematócrito (%), VCM: volume corpuscular médio (femtolitro), HCM: hemoglobina corpuscular média (pg), GB: leucócitos ($10^3 \cdot \text{mm}^3$), Plq: plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$), Última Trans.: última transfusão sanguínea (Data da coleta – data da transfusão), T2 – T1: intervalo de semanas entre o T1 e T2.

APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Questionário do projeto de Pesquisa "Estresse oxidativo em doentes falciformes: influência dos haplótipos, interações genéticas e medicação específica".

Data: ____/____/____

Nome completo: _____

Sexo: () feminino () masculino

Endereço: _____

Cidade e estado aonde mora: _____

Telefone residencial: (____) _____

Telefone comercial: (____) _____

Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Etnia (indicar o país de origem): _____

Local de nascimento (indicar cidade, estado e país): _____

História Clínica: Complicações Agudas ou Crônicas

Nº de crises de dor por ano nos últimos 3 anos: 0 a 2 3 a 5 maior ou igual a 6

Nº de infecções por ano dos últimos 3 anos: 0 a 2 3 a 5 maior ou igual a 6

Nº de internações por ano nos últimos 3 anos: 0 a 2 3 a 5 maior ou igual a 6

Pulmonar:	Síndrome Torácica Aguda	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Cardíaca: Cardiomegalia	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	ICC	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Hepatobiliar: Cálculo Biliar	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	Colecistectomia	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
Neurológica:	AVC	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Endócrina:	Diabetes Mellitus	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Osteoarticular:	Osteonecrose	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Cutânea:	Úlcera isquêmica	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Urológica:	Priapismo	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Oftalmológica:	Retinopatia	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Outra: Esplenectomia:	Esplenectomia	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim

Histórico Transfusional

-Nº de unidades de concentrado de hemácias transfundidas até o início do estudo?

menor 10 10 a 20 21 a 30 31 a 10 maior que 40

- Em regime regular de transfusão de hemácias?

Não Sim Intervalo: _____ Data da última transfusão: _____

Medicamentos em uso

- Hidroxiureia: Não Sim Início (data): _____ Dose diária: ____

- Desferroxamina (Desferal): Não Sim Início (data): _____ Dose diária: ____

- Deferiprona (Ferriprox): Não Sim Início (data): _____ Dose diária: ____

- Deferasirox (Exjade): Não Sim Início (data): _____ Dose diária: ____

- Ácido fólico: Não Sim Início (data): _____

- Vitaminas: Não Sim Quais? _____

- Analgésicos: Não Sim Quais? _____

- Outros: Não Sim Quais? _____

Tem contato com produtos químicos? (Exemplos: solvente, cola, tinta, pesticida, herbicida, fertilizante, óleos de motor, gasolina, fumaça, material radioativo, outras substâncias)

() não

() sim – Quais? _____

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

Toma bebidas alcoólicas?

() não

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

Muito obrigado por sua consideração em dispor o seu tempo para preencher este questionário.

Edis Belini Junior

Cargo/função: Pós-graduando/Biólogo

Intituição IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – CEP: 15054-000.

São José do Rio Preto – SP, Fone: (17) 3221-2392

APÊNDICE D- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**UNESP – São José do Rio Preto**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “**Estresse oxidativo em doentes falciformes: influência dos haplótipos e medicação específica**” sob responsabilidade do Pós-Graduando Edis Belini Junior. O estudo será realizado com amostras de sangue para diagnóstico de hemoglobinas anormais, hemocromatose e capacidade antioxidante, visando esclarecer as diferenças de manifestação entre os diferentes indivíduos. O risco é considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de mancha roxa no local da picada da agulha de coleta. Você poderá consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou por telefone, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. O material biológico cedido será armazenado e você poderá ser chamado para dar a sua autorização para novo(s) projeto(s). Caso isso seja impossível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 347/2005.

Assim, concordo em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome: _____ R.G.: _____

Endereço: _____ Fone: _____

_____, ____ de _____ 2008.

Usuário/ responsável legal

Pesquisador responsável

OBS: Este termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador.

Edis Belini Junior

Cargo/função: Pós-graduando; Biólogo

Intituição IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – CEP: 15054-000.

São José do Rio Preto – SP, Fone: (17) 3221-2392

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura