



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

Programa de Pós-graduação em Genética

ELIANA LITSUKO TOMIMATSU SHIMAUTI

Capacidade antioxidante na Hb S: influência de talassemia alfa,
haplótipos do gene β^S globina e melatonina

São José do Rio Preto

2011



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

Programa de Pós-graduação em Genética

ELIANA LITSUKO TOMIMATSU SHIMAUTI

Capacidade antioxidante na Hb S: influência de talassemia alfa,
haplótipos do gene β^S globina e melatonina

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Genética junto ao Programa de Pós-graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

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

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto

2011

Shimauti, Eliana Litsuko Tomimatsu.

Capacidade antioxidante na Hb S: influência de talassemia alfa, haplótipos do gene β^S globina e melatonina / Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011. 150 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Co-orientador: Eduardo Alves Almeida

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobinopatia. 2. Anemia falciforme. 3. Estresse oxidativo. 4. Melatonina. 5. Haplótipos. 6. Talassemia alfa. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Almeida, Eduardo Alves. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616.155

Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti

Capacidade antioxidante na Hb S: influência de talassemia alfa,
haplótipos do gene β^S globina e melatonina

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Paulo César Naoum
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Isaac Lima da Silva Filho
Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro

Prof. Dr. Octavio Ricci Junior
FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

01/julho/2011.

*Dedico este trabalho aos meus pais pelo incentivo constante
e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por mais essa conquista.

À Profª Drª Claudia Regina Bonini Domingos, minha gratidão pela confiança, carinho, dedicação, paciência, incentivo e inestimável apoio e orientação segura para a realização deste trabalho, muito obrigada.

Agradeço ao meu co-orientador Prof Dr. Eduardo Alves de Almeida pelo apoio, dedicação, incentivo e valiosa discussão e contribuição técnico-científica, muito obrigada.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do campus de São José do Rio Preto, São Paulo, pela oportunidade em conceder o aperfeiçoamento acadêmico e técnico-científico.

Agradeço ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do campus de São José do Rio Preto, São Paulo, pela dedicação e contribuição no aperfeiçoamento acadêmico-profissional.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), Paraná, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina (DAB)-UEM, por proporcionar a oportunidade de aperfeiçoamento profissional, técnico-científico.

Ao Ministério da Saúde (3072/2007) e Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (Processo 5636/2009) pelo apoio financeiro para possibilitar o desenvolvimento do Projeto de Tese.

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (convênio 322/2009) por ter concedido bolsa auxílio e auxílio deslocamento para realização das atividades de doutorado.

Aos membros da banca de exame de qualificação e da defesa de tese pela colaboração e importante contribuição.

À Coordenação e sua equipe do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), à Diretora e sua equipe do Hemocentro Regional de Maringá, à Direção e sua equipe do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Maringá (UEM), PR, pelo apoio na seleção e/ou avaliação dos prontuários dos pacientes.

Ao Dr. Francismar Prestes Leal pelo encaminhamento dos pacientes para possibilitar o desenvolvimento da pesquisa, muito obrigada.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH)-UNESP, aqueles que já passaram e aos que continuam compartilhando e trocando as experiências técnico-científicas, pelo apoio, pelos momentos de descontração e amizade, muito obrigada.

Aos amigos do laboratório de Hematologia–DAB-UEM, Fabiana, Fátima, Izaura, Juliana, Luís, Sirlene e Valéria, pela amizade, companheirismo, incentivo, apoio, momentos de descontração, orações e pela valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada. Os nomes estão relacionados em ordem alfabética.

À Dra. Paula J. Antoniazzi Zamaro, minha gratidão pela valiosa contribuição na assistência e aperfeiçoamento técnico-científico, pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre.

À Sirlene Pereira da Silva, por ter me acompanhado na busca ativa dos pacientes, sem medir os esforços, nas madrugadas, viajando pelas rodovias, para a realização das coletas de amostras de sangue, muito obrigada.

Aos docentes dos Laboratórios de Imunogenética, Imunologia Clínica, Bioquímica de microorganismos, Bacteriologia Clínica, Organização Funcional do Núcleo e Micologia da Universidade Estadual de Maringá, PR, por ter cedido a estrutura física e equipamentos para possibilitar a realização das partes dos experimentos deste projeto, que foi fundamental para consecução deste trabalho. E ao pessoal técnico-administrativo e pós-graduandos destes setores, pelo apoio.

Ao Danilo Grunig Humberto Silva, pelo valioso auxílio na padronização de método e no desenvolvimento técnico, amizade e disponibilidade em colaborar.

À Profa Msc. Cristiane Maria Colli pelo auxílio na padronização de um dos métodos da Biologia Molecular, pela dedicação, amizade e disponibilidade em colaborar, muito obrigada.

Ao Edis Belini Junior, pela valiosa contribuição nas análises estatísticas, apoio, amizade e disponibilidade em colaborar.

À Profa Dra Eniuce Menezes de Souza, Profa Dra Daniele Granzotto e Érika Cristina Ferreira, pela valiosa contribuição na análise estatística.

Ao Dr. Francisco, Coordenador do Laboratório de Análises Clínicas da UNIPAR-Umuarama-Paraná e sua equipe, por ter cedido a estrutura física e

equipamento para processamento das amostras de sangue colhidas das pessoas residentes naquele município.

À Dra. Adriana Fiorini, Profa. Dra. Ione P. B. Tassmann, Profa. Dra. Luiza Tsuneto, Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez, Msc. Marlene curty, Profa. Dra. Rosilene Fressatti, Profa. Dra. Thaís V. Silveira pelo auxílio inestimável prestado em algum momento deste trabalho, muito obrigada. Os nomes estão listados em ordem alfabética.

Aos pacientes e todas as pessoas que doaram as amostras biológicas, meu afeto e eterna gratidão.

A todos os docentes e pessoal técnico-administrativo do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), pelo apoio, amizade, incentivo, momentos de descontração e contribuição direta e indireta no desenvolvimento deste trabalho.

À acadêmica Bruna A. A. Aguiar, por ter me auxiliado na tabulação de dados.

Aos meus pais, às minhas irmãs, meus irmãos, cunhadas, pelo incentivo, carinho e por estarem presentes na minha vida não somente nos momentos de alegria, também nos momentos de dificuldades. Muito obrigada.

Ao meu marido Junzi, que esteve ao meu lado apoiando e me incentivando, com paciência e compreensão, e pelo companheirismo. Muito obrigada.

Aos meus filhos Augusto e Fernanda, vocês me fazem realimentar a energia e impulsionar à busca dos meus ideais e manter constante a chama da esperança.

A todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho meus sinceros agradecimentos.

MUITÍSSIMO OBRIGADA A TODOS!

Faça, erre, tente, falhe, lute. Mas, por favor, não jogue fora, se acomodando, a extraordinária oportunidade de ter vivido, tendo consciência de que cada um foi feito para fazer história. Que a vida é um milagre e traz em si uma revolução.

Autor desconhecido

RESUMO

A anemia falciforme (Hb SS), caracterizada por estados de inflamação crônica e eventos de agressão isquêmica e reperfusão pode causar danos oxidativos às macromoléculas biológicas. Os genes epistáticos e os haplótipos do gene da globina β^S são possíveis moduladores de variabilidade fenotípica na Hb SS. A melatonina pode atenuar o estresse oxidativo e abrandar a morbidade. O objetivo deste foi analisar a influência de talassemia alfa ($-\alpha^{3.7}$), haplótipos do gene β^S e melatonina na capacidade antioxidante total e expressão fenotípica, em indivíduos com Hb SS e Hb AS. Para avaliar o nível de melatonina sérica foram selecionadas 15 amostras de pacientes com Hb SS e 24 com Hb AA da região noroeste do estado do Paraná (NOPR). A triagem das hemoglobinas foram realizadas por métodos eletroforéticos e cromatográfico, e a caracterização genotípica da Hb S por meio de PCR- RFLP e PCR-AE. As espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS), e a capacidade antioxidante total em equivalência ao Trolox (TEAC) foram determinadas por meio da espectrofotometria. A melatonina foi estimada por meio de HPLC. O estado redox foi analisado selecionando amostras de 68 indivíduos com Hb SS, 53 com Hb AS e 149 com Hb AA, das regiões sul e sudeste do Brasil. Para analisar a influência dos genes epistáticos sobre a TEAC, melatonina e expressão fenotípica, foram selecionadas 17 amostras com Hb SS, 30 com Hb AS, e 30 com Hb AA, da NOPR. O critério para elegibilidade foi ser não fumantes, não gestantes, não etilistas e estar na fase estável para os indivíduos com HbSS. Os haplótipos do gene β^S e a talassemia $-\alpha^{3.7}$ foram identificados por meio de PCR-RFLP e PCR multiplex, respectivamente. Os níveis séricos de melatonina apresentaram-se reduzidos nos indivíduos com Hb SS ($P<0,001$), e os TBARS e TEAC elevados quando comparados a grupo controle ($P<0,001$ e $P<0,01$ respectivamente). A correlação entre TBARS e TEAC ($r=0,51$; $P=0,04$) sugeriu a ação da melatonina na defesa antioxidante. Entre os grupos de diferentes localidades, o menor nível de TBARS incidiu no grupo que fazia o uso combinado de antioxidantes ($P<0,05$). Os níveis de TBARS e TEAC dos portadores de Hb AS não apresentaram diferença quando comparados ao grupo com Hb AA ($P>0,05$). Os valores de TBARS, TEAC e melatonina não diferiram ($P>0,05$) entre os Bantu/Bantu, Bantu/Benin, bem como

entre a interação SS/ talassemia $-\alpha^{3.7}$ e sem talassemia ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) ($P>0,05$). Assim concluímos que os haplótipos Bantu e Benin, e a deleção $-\alpha^{3.7}$ na população analisada não influenciaram os níveis séricos de melatonina, a capacidade antioxidante total e a expressão fenotípica. Os resultados sugerem também que a melatonina contribui na elevação da defesa antioxidante total.

Palavras-chave: anemia falciforme; traço falciforme; TBARS; TEAC; hemoglobinopatia; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Sickle cell disease (Hb SS), characterized by chronic inflammation and ischemic damage episodes and reperfusion, comprises excessive production of free radicals which can cause oxidative damage to biologic macromolecules. The epistatic genes and the polymorphism of the β^S globin gene region are possible modulators of phenotypical variability of sickle cell disease in Hb SS. Melatonin can diminish both the oxidative stress and morbidity. The objective of this study was to analyze the influence of $-\alpha^{3.7}$ thalassemia and from β^S gene haplotypes on total anti-oxidant capacity, melatonin serum levels and phenotypical expression in individuals with Hb SS and Hb AS. To evaluate melatonin serum level 15 samples with HbSS and 24 with Hb AA from the northwest region of Paraná state (NOPR). The hemoglobin screenings were performed by electrophoretic and chromatographic methods and genotypic characterization of Hb S by PCR- RFLP and PCR-AE. The concentrations of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), used as markers of oxidative stress and total antioxidant capacity in equivalence to Trolox (TEAC), were determined by spectrophotometry. Melatonin was estimated by HPLC. The redox state was analyzed through selecting 68 individuals with Hb SS, 53 with Hb AS and 149 with Hb AA from Brazil's south and southeast regions. To analyze the influence of epistatic genes on TEAC, melatonin and phenotypical expression, there were selected 17 samples with Hb SS, 30 with Hb AS, and 30 with Hb AA from NOPR. The β^S gene haplotypes and $-\alpha^{3.7}$ thalassemia were identified through RFLP-PCR and multiplex PCR, respectively. The melatonin serum levels appeared significantly reduced in individuals with Hb SS ($P<0.001$); and the TBARS and TEAC appeared significantly increased when compared to the control group ($P<0.001$ and $P<0.01$, respectively). The correlation between TBARS and TEAC ($r=0.51$; $P=0.04$) suggested the participation of melatonin in antioxidant defense. Among the groups of different localities, the lower levels of TBARS occurred in the group that made use of combined antioxidants ($P<0.05$). The TBARS and TEAC levels of Hb AS group did not show any difference when compared to Hb AA group ($P>0.05$). The TBARS, TEAC and melatonin levels did not differ ($P>0.05$) between the Bantu/Bantu, Bantu/Benin groups, as well as between the interaction SS/ $-\alpha^{3.7}$ thalassemia

and with no thalassemia ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) ($P>0.05$). Thus, it was concluded that the Bantu and Benin haplotypes, as well as the $-\alpha$ 3.7 deletion in the studied population, did not influence the melatonin serum levels, the total antioxidant capacity and phenotypical expression. The results also suggest that melatonin contributes to the elevation of total antioxidant defense.

Keywords: *sickle cell anemia; sickle cell trait; TBARS; TEAC; hemoglobinopathy; oxidative stress.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1	Organização cromossômica do complexo gênico de globina α e β	22
Figura 2	Representação do grupamento do gene α com pareamento errôneo e recombinação homóloga desigual em que os segmentos homólogos X, Y, Z estão indicados em barras.....	27
Figura 3	Processo oxidativo na Hb S.....	30
Figura 4	Diagrama de múltiplas ações de melatonina contra o dano oxidativo..	32
Figura 5	Representação esquemática do produto de amplificação por PCR-AE para a identificação da Hb S.....	39
Figura 6	Representação esquemática de produtos de amplificação e digestão por PCR-RFLP para identificação da Hb S.....	40
Figura 7	Localização dos oligonucleotídeos específicos para a identificação da deleção $-\alpha^{3.7}$ por PCR-multiplex.....	41
Figura 8	Representação esquemática do produto de amplificação por PCR-multiplex para a identificação da deleção $-\alpha^{3.7}$	41
Figura 9	Haplótipos do complexo gene β^S , determinados pelas quatro enzimas de restrição.....	42
ARTIGO I		
Figura 1	HPLC-EC detection of serum melatonin.....	52
Figura 2	The oxidative stress parameters evaluated in SCA patients and group control.....	54
Figura 3	Serum melatonin levels break down the age ranges in SCA patients and control group.....	55
ARTIGO III		
Figura 1	Análise comparativa dos níveis de TBARS dos indivíduos com Hb SS de NOPR, NOSP e LSP.....	74
Figura 2	Análise comparativa dos níveis de TEAC dos indivíduos com Hb SS de NOPR, NOSP e LSP.....	74

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1	Características demográficas dos indivíduos avaliados com anemia falciforme, traço falciforme e controle (Hb AA).....	36
Tabela 2	Distribuição da procedência dos indivíduos avaliados com Hb SS e Hb AS.....	36
Tabela 3	Oligonucleotídeos e enzimas para detecção dos haplótipos de Hb S: regiões dos sítios polimórficos; tamanho dos fragmentos gerados antes e após a clivagem.....	42
Tabela 4	Oligonucleotídeos para amplificação de regiões do grupamento β : localização referente ao grupamento do gene β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).....	43

ARTIGO I

Tabela 1	<i>Patient phenotypes and clinical characteristics</i>	50
Tabela 2	<i>Hematological profile and hemoglobin fraction concentration in SCA patients and the control group</i>	53

ARTIGO II

Tabela 1	Características clínicas da coexistência da talassemia $\alpha^{3.7}$ com Hb SS observadas nos paciente 1 e 2 com deleção de um gene e de dois genes alfa respectivamente.....	64
Tabela 2	Dados hematológicos da interação entre Hb SS/ $\alpha^{3.7}$ de pacientes 1 e 2 com deleção de um gene e de dois genes alfa, respectivamente	65

ARTIGO III

Tabela 1	Cartacterísticas demográficas e perfil clínico/hematológico dos grupos avaliados segundo a região de origem.....	72
Tabela 2	Distribuição dos valores medianos de TBARS e TEAC dos indivíduos com Hb SS, de acordo com o esquema terapêutico instituído por localidade.....	75

ARTIGO IV

Tabela 1	Distribuição dos dados demográficos, laboratoriais de todos os indivíduos com anemia falciforme (Hb SS), traço falciforme (Hb AS)	
----------	---	--

	e sem hemoglobinopatias)Hb AA).....	89
Tabela 2	Perfil redox e características hematológicas dos portadores de Hb SS de acordo com os haplótipos do gene β^S e co-herança de talassemia $-\alpha^{3.7}$ e genótipo normal para α	90
Tabela 3	Distribuição dos valores medianos da capacidade antioxidante e peroxidação lipídica dos haplótipos Bantu e Benin, comparados com o grupo controle (Hb AA).....	90
Tabela 4	Perfil redox e características hematológicas dos portadores de Hb AS de acordo com a co-herança de talassemia $-\alpha^{3.7}$ e genótipo normal para α	91
Tabela 5	Distribuição das frequências das manifestações clínicas nos portadores de anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene β^S e co-herança de talassemia $-\alpha^{3.7}$ e genótipo normal para α	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
AF	anemia falciforme
AFMK	N1-acetil-N2-formil-5 metoxiquimuramina
AMK	N-acetil-5-metoxikinuramine
BAN	haplótipo Bantu
BEN	haplótipo Benin
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
EDTA _{K₃}	ácido etilenodiaminotetracético tripotássico
ERO	espécies reativas de oxigênio
ERN	espécies reativas de nitrogênio
et al.	e outros
Fe ⁺⁺	átomo de ferro ferroso
Fe ⁺⁺⁺	átomo de ferro férrico
g/dL	grama por decilitro
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione reduzida
Hb	hemoglobina
Hb A	hemoglobina A (normal)
Hb S	hemoglobina S (falciforme)
Hb F	hemoglobina fetal
Hb SS	homozigoto para hemoglobina S (anemia falciforme)
Hb AS	heterozigoto para hemoglobina S (traço falciforme)
HCM	hemoglobina corpuscular média
HO [·]	radical hidroxil
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HU	hidroxiuréia
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
ICAM-1	molécula de adesão intercelular - 1
Kb	kilobase
LCR	<i>locus control region</i>

LPO	peroxidação lipídica
LSP	região leste do estado de São Paulo
MEL	melatonina
mM/L	milimolar por litro
μL	microlitro
ng/mL	nanograma por mililitro
NO [•]	óxido nítrico
NOPR	região noroeste do estado do Paraná
NOSP	região noroeste do estado de São Paulo
NF- κB	fator nuclear - kappa B
6-OHM	6-hidroxi melatonina
O ₂ ^{•-}	íon superóxido
pb	pares de base
PCR-AE	reação em cadeia da polimerase alelo específico
PCR-RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição
PR	Paraná
RO [•]	radical alcóxil
ROO [•]	radical peróxil
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SP	São Paulo
SOD	superóxido dismutase
SCA	<i>sickle cell anemia</i>
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEAC	capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox
TBA	ácido tiobarbitúrico
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular -1
VCM	volume corpuscular médio

LISTA DE SÍMBOLOS

α	gene alfa
β	gene beta
β^S	gene beta S mutante
δ	gene delta
ϵ	gene épsilon
ζ	gene zeta
ψ	pseudo genes
γ^A	gene gama alanina
γ^G	gene gama glicina
$-\alpha^{3.7}$	talassemia alfa por deleção de 3.7 kb de gene alfa
$-\alpha/-\alpha$	homozigose para talassemia $-\alpha^{3.7}$
$-\alpha/\alpha\alpha$	heterozigose para talassemia $-\alpha^{3.7}$

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1	Estrutura e síntese das Hemoglobinas humanas	21
1.2	Hemoglobinopatia S	23
1.3	Haplótipos da globina do gene β^S	25
1.4	Talassemia alfa	25
1.5	Estresse oxidativo	27
1.6	Processo oxidativo na anemia falciforme e traço falciforme.....	29
1.7	Melatonina.....	31
2	Objetivos	34
2.1	Objetivos gerais.....	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Casuística	35
3.2	Métodos	36
3.2.1	Avaliação do hemograma.....	36
3.2.2	Avaliação do perfil de hemoglobinas.....	36
3.2.3	Análises moleculares	38
3.2.4	Determinação da Capacidade Antioxidante Total em Equivalência ao Trolox (TEAC)	43
3.2.5	Dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)..	44
3.2.6	Dosagem de melatonina	44
3.2.7	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	ARTIGO I	47
4.2	ARTIGO II	61
4.3	ARTIGO III	67
4.4	ARTIGO IV	82
5	DISCUSSÃO GERAL	99
6	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXO	112
	ANEXO A: Métodos	113

APÊNDICE.....	138
APÊNDICE A - Planilhas	139
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	147
APÊNDICE C - Questionário	148

1 Introdução geral

1.1 Estrutura e síntese das Hemoglobinas humanas

A hemoglobina (Hb), presente no meio intra-eritrocitário, é uma molécula de estrutura quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas, ou globínicas, e quatro grupamentos heme, cuja principal função é transportar o oxigênio (O₂) dos pulmões para os tecidos. Sua estrutura é quimicamente unida a um grupamento prostético de ferro, o heme, constituído por um anel tetrapirrólico de protoporfirina IX que contém no seu centro um átomo de ferro no estado ferroso (Fe²⁺) com a propriedade de ligar ou liberar o O₂ nos tecidos (MARENGO-ROWE, 2006; SCHECHTER, 2008). Duas das quatro subunidades globínicas são compostas de cadeias do tipo alfa (alfa- α e zeta- ζ) cada qual com 141 resíduos de aminoácidos. As outras duas, com 146 resíduos de aminoácidos cada, são compostas por cadeias do tipo beta (beta- β , delta- δ , gama- γ e épsilon- ϵ). As combinações entre as cadeias do tipo alfa com as do tipo beta originam diferentes moléculas de Hb no decorrer das distintas fases de desenvolvimento humano, desde o embrionário até a fase pós-natal (NAOUM, 1997; ZAGO, 2001).

A síntese de cadeias globínicas é controlada por duas famílias gênicas localizados no cromossomo 16 (família dos genes tipo α) e no cromossomo 11 (família dos genes tipo β), na ordem em que são expressos, no sentido 5' → 3'. Nos períodos embrionário, fetal e adulto, diferentes grupos de genes são ativados ou suprimidos, sendo as cadeias polipeptídicas sintetizadas e coordenadas, em quantidades equivalentes (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; SCHECHTER, 2008). A família α e β incluem, além dos genes estruturais ativos, os pseudogenes (ψ) que possuem sequências equivalentes a um gene de globina ativo, porém, inativados devido à mutações que inibem a sua expressão. Os genes da família α estão distribuídos em um segmento de DNA de cerca de 30 kb do braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) e se dispõem como segue: 5'- ζ - $\psi\zeta$ - $\psi\alpha$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ -3'. A família do gene β ocupa cerca de 60 kb do braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) onde se observam os genes 5'- ϵ - γ - $\psi\beta$ - δ - β -3'.

A expressão do gene α é regulada por uma seqüência denominada HS-40, sítio hipersensível à digestão com DNase, situada a 40 kb do gene ζ (ZAGO et al., 2001; SCHECHTER, 2008). A regulação da expressão dos genes do tipo β é

controlada por uma região denominada *locus control region* (LCR), constituído por cinco sítios hipersensíveis à digestão com DNase, localizados entre 6 e 18kb do gene ϵ . Essa região parece contribuir para a expressão sequencial dos genes durante o desenvolvimento ontogenético (ZAGO et al., 2001; SCHECHTER, 2008) (Figura 1).

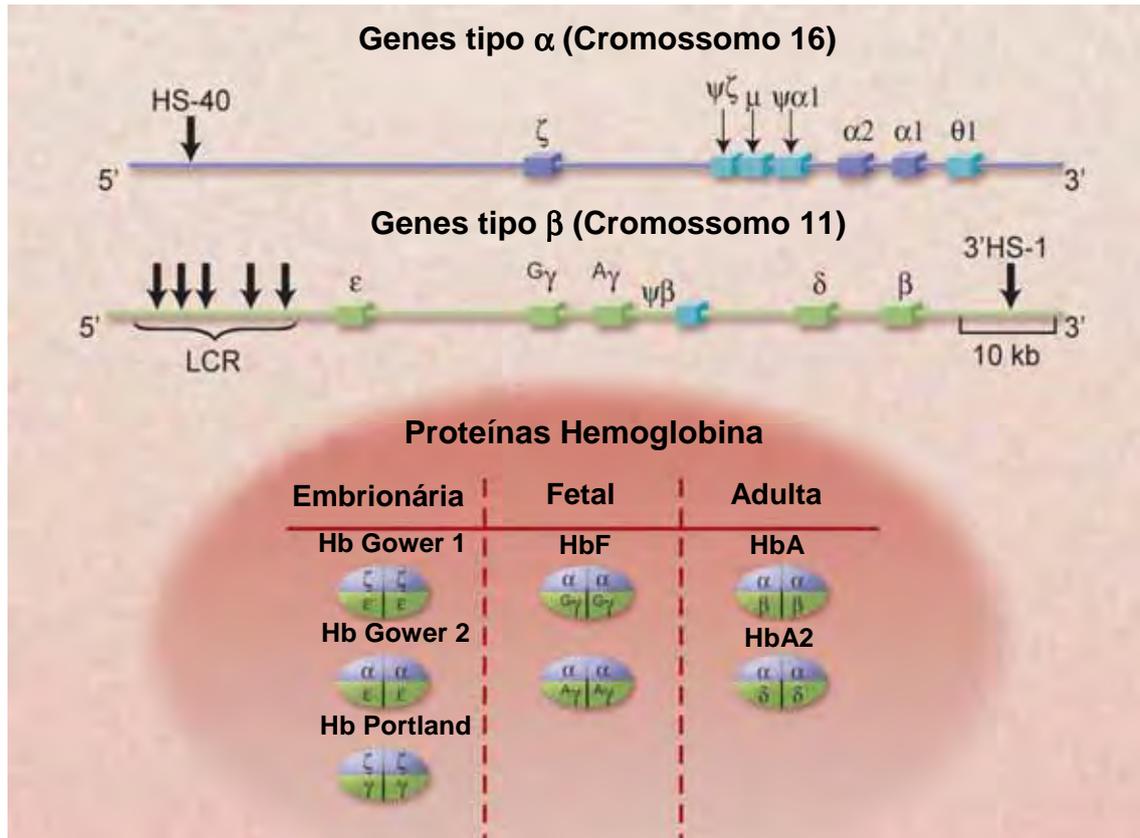


Figura 1. Organização cromossômica do complexo gênico de globina α e β (Adaptado de SCHECHTER, 2008)

As Hb embrionárias Gower-1 ($\zeta_2\epsilon_2$), são predominantes nas quatro semanas iniciais do período embrionário e as Portland ($\zeta_2\gamma_2$) e Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) produzidos até três meses pós concepto. A partir desse período, na fase fetal, prevalece a produção de Hb fetal (Hb F- $\alpha_2\gamma_2$), enquanto a Hb A ($\alpha_2\beta_2$) e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) são produzidas em pequenas proporções. Ao nascimento as Hb F e Hb A perfazem cerca de 80% e 20% da Hb total, respectivamente, havendo substituição gradual da cadeia γ por β até estabilizarem-se ao redor do sexto mes de vida pós-natal. Na fase adulta a Hb A é predominante (96% a 98%), seguida de Hb A₂ (2,5% a 3,7%) e Hb F (0 a 1%) (NAOUM,1997; GALIZA NETO, PITOMBEIRA, 2003).

1.2 Hemoglobinopatia S

As hemoglobinas anormais são desordens genéticas amplamente distribuídas em todos os continentes (NAOUM, 1997). As mais comuns são a hemoglobina variante S (Hb S) e as talassemias alfa e beta, descritas em várias combinações, com grande heterogeneidade fenotípica, que variam de quase imperceptíveis a letais (NAOUM, 1997; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003). O gene da Hb S, de origem multicêntrica, provenientes das regiões distintas do continente africano, e também da península arábica e da Índia, foi introduzido no Brasil e em outros países das Américas por meio do comércio dos escravos (PAGNIER et al., 1984; KULOZIK, et al., 1986; BRASIL, 1996;).

A molécula de Hb S, um tetrâmero de duas cadeias globínicas alfa e duas cadeias globínicas β^S , é originada de uma transversoão GAG para GIG no gene cujo códon codifica o sexto aminoácido de cadeia globínica β . Essa mutação resulta na troca do aminoácido ácido glutâmico por valina durante o processo de tradução, sendo descrita tanto em homozigose (Hb SS-anemia falciforme) como em heterozigose (Hb AS-traço falciforme), além da combinação com talassemia alfa ou beta ou com outras variantes hemoglobínicas. O processo mutacional afeta a molécula no seu estado desoxigenado por causar a oxidação da Hb S com precipitação de corpos de Heinz e a geração de radicais livres oxidantes. Essas agressões intra-eritrocitárias prejudicam o desempenho fisiológico da membrana do eritrócito falcêmico, causando lesões e perda de sua plasticidade (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Estima-se que 10% da população mundial possuem genes da Hb S e das talassemias (NAOUM,1997). No Brasil, a prevalência de Hb AS varia, aproximadamente, de 1,5% a 10%, e estima-se que cerca de 25 a 30 mil brasileiros portam a anemia falciforme com a taxa anual de 3.500 novos casos. Estima-se que para cada 1000 recém-nascidos vivos, uma criança seja portador de anemia falciforme (CANÇADO; JESUS, 2007; SIMÕES et al., 2010; LERVOLINO et al., 2011).

Entre as doenças falciformes destaca-se a anemia falciforme, por ser a mais prevalente e por apresentar maior gravidade clínica e hematológica (NUZZO; FONSECA, 2004; ZAGO; SILVA PINTO, 2007; SONATI; COSTA, 2008; MARTINS;

MORAES-SOUZA; SILVEIRA, 2010). Refere-se como doença falciforme, a forma sintomática do gene da globina β^S , em homozigose ou em heterozigose com outras hemoglobinopatias (CANÇADO, 2007).

A distribuição da Hb S, bem como das talassemias apresentam variações regionais devido às diferenças nas composições étnicas acrescida à intensa miscigenação que caracteriza a população brasileira (ORLANDO et al., 2000; WENNING et al., 2000; CHINELATO-FERNANDES; BONINI-DOMINGOS, 2005; SEIXAS et al. 2008; SILVA FILHO et al., 2010). Devido à significativa prevalência, associada a alto índice de morbi-mortalidade, as doenças falciformes bem como as síndromes talassêmicas são atualmente consideradas como um problema de Saúde Pública no Brasil. A detecção da Hb anormal, incluída no Programa da Triagem Neonatal, reflexo da relevância da hemoglobinopatia na saúde pública, possibilita as medidas preventivas e tratamentos das complicações agudas e crônicas, aumentando assim a sobrevivência dos portadores de doença falciforme (RAMALHO et al., 2003; CANÇADO; JESUS, 2007).

O curso clínico da anemia falciforme é significativamente distinto, embora a alteração molecular seja a mesma. São documentados vários indicadores como possíveis moduladores desta variabilidade fenotípica na anemia falciforme, entre os quais a talassemia alfa e os haplótipos associados ao gene da globina β^S (GUPTA et al., 1991; FIGUEIREDO, 2007; FLEURY, 2007). Tem sido reportado que a concentração intracelular de Hb S está na dependência direta do genótipo de globina alfa (GUPTA et al., 1991). A deficiência da globina alfa, causada pela talassemia alfa, parece favorecer muito mais a formação de dímeros $\alpha\beta^A$ que a formação de dímeros $\alpha\beta^S$, pelo fato da globina alfa estar carregada positivamente e a globina β^A mais negativamente que a β^S (STEINBERG; EMBURY, 1986). Assim, a co-herança de talassemia alfa com Hb S parece reduzir a polimerização de Hb S e a intensidade da hemólise, atenuando desse modo complicações clínicas associadas, tais como, úlcera de perna, priapismo e doença cerebrovascular. Por outro lado, a elevação da taxa de Hb pode aumentar o risco de osteonecrose e frequência de eventos vaso-oclusivos (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; FERTRIN; COSTA, 2010). Além destes fatores moduladores, o estudo multicêntrico de genoma tem associado diversidade clínica da anemia falciforme a polimorfismo de nucleotídeo único (FERTRIN; COSTA, 2010).

1.3 Haplótipos da globina do gene β^S

O polimorfismo no complexo gênico das globinas beta é produzido por variações de seqüências que alteram o sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição. O padrão de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é denominado de haplótipo (ANTONARAKIS et al., 1984). Os haplótipos marcam segmentos cromossômicos reconhecíveis que podem ser seguidos através de genealogias e de populações. Assim, podem ser úteis no estudo da origem e na evolução humana, (NAGEL e RANNEY, 1990), bem como no estudo clínico, que pode ter papel determinante no prognóstico da doença (POWARS, 1991).

O complexo gênico da globina β^S está associado a pelo menos cinco diferentes haplótipos, os quais são classificados conforme as regiões geográficas específicas da África e Oriente Médio onde predominam. O haplótipo Benin está associado à África Ocidental; Bantu, à África Oriental Centro-Sul; o Senegal, à África Atlântico Ocidental; Camarões ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana; e Árabe-Indiano à Índia e Península Arábica Oriental (CHEBLOUNE et al., 1988; NAGEL; RANNEY, 1990; ELION et al., 1992; LAPOUMÉROULIE et al., 1992). Estes parecem exercer influência na expressão do quadro clínico da anemia falciforme bem como nos níveis de Hb F. Os haplótipos Senegal e Árabe-Indiano aumentam os níveis de Hb F (>15%) e tornam o quadro clínico menos grave; o Benin, níveis intermediários de Hb F (5% a 15%) e curso clínico grave, enquanto o haplótipo Bantu apresenta níveis diminuídos de HbF (< 5%) e pior evolução clínica (POWARS, 1991; ELION et al., 1992; POWARS; HAITI, 1993; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003)

1.4 Talassemia alfa

As talassemias compreendem alterações genéticas monogênicas mais comuns na população mundial e caracterizam-se pela redução ou ausência da síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da molécula de hemoglobina. Essa anormalidade gera um desequilíbrio nas quantidades relativas entre as cadeias, com repercussão clínica e hematológica de diferente intensidade, desde anemia grave,

incompatível com a vida, até formas assintomáticas (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998; OLIVEIRA; MENDIBURU; BONINI-DOMINGOS, 2006).

A talassemia alfa apresenta alta prevalência no sudeste da Ásia, na população africana, na Europa e Índia (HARTEVELD; HIGGS, 2010). No Brasil, cerca de 20% dos Afrodescendentes que portam o gene para variante Hb S apresentam associações com a talassemia alfa (ZAGO, 2001).

As talassemias alfa decorrem de lesões nos grupamentos de genes codificadores de globinas alfa (α_1 e α_2). As lesões mais comuns que comprometem o gene alfa é a deleção do gene $\alpha^{3.7}$ que indica remoção de 3.700 bases nitrogenadas do complexo gênico que resulta em um gene alfa a menos em um cromossomo ($-\alpha$) e outro com três genes alfa ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$) (URBINATI; MADIGAN; MALIK, 2006). A deleção de 3.7 kb é causada pelo pareamento errôneo e recombinação homóloga desigual entre regiões homólogas Z não correspondentes (Figura 2). Como existem dois genes α funcionais e próximos em cada cromossomo, genotipicamente, as talassemias alfa são complexas. O genótipo do indivíduo normal é representado por dois haplótipos ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Já o genótipo para o indivíduo alterado pode produzir deleções nos quatro genes α ($--/--$), a denominada hidropsia fetal, uma forma incompatível com a vida, comum no extremo asiático, ou deleção em três com presença de somente um gene α funcional ($--/\alpha$) que causa anemia crônica de intensidade intermediária, conhecida como doença de hemoglobina H, rara no Brasil. Existem ainda as formas em que há lesão de somente um ($-\alpha/\alpha\alpha$) ou de dois genes α ($--/\alpha\alpha$; $-\alpha/\alpha$), caracterizadas como portador silencioso e traço alfa talassêmico, respectivamente (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1998; ZAGO, 2001).

A prevalência do portador silencioso na população brasileira varia aproximadamente de 10 a 20% e a de traço alfa talassêmico cerca de 3% entre os Afrodescendentes (SONATI et al., 1991; FIGUEIREDO et al., 1996; BEZERRA et al., 2007; SILVA FILHO et al., 2009). O excesso de cadeias não- α (β e γ) nos eritrócitos tende a tetramerizar-se, formando a Hb H (β^4) nas crianças e nos adultos, e Hb Bart's (γ^4) no período fetal ou até alguns meses após o nascimento. A Hb H facilmente oxida e resulta em formação de hemicromos, que tende a precipitar e fixar nas membranas dos eritrócitos e nos precursores eritróides, causando lesão, destruição prematura e eritropoese ineficaz (CHUI; FUCHAROEN; CHAN, 2003). A heterozigose para talassemia $\alpha^{3.7}(-\alpha/\alpha\alpha)$ não apresenta anormalidade clínica ou

hematológica, enquanto os homozigotos ($-\alpha/-\alpha$) caracteriza-se pela anemia discreta e microcitose (OLIVEIRA; MENDIBURU; BONINI-DOMINGOS, 2006).

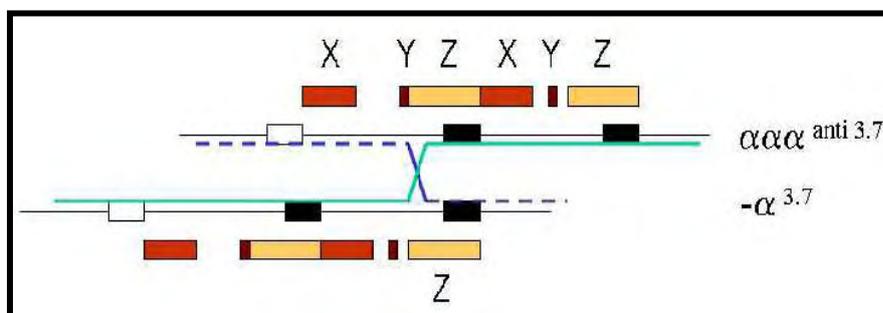


Figura 2. Representação do grupamento do gene α com pareamento errôneo e recombinação homóloga desigual em que os segmentos homólogos X, Y, Z estão indicados em barras (Adaptado de HARTEVELD; HIGGS, 2010)

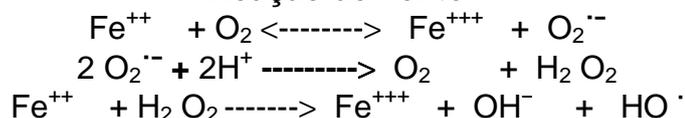
1.5 Estresse oxidativo

O sistema óxido-redutor é um processo fundamental do metabolismo celular, assim, os radicais livres são produzidos fisiologicamente a partir de compostos endógenos, ou por alguma disfunção biológica (VASCONCELOS et al., 2007). Pode também ser oriundo do metabolismo de alguns compostos exógenos (BLOCK et al., 2002). Radical livre é um átomo ou molécula altamente reativo que contém um ou mais elétrons desemparelhados nas suas últimas camadas de valência. Porém, como a maioria dos agentes reativos patogênicos são derivados do metabolismo do oxigênio, os mesmos são denominados também como espécies reativas de oxigênio (ERO) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A produção de ERO é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas como na fagocitose de agentes patogênicos, na sinalização intercelular, controle de pressão sanguínea, na apoptose, entre outras funções (BARREIROS; DAVID, 2006; VASCONCELOS SML et al., 2007). As ERO incluem íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (HO^{\cdot}), radical peroxil (ROO^{\cdot}), radical alcóxil (RO^{\cdot}) e óxido nítrico (NO^{\cdot}) (YU, 1994; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

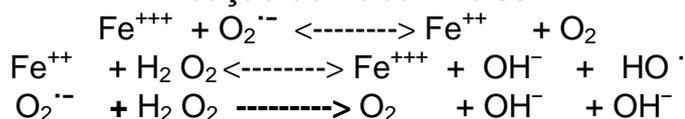
O íon ferro, metal mais abundante no organismo, exerce importante papel na formação das ERO, como pode ser observado nas reações de Fenton e de Haber-Weiss, descritas abaixo. Desse modo, as lesões teciduais associadas a sangramentos ou hemólise, podem liberar a Hb e o ferro, favorecendo a formação de

ERO, sendo considerados como agressor oxidante (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Reação de Fenton



Reação de Haber-Weiss



O organismo possui um sistema de defesa antioxidante classificado em enzimático, predominante no meio intracelular, e não enzimático localizado principalmente no meio extracelular. O enzimático é representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx), e o não enzimático constituído por glutathiona (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico, β -caroteno (VASCONCELOS et al., 2007), melatonina (REITER et al., 2000; ALLEGRA et al., 2003), hidroxauréia, por remover o radical HO^\cdot (LIU et al., 2010), quelador de metal (RICE-EVANS; OMORPHOS; BAYSAL, 1986), entre outros.

O excesso de ERO e/ou redução da capacidade antioxidante causa alteração no balanço redox (desequilíbrio entre pró e antioxidante) do sistema biológico e produz estresse oxidativo, responsável pelo dano celular e tecidual (YU, 1994; VASCONCELOS et al., 2007). Existem evidências do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia de diversas doenças crônicas, tais como câncer, doenças do pulmão, cardiopatias, doença de Alzheimer, artrite reumatóide, entre outras (VASCONCELOS et al., 2007). Na anemia falciforme, o estresse oxidativo parece ser multifatorial, e provavelmente contribui para o desenvolvimento de vasculopatia, em que há envolvimento da aderência de eritrócitos, leucócitos e plaquetas e agravamento do curso clínico (RICE-EVANS, 1986; KATO et al., 2009; BELINI, 2010; SILVA et al., 2011).

1.6 Processo oxidativo na anemia falciforme e traço falciforme

A patogênese da doença falciforme caracteriza-se pelo estado de inflamação crônica e repetidos episódios de agressão isquêmica e reperfusão, resultando em excesso de produção de radicais livres e estresse oxidativo (SOUSA, 2001; DASGUPTA; HEBBEL; KAUL, 2006).

Os eritrócitos falciformes são importantes fontes de ERO. Durante o processo de desoxigenação e auto-oxidação da Hb S são produzidos $O_2^{\cdot-}$ pela transferência de elétrons entre o ferro e o O_2 (KLINGS; FARBER, 2001), e como a Hb S se auto-oxida cerca de duas vezes a mais que a Hb A, os portadores de Hb SS apresentam alta propensão para a produção de oxidantes (HEBBEL et al., 1982). A meta-Hb S, forma oxidada de Hb S, é reduzida à oxiHb S pela meta-Hb redutase, porém, quando o processo de oxidação de Hb S supera a ação desta enzima, a meta-HbS se desnatura em hemicromo, com subsequente ligação à membrana dos eritrócitos causando lesão celular (LIU; ZHAI; PALEK, 1988; JAROLIM et al., 1990). A membrana das hemácias falciformes apresenta reação de Fenton acelerada, por possuir maior quantidade de ferro livre e/ou associada à membrana, provenientes de hemicromos ou de grupos heme da Hb (HEBBEL et al., 1982). Os átomos de ferro, ao reagirem com as ERO, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , por meio das reações redox, Haber-Weiss e Fenton, formam radicais HO^{\cdot} responsáveis pela peroxidação lipídica da membrana eritrocitária. Essa agressão oxidativa ocasiona desnaturação de proteínas (BARREIROS; DAVIS; DAVID, 2006), anormalidades no transporte ativo ou passivo normal da membrana celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIROS; DAVIS; DAVID, 2006) e alteração na sua plasticidade (NAOUM, 2000), culminando em sua ruptura e morte celular como ilustrada na Figura 3.

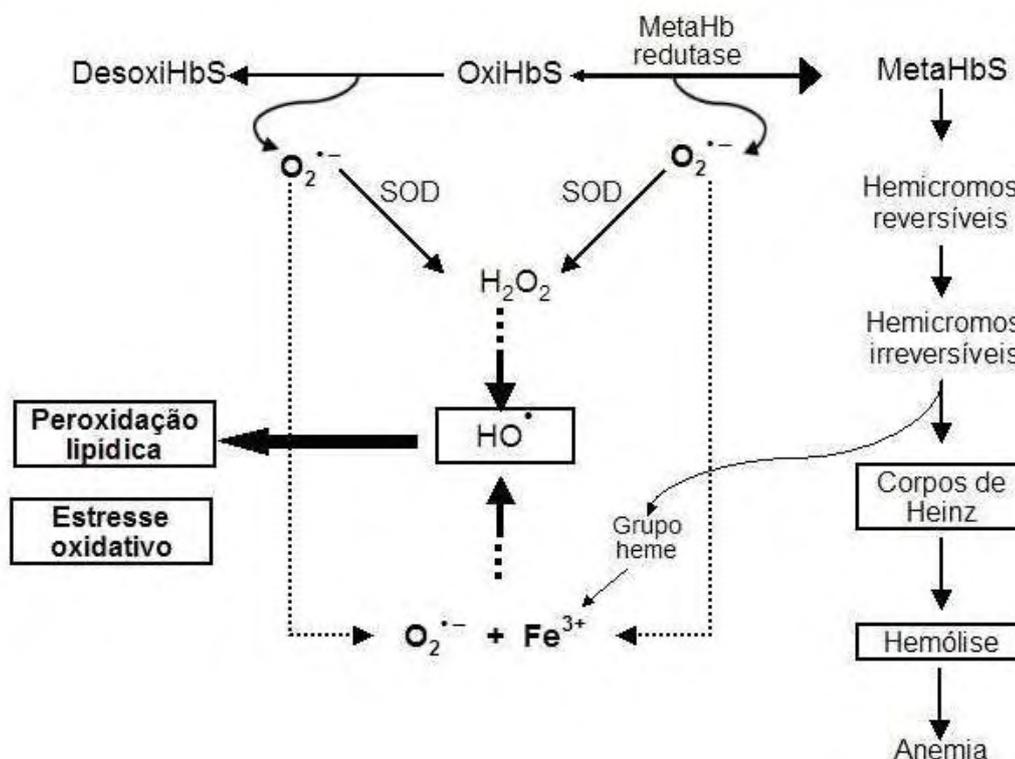


Figura 3. Processo oxidativo na Hb S

A inflamação, na anemia falciforme, é supostamente desencadeada pela anormalidade da membrana eritrocitária e pela hemólise crônica. Os eritrócitos, após vários eventos de falcização expõem a fosfatidilserina, ligante de anexina V, à camada externa da membrana citoplasmática (JONG et al., 2001). Esse glicolípido contribui para o estado pró-inflamatório e pró-trombótico, levando à ativação do endotélio vascular. As células endoteliais estimuladas promovem o rolamento e aderência de leucócitos em vênulas, por meio da expressão de quemoquinas e moléculas de adesão como selectinas, VCAM-1 e ICAM-1. Os neutrófilos ativados e aderidos ao endotélio vascular captam os eritrócitos tanto falcizados como discóides, levando subseqüentemente a vaso-oclusão transitória e a processo de isquemia e reperfusão, desencadeando múltiplos mecanismos fisiopatológicos.

As membranas dos eritrócitos falcêmicos e endotélio vascular estão sujeitos a extenso dano oxidativo mediado por uma variedade de radicais livres endógenos ou exógenos o que poderia contribuir de um modo decisivo na fisiopatologia da doença falciforme (RICE-EVANS; OMORPHOS; BAYSAL, 1986; JAROLIM et al., 1990; NAOUM, 2000; BELINI, 2010; SILVA et al., 2011). Estudos sugerem que na anemia falciforme, quanto maior a gravidade da doença, maior a lipoperoxidação da membrana celular com significativa redução nas atividades antioxidantes

enzimáticas (SOS, catalase e glutathione peroxidase) e não enzimáticas (glutathione [GSH], vitamina E) (DASGUPTA; HEBBEL; KAUL, 2006; BELINI, 2010; SILVA et al., 2011). Porém, pouco se sabe sobre o traço falciforme. Alguns apontam que a sua morbidade está na dependência de fatores ambientais (SILVA FILHO et al., 2002).

Apesar de haver consenso de que o traço falciforme é uma condição benigna, tem sido reportada a exteriorização clínica de grau variável, desde discreta até grave quando exposto às situações adversas (LANE; GITHENS, 1985; FABRON, 1986). Silva Filho et al. (2005), apontam que trabalhadores com o genótipo AS, expostos ocupacionalmente a agentes oxidantes, apresentam uma chance consideravelmente elevada de sofrer uma meta-hemoglobinemia tóxica.

Existem biomarcadores utilizados para avaliar o dano oxidativo, porém, nem todos são apropriados para estudo epidemiológico ou para triagem clínica envolvendo muitos indivíduos. Dentre os biomarcadores, há os que apresentam maior sensibilidade e são amplamente utilizados, tais como: Capacidade Anti-Oxidante em Equivalência ao Trolox (TEAC), que permite estudar em diferentes tecidos e estimar a resposta sistêmica do organismo contra a agressão dos radicais livres, e Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), considerado eficaz indicador de lipoperoxidação da membrana, ou de estresse oxidativo (BLOCK et al., 2002).

1.7 Melatonina

A melatonina é um composto sintetizado na glândula pineal que apresenta importante ação antioxidante por detoxificar ERO e de ERN em diferentes sistemas (TAN et al., 2000; CUZZOCREA; REITER, 2002; ALLEGRA, et al., 2003). A propriedade antioxidante da melatonina resulta principalmente de doação de elétrons e de cruzamento irrestrito de barreira morfofisiológica, o que facilita o acesso a compartimentos sub-celulares, tornando-a disponível para neutralizar as ERO. Além disso, estimula uma variedade de enzimas antioxidantes tais como, SOD, GPx e GR, aumentando a sua eficiência (REITER et al., 2000; TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005; MALDONADO et al., 2007). Os metabólitos de melatonina, como 6-hidroximelatonina e AFMK (N1-acetil-N2-formil-5 metoxiquimuramina) também são documentados como eficazes neutralizadores de

radicais livres (TAN et al., 2001). Desse modo, a melatonina, além de apresentar efeito protetor contra a lesão tecidual decorrente de isquemia e reperfusão, previne a indução de estresse oxidativo e restaura a função celular em órgãos que sofreram danos (MUÑOZ-CASARES et al., 2006). Estudos envolvendo o estresse oxidativo induzido por lesão renal (KURCER et al., 2007), infarto de miocárdio (DROBNIK et al., 2011), complicação diabética (GUNEY et al. 2011), e neurotoxicidade (KWON et al., 2011), revelam que a suplementação de melatonina reduz a peroxidação lipídica, aumenta o sistema de defesa de antioxidante enzimática e não enzimática, conferindo assim o papel protetor contra o dano oxidativo em diferentes sistemas biológicos. Demonstra também que a administração concomitante de melatonina com outros antioxidantes, como resveratrol, potencializa o efeito protetor contra o dano oxidativo (KWON et al., 2010; KWON et al., 2011). Assim, o mecanismo de ação da melatonina para atenuar a destruição e disfunção celular é extenso (Figura 4).

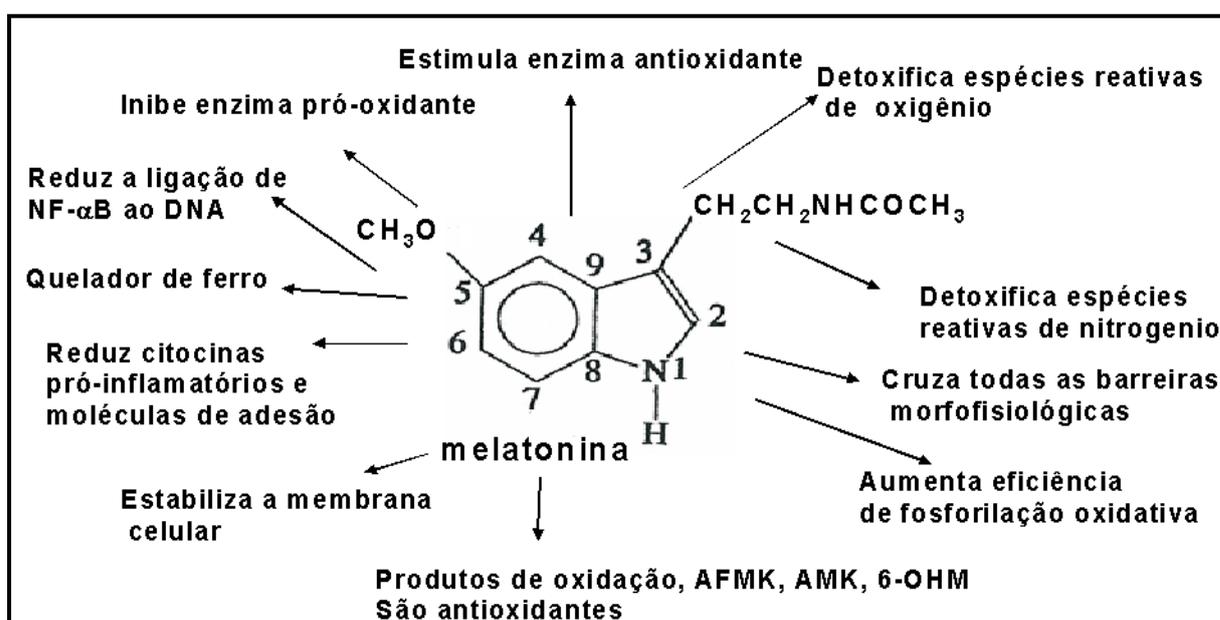


Figura 4. Diagrama de múltiplas ações de melatonina contra o dano oxidativo. AFMK: N-acetil-N-formil-5-metoxikinurenamine; AMK: N-acetil-5-metoxikinuramine; 6-OHM: 6-hidroxi melatonina (Adaptado de MAHARAJ; GLASS; DAYA, 2007)

Diante da possibilidade da Hb S, independente da sua concentração intracelular ou do estado de oxigenação, apresentar tendência à produção de ERO, moduladora do estado mórbido, avaliamos a influência da talassemia alfa, dos

haplótipos do gene da globina β^S e da melatonina na capacidade antioxidante total. A hipótese dessa tese foi a de que a expressão metabólica variável observada em indivíduos com Hb SS e Hb AS pode depender em parte da eficiência dos mecanismos envolvidos na detoxificação celular aliada à influência dos fatores moduladores das concentrações de Hb S e de Hb F.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a expressão fenotípica de indivíduos com anemia falciforme e traço falciforme por meio da análise dos biomarcadores envolvidos na peroxidação lipídica e capacidade antioxidante, bem como a influência de haplótipos da globina β^S e de talassemia alfa.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar os haplótipos do gene da globina β^S em indivíduos com Hb SS provenientes do estado do Paraná (PR).
2. Identificar e avaliar a frequência da deleção de $\alpha^{3.7}$ por PCR-multiplex em portadores do gene da globina β^S do estado do Paraná e o quadro clínico laboratorial da associação entre heterozigoto ($-\alpha/\alpha\alpha$) e homozigoto ($-\alpha/-\alpha$) da talassemia $-\alpha^{3.7}$ em portadores de Hb SS.
3. Avaliar o perfil oxidativo e capacidade antioxidante dos indivíduos com Hb SS e Hb AS do estado do Paraná (PR), por meio de biomarcadores de lipoperoxidação das membranas celulares e de antioxidante sistêmico, e comparar com os resultados obtidos no estado de São Paulo (SP).
4. Avaliar os níveis séricos de melatonina em portadores do gene β^S e sem hemoglobinopatias com influência na manifestação clínica.

3. Material e Métodos

3.1 Casuística

O projeto de tese consistiu em estudo transversal, observacional, descritivo e analítico, realizado com 270 indivíduos provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil, após o consentimento informado. As amostras biológicas colhidas em EDTA K3, em heparina e em tubos sem anticoagulante foram processadas, aliquotadas e acondicionadas a -20°C (sangue total) para uso em biologia molecular, e a -80°C (plasma e soro) para dosagens bioquímicas.

As Tabelas 1 e 2 demonstram os dados demográficos do total de indivíduos e a procedência dos indivíduos analisados, respectivamente.

Os portadores de Hb SS da região noroeste do estado do Paraná (NOPR) eram pacientes ambulatoriais atendidos no Hemocentro e no Hospital Universitário da Universidade Pública, e de outros serviços de saúde. Os indivíduos com Hb SS da região leste (LSP) e noroeste do estado de São Paulo (NOSP) eram provenientes dos respectivos Hemocentros. Quanto aos traços falciformes, os procedentes da região NOPR eram doadores de sangue voluntários da região, selecionados aleatoriamente, e de NOSP, doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto, SP. O grupo com Hb AA foi constituído por estudantes universitários e servidores de uma Instituição Pública de Ensino Superior e pelos doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto, SP. As informações relativas às medicações em uso, exposição a interferentes ambientais, eventos clínicos e transfusões sanguíneas foram obtidas por meio de consulta aos prontuários médicos, ao banco de dados dos Hemocentros e pela aplicação de questionários no momento da coleta. Os dados laboratoriais dos portadores de Hb S da região NOSP foram obtidos por meio de banco de dados do Hemocentro, enquanto os dados de outras regiões foram obtidos por meio da realização de ensaios laboratoriais a partir de amostras sanguíneas coletadas. O critério para elegibilidade foi ser não fumantes, não gestantes, não etilistas e estar na fase estável para os indivíduos com HbSS. O Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Pesquisa da UNESP/IBILCE e desenvolvido, obedecendo aos princípios éticos estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) sob o protocolo número 0025.0.229.000-07.

Tabela 1. Características demográficas dos indivíduos avaliados com anemia falciforme, traço falciforme e controle (Hb AA)

	<i>N (%)</i>	<i>idade</i>	<i>Gênero n(%)</i>	
			<i>Feminino</i>	<i>Masculino</i>
SS	68 (25,2)	9 – 50	47 (69%)	21 (31%)
AS	53 (19,61)	14 – 66	26 (49%)	27 (51%)
AA	149 (55,2)	11 - 55	42 (28,2%)	107(71,8%)

SS-anemia falciforme; AS-traço falciforme

Tabela 2. Distribuição da procedência dos indivíduos com Hb SS e Hb AS

	<i>NOPR n(%)</i>	<i>LSP n(%)</i>	<i>NOSP n(%)</i>	<i>Total</i>
SS	17 (25%)	35 (51,5%)	16 (23,5%)	68 (100%)
AS	30 (56,6%)	-	23 (43,4%)	53 (100%)

NOPR-região noroeste do Paraná; LSP-região leste do estado de São Paulo; NOSP-região noroeste do estado de São Paulo

3.2 Métodos

Discriminados de acordo com a sequência metodológica utilizada para caracterização das hemoglobinopatias e avaliação do estado oxidante - antioxidante. Os protocolos completos das respectivas metodologias encontram-se no anexo A.

3.2.1 Avaliação do hemograma

Os dados hematológicos foram obtidos pelo analisador automático, BC-300 PLUS – Mindray, e a análise microscópica por meio do esfregaço sanguíneo corado segundo método de May-Grunwald-Giemsa (LEWIS, BAIN, BATES, 2006).

3.2.2 Avaliação do perfil de hemoglobinas.

Foi realizada de acordo com o padrão internacionalmente estabelecido com as seguintes metodologias clássicas:

Eletroforese em acetato de celulose pH 8,4-8,6

As amostras de sangue, previamente hemolisadas segundo descrito anteriormente por Bonini-Domingos (2006), foram submetidas à eletroforese em pH alcalino para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais (MARENGO-

ROWE, 1965). Foi utilizada como triagem para identificação das Hb S, Hb F, Hb A₂ e Hb A.

Eletroforese em ágar pH 6,2

O emprego deste sistema foi específico para diferenciar alguns tipos de Hb mais lentas que a Hb A. Foi utilizada para confirmação da Hb S observada previamente na eletroforese alcalina (VELLA, 1968).

Eletroforese em pH 6,8-7,1

Foi utilizada para identificação da Hb H que apresenta perfil de migração em pH alcalino similar a algumas proteínas plasmáticas e produtos de degradação de hemoglobinas (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Pesquisa citológica de Hb H

Após coloração de eritrócitos com solução de azul de cresil brilhante, os corpos de inclusão da Hb H, oriundos da desnaturação do tetrâmetro de cadeia β , são revelados como pequenos pontos azuis dispostos homogeneamente no interior das hemácias. Foi utilizada como teste complementar (PAPAYANNOPOULOS; STAMATAYANNOPOULOS, 1974).

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Consiste em uma cromatografia de troca catiônica em que moléculas com cargas positivas são adsorvidas em uma fase estacionária da coluna cromatográfica, seguida por eluições induzidas pela passagem de um líquido com alta concentração de cátions. O eluato é detectado opticamente e quantificado determinando a área do gráfico correspondente à fração de Hb eluída. O HPLC foi realizado pelo sistema automatizado VARIANT (BIO-RAD) e o kit utilizado nas análises foi o “ β Thalassemia Short Program”. Essa técnica foi utilizada para realizar a quantificação precisa das frações hemoglobínicas A₁, A₂, Fetal e S (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 2006).

3.2.3 Análises moleculares

Extração fenólica de DNA genômico

Foi realizada extração de DNA genômico a partir de sangue total colhido em EDTA 10%. O método usado para isolamento e concentração do DNA foi a extração com fenol/clorofórmio, seguida de precipitação com etanol. Durante a extração orgânica, as proteínas contaminantes são desnaturadas e mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. Álcool isoamílico é adicionado à mistura fenol/clorofórmio quando ocorre a formação excessiva de espuma durante a extração. Durante a precipitação com etanol, os sais e outros solutos como os resíduos da extração fenol/clorofórmio permanecem em solução enquanto os ácidos nucleicos formam um precipitado que pode ser facilmente separado por centrifugação. O DNA genômico obtido é adequado para amplificação por PCR e para a digestão com enzimas de restrição (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Identificação dos genótipos de Hb S por reação em cadeia da polimerase alelo específico (PCR-AE)

As amostras que apresentaram o perfil eletroforético e cromatográfico com presença de Hb S (Hb AS e Hb SS), foram submetidas à amplificação gênica PCR-AE. Esta técnica foi realizada em dois tubos contendo três oligonucleotídeos para cada mistura de reação (*mix*), isto é, utilizou-se oligonucleotídeos controles (B5a e B5b) oligonucleotídeos específico alelo normal (BA) para um *mix*, e noutro tubo oligonucleotídeos controles (B5a e B5b) e oligonucleotídeo específico alelo mutante (BS). Os oligonucleotídeos estão discriminados abaixo:

B5a:5'-GGCTGTCATCACTTAGACCTCA-3'

B5b:5'-AGAAGGGGAAAGAAAACATCAA-3'

BA:5'-CAG TAACGGCAGACTTCTCCT C-3

BS:5'-CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCA-3'

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 25µL. A amplificação foi realizada em termociclador Biosystems e o produto de PCR analisado em gel de agarose 1,5%, e corados com brometo de etídio 0,2%. Os

produtos amplificados apresentaram um fragmento de 660 pb (controle da funcionalidade) e outro de 216 pb. A interpretação dos resultados obtidos, na identificação da Hb S, está na dependência da verificação do fragmento de 216 pb, como segue: se presente apenas no primeiro tubo, é caracterizada como homozigoto normal; se for verificada nos tubos 1 e 2, permite caracterizar o indivíduo como heterozigoto para a mutação analisada; se o material amplificado tiver resposta apenas no tubo 2, fica evidenciado um indivíduo homozigoto para a mutação analisada (Figura 5) (BONINI-DOMINGOS, 2006).



Figura 5. Representação esquemática do produto de amplificação por PCR-AE para a identificação da Hb S (Adaptado de Bonini-Domingos, 2006)

Reação em cadeia da polimerase Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP)

As amostras que apresentaram o perfil inconclusivo na análise molecular foram também submetidas à amplificação gênica seguida de análise de restrição. A amplificação do segmento que codifica a Hb S foi realizada pelos seguintes *primers*:

P277 (sense): 5'-GGCAGAGCCATCTATTGCTTA- 3'

P278 (antisense): 5'-ACCACCTTAGGGTTGCCATAAC-3'

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 25µL. Utilizaram-se seguintes condições de amplificação: 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 55°C, 1 minuto de extensão a 72°C e extensão final por 10 minutos a 94°C e ∞ a 4°C. O fragmento de DNA amplificado foi de 288pb, o qual foi submetido à digestão com a enzima *DdeI* (15U). Como a mutação no códon 6 da beta globina (GAG→GTG) elimina um sítio de restrição da enzima *DdeI* (C ↓ TNAG),

após a digestão, o alelo normal gera três fragmentos de 87pb, 201pb e 88pb; e alelo mutante homozigoto gera dois, um de 288 pb e outro de 88pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% sob corrente constante de 80V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração em brometo de etídeo (Figura 6) (BONINI-DOMINGOS, 2006).

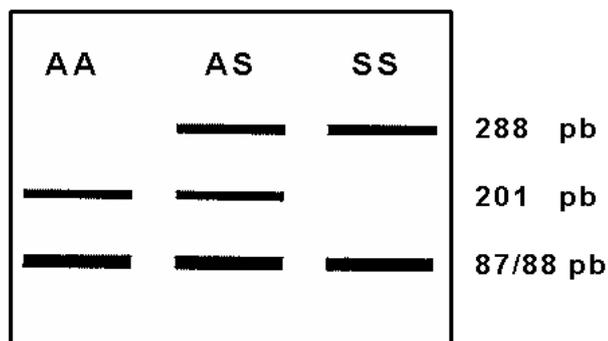


Figura 6. Representação esquemática de produtos de amplificação e digestão por PCR-RFLP para identificação da Hb S (Adaptado segundo Bonini-Domingos, 2006).

Identificação dos genótipos de talassemia alfa^{3.7}

O DNA, previamente obtido foi submetido à amplificação gênica (PCR-Multiplex) para identificação da deleção $-\alpha^{3.7}$. A PCR multiplex foi realizada em uma única reação de amplificação, onde vários oligonucleotídeos específicos *sense* e *antisense* foram adicionados simultaneamente para identificar a mutação, permitindo diferenciar o alelo normal do mutante, e também os estados de homozigose e heterozigose. O oligonucleotídeo $\alpha_2/3.7F$, 5' CTGGCCAAACCATCACTTTT 3', localiza-se a 5' do gene α_2 , enquanto o oligonucleotídeo α_2R , 5' GTGCAAGGAGGGGAGGAG 3', está localizado a 3' do gene α_2 , e o oligonucleotídeo 3.7R, 5' CTCCACTTTCCCTCCTCCAT 3', anela o extremo 3' do gene α_1 (Figura 7). Na presença do alelo normal (gene α_2) os oligonucleotídeos $\alpha_2/3.7F$ e α_2R geram um fragmento de 1,8 Kb, enquanto que na presença do alelo $\alpha^{3.7}$ os oligonucleotídeos $\alpha_2/3.7F$ e 3.7R geram um fragmento de 2,1 Kb (Figura 8) (MENDIBURU, 2005).

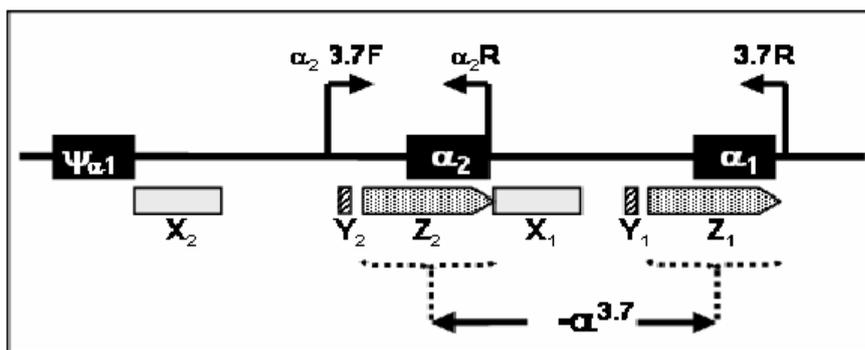


Figura 7. Localização dos oligonucleotídeos específicos para a identificação da deleção - $\alpha^{3.7}$ por PCR-multiplex (Adaptado de MENDIBURU, 2005).

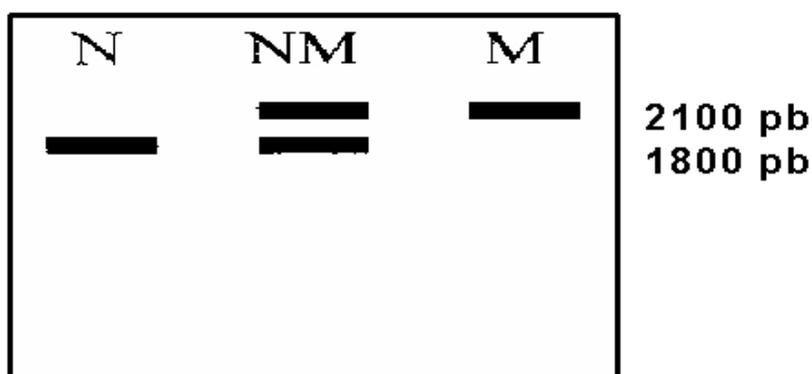


Figura 8. Representação esquemática do produto de amplificação por PCR-multiplex para a identificação da deleção - $\alpha^{3.7}$. N: homozigoto normal; NM: heterozigoto; M: homozigoto mutante

Identificação dos haplótipos do grupamento do gene da globina β^S

A caracterização dos haplótipos foi realizada por meio de PCR-RFLP. O DNA obtido pela extração fenólica foi submetido à amplificação e à digestão enzimática para verificação de polimorfismos de tamanhos de fragmentos, segundo Sutton, Bouhassira, Nagel (1989) (Tabela 3). A análise dos haplótipos β^S foi realizada utilizando-se seis sítios: $5'\gamma^G$ (*XmnI*), γ^G (*Hind III*), γ^A (*Hind III*), $\psi\beta$ (*Hinc II*), $3'\psi\beta$ (*Hinc II*) e $5'\beta$ (*Hinf I*) (Figura 9). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação de regiões do grupamento do gene β descritas por Sutton, Bouhassira, Nagel (1989) estão representados na Tabela 4.



Sítio Haplótipo	1	2	3	4	5	6
CAR	-	+	-	-	-	-
Benin	-	-	-	-	+	-
Senegal	+	+	-	+	+	+
Camarões	-	+	+	-	+	-
Asiático	+	+	-	+	+	-

Figura 9. Haplótipos do complexo gene β^S , determinados pelas quatro enzimas de restrição (Adaptado de GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2002)

Tabela 3: Oligonucleotídeos e enzimas de restrição para detecção dos haplótipos de Hb S; regiões dos sítios polimórficos; tamanho dos fragmentos gerados antes e após a clivagem.

Primers	Enzima	Região	Tamanho Fragmento	Fragmentos após clivagem
H0 e H1	<i>XmnI</i>	5' γ^G	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>HindIII</i>	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>HindIII</i>	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>HincII</i>	$\psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>HincII</i>	3' $\psi\beta$	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>HinfI</i>	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb

Tabela 4. Oligonucleotídeos para amplificação de regiões do grupamento β : localização referente ao grupamento do gene β no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).

<i>Primer</i>	<i>Sequência do Primer (5' - 3')</i>	<i>Direção</i>	<i>Posição</i>	
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	33862	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACCTCAG	←	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	→	36203	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	←	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	40358	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	46426	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	47126	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	49476	3' $\psi\beta$
H8	GGACCTAACTGATATAACTA	←	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	60906	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	61291	

→: sense; ← anti-sense.

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

Foi realizada a dosagem da capacidade anti-oxidante total no plasma. O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical Co 23881-3), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Trata-se de 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 antioxidantes a este radical cátion, pré-formado, o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade

antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria, pela observação da mudança na absorbância obtida 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 atividade antioxidante 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 milimoles por litro (mM/L) correspondente à concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente à da amostra (MILLER et. al., 1993; RE et al., 1999). Os valores de referência estabelecidos no presente trabalho foram de 1,83 a 2,07 mM/L.

3.2.5 Dosagem de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem de TBARS no plasma é baseada na reação com o ácido tiobarbitúrico em condições acídicas e aquecimento, e tem sido a forma mais utilizada de avaliação da peroxidação lipídica da membrana. O método baseia-se na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo de absorção máxima em 535 nm. Valores até 440 ng/mL são considerados normais (MIHARA; UCHIYAMA, 1978; PERCÁRIO; VITAL; JABLONKA, 1994).

3.2.6 Dosagem de melatonina

A concentração sérica de melatonina (MEL) foi determinada por meio do sistema de HPLC acoplado a detector coulométrico eletroquímico (HPLC Pump modelo 584 SHIMADZU; Coulochem III ESA modelo 526, Bedford, MA, USA) de acordo com o método descrito por Laganà et al.(1995), exceto a composição da fase móvel que sofreu um ajuste para 50 mM acetato de sódio; 100 mM ácido acético (pH 4,20); 0,1 mM EDTANa₂; acetonitrila (85:15, v/v), com taxa de fluxo de 0,900 mL min⁻¹ a 500 nA (SHIMAUTI et al., 2010). Nestas condições a melatonina foi eluída nitidamente em 30 minutos. O condicionador celular foi mantido a um potencial de +100mV e a análise celular, coulometrico – amperometrico, a +350mV (1^o célula) e +500mV (2^o célula). A identificação e quantificação do pico de melatonina foi realizada usando um computador integrado Windows XP. A extração da melatonina sérica foi realizada pela adição de 2 mL de diclorometano (Sigma Aldrich) a 2 mL de

soro. Após vigorosa agitação, a mistura foi centrifugada a 6.500 rpm por 10 min a 4°C. A fase aquosa foi descartada e o diclorometano submetido a fluxo de nitrogênio até a completa secagem. O extrato foi diluído em 100 µL de fase móvel, e filtrado através do *Millex syringe filter units* (0,22 µm) (Sigma Aldrich), e o volume obtido injetado no sistema HPLC. A concentração da melatonina foi calculada fundamentada numa curva padrão previamente construída pela injeção de padrão de referência de melatonina (Sigma) no aparelho, e expressa em pg mL⁻¹ (LAGANÀ, A. et al., 1995).

3.2.7 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizada *software* Statistica, versão 8.0, SAS, versão 9.1 Exato de *Fisher*. As amostras foram avaliadas quanto a normalidade e homocedasticidade. Como os dados não atenderam às tais suposições, utilizaram-se os testes não paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*, complementado por teste de comparações múltiplas de Dunn. Para as análises de correlação foi utilizado o teste de correlação de Spearman. O nível de significância para os testes aplicados foi fixado em 5% ($\alpha=0.05$).

4. Resultados

Os resultados estão apresentados em forma de artigos, conforme segue:

- Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia
Este artigo foi publicado na Revista Blood Cells, Molecules and Disease, v. 45, n. 4, p. 297-301, 2010.
ISSN: 1079-9796
Fator de Impacto: 2.901
Qualis: B1

- Interação entre Hb SS/Talassemia $\alpha^{3.7}$: estudo familiar
Este artigo foi aceito para publicação na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Fator de Impacto: 0,36
Qualis: B4

- Influência do alelo β^S em heterozigose e homozigose nos parâmetros de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante
Este artigo será submetido à revista científica Archives of Medical Science
ISSN: 1734-1922
Fator de impacto: 1,01
Qualis B3

- Influência da Talassemia $\alpha^{3.7}$ e dos haplótipos do gene β^S na capacidade antioxidante total e níveis de melatonina em portadores do gene β^S da globina
Este artigo será submetido à revista International Journal of Laboratory Hematology
INSS: 1751-5521
Fator de impacto: 1,304
Qualis B5

4.1 ARTIGO I

Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia

Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti^{1,2}

Danilo Grunig Humberto Silva^{1,3}

Eduardo Alves de Almeida³

Paula Juliana Antoniazco Zamaro¹

Edis Belini Junior¹

Claudia Regina Bonini-Domingos^{1*}

¹ UNESP - Sao Paulo State University, Biology Department, Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases Laboratory, São Paulo, Brazil.

² UEM - Maringá State University, Department of Clinical Analysis, Paraná, Brazil.

³ UNESP - São Paulo State University, Department of Chemistry and Environmental Sciences, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author: Claudia Regina Bonini-Domingos

UNESP- Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - IBILCE

Biology Department, Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases Laboratory

Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth

CEP: 15054-000 São José do Rio Preto – São Paulo - Brazil

Telefone: +55-17-3221-2392

e-mail: claudiabonini@sjrp.unesp.br

Abstract

This study evaluated serum melatonin levels in patients with sickle cell anemia (SCA), and compared the results to lipid peroxidation by determining thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). The group studied was composed of: 15 SCA patients and 24 subjects without hemoglobinopathies. The average melatonin level was significantly reduced in the SCA patients ($p < 0.001$) when compared to the control group. The SCA patients showed significantly higher values for TBARS and TEAC when compared to values obtained for the control group, ($p < 0.001$ and $p < 0.01$). Results from the correlation analysis in the SCA group was not statistically significant for any parameters except for TBARS and TEAC levels, which had a positive correlation ($r = 0.51$; $p = 0.04$), suggesting the participation of melatonin in antioxidant defense. The use of melatonin could be a possible therapeutic target for improving antioxidant defense and to reduce oxidative damage, alleviating symptoms associated with SCA.

Keywords: Sickle Cell Anemia; Antioxidant Capacity; Melatonin

Introduction

Sickle cell anemia (SCA), an inherited monogenic disease is caused by a transversion in the codon of the sixth amino acid of the beta globin chain, on chromosome 11 [1], resulting in the formation of a structurally abnormal hemoglobin S (Hb S) that in its deoxygenated state tends to aggregate into rodlike polymers, resulting in the deformed sickle shape and rigidity of red cells characteristic of this condition [2].

SCA is often associated with oxidative stress due to increases in the generation of reactive oxygen species (ROS), which contributes to the proinflammatory, pro-thrombotic and vaso-occlusive state of the disease, and which sometimes leads to increases in antioxidant defenses [3-4]. It has been proposed that melatonin has antioxidant properties [5-8]. The importance of melatonin as an antioxidant is also due to its capacity to cross biological barriers, which eases the removal of ROS in different biological compartments [9-10]. Clinical and experimental studies show that melatonin exerts both, anti-inflammatory effect and immunoregulatory activity by inhibiting prostaglandin, tumor necrosis factor alpha and

interleukin-8 biosynthesis. Additionally, melatonin stimulates the activities of enzymes that metabolize reactive species [11-13].

No reports of melatonin levels or their correlation with oxidative stress parameters in SCA have been found in the literature. Therefore, the goal of this study was to evaluate serum melatonin levels, plasma Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and lipid peroxidation (TBARS) in SCA patients when compared to a control group (Hb AA).

Methods

Subjects

Thirty nine subjects (25 males and 14 females; mean age: 26.2 years old; range: 10 – 55 years old) from the northwestern region of Parana state in Brazil were studied. The test group was composed of 15 SCA patients, and the control group was composed of 24 subjects without hemoglobinopathies. The subjects were screened using a questionnaire, and were excluded if they were smokers, drinkers, had had a stroke or pain and hemolytic crisis in the last two months, or were taking medication known to affect melatonin production, such as β -adrenergic blockers. All subjects gave their informed consent, and the study was approved by the ethics of human experimentation committee using the guidelines established by the National Health Ministry of Brazil. The Hb SS group was composed by individuals receiving conventional treatment for SCA, including transfusion, folic acid and hydroxyurea (HU), which can affect the Hb F values. The SCA patient phenotypes and clinical characteristics are provided in Table 1.

Biological samples

Blood samples (20 mL) were collected through venipuncture between 6:30 am and 7:30 am. The heparinized blood (7 mL) was incubated for 20 min at 37°C, and was then centrifuged at 1500 rpm for 20 min to separate the plasma. The blood without anticoagulants (9 mL) was submitted to centrifugation at 3000 rpm for 10 min to obtain the serum. The plasma and serum were frozen at -80°C for further analysis. The EDTA sample fraction (4 mL) was used for the Hb tests and genotypic determination.

Table 1. Patient phenotypes and clinical characteristics

Characteristics	n=15
Age (in yr) Mean \pm SD	21.33 \pm 9.04
Hydroxyurea treatment	07 (46.7%)
β - globin haplotypes (n, % of patients)	
Bantu/Benin	07 (46.7%)
Bantu/Bantu	05 (33.3%)
Benin/Benin	02 (13.3%)
Bantu/Atypical	01 (6.7%)
Number of painful crises (n, % of patients)	
0-2	11 (73.3%)
3-6	03 (20.0%)
\geq 6	01 (6.7%)
Complications of sickle cell anemia (n, % of patients)	
Cardiac complications	05 (33.3%)
Muscular/Skeletal/Skin complications	04 (26.7%)
Gastrointestinal/hepatobiliary complications	04 (26.7%)
Splenic complications	04 (26.7%)
Pulmonary complications	02 (13.3%)
Neurologic complications	0 (0.0%)

Number of painful crises episodes per person per year in the last 3 years. SD: standard deviation

Hemoglobin phenotypes and hematologic profile

Hb identification was performed using electrophoresis on cellulose acetate pH 8.4, and agar electrophoresis at pH 6.2, and the Hb fraction quantification was obtained using high performance liquid chromatography (HPLC) with the automated VARIANTTM equipment (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) [14]. Hematologic parameters were obtained using the BC-300 PLUSTM automatic analyzer (Mindray, CHN). Cell morphology microscopic analysis was performed on the stained blood using May-Grünwald-Giemsa.

Hemoglobin genotypes and β^S - globin haplotypes

In all patient samples, the Hb genotype was developed by molecular analysis using PCR-RFLP. The segment amplification that encodes Hb S was accomplished by specific primers, and the amplicon was cleaved with the *DdeI* restriction endonuclease (New England BioLabs, MA, USA) [14].

Haplotypes were determined through the analysis of the following polymorphic restriction sites by PCR-RFLP: γ G (*Hind* III), γ A (*Hind* III), $\psi\beta$ (*Hinc* II), 3' $\psi\beta$ (*Hinc* II) e 5' β (*Hinf* I), as previously by Sutton et al. [15].

Biochemical analysis

Lipid peroxidation levels were assessed in plasma using the thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) assay [16]. Antioxidant capacity was determined in plasma samples according to their equivalence to Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) [17]. Serum melatonin concentration was determined using HPLC coupled to a coulometric electrochemical detector (Coulchem III ESA, Bedford, MA) according to Laganà et al. [18], except the mobile phase, which was adjusted to 50 mM sodium acetate, 100 mM acetic acid (pH 4.20), and EDTANa₂ 0.1 mM with 15 % acetonitrile. Under these conditions, melatonin clearly eluted ~30 min (Figure 1). Melatonin was extracted from the serum samples by adding 2 mL of dichloromethane to 2 mL of serum. After vigorous stirring, the mixture was centrifuged at 6500 rpm for 10 min at 4°C, and the dichloromethane phase was collected and submitted to nitrogen flow until it was completely dry. The extract was then re-suspended in 100 µL of mobile phase, filtered through Millex syringe filter units (0.22 µm) and directly injected into the HPLC system. The calculations were based on a calibration curve previously constructed by injecting authentic melatonin standards into the HPLC system.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the Statistica 8.0 software (Statsoft Inc.) and the R 2.8.0 software. Data were expressed as mean \pm standard deviation and were tested for normal distribution using the Shapiro Wilk test. Data were also tested for homogeneity of variances using the Levene test. Means between the groups were compared by applying the t test for parametric data, and the Mann-Whitney test for non-parametric data. To assess the degree of association between the studied variables, we used the Pearson correlation for parametric data, and the Spearman correlation for non-parametric data. The level of significance was set at $p < 0.05$.

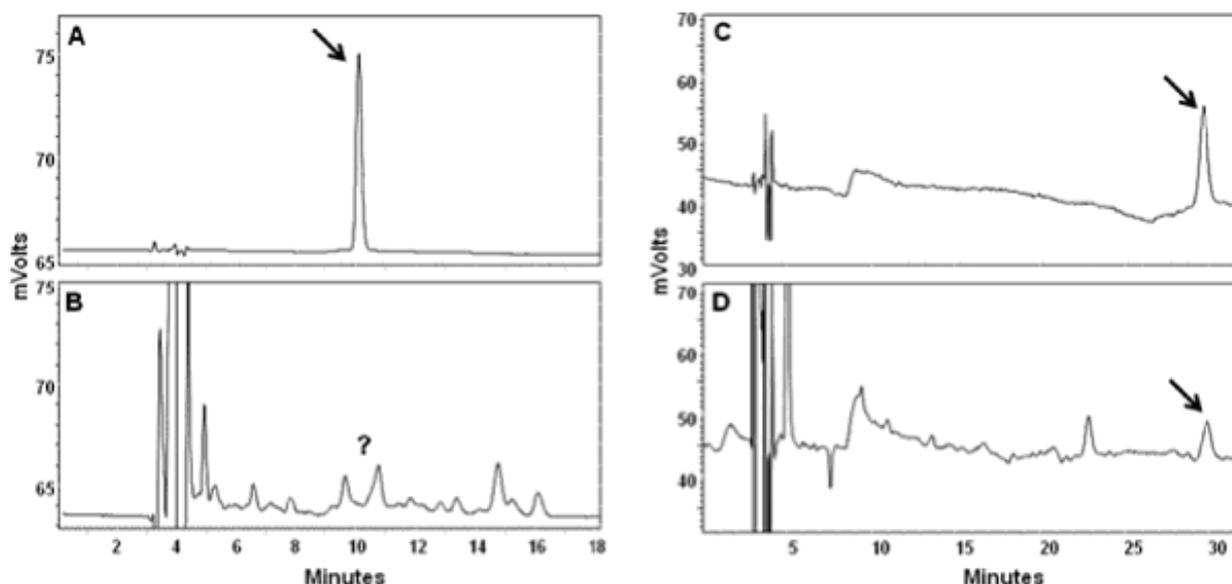


Figure 1. HPLC-EC detection of serum melatonin. A and B are chromatograms of a melatonin standart (A, 100pmol) and a human serum sample (B, undefined) following the method of Laganà et al. (1995).C and D are chromatograms of melatonin standart (C, 100pmol) and a human serum sample (D) after decreasing acetonitrile concentration to 15% in the mobile phase, as described on material and methods. The arrows indicates the melatonin peak.

Results and discussion

The hematological profile and hemoglobin fraction values of SCA patients and control group are detailed in Table 2. All parameters were significantly different between the groups, as expected, confirming the previously well-described condition of SCA patients [19]. It should be mentioned that the hemoglobin A₂ values was slightly higher than expected for SCA, due to the automated HPLC characteristics, in which Hb S acetylated subfractions elute at the Hb A₂ window increasing HbA₂ values as an artifact [20].

The serum melatonin levels in the control group were slightly higher than data reported in the scientific literature [21-22]. Kennaway and Voultisios [22] reported plasma melatonin levels ranging from 400 to 500 pmol/mL, which corresponds to ~90 to 120 pg/mL. Indeed, Ueno-Towatari et al. [24] found a mean melatonin level in Japanese population of ~90 pg/mL, with individuals reaching 220 pg/mL at 7:00 A.M. These results are consistent with our data. In a review, Karasek [25] suggest that serum melatonin concentration reach about 180 pg/mL in children between 5 and 10 years old, and about 110 pg/mL in 15 to 35 yr. The mean age of the studied subjects

is 26.2 yr, thus confirming that serum melatonin levels found in the present study are in accord to the expected concentration for human blood. It should be also noted that there are no previous reports for serum melatonin levels in Brazilian population, which is genetically mixed.

Table 2. Hematological profile and hemoglobin fraction concentration in SCA patients and the control group

	SCA patients (n=15)	Control group (n=24)
Hemoglobin (g/dL)	7.81 ± 1.21*	13.65 ± 1.06
MCV (fL)	98.55 ± 12.13*	85.90 ± 2.58
MCH (pg)	32.34 ± 4.29*	28.38 ± 1.07
Leucocytes(/mm ³)	12746.67 ± 3212.22*	6408.33 ± 1580.01
Lymphocytes (/mm ³)	4441.60 ± 1308.13*	2610.87 ± 757.11
Neutrophils (/mm ³)	6587.40 ± 2340.52*	3230.16 ± 927.71
Monocytes (/mm ³)	905.73 ± 512.15*	345.62 ± 153.30
Eosinophils (/mm ³)	524.87 ± 480.73*	259.95 ± 105.22
Hb F (%)	11.03 ± 6.73*	1.37 ± 1.13
Hb A ₂ (%)	4.76 ± 0.39*	2.75 ± 0.39
Hb S (%)	81.97 ± 9.63*	0.0

MCV, Mean Corpuscular Volume; MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin
Reference value: TBARS: 0-440ng/mL; TEAC: 1.84-2.00mM/L.

* Indicates statistical difference (*t* test, *p* < 0.05).

The serum melatonin levels for SCA patients were significantly lower when compared to the control group (Figure 2). Conversely, the TBARS levels and TEAC were significantly higher in the SCA patients, suggesting an antioxidant response but one that was not sufficient enough to counteract the high levels of ROS generated by the disease. Our data corroborate the studies developed by Manfredini et al. [26], which showed increased oxidative stress elicited elevated antioxidant enzymes and a high level of oxidative damage in proteins and lipids in SCA patients. High levels of lipid peroxidation in SCA patients were also reported by Repka and Hebbel [27], and Sess et al. [28].

The SCA patients mean age in this study was 21.33 yr while the control group had a mean age of 29.25 yr (*p*=0.02). This is another indication that the disease contributes to the decrease in melatonin levels, since a lower value would be expected in the older group, as melatonin decreases along age [25]. Due to the significant difference in the age of SCA and control subjects, we stratified the study

groups by age ranges (> 20 and ≤ 20 years old), for a better attribution of differences in melatonin levels (Figure 3). We observed that melatonin level decreased in control group along age, as expected, despite no statistical difference was observed between control groups with different ages. Comparing the control group with the SCA patients, we observed a significant difference in melatonin level for both group of ages, showing a clear decrease in the SCA patients, confirming that the disease contributes to a significant decrease in melatonin level.

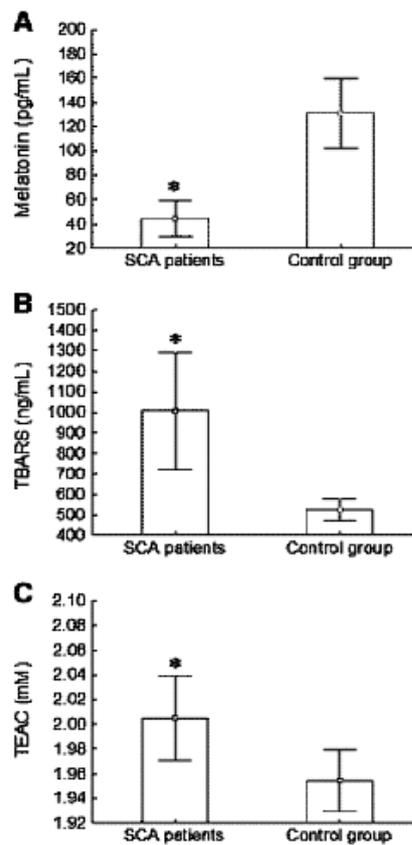


Figure 2. The oxidative stress parameters evaluated in SCA patients and group control. A) Serum melatonin levels in SCA patients were ~3 times lower when compared to the control group ($p < 0.001$). B) TBARS levels were ~2 times higher than in the control group ($p < 0.001$) and C) TEAC levels in SCA patients were higher ($p < 0.05$). * Indicates statistical difference ($p < 0.05$) according to the Mann-Whitney test (melatonin and TBARS) or the t test (TEAC).

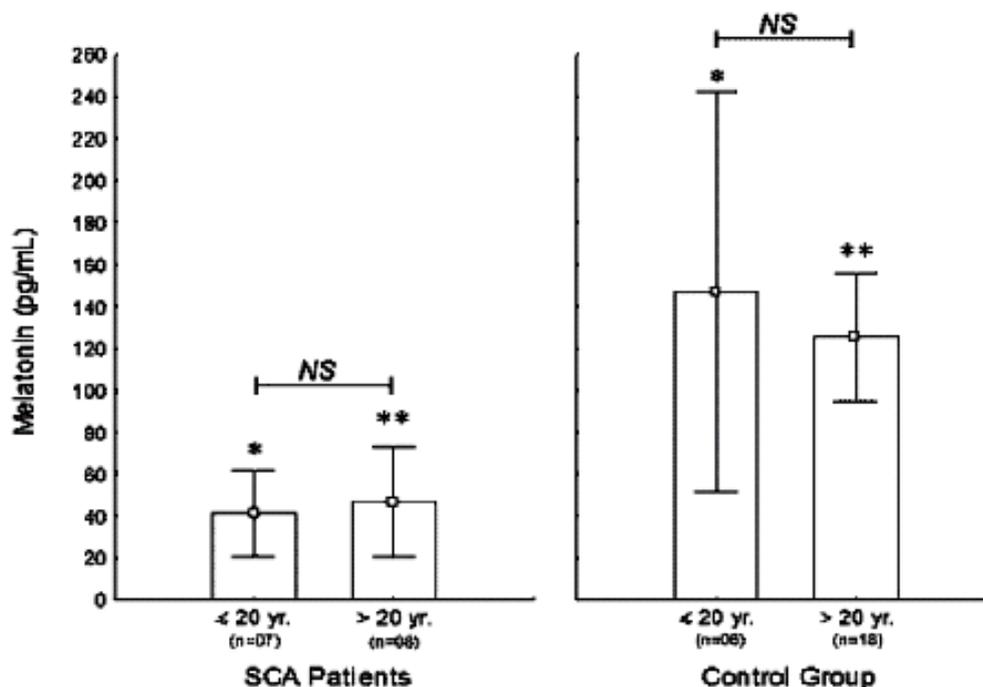


Figure 3. Serum melatonin levels break down the age ranges in SCA patients and control group: ≤ 20 years and > 20 years. NS: not significance (t test). * Indicates statistical difference ($p < 0.05$) between the ≤ 20 yr. and ** the > 20 yr. between the different groups (Mann-Whitney test).

The statistical correlation analysis in the SCA patients group was not significant for any parameters evaluated, except for mean TBARS and TEAC levels ($r=0.51$; $p=0.04$), which suggests the participation of melatonin in the antioxidant defense. Benot et al. [29] suggest that the physiological concentration of serum melatonin, among other antioxidants, contribute to the effectiveness of total antioxidant capacity.

There are no reports in the literature for melatonin levels in other hemolytic anemia. However, it could be expected that this compound is affected by this kind of disease, since high rates of ROS generation and iron release are generally associated with hemolytic anemia. The well known antioxidant properties of melatonin can counteract the deleterious effects of ROS with a consequent decrease in its blood levels due to its consumption by ROS. Also, it was previously demonstrated that melatonin and its metabolites (6-hydroxymelatonin) have important role in reducing free radical generation due to metal detoxification, promoting tissue protection by facilitating conversion of Fe^{3+} to Fe^{2+} , thus reducing Fenton-like reactions with a concomitant decrease in lipid peroxidation [30-31].

Reduced levels of melatonin and the activity of antioxidant enzymes have been observed in inflammatory diseases caused by ROS production due to immune system activation [9]. In SCA patients with chronic inflammatory processes, the serum melatonin levels were ~3 times lower than levels observed in the control group. This data is consistent with other studies on patients with chronic inflammatory diseases such as bronchial asthma, non-insulin-dependent diabetes mellitus, and multiple sclerosis [32-34]. This apparent reduction in the concentration of serum melatonin may be due to its excessive consumption by ROS generated during oxidative stress.

In other hemolytic anemias such as alpha and beta-thalassemia, hereditary spherocytosis, congenital dyserythropoietic anemia (CDA), paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, ROS generation can also increase, mainly due to the hemolysis process [35]. However, compared to SCA such ROS production is lower because of several SCA intrinsic factors, such as Hb S auto-oxidation [36], heme iron release, increases in asymmetric dimethylarginine (ADMA) [37], nitric oxide (NO) decrease [38], which favors the generation of oxidizing agents triggering the oxidative stress.

Therefore, more research is needed involving melatonin and Hb S for a better comprehension of the melatonin antioxidant role in the disease. In the present work, we observed a significant decrease in melatonin level in SCA patients, but the mechanisms that promoted this result should be better studied. We suggest that this decrease are due to oxidation of melatonin by ROS and/or its consumption by free iron released by erythrocyte hemolysis, but other unknown process can also contribute to this result, including a decrease in melatonin secretion by the organism. One alternative for a better attribution of the effect of ROS to melatonin decrease would be the quantification of melatonin degradation products, like N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine (AFMK) [39] in SCA patients, but this remains to be further investigated. With the evidence of these results, we suggest that melatonin can be also used as an adjunct in reducing oxidative stress, improving the oxidative and inflammatory status of the disease.

Acknowledgments

The authors would like to thank the following Brazilian foundations: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant 409691/2006-

2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2006/03873-1), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, and the Ministry of Health (Grant MS 3072/2007) for their financial support.

Authorship

E.L.T.S: data design, data acquisition, data analysis, data interpretation, and manuscript preparation. D.G.H.S: technical assistance in the standardization and quantification of melatonin levels, data analysis, data interpretation, and manuscript preparation. E.A.A: guidance on standardization of the methods for melatonin analysis and critical review of the manuscript. P.J.A.Z: technical assistance and molecular biology analysis. E.B.J: statistical analysis, data interpretation and manuscript preparation. C.R.B.D: study concept and design, and critical review of manuscript.

Conflict of interest disclosure

The authors declare no competing financial or other relationship with other people or organizations interests.

References

1. Taylor JG, Ackah D, Cobb C et al. Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2008; 83(1): 6-14.
2. Embury SH, Mohandas N, Paszty C, Cooper P, and Cheung AT. In vivo blood flow abnormalities in the transgenic knockout sickle cell mouse. *J Clin Invest* 103: 915–920, 1999.
3. Jong K, Larkin SK, Styles LA et al. Characterization of the phosphatidylserine exposing subpopulation of sickle cells. *Blood* 2001;98(3):860-7.
4. Dasgupta T, Hebbel RP, Kaul DK. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic Biol Med.*2006; 41(12):1771-80.
5. Tan DX, Manchester LC, Reiter R J et al. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept.* 2000; 9(3-4): 137-159.

6. Tan DX, Manchester LC, Terron MP et al. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007; 42(1):28-42.
7. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 2000; 7 (6):444-58.
8. Sener G, Tugtepe H, Velioglu-Ogünç A et al. Melatonin prevents neutrophil-mediated oxidative injury in Escherichia coli-induced pyelonephritis in rats. *J Pineal Res.* 2006;41(3):220-7.
9. Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(4):1129-46.
10. Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem.* 2002;2(2):153-65.
11. Erkanli K, Kayalar N, Erkanlı G et al. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res.* 2005; 39(3):238-42.
12. Taysi S, Ucuncu H, Elmastas M et al. Effect of melatonin on lipid peroxidation, glutathione and glutathione-dependent enzyme activities in experimental otitis media with effusion in guinea pigs. *J Pineal Res.* 2005; 39 (3): 238-42.
13. Lee MY, Kuan YH, Chen HY et al. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res.* 2007;42(3):297-309.
14. Bonini-Domingos CR. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias. HN ed., São José do Rio Preto, 2006; 121p.
15. 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.
16. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978;86(1):271-8.
17. Re R, Pellegrine N, Proteggente A et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-7.
18. Lagana A, Marino A, Fago G et al. Sensitive assay for melatonin in human serum by liquid chromatography. *Anal Chim Acta.* 1995;316:377-85.
19. Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Sci World J.* 2008;8:1295-324.

20. Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verweij M et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int J Lab Hematol*. 2009 Oct;31(5):484-95. Epub 2009 Apr 17.
21. Rizzo V, Porta C, Moroni M et al. Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromat*. 2002; 774: 17-24.
22. Benloucif S, Burgess HJ, Klerman EB et al. Measuring melatonin in humans. *J Clin Sleep Med* 2008; 4(1): 66-69.
23. Kennaway DJ, Voultsios A. Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. *J Clin Endoc Metabol*. 1998;83(3):1013-15.
24. Ueno-Towatari T, Norimatsu K, Blazeiczky K et al. Seasonal variations of melatonin secretion in young females under natural and artificial light conditions in Fukuoka, Japan. *J Physiol Anthropol* 2007: 26: 209-215.
25. Karasak M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol*. 2004 Nov-Dec;39(11-12):1723-9.
26. Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patientis in steady state. *J Natl Med Assoc*. 2008;100:897-902.
27. Repka T, Hebbel RP. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood* 1991;78:2753-8.
28. Sess ED, Carbonneau MA, Meité M et al. Markers of lipid peroxidation, inflammatory proteins and plasma tocopherols in homozygotic and heterozygotic sickle cell anemia. *Bull Soc Pathol Exot*. 1998;91(3):238-41.
29. Benot S, Goberna R, Reiter RJ et al. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. *J Pineal Res*. 1999; 27(1):59-64.
30. Limson J, Nyokong T, Daya S. The interaction of melatonin and its precursors with aluminium, cadmium, copper, iron, lead, and zinc: an adsorptive voltammetric study. *J Pineal Res*. 1998 Jan;24(1):15-21.
31. Maharaj DS, Limson JL, Daya S. 6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation. *Life Sci*. 2003 Feb 7;72(12):1367-75.
32. Gumral N, Caliskan S, Ozgüner et al. Melatonin levels and enzymatic antioxidant defense system decrease in blood of patients with bronchial asthma. *Toxicol Ind Health*. 2009;25:411-6.
33. Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Kozakiewicz M et al. Melatonin improves oxidative stress parameters measured in the blood of elderly type 2 diabetic patients. *J Pineal Res*. 2009 Apr;46(3):333-7.

34. Akpınar Z, Tokgöz S, Gökbel H et al. The association of nocturnal serum melatonin levels with major depression in patients with acute multiple sclerosis. *Psychiatry Res.* 2008 Nov 30;161(2):253-7. Epub 2008 Oct 10.
35. Fibach E, Rachmilewitz E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Curr Mol Med.* 2008 8(7):609-19.
36. Umbreit J. Methemoglobin--it's not just blue: a concise review. *Am J Hematol.* 2007Feb;82(2):134-44.
37. Landburg PP, Teerlink T, Biemond BJ et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Apr 15;44(4):229-32. Epub 2010 Feb 24.
38. Wood KC, Hsu LL, Gladwin MT. Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med.* 2008 Apr 15;44(8):1506-28. Epub 2008 Jan 26.
39. Almeida EA, et al. Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ($O_2(1\Delta g)$) produces N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynurenine. *J Pineal Res.* 2003 Sep;35(2):131-7.

4.2 ARTIGO II

Interação entre Hb SS/Talassemia $\alpha^{3.7}$: estudo familiar

The interaction between Hb SS/ $\alpha^{3.7}$ Thalassemia: a familial study

Eliana LitsukoTomimatsu Shimauti¹

Paula Juliana Antoniazio Zamaro²

Claudia Regina Bonini-Domingos³

Laboratório de Hemoglobina e Genética de Doenças Hematológicas da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – São Paulo, Brasil; Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá – Paraná, Brasil.

¹Doutoranda do Curso de pós-graduação em Genética da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - SP e Professora do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina - Universidade Estadual de Maringá-UEM - PR.

²Bióloga do Laboratório de Hemoglobina e Genética de Doenças Hematológicas da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho - SP.

³Professora do Departamento de Biologia da UNESP - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho- São José do Rio Preto-SP.

Correspondência: Eliana Litsuko Tomimatsu Shiamuti

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina

Av. Colombo, 5.790

Jardim Universitário

CEP: 87020-900 Maringá – Paraná – Brasil

Telefone: +55-44-3011-4800

E-mail: eltshimauti@uem.br

Resumo

A manifestação clínica da doença falciforme é heterogênea. Entre os fatores que contribuem para esta heterogeneidade está a co-herança de talassemia alfa, possível modulador da gravidade clínica. O intuito deste estudo foi relatar o quadro clínico-laboratorial observado na associação entre heterozigoto ($-\alpha/\alpha\alpha$) e homozigoto ($-\alpha/-\alpha$) de talassemia $-\alpha^{3.7}$ em portadores de Hb SS, de mesmo núcleo familiar. Os pacientes, gênero masculino, 10 anos de idade ($-\alpha/\alpha\alpha$), e gênero feminino, 22 anos de idade ($-\alpha/-\alpha$), ambos pardos, com haplótipo Bantu/Benin. O paciente com homozigose para talassemia $-\alpha^{3.7}$ não apresentava complicação hepatobiliar bem como vasculopatia, porém foi evidenciada esplenomegalia. Os eventos clínicos citados foram observados no heterozigoto. Quanto aos parâmetros hematológicos, o paciente homozigoto ($-\alpha/-\alpha$) apresentou menor grau de hemólise, anemia mais discreta, redução dos índices hematimétricos, menor quantidade de drepanócitos irreversíveis e de marcadores celulares de inflamação quando comparados a heterozigoto ($-\alpha/\alpha\alpha$). O benefício dessa influência epistática parece aumentar com o perfil herdado quanto à deleção do gene $-\alpha^{3.7}$, um fator que influencia a variabilidade clínica e gravidade na anemia falciforme.

Palavras-chave: anemia falciforme; talassemia; hemoglobinopatia.

Abstract

The clinical manifestation of sickle cell disease is heterogenic. Among the factors that contribute to this heterogeneity is the co-inheritance of alpha-thalassemia, a possible modulator of clinical gravity/severity. The aim of this study was to report the clinical and laboratorial conditions seen in the association between ($-\alpha/\alpha\alpha$) heterozygote and ($-\alpha/-\alpha$) homozygote of $-\alpha^{3.7}$ thalassemia in Hb SS carriers of the same familial nucleus. Patients, male, 10 years of age ($-\alpha/\alpha\alpha$) and female, 22 years of age ($-\alpha/-\alpha$), both pardos with Bantu/Benin haplotype. The patient with homozygosis for $\alpha^{3.7}$ thalassemia showed no hepatobiliary complication as well as vasculopathy, however, splenomegaly was found. The clinical episodes mentioned were found in the heterozygote. As for the hematological parameters, the homozygous patient ($-\alpha/-\alpha$) showed lower level of hemolysis, milder anemia, reduction of erythrocyte indices,

smaller quantity of irreversible drepanocytes and inflammation cellular makers when compared to (- $\alpha/\alpha\alpha$) heterozygote. The benefit of this epistatic influence seems to increase with the inherited profile as for the $\alpha^{3.7}$ gene deletion, a factor that modulates the clinical variability and the severity of sickle cell anemia.

Keywords: sickle cell anemia; thalassemia; hemoglobinopathy.

Senhor Editor

O curso clínico da anemia falciforme (Hb SS) é significativamente distinto, embora a alteração molecular seja a mesma. São documentados, possíveis moduladores da variabilidade fenotípica, entre os quais a talassemia alfa e os haplótipos do grupamento do gene β^S .⁽¹⁾ Os possíveis benefícios advindos da co-herança com talassemia alfa, também influenciam os parâmetros hematológicos.⁽²⁾ A concentração intracelular de Hb S parece apresentar dependência direta com o genótipo de globina alfa. Desse modo, a associação de talassemia alfa e Hb SS, minimiza os efeitos fisiopatológicos nos portadores de hemoglobinopatia S. A talassemia alfa causada pela deleção de 3.7 kb de DNA ($-\alpha^{3.7}$) é a mais comum no Brasil.⁽³⁾

O presente artigo relata a observação de quadro clínico e hematológico diverso em dois indivíduos portadores de Hb SS, de mesmo núcleo familiar com associação entre heterozigose ($-\alpha/\alpha\alpha$) e homozigose ($-\alpha/-\alpha$) de talassemia $-\alpha^{3.7}$.

Paciente 1, gênero masculino, 10 anos de idade ($-\alpha/\alpha\alpha$); paciente 2, gênero feminino, 22 anos de idade ($-\alpha/-\alpha$), ambos pardos. As confirmações diagnósticas para a Hb S e para a talassemia $-\alpha^{3.7}$ foram efetuadas por meio de PCR-RFLP⁽⁴⁾ e PCR-multiplex,⁽⁵⁾ respectivamente. As concentrações das frações hemoglobínicas foram determinadas por meio da HPLC Variant™ - Beta Thal Short Program (Bio-Rad). Os parâmetros hematológicos foram obtidos por meio de analisador automático BC-300 PLUS – Mindray. As amostras sanguíneas foram colhidas após o consentimento informado e segundo os princípios éticos estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Os dados clínicos obtidos por meio da avaliação de prontuários médicos estão demonstrados na Tabela 1. O paciente (1) tinha sido transfundido há 130 dias

e o paciente (2) há 3.204 dias antes da coleta de amostras para a pesquisa. Ambos não faziam uso de hidroxiuréia, sendo medicados somente com ácido fólico.

Tabela 1. Características clínicas da coexistência da talassemia $\alpha^{3.7}$ com Hb SS observadas nos paciente 1 e 2 com deleção de um gene e de dois genes alfa respectivamente

<i>Dados clínicos</i>	<i>SS/(-α/$\alpha\alpha$)</i>	<i>SS/(-α/α)</i>
Crise álgica	N	N
Dores articulares	S	N
Colecistectomia	S	N
Esplenectomia	N	S
Úlcera de perna	S	N

S- sim; N-não.

Os dados laboratoriais quantitativos estão especificados na Tabela 2. Quanto às alterações qualitativas eritrocitárias, a hipocromia estava presente somente no caso de interação da Hb SS com o genótipo $-\alpha/-\alpha$, e os macrócitos policromáticos somente na interação da Hb SS com genótipo $-\alpha/\alpha\alpha$. As outras alterações, tais como microcitose, macrocitose, policromasia, drepanócitos, corpúsculo de Howell Jolly, codócitos e eritroblastos eram comuns em ambos. Os haplótipos foram caracterizados como Bantu/Benin pela PCR-RFLP em ambos.

Tabela 2. Dados hematológicos da interação entre Hb SS/ $\alpha^{3.7}$ de pacientes 1 e 2 com deleção de um gene e de dois genes alfa, respectivamente

<i>Parâmetros hematológicos</i>	<i>SS/(-α/$\alpha\alpha$)</i>	<i>SS/(-α/α)</i>
Hemoglobina (g/dL)	7.6	9.0
Volume globular (%)	22.1	28.7
VCM (fL)	88.1	79.5
HCM (pg)	30.2	24.8
CHCM (%)	34.3	31.3
RDW (%)	17.7	14.2
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	14.0	9.7
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	6.1	4.9
Monócitos ($\times 10^9/L$)	0.7	0.3
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	380	280
HbS (%)	80.2	72.6
HbA2 (%)	4.7	4.4
HbF (%)	15.1	23
Reticulócitos (%)	12.1	6.3
Drepanócitos irreversíveis (%)	3.0	1.0

VCM-Volume Corpuscular Médio; HCM-Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM-Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; RDW- Red Cell Distribution Width

Foi evidenciada complicação hepatobiliar e vasculopatia no paciente 1 (- $\alpha/\alpha\alpha$), e a esplenomegalia observada somente no paciente 2 (- α/α). Quanto a efeito hematológico, o paciente homocigoto para talassemia alfa (- α/α) apresentou menor grau de hemólise, anemia mais discreta, redução dos índices hematimétricos bem como de marcadores celulares de inflamação (granulócitos e monócitos), quando comparados a heterocigoto (- $\alpha/\alpha\alpha$). A co-herança de talassemia alfa/Hb SS está associada com baixo risco de colelitíase⁽⁶⁾ e maior frequência de esplenomegalia.⁽⁷⁾ Desse modo, homocigose para a deleção do gene $\alpha^{3.7}$ parece receber maior benefício dessa influência epistática.

Os resultados corroboram os dados da literatura que evidenciam a coexistência de homocigotos para talassemia $\alpha^{3.7}$ com anemia falciforme como um fator que influencia a variabilidade clínica e gravidade hematológica e evidenciam a diversidade de manifestações mesmo em um único núcleo familiar.

Contribuição dos autores

Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti: aquisição, análise e interpretação de dados e elaboração de manuscrito.

Paula Juliana Antoniazco Zamaro: análise e assistência técnica em biologia molecular.

Claudia Regina Bonini-Domingos: orientação do trabalho e análise crítica do manuscrito.

Agradecimento

O presente estudo é parte do Projeto de Pesquisa financiado pelo Ministério da Saúde (3072/2007) e Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (Processo 5636/2009). Agradecemos à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná pelo suporte financeiro (convênio 322/2009).

Referências Bibliográficas

1. Costa FF. Anemia falciforme. In: Zago MA, Falcão RP, Pasqini R. Hematologia fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu; 2001. p. 289-307.
2. Steinberg MH, Embury SH. α -Thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. Blood 1986; 68 (5): 985-990.
3. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of α -thalassemia in a Black population of Brazil. Hemoglobin 1991; 15: 309-311.
4. Bonini-Domingos CR. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias. São José do Rio Preto (SP): HN; 2006.
5. Mendiburu CF. Estudo das talassemias do tipo alfa em dois estados das regiões nordeste e sudeste do Brasil. 2005. Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre em Genética. UNESP- São José do Rio Preto-SP. 121p
6. Vasavda N, Menzel S, Kondaveeti S, Maytham E, Awogbade M, Bannister et al. The linear effects of α -thalassemia, the UGT1A1 and HMOX1 polymorphisms on cholelithiasis in sickle cell disease. Br J Haematol 2007; 138: 263-70.
7. Higgs DR, Aldridge BE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, Hayes RJ et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. N Engl J Med 1982; 306: 1441-46.

4.3 ARTIGO III

Influência do alelo β^S em heterozigose e homozigose nos parâmetros de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante

Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti^{1,2}, Edis Belini Junior¹, Ligia Marcia da Silveira Viana Baracoli¹, Eniuce Menezes de Souza³, Daniele Granzotto³, Eduardo Alves de Almeida⁴, Danilo Grunig Humberto Silva⁴, Octavio Ricci Junior⁵, Claudia Regina Bonini Domingos¹

¹ UNESP- Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

² UEM- Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Paraná, Brasil.

³ UEM- Universidade Estadual de Maringá Departamento de Estatística, Paraná, Brasil.

⁴ UNESP- Universidade Estadual Paulista, Departamento de Química, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

⁵ FAMERP- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Departamento de Medicina, São Paulo, Brasil.

Correspondência:

Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti

Universidade Estadual de Maringá,

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina

Av. Colombo, 5.790

Jardim Universitário

CEP: 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil

Telefone: +55-44-3011-4800

e-mail: eltshimauti@uem.br

Resumo

Introdução: O processo oxidativo tem papel fundamental na fisiopatologia da anemia falciforme (AF), e as características populacionais e ambientais podem influenciar no equilíbrio redox. Objetivo deste estudo foi avaliar a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante em portadores de Hb S das regiões sul e sudeste do Brasil, submetidos às terapêuticas distintas.

Casuística e métodos: Foram analisadas amostras sanguíneas de 270 indivíduos (Hb SS, n=68; Hb AS, n=53, e Hb AA, n=149). As Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) utilizadas para avaliação da peroxidação lipídica, e capacidade antioxidante em equivalência ao trolox (TEAC), foram estimadas espectrofotometricamente no plasma. Frações hemoglobínicas foram quantificadas por meio de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

Resultados: O grupo de pacientes que utilizava o quelador de ferro combinado com hidroxiuréia (HU), associado a processo transfusional foi o que apresentou menor nível de TBARS ($p \leq 0,04$) e maior nível de TEAC ($p \leq 0,03$). O perfil antioxidante/oxidante dos indivíduos com HbAS não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em comparação ao grupo com Hb AA.

Conclusões: A combinação de agentes farmacológicos que exercem o efeito sinérgico na defesa antioxidante pode reduzir o nível de estresse oxidativo na AF e melhorar a qualidade de vida. O sistema antioxidante de portadores de Hb AS é eficiente para manter o equilíbrio redox controlado.

Palavras chave: anemia falciforme, traço falciforme, estresse oxidativo, TBARS, TEAC.

Introdução

A molécula de Hb S, originada pela transversão GAG para GIG no sexto códon da globina β , no cromossomo 11, responsável pela troca de ácido glutâmico por valina, acarreta alterações físico-químicas da molécula [1,2]. Estima-se que cerca de 4% da população brasileira e 6% a 10% dos afrodescendentes são portadores assintomáticos (Hb AS), e 25 a 30 mil brasileiros possuem anemia falciforme [3,4]. Devido à alta prevalência e alto índice de morbi-mortalidade, a

doença falciforme é considerada como problema de saúde pública no Brasil [5]. Como resultado de interação de múltiplos fatores, uma das conseqüências da doença é a rigidez e deformação dos eritrócitos, ocasionando oclusão da microvasculatura, associada a dano endotelial, oxidativo e anemia hemolítica crônica [6,7]. Os fatores que predispõem à hemólise decorrem da desoxigenação e metahemoglobinação da Hb S, seguida de formação de hemicromos que se ligam excessivamente na membrana de eritrócitos falciformes facilitando a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) [8, 9]. A externalização da fosfatidilserina na membrana dos eritrócitos falciformes decorrente de desequilíbrio iônico e peroxidação lipídica [10,11], bem como consumo de óxido nítrico pelo heme plasmático liberado pela hemólise, podem levar à vaso-occlusão [7, 12].

O estado oxidativo é determinado pelo equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. O desequilíbrio crônico no sistema redox das células falciformes pode contribuir para o agravamento dos sintomas da anemia falciforme (AF) e encurtamento da sobrevida dos eritrócitos [13, 14, 11]. A resposta ao efeito mais lesivo dos radicais livres é a peroxidação lipídica (LPO) da membrana eritrocitária, induzida por ERO, tais como, íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila ($\cdot OH$) e peróxil (ROO) [15]. O ferro, proveniente da auto-oxidação e degradação da Hb S desempenha papel determinante na iniciação deste processo, pois potencializa a geração de radical $\cdot OH$, considerado o mais reativo e mais lesivo das ERO [6, 7, 16, 17]. Existem evidências de que as ERO possam estar envolvidas em mais de 50 eventos patológicos, tais como enfisema, asma, acidente vascular cerebral, catarata, diabetes, doença de Alzheimer, entre outros [18].

O organismo se defende contra agressões mediadas pelos radicais livres por meio de sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, além do sistema de quelação de metal [7]. Tem sido reportado que as atividades dos antioxidantes enzimáticos são potencializadas na presença de cofatores como selênio e metais de transição, e também pelas citocinas inflamatórias, endotoxinas bacterianas e vitamina E [19, 20]. As características populacionais, a influência do meio ambiente e tipo de tratamento também podem influenciar a capacidade da defesa antioxidante na Hb S. Assim, avaliar os indivíduos com Hb S de diferentes regiões do país, submetidos a condições ambientais e terapêuticas distintas pode fornecer subsídios para verificar situações que se coadunam a melhor equilíbrio

redox na AF. Os traços falciformes, ao contrário da AF, são considerados como portadores de condição benigna, porém, há vários relatos de ocorrência de manifestações clínicas, discretas até graves quando exposto a situações adversas [21, 22, 23]. Desse modo, avaliar o estado oxidativo dos traços falciformes é importante para a compreensão da patofisiologia da Hb S.

Casuística e Método

Foram analisadas amostras sanguíneas de 121 indivíduos com Hb S, dos quais 68 com Hb SS na fase estável da doença, isto é, fora da crise álgica e 53 portadores de Hb AS, além de 149 indivíduos com Hb AA. Os critérios de inclusão foram ser não fumantes, não gestantes, não etilistas e de não uso de suplemento de vitamina E com dose superior a 800 UI/dia [24]. Nenhum dos participantes estavam utilizando vitamina E. Para a composição dos grupos não houve distinção entre gêneros, a faixa etária foi de 9 a 66 anos de idade. Os indivíduos com Hb S eram provenientes da região noroeste do estado do Paraná (NOPR) (Hospital público de referência e outras unidades de saúde); região noroeste do estado de São Paulo (NOSP-Hemocentro) e da região leste de São Paulo (LSP - Hemocentro). O grupo com Hb AA (controle) foi constituído por estudantes de Instituição Pública de Ensino Superior e outros doadores voluntários de sangue. Após o consentimento informado foram coletadas amostras de sangue venoso (4mL) em EDTA, para exames hematológicos, triagem de hemoglobinopatias e biologia molecular; e 7mL em heparina para avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo.

Os testes de triagem para hemoglobinopatias consistiram de eletroforese de hemoglobina em pH 8,6 e pH 6,2, [25, 26]. Para análise quantitativa das frações hemoglobínicas utilizou-se Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) com o equipamento Variant (Bio-Rad) [27]. A confirmação da Hb S foi realizada por biologia molecular, extraído-se o DNA genômico dos leucócitos pelo método de fenol/clorofórmio [28]. Para caracterização da Hb S e determinação do genótipo submetem-se à Reação em Cadeia da Polimerase alelo específico (PCR-AE) e à análise do Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) [28]. Os dados hematológicos para as amostras de NOPR e de LSP foram obtidos por meio de analisador hematológico, BC-300 PLUS – Mindray e Cell-Dyn®, 3000 –

Abbot Diagnostics, respectivamente. Enquanto os dados dos indivíduos da NOSP foram obtidos por meio de banco de dados do Hemocentro. Informações sobre uso de medicação, eventos clínicos e transfusões sanguíneas foram obtidas por meio de consulta aos prontuários médicos, ao banco de dados dos Hemocentros e pela aplicação de questionário no momento da coleta. A avaliação da peroxidação lipídica, por meio de TBARS, foi determinada segundo o método descrito por Mihara e Uchiyama [29] e por Percário et al. [30] tendo como valor de referência, 0 a 440 ng/mL. O nível plasmático foi medido espectrofotometricamente a 532 nm sob condições ácidas. A capacidade de defesa antioxidante, TEAC, para avaliar antioxidantes não enzimáticos no plasma, foi realizada conforme descrito por Miller et al [31] e por RE et al. [32]. A sua determinação é fundamentada segundo sua equivalência ao Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-Carboxílico, Aldrich Chemical Co 23881-3), um antioxidante análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. O valor de referência estabelecido para TEAC, considerando a variação étnica regional e as condições laboratoriais foram de 1.83-2.07mM/L.

Os dados foram expressos em medianas, e para as análises estatísticas foi utilizado o *software* Statistica, versão 8.0. Os resultados foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade. Como os dados não atenderam às tais suposições, utilizaram-se os testes não paramétricos de *Mann-Whitney e Kruskal-Wallis*, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Para as análises de correlações foi utilizado o teste de correlação de Spearman. O nível de significância para os testes aplicados foi fixado em 5% ($\alpha=0.05$).

Resultados

Do total de 68 indivíduos com Hb SS, 25% (n=17) eram da região NOPR, 23,5 % (n=16) oriundos da região de NOSP e 51,5% (n=35) da região LSP. Entre os Traços Falciformes (Hb AS), 56,6% (n=30) eram doadores voluntários de sangue provenientes de NOPR, e 43,4% (n=23) doadores de sangue provenientes do Hemocentro de NOSP. A faixa etária variou de, 9 a 50 anos para Hb SS, de 14 a 66 anos para Hb AS e de 11 a 55 anos para grupo sem hemoglobinopatia (Hb AA) (Tabela 1).

As concentrações de Hb S, Hb F e Hb A, esta última decorrente de processo transfusional, nos indivíduos com Hb SS das três localidades, quando comparadas

entre si, apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,01$, $p=0,01$ e $p<0,0001$ respectivamente). A maior concentração de Hb S e de Hb F incidiu nos indivíduos de NOPR e o menor nível de HbS foi observado nos indivíduos de LSP. Quanto à Hb A, a maior concentração foi observada nas amostras de LSP e são resquícios de processo transfusional (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas e perfil clínico/hematológico dos grupos avaliados segundo a região de origem

	NOPR	LSP	NOSP
N	77	35	158
Gênero F/M (n %)	36(46,8%)/41(53,2%)	27(77,1%)/8(22,9%)	59(37,3%)/99(62,7%)
Idade (anos)	28 (10 a 55)	24 (9 a 50)	30 (18 a 66)
Genótipo (n)			
AA	30	-	119
AS	30	-	23
SS	17	35	16
Dados hematológicos (HbSS)			
Hb (g/dL)	7,6 ^a (5,9-9,7)	8,1 ^b (5,6-10,8)	7,8 ^a (4,7-12,8)
Reticulócitos (%)	11,2 ^a (6,3-36,9)	6,8 ^b (0,7-14,8)	-*
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	12,6 ^a (8,6 - 18,8)	10,2 ^b (5,35 - 15,6)	13,3 ^{a,c} (7,1 - 23,7)
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	6,10 ^a (4,47 - 11,28)	5,17 ^b (2,30 - 10,30)	-*
Linfócitos ($\times 10^9/L$)	4,64 ^a (2,08 - 6,83)	2,79 ^b (1,23 - 4,94)	-*
Monócitos ($\times 10^9/L$)	0,72 ^a (0,17 - 0,22)	0,79 ^a (0,23 - 0,17)	-*
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	374 ^{a,a1} (249 - 514)	415 ^{a,b} (132 - 794)	315 ^{a1} (86 - 720)
Hb F (%)	10,2 ^a (1,2 - 24,2)	4,5 ^b (1,1 - 34,2)	4,25 ^b (0,6 - 13,3)
Hb S (%)	83,5 ^a (55,3 - 93,9)	68,6 ^b (30,4 - 94,1)	76,4 ^{a,b} (25,6 - 93,3)
Hb A (%)	1,9 ^a (0 - 33)	20 ^b (1,1 - 61,7)	5,5 ^b (1,5 - 60,6)
Tratamento (Hb SS) (%)			
Quelação de ferro	5,9	74,3	18,7
Hidroxiuréia	53	31,4	25
Ácido fólico	88,2	100	100
Transfusão sanguínea**	5,9	68,6	43,8
Complicações clínicas (Hb SS) (%)			
Osteonecrose	23,5	20	0
Úlcera de perna	5,8	22,9	50
Síndrome torácica aguda (STA)	5,9	2,85	6,3
Acidente vascular cerebral (AVC)	0	34,3	12,5
Priapismo (% M)	0	25	33,3
Colelitíase/colecistectomia	35,2	30	25
Retinopatia	0	5,7	0
pneumonia	23,5	.	.
Dor articular e muscular	29,4	.	.
Anormalidades cardíacas***	41,2	.	.
Crise algica nos últimos três anos (%)			
0 - 2	70,6	60	43,8
3 - 5	23,5	22,9	12,5
≥ 6	5,9	17,1	43,8

F-feminino; M-masculino; NOPR-região noroeste do Paraná; NOSP-região noroeste de São Paulo; LSP-região leste de São Paulo; -* não demonstrados, ausência de informações nos prontuários; ** até 60 dias que precedeu à coleta; *** insuficiência mitral, cardiomegalia, sopro cardíaco. As mesmas letras indicam diferença não significativa ($P>0,05$) e as letras diferentes indicam significância estatística ($P<0,05$). Teste Kruskal-Wallis e Mann Whitney com nível de significância de 0,05.

Quanto aos parâmetros hematológicos, a concentração de Hb do grupo SS de LSP foi significativamente maior quando comparada à do grupo de NOPR e NOSP ($p < 0,0001$), e o grau de reticulocitose foi significativamente menor no grupo de LSP ($p < 0,001$). A leucometria global, neutrófilos e linfócitos, marcadores celulares de processo inflamatório e/ou infeccioso, também mostraram níveis significativamente reduzidos no grupo SS de SP quando comparados aos de outras localidades.

Os níveis de TBARS dos grupos com Hb SS de NOPR, NOSP e de LSP, quando comparados com o grupo controle (Hb AA), mostraram-se, como esperado, significativamente elevados ($p < 0,01$). Os valores de TEAC da Hb SS destas localidades, em comparação a Hb AA também estavam elevados ($p < 0,01$). A análise comparativa de TBARS entre as localidades demonstrou elevação significativa nos grupos de NOPR ($p = 0,01$) e NOSP ($p = 0,04$) em relação ao de LSP (Fig.1). Os valores de TEAC mostraram diferença significativa entre as três localidades ($p < 0,001$), com maior nível no grupo de LSP e menor no grupo de NOPR (Fig. 2).

A Tabela 2 demonstra a relação entre os tipos de medicação e seus respectivos valores de TBARS e TEAC. Os tratamentos utilizados pelos portadores de diferentes localidades estão mencionados na Tabela I.

Quanto aos dados do grupo com Hb AS, comparados com os do grupo com Hb AA, foram observados o que segue: no grupo de NOPR, tanto o nível de TBARS quanto o de TEAC, não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$); o grupo de NOSP também não mostrou significância estatística ($p > 0,05$) no nível de TBARS, porém, foi observada elevação significativa nos níveis da TEAC ($p < 0,01$). A comparação de dados das amostras de Hb AS entre as localidades apresentaram o nível da TEAC significativamente menor ($p < 0,0001$), e o de TBARS significativamente maior ($p < 0,0001$), no grupo de NOPR; quanto aos parâmetros hematológicos, a taxa de Hb total (12,4g/dL-NOPR; 14,8g/dL-NOSP) e de Hematócrito (38,3%-NOPR; 44%-NOSP), apresentaram-se significativamente menores ($p < 0,0001$), e a de leucometria global ($7,6 \times 10^9/L$ -NOPR; $6,3 \times 10^9/L$ -NOSP) significativamente maior ($p < 0,01$), nas amostras de NOPR.

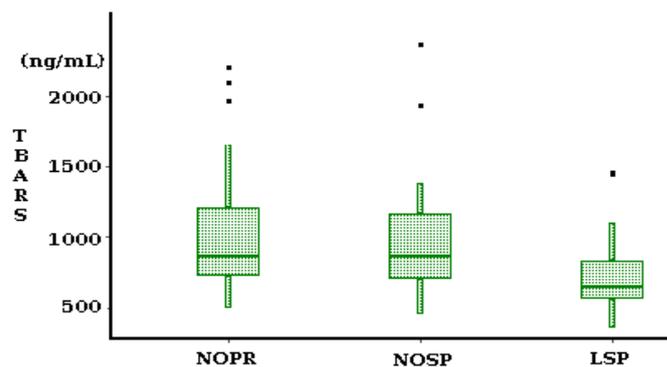


Figura 1. Análise comparativa dos níveis de TBARS dos indivíduos com Hb SS de NOPR, NOSP e LSP, utilizando o Teste Kruskal-Wallis complementado pelo Dunn com nível de significância de 0,05. Entre NOPR e NOSP ($p=1$); NOPR e LSP ($p=0,01$); NOSP e LSP ($p=0,04$). NOPR-região noroeste do Paraná; NOSP-região noroeste de São Paulo; LSP-região leste de São Paulo

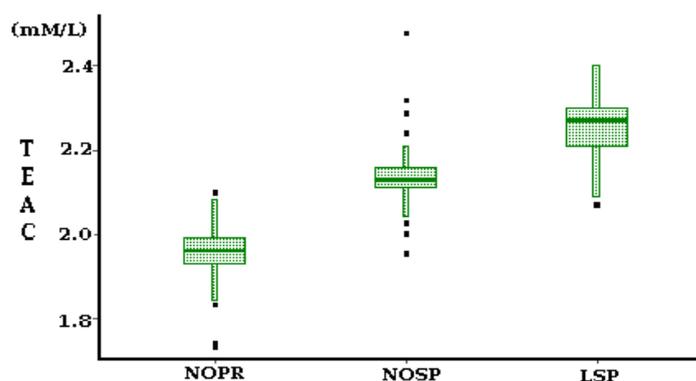


Figura 2. Análise comparativa dos níveis de TEAC dos indivíduos com Hb SS de NOPR, NOSP e LSP; utilizando o Teste Kruskal-Wallis complementado pelo Dunn com nível de significância 0,05. Entre NOPR e NOSP ($p=0,005$); NOPR e LSP ($p<0,0001$); NOSP e LSP ($p=0,03$). NOPR-região noroeste do Paraná; NOSP-região noroeste de São Paulo; LSP-região leste de São Paulo.

Tabela 2. Distribuição dos valores medianos de TBARS e TEAC dos indivíduos com Hb SS, de acordo com o esquema terapêutico instituído por localidade

medicação	n (%)	LSP		n(%)	NOSP		n(%)	NOPR#		P	
		TBARS ng/mL	TEAC mM/L		TBARS ng/mL	TEAC mM/L		TBARS ng/m	TEAC mM/L	TBARS	TEAC
HU	2(5,7)	776,5	2,27	3(18,7)	680	2,14**	8(47)	907,1	1,99**	0,531	0,014
HU+QF	9(25,7)	568*	2,22	1(6,3)	-	-	1(5,9)	-	-	-	-
QF	17(48,6)	654	2,28	2(12,5)	883	2,13	-	-	-	-	-
Ác Fólico	7(20)	780 ^{†,c}	2,29 ^a	10(62,5)	892,5 ^c	2,15 ^a	7(41,2)	910,9 ^c	1,98 ^b	0,251	0,0007
P		0,029	0,240		0,592	0,872		0,943	0,670		

HU:hidroxiuréia; QF: quelador de ferro; Ác Fólico: ácido fólico; NOPR-região noroeste do Paraná; NOSP-região noroeste de São Paulo; LSP-região leste de São Paulo; # No grupo de Maringá, 1 (5,9%) não utilizava nenhum medicamento no período da coleta; *significância estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos no grupo de SP; ** significância estatística entre os grupos que utilizam HU; mesmas letras indicam sem significância estatística ($p > 0,05$); letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre os grupos que utilizam Ac Fólico; $n \leq 2$ não foram analisados. Teste de Kruskal Wallis complementado por Teste de Dunn, e Teste de Mann Whitney com nível de significância de 0,05.

A correlação positiva observada entre TBARS e TEAC ($r=0,388$, $p=0,033$) e negativa entre TEAC e HbF ($r=-0,373$, $p=0,041$), na amostragem de Hb AS, indicam a eficácia da resposta do sistema de defesa antioxidante total contra as ERO, e a contribuição da Hb F no equilíbrio redox. No grupo com Hb SS, os níveis de TBARS e TEAC não mostraram correlação com nenhum dos parâmetros analisados, exceto entre TBARS e leucócitos ($r=0,31$; $p=0,008$), e TEAC e Hb A ($r=0,35$; $p=0,003$) que apresentaram correlação positiva significativa.

Discussão

As membranas dos eritrócitos falciformes estão sujeitas a estresse oxidativo contínuo, pela produção de radicais alcoxí e peroxi lipídico, catalisados pelo ferro, contribuindo assim para a lesão celular [16]. A extensão do estresse oxidativo, avaliada pela TBARS, reflete a LPO das membranas celulares, cuja elevação é indicativa de desequilíbrio entre ERO e defesa antioxidante [33]. Este estudo, consistente com a biologia da AF, evidenciou aumento significativo tanto nos níveis de TBARS como nos de TEAC, nas amostras com Hb SS de todas as localidades, em comparação ao grupo com Hb AA, conforme descrito previamente em pacientes com AF [34]. Para proteger as células contra o estresse oxidativo, o sistema de

defesa antioxidante parece responder de maneira adaptativa elevando a sua atividade. Entretanto essa adaptação é insuficiente para proteger contra os danos orgânicos quando a magnitude da ERO é excessiva [35]. Estudo realizado em modelo animal a elevação no nível de LPO associada à marcada redução no sistema de defesa antioxidante é o reflexo da gravidade da doença, a qual é proporcional à concentração da Hb S [7].

Na análise comparativa do perfil oxidativo entre as localidades, observamos a concentração significativamente diminuída de TBARS associada a elevado nível de TEAC no grupo com Hb SS de LSP, quando comparados com os grupos de NOPR e de NOSP. Sugere-se que o estado redox mais favorável, evidenciado no grupo de LSP, relaciona-se à terapêutica instituída. A eficácia dos agentes farmacológicos na redução de ERO é observada pelos níveis significativamente reduzidos de TBARS nos indivíduos com Hb SS de LSP, que utilizavam quelantes de ferro combinados com HU, em comparação aos que faziam uso somente de ácido fólico. Os dados semelhantes foram observados por Rice-Evans, Omorphos e Baysal [16], em que o uso combinado de quelador de metal e ascorbato causou maior redução na LPO do que utilização isolada destes antioxidantes. Aliada à ação medicamentosa, a baixa concentração de Hb S e presença apreciável de Hb A, decorrente de processo transfusional, podem ter contribuído na otimização do estado redox. No grupo com elevado nível de TBARS e baixa capacidade antioxidante (pacientes com Hb SS de NOPR) estava associado à maior concentração de Hb S e menor nível de Hb A, em que a utilização dos quelantes de ferro bem como transfusão sanguínea não era usual. Os quelantes de ferro suprimem a peroxidação lipídica da membrana eritrocitária por não disponibilizarem os metais para catalisarem a conversão de hidroperóxido lipídico a radicais altamente reativos, como RO^{\cdot} e ROO^{\cdot} [16]. A HU, além de vários efeitos benéficos sobre a linhagem eritrocitária, como redução da expressão de moléculas de adesão da superfície de hemácias e de plaquetas, elevação da Hb F e de Hb total [36], recentemente, foi indicado também ser removedor dose dependente de radical $^{\cdot}OH$ [37]. A atividade da antioxidante enzimática da glutathione peroxidase (GPx), nos pacientes com AF tratados com HU é 90% maior que naqueles não tratados. A expressão de GPx induzida por HU foi demonstrada na cultura de células, sendo dependente da via de sinalização GMPc-ON e p53 [38]. Desse modo, há evidências de que tanto os quelantes de ferro como

o uso de HU possuem potente atividade antioxidante na AF. Muitos indivíduos, principalmente os de NOSP, seguidos dos de NOPR, utilizavam somente ácido fólico no período da coleta, o que pode ter elevado o nível de TBARS em relação ao grupo de LSP.

O nível de Hb F observado, embora maior no grupo de pacientes (Hb SS) de NOPR, não parece ter sido suficiente para promover a redução do desequilíbrio redox ao nível daquele verificado para o grupo de LSP. Essa elevação da Hb F pode ser atribuída à administração de HU, entretanto, a dose e o período do tratamento podem não ter sido suficientes para minimizar a polimerização da Hb S. Alguns autores têm sugerido que para eliminar completamente a polimerização da Hb S, são necessárias concentrações maiores que 25% de Hb F [39, 40], porém, o índice observado no nosso estudo foi aquém dessa taxa. A extensão da polimerização de Hb S desoxigenada está na dependência da concentração intracelular da Hb S e da não-S [39]. O quadro clínico de maior gravidade é manifestado quando a Hb S atinge uma concentração aproximada de 75% [41] e níveis de Hb F menores que 10%. A elevação de hemoglobinas que não interagem com as moléculas de Hb S, tais como a Hb F e Hb A dificultam a polimerização e a falcização, reduzindo a gravidade e intensidade das manifestações clínicas. Assim, nos pacientes que apresentam Hb A, embora em menor quantidade do que a Hb S, foi suficiente para inibir a formação de polímeros [42]. Os nossos resultados corroboram tais observações, visto que, a correlação positiva significativa entre Hb A e TEAC entre os grupos com Hb SS, sugerem o efeito protetor contra LPO na AF.

A crise de dor tem sido considerada importante parâmetro para estimar a gravidade da doença falciforme. Entretanto, neste estudo foram detectadas colelitíase e osteonecrose, aliada a elevado nível de TBARS, inclusive em indivíduos sem crise ou baixa taxa de crise álgica nos últimos três anos. Essas observações sugerem que a taxa de crise álgica independe do nível de TBARS e complicações clínicas. A natureza retrospectiva dessas informações pode ter incorrido em erro sistemático, porém os nossos dados corroboram os do Van Beers e colaboradores [44] que detectaram que as complicações clínicas e danos orgânicos em doentes falciformes não estão relacionados às crises álgicas e ocorrem mesmo em pacientes que parecem clinicamente estáveis.

Este estudo indica que os traços falciformes são favorecidos pela melhor capacidade de defesa antioxidante e menor agressão oxidativa. Esses resultados

corroboram os dados da literatura que demonstram melhor conservação do tocoferol, um dos principais antioxidantes do organismo, nos heterozigotos, conferindo assim melhor proteção contra LPO [44]. Enfatizamos ainda que, o grupo com Hb AS que apresentou maior nível na relação entre antioxidante/pró-oxidante foi a amostragem de NOSP. O melhor equilíbrio pró e antioxidante neste grupo, deve-se possivelmente ao fato de ser constituído por doadores de sangue, os quais devem preencher os requisitos que atestem bom estado de homeostase.

O estresse oxidativo desempenha importante papel na fisiopatologia da AF, visto que, mesmo na fase estável da doença, apesar da defesa antioxidante aumentada, foram evidenciados danos oxidativos. Tem sido reportado que os tratamentos com os agentes antioxidantes, tais como α -Tocoferol, vitamina C, N-acetyl L-cysteine, têm reduzido a LPO e proporcionado melhoras nas anormalidades induzidas por estresse oxidativo na AF [45]. No presente estudo, menor nível de estresse oxidativo foi observado no grupo de AF que utilizava combinação de antioxidantes, assim, sugere-se que o uso racional de antioxidantes poderia atenuar a gravidade clínica. Estudos envolvendo a dose adequada dos antioxidantes que atuam em sinergia para minimizar a LPO poderiam contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos doentes. Os portadores de Hb AS já dispõem de sistema antioxidante tão eficiente quanto o de portadores de Hb AA para manter o equilíbrio redox controlado.

Agradecimentos

Os autores agradecem as seguintes fundações pelo apoio financeiro: Ministério da Saúde (3072/2007) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (convênio 322/2009).

REFERÊNCIAS

1. Steinberg M, Brugnara C. Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease. *Annu Rev Med* 2003; 54:89-112.
2. Galiza Neto GC, Pitombeira MS. Molecular aspects for sickle cell. *J Bras Patol Medic Lab* 2003; 39: 51-56.
3. Cançado RD, Jesus JÁ. Sickle cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29: 203-06.

4. Simões BP, Pieroni F, Barros GMN, Machado CL et al. Brazilian Consensus Meeting on stem cell transplantation: hemoglobinopathies committee. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010; 32: 46-53.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes. Ministério da Saúde, Brasília, 2002.
6. Sousa PC. Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da HbS em eritrócitos de doentes falcêmicos. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2001; 23: 53-54.
7. Dasgupta T, Hebbel RP, Kaul DK. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 1771-80.
8. Frennete PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest Ann Arbor* 2007; 117: 850-58.
9. Booth C, Inusa B, Stephen KO. Infection in sickle cell disease: a review. *Int J Infect Dis*, 2010; 14: e2-e12.
10. Lang PA, Kempe DS, Tanneur V et al. Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 2005; 118: 1233-43.
11. De Jong K, Larkin SK, Styles LA, Bookchin RM, Kuypers FA. Characterization of the phosphatidylserine exposing subpopulation of sickle cells. *Blood* 2001; 98: 860-67.
12. Kato GJ, Hebbel RP, Steinberg MH, Gladwin MT. Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. *American Journal of Hematology* 2009; 84: 618-25.
13. Fibach E, Rachmilewitz E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. 2008; 8: 609-19.
14. Silva Filho IL, Gonçalves MS, Adorno EV, Campos DP, Fleury MK. Screening of abnormal hemoglobin and the evaluation of oxidative degeneration of hemoglobin among workers with the sickle cell trait (HbAS), exposed to occupational hazards. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2005; 27:183-87.
15. Ferreira ALA, Matsybara, LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* 1997; 43: 61-68.
16. Rice-Evans C, Omorphos SC, Baysal E. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J* 1986; 237: 265-69.
17. Jarolim PJ. Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin. *Blood* 1990; 76: 2125-31.

18. Pereira B. Oxygen free radical and its importance for the immunological functionality. *Motriz* 1996; 2: 71-79.
19. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-61.
20. Harris R. Regulations of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2675-83.
21. Lane PA, Githens JH. Splenic syndrome at mountain altitudes in sickle cell trait. Its occurrence in nonblack persons. *JAMA* 1985; 253: 2251-54.
22. Murao M, Ferraz MH. Sickle cell trait – heterozygous for the hemoglobin S. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007;29:223-25.
23. Tsaras G, Owusu-Ansah A, Boateng FO, Amoateng-Adjepong Y. Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. *Am J Med* 2009; 122: 507-12.
24. Block B, Dietrich M, Norkus EP et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 274-85.
25. Marengo-Rowe A J. Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Pathol* 1965; 18: 790-92.
26. Vella F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am J Clin Pathol* 1968; 49: 440-42.
27. Instruction manual of Bio-Rad. Variante β -Thalassemia short program instruction manual. Bio-rad laboratories, 2006.
28. Bonini-Domingos CR. Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias. 1ª ed., HN, São José do Rio Preto (SP), 2006.
29. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 1978; 86: 271-78.
30. Percário S, Vital ACC, Jablonka F. Dosagem do malondialdeído (MDA). *Newslab*, 1994; 2: 46-50.
31. Miller N, Rice-Evans C, Davies MJ et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; 84: 407-12.
32. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad BiolMed* 1999; 26:1231-37.
33. Brigelius-Flohe R. Commentary: oxidative stress reconsidered. *Genes Nutr* 2009; 4:161–163.

34. Shimauti ELT, Silva DGH, Almeida EA, Zamaro PJA, Belini Junior E, Bonini-Domingos CR. Serum melatonin level and oxidative e stress in sickle cell anemia. *Blood Cells, Mol Dis* 2010; 45: 297–301.
35. Manfredini V, Lazzaretti LL, Griebeler IH et al. Antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J Natl Med Assoc.* 2008; 100: 897-902.
36. Covas DM, Ângulo IL, Palma PVZ, Zago MA. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in suckle cell anemia. *Hematologica* 2004; 89: 273-280.
37. Liu YH, Liu YH, Wu WC, Lu YL, Lai YJ, Hou WC. Antioxidant and amine oxidase inhibitory activities of hydroxyurea. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74:1256-60.
38. Cho CS, Kato GJ, Yang SH et al. Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13:1-11.
39. Noguchi CT, Torchi DA, Schechter AN. Intracellular polymerization of sickle hemoglobin. Effects of cell heterogeneity. *J Clin Invest* 1983; 72: 846-52.
40. Atweh GF, Loukopoulos D. Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia. *Semin Hematol* 2001; 38: 367-73.
41. Fleury M. Beta globin haplotypes in sickle cell anemia in patients from Rio de Janeiro. *Clinical and laboratory aspects. RBAC* 2007; 39: 89-93.
42. Zago MA, Silva Pinto AC. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2007; 29: 207-14
43. Van Beers EJ, Van Tuijn CFG, Mac Gillavry MR, Van der Giessen A, Schnog JJB, Biemond BJ. Sickle cell disease-related organ damage occurs irrespective of pain rate: Implications for clinical practice. *Haematologica* 2008; 93: 757-760.
44. Sess ED, Carbonneau MA, Meité M et al. lipoperoxydation markers, inflammatory reaction proteins and sera tocopherol in sickle homozygous and heterozygous disease. *Bull Soc Pathol Exot* 1998; 91: 238-241.
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. *Br J Haematol* 2005; 132: 108-113.

4.4 ARTIGO IV

Influência da Talassemia $\alpha^{3.7}$ e dos haplótipos do gene β^S na capacidade antioxidante total, níveis de melatonina e peroxidação lipídica em portadores do gene β^S da globina

Perfil redox: efeito da talassemia e haplótipos

E.L.T. Shimauti^{1,2}, E. M. Souza³, E. A. Almeida⁴, C. R. Bonini-Domingos¹

¹ UNESP- Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética de Doenças Hematológicas, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

² UEM- Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Paraná, Brasil.

³ UEM- Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Estatística, Paraná, Brasil.

⁴ UNESP- Universidade Estadual Paulista, Departamento de Química e Ciências ambientais, São Paulo, Brasil.

Correspondência:

Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina

Av. Colombo, 5.790

Jardim Universitário

CEP: 87020-900 Maringá – Paraná – Brasil

Telefone: +55-44-3011-4800

E-mail: eltshimauti@uem.br

RESUMO

A heterogeneidade clínica da anemia falciforme (AF) parece depender dos fatores moduladores das concentrações de Hb S e de Hb F. O objetivo foi analisar o efeito da talassemia $-\alpha^{3.7}$ e dos haplótipos do gene β^S sobre capacidade antioxidante total, níveis séricos de melatonina e expressão fenotípica em indivíduos com Hb SS e Hb AS. Foram analisadas 17 amostras com Hb SS, 30 com Hb AS e 30 com Hb AA. Os haplótipos e a deleção $-\alpha^{3.7}$ foram identificados pela PCR-RFLP e PCR-multiplex, respectivamente; a capacidade antioxidante total em equivalência ao trolox (TEAC) e peroxidação lipídica (LPO) pelas dosagens bioquímicas; os níveis de melatonina pelo HPLC. A LPO, TEAC e melatonina não apresentaram diferença estatística entre os Bantu/Bantu e Bantu/Benin ($P>0,05$), bem como entre a Hb SS com talassemia $-\alpha^{3.7}$ e sem talassemia ($P>0,05$). A frequência de manifestações clínicas entre os haplótipos do gene β^S e entre os Hb SS/ $-\alpha^{3.7}$ e sem talassemia foram similares ($P>0,05$). Os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin estão associados a elevado nível de LPO e de capacidade antioxidante total, associados à redução no nível de melatonina. A talassemia $-\alpha^{3.7}$, quando coexiste com os haplótipos de maior gravidade clínica, parece não influenciar no equilíbrio pró e antioxidante. A interação entre Hb AS/ $(-\alpha/\alpha\alpha)$ resulta em redução significativa na concentração de Hb S, porém, não mostrou efeito sobre o estado redox. Os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin, bem como talassemia $-\alpha^{3.7}$ não influenciaram os níveis séricos de melatonina, a capacidade antioxidante total e expressão fenotípica.

Palavras chave: talassemia alfa, haplótipos, TBARS, TEAC, fenótipo.

INTRODUÇÃO

A hemoglobina S (Hb S), mutação causada pela transversão de GAG para GTG no sexto códon de cadeia β globina, em homozigose (Hb SS) é conhecida como anemia falciforme (AF), e em heterozigose (Hb AS) o traço falciforme (Frenette & Atweh, 2007). A desoxigenação da Hb S ocasiona a polimerização, enrijecimento celular, vaso-oclusão e eventos de isquemia e reperfusão. Esse processo leva à marcada resposta inflamatória caracterizada por geração de oxidantes endotelial e estresse oxidativo, que contribui para o dano em múltiplos

órgãos (Kaul et al., 2004). Devido à elevada tendência à auto-oxidação, e propensão para produzir oxidantes como ânion superóxido e radical hidroxila, a Hb S pode alterar o balanço redox e promover a peroxidação lipídica (LPO) da membrana eritrocitária e culminar em hemólise. Na anemia falciforme, quanto maior a gravidade clínica, maior a LPO, com significativa redução no sistema de defesa antioxidante, tais como melatonina, vitamina E, glutatona [GSH], entre outras (Dasgupta, Hebbel & Kaul, 2006; Shimauti et al., 2010). A melatonina tem ação tanto direta como indireta sobre as espécies reativas de oxigênio (ERO), ou em sinergismo com outros antioxidantes, induzindo assim à redução do estresse oxidativo (Reiter et al., 2000; Shimauti et al., 2010).

O curso clínico da anemia falciforme é extremamente heterogêneo, sendo consideradas algumas características genéticas como moduladores da gravidade clínica, tais como co-herança da talassemia α e haplótipos do complexo gênico da globina β^S . Estes parecem determinar os níveis da Hb S e da Hb fetal (Hb F), dificultando assim a polimerização intracelular da Hb S, e por conseguinte a redução da hemólise e vaso-occlusão (Steinberg & Embury, 1986). No Brasil, a causa mais freqüente da talassemia alfa é a deleção do gene $\alpha^{3,7}$ ($-\alpha^{3,7}$) (Sonati et al, 1991). São descritos pelo menos quatro haplótipos do gene da globina β^S denominados conforme a região de origem geográfica e sua prevalência. Os haplótipos Senegal e Árabe Indiano estão associados a curso clínico menos grave e à maior concentração de Hb F (>15%); o Benin tem curso clínico intermediário e está associado à Hb F com concentração entre 5% e 15%; o Bantu representa o pior prognóstico e níveis reduzidos de HbF (<5%) (Powars & Haiti, 1993). Apesar do consenso de que o traço falciforme é uma condição benigna, tem sido reportada a exteriorização clínica de grau variável, desde discreta até grave quando exposto às situações adversas, tais como hipóxia tecidual grave, acidose e desidratação (Tsaras, 2009). Assim, hipotetizamos que a expressão clínica variável, observada em indivíduos com Hb SS e Hb AS, depende da eficiência do mecanismo envolvido na detoxificação celular aliada à influência dos fatores moduladores das concentrações de Hb S e de Hb F. O objetivo deste estudo foi analisar a influência de talassemia alfa ($-\alpha^{3,7}$) e dos haplótipos do gene β^S na capacidade antioxidante total, níveis séricos de melatonina e expressão fenotípica em indivíduos com Hb SS e Hb AS.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Casuística

Foram selecionados 77 indivíduos, sem distinção de gênero, provenientes da região noroeste do estado do Paraná, Brasil. Destes, 17 eram portadores de Hb SS (idade entre 10 e 39 anos) provenientes do serviço de atendimento ambulatorial de Instituições de Saúde; 30 eram portadores de Hb AS (14 a 53 anos) constituídos por doadores voluntários de sangue; 30 indivíduos com Hb AA (11 a 55 anos), constituídos por estudantes, servidores de Instituição pública de ensino, com Hb acima do limite mínimo referencial para gênero e faixa etária (Lewis, Bain, Bates, 2006). O critério para a elegibilidade foi ser não fumantes, não gestantes, não etilistas, e para os indivíduos com Hb SS não ter sido submetido a processo transfusional nos últimos três meses que antecederam à coleta e estar na fase estável da doença. As informações referentes às medicações em uso, eventos clínicos e transfusões sanguíneas foram obtidas por meio da avaliação dos prontuários médicos das Instituições de Saúde, bem como pela aplicação de questionários no momento da coleta. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista do Estado de São Paulo, Brasil (nº 0025.0.229.000-07).

Amostras biológicas

Foram obtidos 20 mL de sangue periférico, após o consentimento informado, e distribuídos em tubos com EDTA K3 (4 mL), para as análises hematológicas, eletroforéticas, cromatográficas e moleculares; em heparina (7 mL), que após incubadas por 20 min a 37°C foram centrifugadas a 1 500 rpm por 20 min para obtenção do plasma, e o mesmo utilizado para dosagem de biomarcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante; tubos sem anticoagulante (9 mL) para a obtenção do soro, utilizado para a dosagem de melatonina. As amostras biológicas foram coletadas entre 6:30 e 7:30 do período matutino visando evitar a inibição da secreção de melatonina pela exposição à luz do dia.

Métodos

Perfil hemoglobínico e parâmetros hematológico

Os parâmetros hematológicos foram obtidos por meio de analisador automático de células sanguíneas (BC-300 PLUS™ – Mindray, China), e a análise microscópica por meio do esfregaço sanguíneo corado segundo método de May-Grunwald-Giemsa (Lewis, Bain, Bates, 2006). O perfil hemoglobínico qualitativo foi determinado por eletroforese em acetato de celulose em pH 8.4 (Marengo-Rowe, 1965), em pH 7,1 (Bonini-Domingos, 2006), e em agar-citrato a pH 6.2 (Vella, 1968). A quantificação das frações hemoglobínicas foi realizada por Cromatografia líquida de alta performance HPLC Variant™ - Beta Thal Short Program (Bio-Rad). A pesquisa citológica de HbH foi utilizada como teste complementar para a triagem de talassemia alfa. (Papayannopoulos & Stamatayannopoulos, 1974).

Identificação dos genótipos de Hb S, haplótipos gene β^S e talassemia $-\alpha^{3,7}$

A caracterização genotípica da Hb S foi realizada pela análise molecular, submetendo o DNA genômico extraído de leucócitos do sangue periférico com fenol/clorofórmio (Bonini-Domingos, 2006) à PCR-RFLP. A amplificação do segmento que codifica a Hb S foi realizada por *primers* específicos, e o segmento amplificado foi clivado com endonuclease de restrição *DdeI* (New England Biolabs, MA, USA) (Bonini-Domingos, 2006). Os haplótipos da globina β^S foram estabelecidos por meio de PCR-RFLP, utilizando-se seis sítios polimórficos de restrição 5' γ^G (*XmnI*), γ^G (*Hind III*), γ^A (*Hind III*), $\psi\beta$ (*Hinc II*), 3' $\psi\beta$ (*Hinc II*) e 5' β (*Hinf I*), segundo o método reportado por Sutton, Bouhassira & Nagel (1989). A deleção $-\alpha^{3,7}$ foi identificada por PCR-multiplex segundo o método descrito por Mendiburu (2005). Foram adicionados simultaneamente, em único tubo, os *primer* $\alpha_2/3,7F$: 5' CTGGCCAAACCATCACTTTT 3', localizada a 5' do gene α_2 , enquanto o *primer* α_2R : 5' GTGCAAGGAGGGGAGGAG 3', localizado a 3' do gene α_2 , e o *primer* 3,7R: 5' CTCCACTTTCCCTCCTCCAT 3', anela o extremo 3' do gene α_1 . Na presença do alelo normal (gene α_2) os *primers* $\alpha_2/3,7F$ e α_2R geram um fragmento de 1,8 Kb, enquanto que na presença do alelo $-\alpha^{3,7}$ os *primers* $\alpha_2/3,7F$ e 3,7R geram um fragmento de 2,1 Kb.

Análise bioquímica

O nível de peroxidação lipídica foi avaliado pela dosagem espectrofotométrica de substâncias reativas a ácido tiobarbitúrico (TBARS), no plasma, segundo o método descrito por Percário, Vital & Jablonka (1994). A capacidade antioxidante (TEAC) foi determinada no plasma, segundo a sua equivalência ao Trolox (ácido 6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchromono-2-Carboxylic, Aldrich Chemical Co 23881-3), um antioxidante análogo, sintético hidrossolúvel, da vitamina E. (RE et al., 1999). A concentração sérica de melatonina foi estabelecida por meio de HPLC acoplado a detector coulométrico eletroquímico (Coulchem III ESA modelo 526, Bedford, MA, USA) como reportado previamente (Shimauti et al., 2010).

Análise estatística

Para analisar a influência do gene epistático sobre a defesa antioxidante total, os indivíduos foram agrupados de acordo com a presença ou ausência da coherença de Hb S com talassemia $-\alpha^{3.7}$.

Para análise estatística foi utilizada *software* Statistica, versão 8.0, SAS. As amostras foram avaliadas quanto a normalidade e homocedasticidade. Utilizou-se os testes não paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*, complementado por Dunn. Para as análises de correlação foi utilizado o teste de correlação de Spearman. O nível de significância para os testes aplicados foi fixado em 5% ($\alpha=0.05$).

Resultados

Entre os indivíduos selecionados com anemia falciforme (Hb SS), nove (52,9%) utilizavam hidroxiuréia (HU), porém, não houve diferença estatística sobre os valores de Hb F ($P=0.199$), TEAC ($P=0.832$), melatonina ($P=0.962$) e TBARS ($P=0.835$). A idade e o gênero dos indivíduos que compunham os grupos de Hb SS, Hb AS e Hb AA também não influenciaram os níveis dos biomarcadores do estado redox ($P>0.05$) avaliados no experimento.

A frequência de talassemia $-\alpha^{3.7}$ entre os 17 Hb SS e os 30 Hb AS foi: sete (14,9%) com heterozigose para $-\alpha^{3.7}$ ($-\alpha/\alpha\alpha$) e um (2,1%) homozigoto ($-\alpha/-\alpha$). Quanto

aos haplótipos do gene β^S foram caracterizados como segue: seis (35,3%) Bantu/Bantu, sete (41,1%) Bantu/Benin, dois (11,8%) Benin/Benin, dois (11,8%) Bantu/Atípico. Não foram observados haplótipo Senegal ou Árabe Indiano na população estudada. Assim, do total de 34 cromossomos analisados, 21 (62%) corresponderam a haplótipo Bantu, 11 (32%) a Benin, e dois (6%) a haplótipos atípicos. As amostras foram agrupadas em Bantu/Bantu e Bantu/Benin, para análise da influência dos haplótipos sobre o estado redox, parâmetros hematológicos e expressão fenotípica.

A Tabela 1 mostra as características do perfil redox e aspecto hematológico de todas as amostras avaliadas. Nota-se que o nível sérico de melatonina, assim como TEAC e LPO dos indivíduos com Hb AS quando comparados com Hb AA não apresentaram diferença estatística ($P > 0.05$). Os portadores de Hb SS apresentaram marcante redução nos níveis de melatonina sérica (≤ 0.0009) e nítida elevação nos níveis de TEAC ($P \leq 0.007$) e LPO ($P < 0.0001$) quando comparados com os portadores de Hb AS e Hb AA.

A Tabela 2 demonstra o perfil antioxidante-oxidante e hematológico dos portadores de anemia falciforme, de acordo com os haplótipos e talassemia $-\alpha^{3.7}$. Na comparação entre os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin, somente os monócitos diferiram significativamente ($P = 0.03$). Entre os grupos com Hb SS/talassemia $-\alpha^{3.7}$ e Hb SS/ $(\alpha\alpha/\alpha\alpha)$, a diferença significativa incidiu somente no VCM e HCM ($P = 0.04$ e $P = 0.03$, respectivamente).

Tabela 1. Distribuição dos dados demográficos, laboratoriais de todos os indivíduos com anemia falciforme (Hb SS), traço falciforme (Hb AS) e sem hemoglobinopatias (Hb AA)

<i>Parametros</i>	<i>Hb SS</i> (n=17)	<i>Hb AS</i> (n=30)	<i>Hb AA</i> (n=30)
idade	22 (10-39)	37 (14-53)	27 (11-55)
TBARS (ng/mL)	863.4 ^a (496.8-2203)	470.6 ^b (280.8-2796.1)	485 ^b (270.2-676.3)
TEAC (mM/L)	2.00 ^a (1.86-2.10)	1.94 ^b (1.74 -2.03)	1.95 ^b (1.73-2.08)
Melatonina (pg/mL)	42.6 ^a (9.63-234.9)	116.2 ^b (6.63-633.8)	146 ^b (39.9-671.6)
Hb (g/dL)	7.6 ^a (5.9-9.7)	12.4 ^b (10.0-15.1)	13.7 ^b (11.5-15.4)
VCM (fL)	96.8 ^a (79.5-121.9)	84.8 ^b (76.0-94.0)	86.5 ^b (82-91.4)
HCM (pg)	31.2 ^a (24.8-40.4)	27.6 ^b (24.2-31)	28.5 ^b (27-30.1)
CHCM%	32.6 ^a (31-35.6)	32.8 ^a (31-34)	33.4 ^a (31.2-34.5)
Reticulócitos (%)	14.8±8.8 (6.30-36.9)	-	-
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	12.600 ^a (8.600-18.800)	7.650 ^b (4.300-10.900)	6.550 ^b (3.800-10.500)
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	6.090 ^a (4.472-11.280)	4.002 ^b (2.250-6.534)	3.454 ^b (1.504-7.144)
Monócitos x10 ⁹ /L	0.725 ^a (0.172-2.256)	0.358.5 ^b (0.138-0.830)	0.334 ^b (0.86-0.735)
Hb Fetal (%)	10.2 ^a (3.8-24.20)	0.0 (0.0-3.00)	2.15 ^c (0.0-2.60)
Hb S (%)	83.5 ^a (55.3-93.9)	36.6 ^b (28.7-40.5)	0.0
Hb A (%)	0.0 (0-33)	58.9 ^a (55-65.5)	95.4 ^b (95-97.6)

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TEAC- capacidade antioxidante total segundo equivalência ao Trolox; Hb- hemoglobina; VCM- volume corpuscular média; HCM- hemoglobina corpuscular média; CHCM- concentração de hemoglobinian corpuscular média. As mesmas letras indicam a diferença não significativa (P>0.05) e as letras diferentes indicam significância estatística (P<0.05). Teste de Kruskal-Wallis e Mann Whitney com nível de significância de 0.05.

Tabela 2. Perfil redox e características hematológicas dos portadores de Hb SS de acordo com os haplótipos do gene β^S e co-herança de talassemia $-\alpha^{3,7}$ e genótipo normal para α

Parâmetros	Bantu/Bantu (n=6)	Bantu/Benin (n=7)	P	SS(- α/α ; - α/α) (n=3)	SS($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (n=14)	P
TBARS (ng/mL)	910.9 (496.8-1970)	842.3 (635.5-2203)	NS	974.4 (635.5-2203)	852.8 (496.8-2097.1)	NS
TEAC (mM/L)	2,0 (1.96-2.05)	1.97 (1.86-2.1)	NS	2.03 (1.97-2.1)	1.99 (1.86-2.1)	NS
Melatonina (pg/mL)	44,8 (17-164)	39,2 (9.63-74.1)	NS	39.3 (15-69.9)	44.8 (9.6-234.9)	NS
Hb (g/dL)	8,1 (6.4-9.7)	7.6 (5.9-9.0)	NS	7.6 (6.7-9.0)	7.8 (5.9-9.7)	NS
VCM (fl)	102,7 (89.1-118.6)	92.9 (79.5-121.9)	NS	88.1 (79.5-92.9)	100.9 (80.7-121.9)	0.04
HCM (pg)	34,4 (28.2-38.3)	30.2 (24.8-40.4)	NS	29.9 (24.8-30.2)	32.9 (26.0-40.4)	0.03
CHCM (%)	32,4 (31-35.6)	33.2 (31.2-34.7)	NS	32.2 (31.3-34.3)	32.7 (31-35.6)	NS
Reticulócitos (%)	13,4 (7.3-36.9)	11.2 (6.3-28.6)	NS	12.1 (6.3-28.6)	11.2 (6.8-36.9)	NS
Hb F (%)	9,5 (3.8-15.9)	14.3 (1.2-24.2)	NS	15.1 (5.4-23)	9.8 (1.2-24.2)	NS
Hb S (%)	85,1 (55.3-8.9)	81.7 (71.7-93.9)	NS	80.2 (72.6-88.8)	89.9 (55.3-93.9)	NS
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	12.150 (8.800-18.800)	13.100 (8.600-15.500)	NS	13.100 (9.700-14.500)	12.300 (8.600-18.800)	NS
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	6,894 (4.536-11.092)	5.633 (4.386-8.370)	NS	5.633 (4.850-6.090)	6.202 (4.386-11.092)	NS
Monócitos ($\times 10^9/L$)	1.202 (0.54-2.256)	0.655 (0.172-1.085)	0.03	0.655 (0.291-0.725)	0.938 (0.172-2.256)	NS

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TEAC- capacidade antioxidante total segundo equivalência ao Trolox; Hb- hemoglobina; VCM- volume corpuscular média; HCM- hemoglobina corpuscular média; CHCM- concentração de hemoglobina corpuscular média; NS-não significativo ($P>0.05$); Teste de Mann Whitney com nível de significância de 0.05.

Os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin, revelaram a elevação estatisticamente significativa nos níveis de LPO e TEAC, e redução estatisticamente significativa de melatonina ($P\leq 0.0001$), comparados com o grupo com Hb AA (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos valores medianos da capacidade antioxidante e peroxidação lipídica dos haplótipos Bantu e Benin, comparados com o grupo controle (Hb AA)

	BAN/BEN+BAN/BAN (n=13)	Hb AA (n=30)	P
TEAC (mM/L)	2.00 (1.86-2.10)	1.95 (1.73-2.08)	0.0081
Melatonina (pg/mL)	42.63 (9.63-164)	146.51 (39.9-671.6)	0.0001
TBARS (ng/mL)	842.3 (496.8-2203)	491.8 (270.2-676.3)	0.0001

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TEAC- capacidade antioxidante total segundo equivalência ao Trolox; BAN/BEN-Bantu/Benin; BAN/BAN-Bantu/Bantu; Teste de Mann Whitney com nível de significância de 0.05.

Quanto aos traços falciformes, quando confrontados entre os grupos com co-herança de talassemia $-\alpha^{3.7}$ e sem talassemia, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TBARS, TEAC e melatonina ($P>0.05$). Entretanto diferiram nos índices hematimétricos e na concentração de Hb S e Hb A ($P\leq 0.05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil redox e características hematológicas dos portadores de Hb AS de acordo com a co-herança de talassemia $-\alpha^{3.7}$ e genótipo normal para α

Parâmetros	AS/ ($-\alpha/\alpha\alpha$) (n=5)	AS/ ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (n=25)	P
TBARS (ng/mL)	699 (338.9-932.1)	466 (280.8-2796.1)	NS
TEAC (mM/L)	1.92 (1.89-1.94)	1.96 (1.74-2.03)	NS
Melatonina (pg/mL)	228.5 (6.63-633.8)	106.8 (41.5-585.5)	NS
Hb (g/dL)	12.8 (10-13.8)	12.4 (10.4-15.1)	NS
VCM (fl)	79.6 (76.2-86.3)	85.3 (76-94)	0.02
HCM (pg)	25.4 (24.5-27.3)	27.8 (24,2-31,0)	0.05
CHCM (%)	31.9 (31-32.8)	32,9 (31-34)	0.01
Hb S (%)	33.1 (28.7-34.3)	37.1 (33.2-40.5)	0.001
Hb A (%)	62.4 (61.3-65.5)	58.6 (55-62.1)	0.002
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	7.700 (4.500-9.900)	7.600 (4.300-10.900)	NS
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	3.900 (2.250-6.534)	4.104 (2.279-6.075)	NS
Monócitos ($\times 10^9/L$)	0.396 (0.225-0.616)	0.357 (0.138-0.830)	NS
Hemac falc* (%)**	40	64	NS

* raras hemácias falciformes, forma reversível, localizadas na região entre corpo e cauda do esfregaço sanguíneo; ** freqüência de casos. TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TEAC- capacidade antioxidante total segundo equivalência ao Trolox; Hb- hemoglobina; VCM- volume corpuscular média; HCM- hemoglobina corpuscular média; CHCM- concentração de hemoglobian corpuscular média NS- não significativo ($P>0.05$); Teste de Mann Whitney com nível de significância de 0.05.

Na análise comparativa das manifestações clínicas entre os grupos com haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin, bem como entre Hb SS/Talassemia alfa, e sem talassemia, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi notada ($P>0.05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição das frequências das manifestações clínicas nos portadores de anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene β^S e co-herança de talassemia $-\alpha^{3.7}$ e genótipo normal para α

	BAN/BAN (n=6) %	BAN//BEN (n=7) %	P	SS/ $-\alpha^{3.7}$ (n=3) %	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (n=14) %	P
Úlcera de perna	0	14,3	NS	33,3	0	NS
Pneumonia	16.6	14.3	NS	33.3	25	NS
Esplenectomia	16.6	28.5	NS	33.3	28.5	NS
Colecistectomia/colelitíase	16.6	42.8	NS	33.3	28.5	NS
Derrame pleural	16.6	0	NS	0	7,1	NS
Síndrome torácica aguda	0	0	0	7,1	NS
Complicações cardíacas	33.3	57.1	NS	66.7	35.7	NS
Osteonecrose	33.3	14,3	NS	0	28.5	NS
Osteomielite	0	16,6	NS	0	7,1	NS
Dores articulares/musculares	50	57.1	NS	66.7	50	NS
Infecção urinária	16.6	0	NS	0	7,1	NS
Transfusão de hemácias*	50	85.7	NS	66.7	66.7	NS
Utilizam Hidroxiuréia	66.6	28.6	NS	0	64.2	NS
Crise algica - últimos três anos						
0-2	66.6	71.4		66.7	71.4	
3-5	33.3	28.6	NS	33.3	21.4	NS
≥ 6	0	0		0	7,1	

* Transfundida no período de 365 dias que precedeu à coleta; BAN/BEN-Bantu/Benin; BAN/BAN-Bantu/Bantu; NS-não significativo ($P>0.05$); Teste Exato de Fisher com nível de significância de 0.05.

Análise da correlação de Spearman revelou que: no grupo com haplótipos Bantu/Bantu, a correlação positiva foi notada entre as TBARS e HCM ($r=0.84$; $P=0.03$) e negativa entre TEAC e melatonina ($r= -0.91$; $P=0.01$), e Hb F e reticulócitos ($r= -0,9$; $P< 0.0001$). A forte correlação e o nível de significância próximo de 5%, credibiliza a associação entre monócitos e reticulócitos ($r=0.77$; $P=0.07$). No grupo com Bantu/Benin, foi observada a correlação positiva entre TEAC e reticulócitos ($r=0.73$; $P= 0.05$); TBARS e reticulócitos ($r=0.82$; $P=0.02$); TBARS e monócitos ($r=0.73$; $P= 0.05$) e Hb F e Hb ($r=0.83$; $P=0.01$). Os dados indicam que a LPO é diretamente associada ao grau de hemólise e à vasculopatia, induzida por componentes inflamatórios. No grupo com SS/talassemia- $\alpha^{3.7}$ a correlação positiva incidiu entre TBARS e TEAC ($r=0.9$; $P<0.0001$) e TBARS e reticulócitos ($r=0.9$; $P<0.0001$), e correlação negativa entre TBARS e Hb ($r= -0.9$; $P<0,0001$). Indicativo de que quanto menor o grau de anemia, menor o nível de LPO, e a capacidade antioxidante total é preservada para responder à LPO. No grupo com Hb

SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), a correlação negativa foi notada entre HbF e Hb S ($r = -0.64$; $p = 0.012$), indica que, o nível de Hb F modula a concentração de Hb S intraeritrocitária com maior tendência à polimerização. No grupo com Hb AS/talassemia $-\alpha^{3.7}$ a correlação positiva foi detectada entre HbS e CHCM ($r = 0.9$; $P = 0.03$) e negativa entre TBARS e VCM ($r = -0.9$; $P = 0.03$) e TBARS e HCM ($r = -0.9$; $P < 0.0001$). Os dados sugerem que a redução no volume celular tende a elevar o nível de LPO.

Discussão

Os resultados mostram que entre os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin não há diferença estatisticamente significativa nos níveis de LPO, capacidade antioxidante total e melatonina. Porém, quando comparados com o grupo controle, nota-se que estão associados a elevados níveis de LPO e capacidade antioxidante total, e ao reduzido nível de melatonina, indicando assim, importante estresse oxidativo. Resultado similar foi demonstrado por Rusanova et al. (2010), em que os haplótipos Bantu e Benin estavam relacionados a elevado nível de LPO, porém com redução nas atividades de antioxidantes. O estresse oxidativo intenso resulta em rápida queda no nível de melatonina sérica por ser rapidamente metabolizada pela interação ERO (Tan et al., 2007). A correlação negativa observada entre a defesa antioxidante total e a melatonina, no haplótipo Bantu/Bantu, sugere a ação sinérgica da melatonina com os antioxidantes clássicos. A melatonina aumenta a ação protetora dos antioxidantes, como vitamina E, vitamina C e glutathione reduzido (GSH), contra a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados mediados por radicais livres (Gitto et al., 2001). Outros estudos também têm demonstrado que a melatonina contribui para capacidade antioxidante total, aumentando o seu nível sérico (Reiter, Manchester & Tan, 2005).

Os monócitos, na anemia falciforme, são responsáveis pela ativação das células endoteliais, atuando como gatilho para a translocação do fator nuclear de transcrição (NF- κ B) (Belcher et al., 2000). O endotélio vascular assim ativado expressa moléculas de adesão ICAM-I, VCAM-I, P-selectina e E-selectina, e fator tissular pró-coagulante, que desempenham papel significativo na fisiopatologia da vaso-oclusão em indivíduos com Hb SS. A forte correlação positiva observada entre monócitos e reticulócitos, sugere que quanto maior a taxa de hemólise, maior é a resposta inflamatória e mais vulnerável é a instalação da vasculopatia. Assim,

sugere-se que em indivíduos com os haplótipos Bantu/Bantu a influencia dos monócitos em pré-dispor o endotélio para o estado inflamatório é mais evidente que em indivíduos com o haplótipo Bantu/Benin, tornando mais vulnerável ao dano oxidativo orgânico.

O haplótipo Bantu/Bantu está associado à maior freqüência de complicações clínicas (Powars, 1991). Entretanto, em consonância com outros estudos, não observamos diferença significativa nas manifestações clínicas avaliadas, bem como nos valores de Hb F, entre os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin para a população avaliada (Rieder et al., 1991; Figueiredo et al., 1996; Silva & Gonçalves, 2010).

Estudos de efeitos da talassemia alfa, em especial da deleção $-\alpha^{3.7}$ sobre os fatores clínicos e hematológicos nos portadores de Hb SS, têm produzido resultados conflitantes. Os dados deste estudo mostraram a não influência da mutação sobre os níveis de pró e antioxidantes e manifestações clínicas. Entretanto, o grau de estresse oxidativo, os níveis de capacidade antioxidante total e de melatonina apresentaram-se reduzidos em portadores de homozigose para $-\alpha^{3.7}(-\alpha/-\alpha)$, quando comparados aos heterozigotos para a deleção ($-\alpha/\alpha\alpha$). Assim, o número de deleção dos genes α poderia beneficiar o curso clínico da AF. Quanto aos dados hematológicos, a similaridade nos níveis de CHCM, Hb e de reticulócitos entre os indivíduos com $-\alpha^{3.7}$, comparados com os portadores de genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, indicam que a hemólise e a anemia não foram atenuadas. Outros estudos são discordantes em alguns aspectos pois detectaram a redução na taxa hemolítica (Higgs et al, 1982; Belisário et al., 2010), ou nenhuma diferença foi notada entre a talassemia $-\alpha^{3.7}$ e $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ (Mouélé et al., 1999). Essas diferenças se devem possivelmente ao grau de comprometimento de deleção de genes $\alpha^{3.7}$ envolvido na população estudada. A correlação inversa entre TBARS e Hb e associação direta entre reticulócitos e TBARS sugerem que a talassemia $-\alpha^{3.7}$, ao abrandar a hemólise e atenuaria a peroxidação lipídica nos indivíduos avaliados.

A co-herança da talassemia $-\alpha^{3.7}$ com Hb SS tende a diminuir a freqüência de ulcera de pernas e síndrome torácica aguda (STA), e em contrapartida, aumentar o risco de osteonecrose e esplenomegalia quando comparados com a não talassemia (Higgs et al., 1982; Powars, 1991; Fertrin & Costa, 2010). Na nossa casuística não foram registradas síndrome torácica aguda, osteonecrose e acidente vascular

encefálico, porém, foi notada maior frequência de úlcera de perna, pneumonia e complicações hepato-esplênicas no grupo com $-\alpha^{3.7}$ em comparação com $(\alpha\alpha/\alpha\alpha)$, embora sem significância estatística. Por outro lado a HU, que promove a elevação no nível de Hb F e protege a polimerização da Hb S, era utilizada com maior frequência entre os não talassêmicos e pelos indivíduos com haplótipo Bantu/Bantu, reflexo da gravidade clínica nesses grupos.

Nos portadores de traços falciformes, a influência do genótipo $-\alpha^{3.7}$ incidiu sobre a concentração de Hb S e nos níveis de VCM, HCM e CHCM como já reportado (Costa e Zago, 1989; Wambua et al., 2006; Tsaras et al., 2009), porém não mostrou efeito sobre o estado redox. A redução no nível de Hb S pode influenciar a gravidade de certas complicações clínicas, e a diminuição de CHCM, retardar a polimerização de Hb S (Steinberg & Embury, 1986). Os portadores do traço falciforme estão sujeitos a desenvolver complicações microvasculares associadas à altitude, exercício extremo, entre outros (Das et al., 1993). Assim, há registros de hematúria, necrose papilar renal, infarto esplênico, hipostenúria e rabdomiólise (Tsaras et al., 2009). Na nossa casuística não foi registrada nenhuma manifestação clínica associada ao traço falciforme. Estudos apontam que os eritrócitos de indivíduos com Hb AS apresentam maior suscetibilidade à oxidação em comparação aos com Hb AA (Das et al., 1993). A correlação inversa entre TBARS e VCM e TBARS e HCM sugere que a deleção $-\alpha^{3.7}$ tende a desenvolver a LPO nos indivíduos avaliados com Hb AS.

Conclusões

O sistema de defesa antioxidante, níveis de melatonina e TEAC, são insuficientes para conter a elevada LPO associadas aos haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin na anemia falciforme. A talassemia $-\alpha^{3.7}$, quando coexiste com Hb SS associados aos haplótipos de maior gravidade clínica, parece não atenuar satisfatoriamente o desequilíbrio pró e antioxidante. Os dados sugerem que a interação entre a Hb AS/ $(-\alpha/\alpha\alpha)$ não propicia maior proteção contra o processo oxidativo. A expressão fenotípica entre os haplótipos analisados e entre a interação da Hb SS com talassemia $-\alpha^{3.7}$ foram similares. Os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin, bem como talassemia $-\alpha^{3.7}$ não influenciaram os níveis séricos de melatonina, a capacidade antioxidante total e expressão fenotípica.

Agradecimentos

Os autores agradecem as seguintes fundações pelo apoio financeiro: Ministério da Saúde (3072/2007); Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná (Processo 5636/2009); Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (convênio 322/2009).

REFERÊNCIAS

- Belcher J.D., Marker P.H., Weber J.P., Hebbel R.P. & Vercellotti G.M. (2000) Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood* 96, 2451-2459.
- Belisário A.R., Rodrigues C.V., Martins M.L., Silva C.M., Viana M.B. (2010) Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. *Hemoglobin* 34, 516-529.
- Bonni-Domingos C. R. (2006) Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias. 1th edn. Ed.HN São José do Rio Preto.
- Costa F.F., Zago M.A. Deletion type α -Thalassemia among brazilian patients with sickle cell anemia (1989) *Rev Brasil Genet* 12,605-611.
- Dasgupta T., Hebbel R. P., Kaul D. K. (2006) Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radical. Biology & Medicine* 41,1771-1780.
- Das SK, Hinds JE, Hardy RE, Collins JC, Mukherjee S. (1993) Effects of physical stress on peroxide scavengers in normal and sickle cell trait erythrocytes. *Free Radic Biol Med* 14, 139-47.
- Fertrin KY, Costa FF. (2010) Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol* 3, 443-58.
- Figueiredo M.S., Kerbauy J., Gonçalves M.S.; Arruda V.R.; Saad S.T.O.; Sonati M.F.; Stoming T. & Costa F.F. (1996) Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia Brazil. *Am J Hematol* 53, 72-76.
- Frenette P.S., Atweh G.F. (2007) Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest* 117, 850-858.
- Gitto E., Tan D.X., Reiter R.J., Karbownik M., Manchester L.C., Cuzzocrea S., Fulia F. & Barberi I. (2001) Individual and synergistic actions of melatonin: studies with

vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. *J Pharm Pharmacol* 53, 1393-1401.

Higgs D.R., Beverley E.A., Lamb J.,B., Weatherall D.J., Hayes R.J., Grandison Y., Lowrie Y.,Mason K.P.,Serjeant B.E. & Swerjeant G.R. (1982) The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *N Engl J Med* 306, 1441-1446.

Kaul D.K., Liu X., Choong S., Belcher J.D., Vercellotti G.M. & Hebbel R.P.(2004) Anti-inflammatory therapy ameliorates leukocyte adhesion and microvascular flow abnormalities in transgenic sickle mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H293-H301.

Lewis M.S., Bain B.J., Bates I. (2006) *Hematologia Prática de Dacie e Lewis*. 9th edn. ARTMED Editora S.A., São Paulo.

Marengo-Rowe A. J. (1965) Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Pathol*, London.18, 790-792.

Mendiburu C.F. (2005) Estudo da talassemia do tipo alfa em dois estados das regiões nordeste e sudeste do Brasil. Dissertação de mestrado em Genética. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

Mouélé R., Boukila V., Fourcade V., Feinogold J. & Galactéros F. (1999) Sickle-cell disease in Brazzaville, Congo: genetical, hematological, biochemical and clinical aspects. *Acta Haematol* 101,178-84.

Papayannopoulos R., Stamatoyannopoulos G. (1974) Stains for inclusions bodies. In *Standardization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies*. Atlanta: Hew publications.

Percário S., Vital A. C. C., Jablonka, F. (1994) Dosagem do malondialdeído (MDA). *Newslab* 2, p. 46-50.

Powars D.R. (1991) Beta S-gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. *Hematol Oncol Clin North Am* 5, 475-493.

Powars D., Hiti A. (1993). Sickle cell anemia. Beta S gene cluster haplotypes as genic markers for severe disease expression. *Am J Dis Child* 147, 1197-1202.

RE, R. et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 26, 1231-1237.

Reiter R.J., Tan D., Osuna C. & Gitto E. (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 7, 444-458.

Reiter R.J., Manchester L.C., Tan D.X. (2005) Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition* 21, 920-924.

Rieder R.F., Safaya S., Gillette P., Fryd S., Hsu H., Adams J.G. & Steinberg M.H. (1991) Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. *Am J Hematol* 36, 184-189.

Rusanova I., Escames G., Cossio G., de Borace R.G., Moreno B., Chahboune M., López L.C., Díez T. & Acuña-Castroviejo D. (2010) Oxidative stress status, clinical outcome, and β -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. *Eur J Haema Eur JHaematol* 85,529-37.

Silva L.B., & Gonçalves R.P. (2010) Phenotypic characteristics of patients with sickle cell anemia related to β^S -Globin gene haplotypes in Fortaleza, Ceara 32, 40-44.

Sonati M.F., Farah S.B., Ramalho A.S.; Costa, F.F. (1991) High prevalence of alpha thalassemia in a black population in Brazil. *Hemoglobin*, 309-311.

Shimauti E.L.T., Silva D.G.H., Almeida, E.A., Zamaro, P.J.A., Belini Junior, E. & Bonini-Domingos C.R. (2010) Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia. *Blood cells Mol Dis* 45, 297-301.

Steinberg M.H., Embury S.H. (1986) α -thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. *Blood* 68, 985-990.

Sutton M, Bouhassira E. F., Nagel R. L. (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 32, 66-69.

Tan D.X., Manchester L.C., Terron M.P., Flores L. J. & Reiter R.J. (2007) One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive and nitrogen species? *J Pineal Res* 42, 28-42.

Tsaras G., Owusu-Ansah A., Boateng F.O., Amoateng-Adjepong, Y. (2009) Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. *Am j med* 122, 507-512.

Vella F. (1968) Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. *Am J Clin Pathol* 49, 440-442.

Wambua S., Mwcharo J., Uyoga S., Macharia A. & Williams T.N. (2006) Co-inheritance of α^+ - thalassemia and sickle trait results in specific effects on haematological parameters. *Br J Haematol* 133, 206-209.

5 Discussão geral

Os resultados demonstraram a redução no nível sérico de melatonina, associado a elevado nível de capacidade antioxidante total e marcante estresse oxidativo nos indivíduos com Hb SS, na fase estável da doença, comparado a grupo controle. A correlação positiva entre os níveis de TBARS e TEAC sugere que a melatonina atua em sinergia com outros antioxidantes. Outros estudos evidenciam que a combinação de melatonina com vitamina C, E, resveratrol, neutraliza os radicais livres e potencializa o efeito protetor contra o dano oxidativo (GITTO, E. et al., 2001; MAHARAJ; GLASS; DAYA, 2007; KWON et al., 2010; KWON et al., 2011). Assim, há indicação de que a melatonina sérica influencia a elevação da capacidade antioxidante total tanto nos humanos quanto no modelo animal (BENOT et al., 1999; REITER; MANCHESTER; TAN, 2005). A redução do nível de melatonina observada no presente estudo, possivelmente foi ocasionada pelo consumo excessivo para promover a elevação do sistema de defesa antioxidante, na tentativa de deter a ERO. A resposta adaptativa do sistema de defesa antioxidante total à elevada quantidade de ERO, em indivíduos com Hb SS, parece ser insuficiente para reverter o desequilíbrio redox. Esses dados, demonstrados pela primeira vez, sugerem o papel protetor da melatonina contra o estresse oxidativo nos indivíduos com Hb SS. Consistente com os dados reportados, este estudo demonstrou que os indivíduos com Hb SS, na fase estável da doença, apresentaram dano oxidativo apesar da defesa antioxidante total aumentada, ratificando desse modo o estresse oxidativo crônico na anemia falciforme (MANFREDINI et al., 2008).

O curso clínico da anemia falciforme varia consideravelmente entre os pacientes, embora a alteração molecular seja a mesma (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003). São documentados vários indicadores como possíveis moduladores desta variabilidade fenotípica na anemia falciforme, entre os quais a talassemia alfa e os haplótipos do grupamento do gene da globina beta (GUPTA et al., 1991; NAOUM, 2000; FLEURY, 2007). Este estudo demonstrou que o haplótipo mais predominante entre os portadores da anemia falciforme, residentes na região noroeste do Paraná, é o Bantu, seguido de Benin. Estes haplótipos são associados ao curso clínico de maior gravidade e de gravidade intermediária, respectivamente (ELION et al., 1992; POWARS, 1991; POWARS; HAITI, 1993; GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003). Os dados apontam que os níveis de LPO, TEAC e melatonina

entre os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin não diferiram. Estes haplótipos estão associados a elevado nível de LPO e capacidade antioxidante total, associado à redução no nível de melatonina, quando comparados com o grupo controle (Hb AA), indicando assim a gravidade clínica similar entre os mesmos. Esses resultados estão em consonância com o estudo desenvolvido por Rusanova et al. (2010), em que os haplótipos Bantu e Benin estão associados a elevado nível de estresse oxidativo. Quanto às manifestações clínicas, concordante com outros estudos, não foi observada diferença significativa entre os haplótipos Bantu e Benin (RIEDER et al., 1991; FIGUEIREDO et al., 1996; SILVA; Gonçalves, 2010). Isso sugere que o haplótipo Bantu/Benin exerce o mesmo efeito sobre o estado redox e sobre a expressão clínica como no Bantu/Bantu.

A freqüência de heterozigotos ($-\alpha/\alpha\alpha$) e de homozigotos ($-\alpha/-\alpha$) para talassemia $-\alpha^{3.7}$, entre a amostragem com hemoglobinopatia S, foi similar aos resultados obtidos por Figueiredo et al. (1996) e Bezerra et al. (2007). A co-herança entre a talassemia $\alpha^{3.7}$ ($-\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha/-\alpha$) e Hb SS, parece não influenciar o estado redox e manifestações clínicas na anemia falciforme. Entretanto, nota-se que o grau de estresse oxidativo, o nível da capacidade antioxidante total e da melatonina estão reduzidos no genótipo $-\alpha/-\alpha$, comparado aos $-\alpha/\alpha\alpha$. Desse modo, presume-se que a homozigose para a deleção $\alpha^{3.7}$ ($-\alpha/-\alpha$) possa abrandar o curso clínico nos portadores de Hb SS. A correlação inversa entre TBARS e Hb, e associação direta entre reticulócitos e TBARS reforçam a sugestão de que a talassemia $-\alpha^{3.7}$ pode abrandar a hemólise e atenuar a LPO. Outros estudos têm registrado a redução na taxa hemolítica (HIGGS et al, 1982; BELISÁRIO et al., 2010), ou nenhuma diferença é detectada no quadro hematológico, na comparação entre a talassemia $-\alpha^{3.7}$ e sem talassemia ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) (MOUÉLÉ et al., 1999). Essas diferenças possivelmente estão relacionadas ao número de deleção de genes $-\alpha^{3.7}$ da população estudada.

A interação de Hb AS/ $(-\alpha/\alpha\alpha)$, consistente com outros estudos, revelou a redução significativa na concentração de Hb S e nos níveis de VCM e CHCM, comparados a não talassemia (COSTA; ZAGO, 1989; WAMBUA et al., 2006; TSARAS et al., 2009). A redução no nível de Hb S pode atenuar a gravidade de certas complicações clínicas associadas à hipóxia grave, acidose, desidratação decorrentes de circunstâncias excepcionais (DAS et al., 1993). E a diminuição de CHCM, pode retardar a polimerização de Hb S (STEINBERG; EMBURY, 1986). Os

eritrócitos de Hb AS apresentam maior suscetibilidade à oxidação em comparação aos de Hb AA (DAS et al., 1993), entretanto, no nosso estudo, os níveis dos biomarcadores do balanço redox não diferiram entre os grupos com Hb AS/ talassemia $-\alpha^{3.7}$ e HbAS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$).

Os níveis de estresse oxidativo do grupo com Hb SS, quando comparados entre os procedentes das regiões sul e sudeste do país, apresentaram diferença significativa. Os dados sugerem que os diferentes tratamentos instituídos para cada grupo de estudo, influenciaram na variabilidade do perfil oxidante-antioxidante. A combinação de agentes farmacológicos com propriedades antioxidantes, quelador de ferro e HU, este último com propriedade neutralizadora de radical HO[•] (LIU et al., 2010), aliada ao processo transfusional, foi mais adequada, pois promoveu a melhora no estado redox. Outros estudos, realizados *in vitro* e *in vivo*, também propõem a combinação de diferentes agentes antioxidantes, como vitamina C com vitamina E, entre outros, para atenuar os sintomas clínicos da anemia falciforme (OHNISHI; OHNISHI, 2001; CHAVES; LEONART; DO NASCIMENTO, 2008). Várias alternativas terapêuticas têm sido direcionadas para a supressão de danos oxidativos nos pacientes com doença falciforme. Estas têm sido fundamentadas no bloqueio dos radicais livres, na inativação de metais ou enzimas e interrupção da LPO, por meio da utilização do quelador de ferro, (RICE-EVANS; OMORPHOS; BAYSAL, 1986), N acetil cisteína, vitamina E, (AMER et al., 2005), entre outros.

Os portadores do traço falciforme apresentam balanço redox compatível com o grupo controle. Esses resultados corroboram os dados da literatura que demonstram a melhor conservação de antioxidantes nos heterozigotos, conferindo assim a maior eficácia na defesa antioxidante e melhor proteção contra a lipoperoxidação (SESS et al., 1998). Os dados sugerem que o equilíbrio redox nos portadores de Hb AS está associado ao estado homeostático, que implica em boas condições nutricionais e ambientais.

6 Conclusões

- Na amostragem da região noroeste do estado do Paraná, o haplótipo Bantu/Benin é o mais prevalente, seguido de Bantu/Bantu, Benin/Benin e Bantu/Atípico. Nesta população os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin, não influenciaram os níveis séricos de melatonina, capacidade antioxidante total e expressão fenotípica.
- Entre os portadores do gene β^S , a co-herança da talassemia $\alpha^{3.7}$ em heterozigose ($-\alpha/\alpha\alpha$) é mais prevalente em relação a homozigose ($-\alpha/-\alpha$). A talassemia $\alpha^{3.7}$ não influencia os níveis séricos de melatonina, TEAC e manifestações clínicas na população estudada, porém a forma homozigota ($-\alpha/-\alpha$) mostra a tendência para minimizar o grau de hemólise, LPO e capacidade antioxidante total.
- Os indivíduos com Hb SS da região noroeste do estado do Paraná, na fase estável da doença, apresentam níveis significativamente elevados de LPO e de capacidade antioxidante total; enquanto os portadores de Hb AS não apresentam o dequilíbrio redox.
- A comparação de estados oxidativos entre os indivíduos com Hb SS de diferentes localidades, indicam que a utilização combinada de agentes farmacológicos com propriedades antioxidantes, atenua o nível de LPO e eleva a capacidade antioxidante; nos portadores com Hb AS, a otimização do balanço redox está associada ao equilíbrio homeostático que depende de fatores nutricionais e ambientais.
- Os níveis séricos de melatonina estão reduzidos nos portadores de Hb SS, na fase estável da doença, porém nenhuma diferença é observada nos indivíduos com Hb AS quando comparados com o grupo controle.

REFERÊNCIAS

ALLEGRA, M. et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **J. Pineal. Res.**, Copenhagen, v. 34, no. 1, p. 1-10, 2003.

AMER, J. et al. Red blood cells platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **Br J Haematol**, Oxford, v. 132, p. 108-113, 2005.

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, no. 3, p. 853-856, 1984.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVIS, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quími. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BELINI JUNIOR, E. **Estresse oxidativo em doentes falciformes**: influência dos haplótipos e uso de medicação específica. 2010. 164f. Dissertação (Mestrado em Genética)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 2010.

BELISÁRIO, A.R. et al. Coinheritance of α -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. **Hemoglobin**, New York, v. 34, p. 516-529, 2010.

BENOT, S. et al. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. **J. Pineal Res**, Copenhagen, v. 27, p. 59-64, 1999.

BEZERRA, M.A. et al. Molecular variations linked to the grouping of β - and α - globin genes in neonatal patients with sickle cell disease in the state of Pernambuco, Brazil. **Hemoglobin**, New York, v. 31, no. 1, p. 83-88, 2007.

BLOCK, B. et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. **Am. J. Epidemiol.**, Cary, v. 156, n. 3, p. 274-285, 2002.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias**. São José do Rio Preto: Ed. HN, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa de anemia falciforme**: Portaria MS nº 951 de 10 de maio de 1996. Brasília, DF, 1996.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.

CANÇADO, R.D. Doenças falciformes. **Prática Hospitalar**. São Paulo, ano IX, no. 50, p. 61-64, 2007.

- CHAVES, M. A.; LEONART, M. S.; DO NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**, Newark, v. 13, no. 3, p. 187-192, 2008.
- CHEBLOUNE, Y. et al. Structural Analysis of the 5' Flanking Region of the β -globin Gene in African Sickle Cell Anemia Patients: Further Evidence for Three Origins of the Sickle Cell Mutation in Africa. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, v. 85, n^o. 12, p. 4431-4435, 1988.
- CHINELATO-FERNANDES, A. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. The contribution of molecular studies of S-like hemoglobins to knowledge of the genetic diversity of the Brazilian population. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Rio de Janeiro, v. 27, no. 3, p. 208-212, 2005.
- CHUI, D. H. K.; FUCHAROEN, S.; CHAN, V. Hemoglobin H disease: not necessarily a benign disorder. **Blood**, Washington, DC, v.10, no. 3, p.791-800, 2003.
- COSTA, F.F.; ZAGO, M.A. Deletion type α -Thalassemia among Brazilian patients with sickle cell anemia. **Rev Brasil Genet**, Rio Preto, v. 12, p. 605-611, 1989.
- CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. **Curr. Top. Med. Chem.**, Hilversum, v. 2, no. 2, p. 153-165, 2002.
- DAS et al. Effects of physical stress on peroxide scavengers in normal and sickle cell trait erythrocytes. **Free Radic Biol Med**, New York, v. 14, p.139-47, 1993.
- DASGUPTA, T.; HEBBEL, R. P.; KAUL, D. K. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. **Free radic. biol. med**, New York, v. 41, p. 1771-1780, 2006.
- DROBNIK, J. et al. Pharmacological doses of melatonin reduce the glycosaminoglycan level within the infarcted heart. **Journal of physiology and pharmacology**, Kraków, v. 62, no. 1, p. 29-35, 2011.
- ELION, J, et al. DNA sequence variation in a negative control region 5' to the β -globin gene correlates with the phenotypic expression of the β^S mutation. **Blood**, Washington, DC., v. 79, no. 3, p. 787-792, 1992.
- FABRON, A. J. Morbidade do traço falciforme. **Bol. Soc. Bras. Hemot.**, Rio de Janeiro, v. 139, no. 8, p. 93-95, 1986.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERTRIN, K. Y.; COSTA, F. F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Rev Hematol**, London, v. 3, p. 443-458, 2010.

FIGUEIREDO, et al. Effect of α -thalassemia and β -globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia Brazil. **Am J Hematol**, New York, v. 53, p. 72-76, 1996.

FIGUEIREDO, M.S. Modifiers factors of clinical severity in sickle cell anemia. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 29, no. 3, p. 215-217, 2007.

FLEURY, M.K. Beta globin haplotypes in sickle cell anemia in patients from Rio de Janeiro: clinical and laboratory aspects. **RBAC**, São Paulo, v. 39, no. 2, p. 89-93, 2007.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 117. no. 4, p. 850-858, 2007.

GALIZA NETO, G.C.; PITOMBEIRA, M.S. Molecular aspects for sickle cell. **J Bras Patol Medic Lab**, Rio de Janeiro, v. 39, no. 1 , p. 51-56, 2003.

GITTO, E. et al. individual and synergistic actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. **J Pharm Pharmacol**, London, no. 53, p. 1393-1401, 2001.

GUNEY, M.; ERDEMOGLU, E.; MUNGAN, T. Selenium-vitamin E combination and melatonin modulates Diabetes-Induced blood oxidative damage and fetal outcomes in pregnant rats. **Biol Trace Elem Res.**, Clifton, 2011. No prelo.

GUPTA, A. K. et al. Effects of α Thalassemia and sickle polymerization tendency on the urine-concentrating defect of individuals with sickle cell trait. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 88, p. 1963-1968, 1991.

HARTEVELD, C.; HIGGS, D.R. α -Thalassemia. **OJRD**, V.5, N.13, P. 3-21, 2010. Disponível em: < <http://www.ojrd.com/content/5/1/13>>. Acesso em: 11 mai. 2011.

HEBBEL, R.P. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v.70, no. 6, p.1253-1259, 1982.

HIGGS, et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **N Engl J Med**, Boston, v. 306, p. 1441-1446, 1982.

INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD. **Variant β -thalassemia short program**. California: Bio Rad Laboratories, 2006

JAROLIM, P.J. et al. Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin. **Blood**, Washington, DC, v.76, no. 10, p. 2125-2131, 1990.

JONG, K. et al. Characterization of the phosphatidylserine exposing subpopulation of sickle cells. **Blood**, Washington, DC., v. 98, no. 3, p. 860-867, 2001.

KATO, G.J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease:

reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood**, Washington, DC, v.21, p. 37-47, 2007.

KATO, G. J. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **Am J Hematol**, New York, v. 84, no. 9, p. 618-625, 2009.

KLINGS, E.S.; FARBER, H.W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Respiratory Research**, Pennsylvania, v. 2, p. 280-285, 2001.

KULOZIK, A.E. et al. Geographical survey of b^S globin gene haplotypes: evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. **Am J Hum Genet**, Chicago, v. 39, no. 2, p.239-244, 1986.

KURCER, Z. et al. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. **J. Pineal Res.**, Copenhagen, v. 43, n. 2, p. 172-178, 2007.

KWON, K.J. et al. Melatonin Potentiates the Neuroprotective Properties of Resveratrol Against Beta-Amyloid-Induced Neurodegeneration by Modulating AMP-Activated Protein Kinase Pathways. **J Clin Neurol**, Heidelberg, v. 6, no .3, p. 127-137, 2010.

KWON, K.J. et al. Melatonin synergistically increases resveratrol-induced the inhibition of ubiquitin dependent proteasome pathway: a possible role in neuroprotection. **J Pineal Res.**, Copenhagen, v. 50, no. 2, p. 110-123, 2011.

LAGANA, A. et al. Sensitive assay for melatonin in human serum by liquid chromatography. **Anal Chim Acta**, Amsterdam, v. 316, p. 377-385, 1995.

LANE, P. A.; GITHENS, J. H. Splenic syndrome at mountain altitudes in sickle cell trait. Its occurrence in nonblack persons. **JAMA**, Chicago, v. 253, no. 15, p. 2251-2254, 1985.

LAPOUMÉROULIE, C. et al. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Human Genetics**, New York, v. 89, no.3, p. 333-337, 1992.

LERVOLINO, L.G. et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in nacional neonatal screening studies. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 1, no. 33, p. 49-54, 2011.

LEWIS, M.S.; BAIN, B.J.; BATES I. **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 572 p.

LIU Y.H. et al. Antioxidant and amine oxidase inhibitory activities of hydroxyurea. **Biosci Biotechnol Biochem**, Tokio, no. 74, p. 1256-1260, 2010.

LIU, S.C.; ZHAI, S.; PALEK, J. Detection of heme release during hemoglobin S denaturation. **Blood**, Washington, DC, v. 71, n. 6, p. 1755-1758, 1988.

LORENZI, T.F. **Atlas de Hematologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 659 p.

MAHARAJ, D.S.; GLASS, B.D.; DAYA, S. Melatonin: now places in therapy. **Biosci Rep**, v. 27, p. 299-320, 2007.

MALDONADO, M.D. et al. The potential of melatonin in inducing morbidity-mortality after craniocerebral trauma. **J Pineal Res**, Copenhagen, v. 42, no.1, p. 1-11, 2007.

MANFREDINI, V. et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **J. Natl Med Assoc**, Silver Spring, v. 100, no. 8, p. 897-902, 2008.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of hemoglobin on cellulose acetate. **J. Clin. Pathol.**, London, v.18, no. 6, p. 790-792, 1965.

MARENGO-ROWE, A.J. Structure-function relations of human hemoglobins. **Proc Bayl Univ Med Cent**, Dallas, v. 19, p. 239-245, 2006.

MARTINS, P.R.J.; MORAES-SOUZA, H.; SILVEIRA, T.B. Morbidity-mortality in sickle cell disease. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v.32, no. 5, p. 378-383, 2010.

MENDIBURU, CF. **Estudo das talassemias do tipo alfa em dois estados das regiões nordeste e sudeste do Brasil**. 2005. Dissertação (Mestrado em Genética)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2005.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. biochem**, New York, v. 86, p. 271-278, 1978.

MILLER, N. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.**, Oxford, v. 84, no. 4, p. 407-412, 1993.

MOUÉLÉ, R. et al. Sickle-cell disease in Brazzaville, Congo: genetical, hematological, biochemical and clinical aspects. **Acta Haematol**, Basel, v. 101, p.178-84, 1999.

MUÑOZ-CASARES, F.C. et al. Melatonin reduces apoptosis and necrosis induced by ischemia/reperfusion injury of the pancreas. **J Pineal Res**, Copenhagen, v. 40, no. 3, p. 195-203, 2006.

NAGEL, R.L.; RANNEY, H.M. Genetic epidemiology of structural mutations of the beta-globin gene. **Semin Hematol**, Orlando, v. 4, p. 342-359, 1990.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. 171 p.

NAOUM, P.C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Talassemia alfa. **Laes & Haes**, São Paulo, v. 3, n. 113, p. 70-98, 1998.

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

NUZZO, D.V.; FONSECA, S.F. Sickle cell disease and infection. **J. pediatr**, Rio de Janeiro, v. 80, no. 5, p. 347-354, 2004.

OHNISHI, S.T.; OHNISHI, T. In vitro effects of aged garlic extract and other nutritional supplements on sickle erythrocytes. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 131, p. 10855-10925, 2001.

OLIVEIRA, G. L. V.; MENDIBURU, C. F.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Avaliação do perfil hematológico de portadores de talassemia alfa provenientes das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 2, p. 105-109, 2006.

ONUJI, J. et al. Inhibition of 5-aminolevulinic acid-induced DNA damage by melatonin, N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine, quercetin or resveratrol. **J Pineal Res.**, Copenhagen, v. 38, no. 2, p. 107-115, 2005.

ORLANDO, G.M. et al., Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 22, no. 2, p. 111-121, 2000.

PAGNIER, J. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc Natl Acad Sci** Washington, DC., v. 81, no. 6, p. 1771-1773, 1984.

PAPAYANNOPOULOS, R.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Stains for inclusions bodies. In:_____. **Standartization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies**. Atlanta: Hew publications, 1974.

PERCÁRIO, S.; VITAL, A. C. C.; JABLONKA, F. Dosagem do malondialdeído (MDA). **NewsLab**, São Paulo, v. 2, n. 6, p. 46-50, 1994.

POWARS, D.R. Sickle cell anemia: beta S-gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. **Semin Hematol**, Orlando, v. 28, no. 3, p. 202-208, 1991.

POWARS, D.; HAITI, A. Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. **Am J Dis Child**, Chicago, v. 147, no.11, p. 1197-202, 1993.

RAMALHO, A.S.; MAGNA, L.A.; PAIVA e SILVA, R.B. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinas em saúde pública no Brasil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1195-1199, 2003.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. Med.**, New York, v. 26, no. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REITER, R.J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **J Biomed Sci.**, Dordrecht, v. 7, no. 6, p. 444-458, 2000.

REITER, R.J.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. **Nutrition**, New York, v. 21, no. 9, p. 920-924, 2005.

RICE-EVANS, C.; OMORPHOS, S.C.; BAYSAL, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. **Biochem J.**, London, v. 237, no. 1, p. 265-269, 1986.

RIEDER, R.F. et al. Effect of beta-globin gene cluster haplotype on the hematological and clinical features of sickle cell anemia. **Am J Hematol**, New York, v. 36, p. 184-189, 1991.

RUSANOVA, I. et al. Oxidative stress status, clinical outcome, and β -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **Eur J Haematol**, Hoboken, v. 85, p. 529-37, 2010.

SCHECHTER, A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, Washington, DC, v.112, no.10, p. 3927-3928, 2008.

SEIXAS, F.A.V. et al. Incidence of hemoglobinopathies in Northwest Paraná, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 30, no. 4, 287-291, 2008.

SESS, E. D. et al. Markers of lipid peroxidation, inflammatory proteins and plasma tocopherols in homozygotic and heterozygotic sickle cell anemia. **Bull Soc Pathol Exot.**, França, v. 91, no. 3, p. 238-241, 1998.

SHIMAUTI, E. L. T. et al. Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, Amsterdam, v. 45, no. 4, p. 297-301, 2010.

SILVA, D. G. H., et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol. Dis**, Amsterdam, 2011. No prelo.

SILVA FILHO, I. L. et al. Hemoglobinopatias em trabalhadores expostos a riscos ocupacionais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 300-301, 2002.

SILVA FILHO, I. L. et. al. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (Hb AS), expostos a riscos ocupacionais. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 27, n. 3, p. 183-187, 2005.

SILVA FILHO, I. L. et al. The frequency of β -globin gene haplotypes, α -thalassemia and genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase, factor V Leiden

and prothrombin genes in children with sickle cell disease in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 32, no. 1, p. 76-78, 2010.

SILVA, L.B.; GONÇALVES, R.P. Phenotypic characteristics of patients with sickle cell anemia related to β^S -Globin gene haplotypes in Fortaleza, Ceara. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 32, no. 1, p. 40-44, 2010.

SIMÕES, B.P. et al. Brazilian Consensus Meeting on Stem Cell Transplantation: Hemoglobinopathies Committee. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 32, no.1, p. 46-53, 2010.

SONATI, M.F.; FARAH, S.B.; RAMALHO, A.S.; COSTA, F.F. High prevalence of alpha thalassemia in a black population in Brazil. **Hemoglobin**, New York, v. 15, p. 309-311, 1991.

SONATI, M.F.; COSTA, F.F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **J. pediatr**, v. 84, no. 4, p. 40-51, 2008.

SOUSA, P. C. Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da HbS em eritrócitos de doentes falcêmicos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 53-53, 2001.

STEINBERG, M.H.; EMBURY, S.H. α -thalassemia in blacks: genetic and clinical aspects and interactions with the sickle hemoglobin gene. **Blood**, Washington, DC, v. 68, p. 985-990, 1986.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. F.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. **Am. J. Hematol.**, New York, v. 32, no. 1, p. 66-69, 1989.

TAN, D. X. et al. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. **Biol. Signals. Recept.**, Basel, v. 9, no. 3-4, p. 137-159, 2000.

TAN, D. X. et. al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. **FASEB J.**, Bethesda, v. 15, p. 2294-2296, 2001.

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulating effect of melatonin on antioxidative enzymes. **J. Pineal Res.**, Copenhagen, v. 39, no. 2, p. 99-104, 2005.

TSARAS, G.; OWUSU-ANSAH, A.; BOATENG, F.O.; AMOATENG-ADJEPONG, Y. Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. **Am J Med**, New York, v. 122, no. 6, p. 507-512, 2009.

URBINATI, F.; CATHERINE, M.; MALIK, P. pathophysiology and therapy for hemoglobinopathies. Part II:Thalassaemias. **Expert Rev Mol Med**, New Jersey, v. 8, p. 1-26, 2006. Disponível em: [URL:<http://journals.cambridge.org/abstractS1462399406010805>](http://journals.cambridge.org/abstractS1462399406010805). Acesso em 25 jan. 2011.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v. 49, no. 3, p. 440-442, 1968.

WAMBUA, S. et al. Co-inheritance of alpha+-thalassaemia and sickle trait results in specific effects on haematological parameters. **Br J Haematol**, Oxford, v. 133, no. 2, p. 206-209, 2006.

WENNING, M.R.S.C. et al. α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 33, no. 9, p. 1041-1045, 2000.

YU, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.**, Baltimore, v. 74, p. 139-161, 1994.

ZAGO, M. A. Talassemias. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. cap. 31, p. 309-328.

ZAGO, M.A.; SILVA PINTO, A.C. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan dysfunction. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Santos, v. 29, no. 3, p. 207-214, 2007.

Anexo

Anexo A - Métodos

1 Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatia S e Talassemia alfa

1.1 Avaliações quantitativas e qualitativas das células sanguíneas.

Os parâmetros hematológicos (eritrócitos, Hb, hematócrito, índices hematimétricos, leucometria global) foram obtidos por meio de analisador automático de células sanguíneas BC-300 PLUS – Mindray, segundo as instruções do fabricante. A contagem diferencial dos leucócitos e avaliação qualitativa da morfologia dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas foram realizadas por meio da microscopia óptica no esfregaço sanguíneo corado segundo método de May-Grünwald-Giemsa.

1.1.2 Método de Coloração de May-Grünwald-Giemsa (LEWIS, BAIN, BATES, 2006)

Os corantes derivados do Romanowsky, os mais utilizados em hematologia, são constituídos por misturas de corantes básicos, as tiazinas (o azul de metileno e seus derivados) e corantes ácidos, as eosinas. As estruturas celulares ácidas como ácido ribonucléico e ácido desoxiribonucléico deixam corar pelos corantes básicos (cor azul), e as estruturas celulares básicas, como hemoglobina, se deixam corar pelos corantes ácidos (cor alaranjada). Além destas, há estruturas celulares azurófilas e neutrófilas que tem afinidade aos corantes azuro e neutros (eosinato de azul de metileno), respectivamente. O método de coloração de May-Grunwald – Giemsa associa o corante de May-Grunwald, pouco específico para o núcleo, com o de Giemsa que apresenta afinidade nuclear.

Solução corante de May-Grünwald

Eosina azul de metileno segundo May-Grünwald	0,3g
Álcool metílico absoluto	100mL

Dissolver o corante em 100mL de metanol a 37°C, agitando várias vezes até a completa dissolução. Após o repouso por 24h, filtrar a solução corante e está pronta para o uso.

Solução corante de Giemsa

Corante de Giemsa em pó	1,0g
Álcool metílico absoluto	100mL

Dissolver o corante em pó em 100mL de metanol a 50°C por 15 minutos, agitando ocasionalmente. Filtrar a solução e diluir em água tamponada na hora de utilizar, na proporção de 1 gota para 1 ml de água tamponada.

Tampão fosfato para coloração hematológica, pH 6,8

Fosfato Monopotássico (KH_2PO_4)	1,0 g
Fosfato Dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3,0 g
Água destilada q.s.p	1.000 mL

Dissolver completamente os sais em água destilada e medir o pH.

Procedimento:

1. Cobrir completamente o esfregaço com a solução corante May-Grünwald e deixar por 4 a 5 minutos; fase de fixação.
2. Escorrer o corante.
3. Cobrir o esfregaço com o corante de Giemsa recém diluído (1 gota de corante para 1 ml de água tamponada) e deixar por 10 minutos.
4. Lavar a lâmina no próprio suporte de coloração, com água de torneira.
5. Limpar com gaze embebida em álcool comum o lado não corado da lâmina.
6. Colocar em escorredor de Lâminas e deixar secar ao ar.

1.2 Preparação de hemolisados (BONINI-DOMINGOS, 2006)

Para que as amostras fossem submetidas aos procedimentos eletroforéticos, os eritrócitos foram lisados para a obtenção da solução de hemoglobinas, de acordo com as seguintes metodologias:

- Hemolisado rápido – com saponina
- Solução de hemoglobina – com clorofórmio

1.2.1 Hemolisado rápido com saponina

Esse procedimento é o mais indicado para a realização da triagem. Não é aconselhável utilizá-lo para dosagens bioquímicas de hemoglobinas, especialmente de Hb Fetal. Reativo hemolisante:

Saponina PA	1g
Água destilada	100mL

Procedimento

1. Para amostras de sangue com hematócrito acima de 40%, misturou-se 1 volume de sangue com 2 volumes de reativo hemolisante.
2. Para amostras de sangue com hematócrito entre 30 e 40%, misturou-se 1 volume de sangue com 1 volume de reativo hemolisante.
3. Para amostras de sangue com hematócrito abaixo de 30%, misturou-se 2 volumes de sangue com 1 volume de reativo hemolisante.

A homogenização foi processada até a hemólise completa da mistura. O hemolisado pode ser utilizado após 5 minutos, e no máximo 24 horas depois da sua preparação. Esta solução de hemolisado foi utilizada para eletroforese em pH alcalino.

1.2.2 Solução de hemoglobina com Clorofórmio

1. 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, após desprezou-se o sobrenadante. O processo foi repetido três vezes.
2. Ao volume de eritrócitos lavados adicionou-se igual volume de água destilada, homogeneizando a solução. A seguir adicionou-se um volume de clorofórmio, idêntico ao do hemolisado formado. 3-A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000 rpm por 15 minutos.

A solução de hemoglobina sobrenadante, ou hemolisado foi retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo limpo com a identificação da amostra. A concentração do hemolisado, preparado conforme metodologia apresentada variou entre 10 e 15g/dl. Esta solução de hemolisado foi utilizada para eletroforese de diferenciação de Hb em pH ácido.

1.3 Eletroforese em pH alcalino (BONINI-DOMINGOS, 2006)

É uma técnica utilizada para qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e grande parte das anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes.

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO, pH 8,5

Tris hidroximetil aminometano	10,2g
Ácido etilenodiaminotetracético	0,6g
Ácido Bórico	3,2g
Água destilada	1000mL

Solução corante: Ponceau

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

Solução descorante

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

Procedimento:

1. As fitas de acetato de celulose foram embebidas por 15 minutos no mínimo e no máximo por seis horas, em tampão TEB pH 8,5;
2. Em seguida, as fitas foram secas entre duas folhas de papel absorvente e foram colocadas na cuba de eletroforese, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multiuso);
3. As amostras de soluções de hemoglobinas foram aplicadas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;
4. Passam-se 300 volts por 30 minutos.

As frações foram analisadas inicialmente sem coloração e posteriormente coradas com Ponceau, embebendo as fitas em solução corantes por cinco minutos,

e posteriormente em solução descorante de ácido acético a 5%, por 30 minutos com agitação da vasilha.

1.4 Testes de triagem para Talassemia alfa

1.4.1 Eletroforese em acetato de celulose pH neutro (BONINI-DOMINGOS, 2006)

É uma técnica utilizada para qualificação e quantificação da hemoglobina H e Bart's.

Reagentes:

Tampão pH neutro

KH ₂ PO ₄	3,11 g
Na ₂ HPO ₄	1,66 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Procedimento:

1. As fitas de acetato de celulose foram embebidas por quinze minutos, no mínimo, em tampão neutro.
2. O mesmo tampão foi colocado nos compartimentos eletrolíticos da cuba de eletroforese.
3. As fitas foram secas entre duas folhas de papel absorvente e colocadas na cuba de eletroforese conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por meio de tiras de tecido absorvente (pano multiuso).
4. As amostras de solução de hemoglobina foram aplicadas a 1,0 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;
5. Passam-se 300 Volts por 30 minutos;
6. As frações hemoglobínicas foram analisadas sem coloração.

1.4.2 Pesquisa de agregados de Hemoglobina H (PAPAYANNOPOULOS; STAMATAYANNOPOULOS, 1974)

Os corpúsculos de inclusão de hemoglobina H são formados por precipitação do tetrâmero de cadeias beta oriundos da desnaturação. Após coloração esses corpúsculos apresentam-se dispostos homoganeamente no interior dos eritrócitos como pequenos pontos azulados.

Reagentes:

Solução salina

Cloreto de sódio	0,9g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução citrato

Citrato de sódio	2,2g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução de Azul Cresil Brilhante

Azul Cresil brilhante	1,0g
Solução salina	100 mL
Solução citrato	25 mL

Procedimento:

1. Foram colocados 50 μ L de sangue total em tubo de ensaio pequeno e adicionados 50 μ L de solução de azul Cresil brilhante. Em seguida o tubo foi agitado suavemente.
2. O material foi incubado a 37°C por 60 minutos.
3. Após o período de incubação, foram confeccionados esfregaços finos e examinados ao microscópio em objetiva de imersão.

1.5 Eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968)

Fundamento:

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

Reagentes:

Solução tampão fosfato pH 6,2

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

Esta solução foi utilizada nos compartimentos eletrolíticos, bem como na preparação do gel de agar.

Gel de Agar-fosfato

Agar-ágar (DIFCO)	200 mg
Tampão fosfato pH 6,2	20 ml

Procedimento:

1. O agar foi dissolvido no tampão por meio de frasco de Erlenmeyer de 250 mL, levando-o ao forno microondas tomando cuidado para não ferver, até completa dissolução.
2. Pipetou-se 3,5 ml do gel liquefeito em lâminas de microscópio. Deixou-se gelificar à temperatura ambiente.
3. Aplicou-se as amostras (solução de hemoglobina) na porção média da lâmina introduzindo verticalmente o aplicador no gel, observando o cuidado de não atingir a lâmina.
4. Colocou-se a lâmina na cuba de eletroforese e fez a conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos utilizando o tecido absorvente (pano multiuso);
5. Passou-se 150 volts por 30 minutos minutos.
6. Analisou-se o fracionamento, inicialmente sem corar.
7. Posteriormente corou-se com Ponceau S por 20 minutos para melhor interpretação das frações.
8. Descorou-se com ácido acético 10%.

1.5 Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (BONINI-DOMINGOS, 2006)

Fundamento:

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD Laboratories) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. A HPLC, neste equipamento, consiste da 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, que é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impresso.

Procedimento:

Misturou-se, em um tubo, 5 μ L de sangue total com 1 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Após hemólise total, foram acondicionados nos recipientes adequados e alojados no equipamento para realização dos procedimentos de leitura e análise das frações hemoglobínicas.

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 referência para frações de Hb obtidas por HPLC (ONDEI, ZAMARO, MANGONARO et al., 2007)

Para amostras com HbAA:

Hb A: 93,8% a 98,2 % ; HbA₂: 2,0% a 3,5%; HbF: 0,0 a 1,3%.

Para as amostras com HbAS: a HbA₂: 2,9% a 5,2%

Para as amostras com HbSS: a HbA₂: 0,8% a 5,6%

1.6 Metodologias Moleculares

1.6.1 Extração do DNA (BONINI-DOMINGOS, 2006)

Fundamento:

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:

Solução de lise 1 (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

Solução de lise 2 (utilizado na lise de células brancas)

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

Proteinase K (20 mg/mL)

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

Conservar em freezer.

Fenol

Clorofórmio : álcool isoamílico (24:1)

Etanol 70%

KCl 2M

Procedimento:

De 300µL a 1mL de amostras de sangue periférico, colhidas em EDTA, foram colocadas em microtubos e o volume foi completado para 1.5 mL com solução de lise 1. Após homogeneização, foi centrifugado por 5 minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi acrescentado solução de Lise 1 até completar 1mL. Após homogeneização deixou em repouso por 10 minutos e centrifugado por 5 minutos a 6500rpm. Essa etapa foi repetida por mais uma vez. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e foram acrescentados ao

precipitado 450ul de solução de Lise 2, 25µl de SDS a 10% e 5µL de proteinase K 20 mg/ml. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por 3 horas a 42°C.

Após esse período de incubação, foram adicionados 500ul de fenol, o material foi centrifugado por 5 minutos a 7000rpm. Em seguida, 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 5 minutos a 7000 rpm. Esse último passo foi repetido por mais uma vez. O sobrenadante foi colocado em microtubo contendo 50µl de solução de KCl 2M gelada e acrescentados 500µL de etanol 100% bem gelado. O microtubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA.

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

1.6.2 Confirmação molecular da Hb S

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (BONINI-DOMINGOS, 2006)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica para amplificação, *in vitro*, que sintetiza, enzimaticamente, seqüências específicas de DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares, sob a ação da enzima DNA polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde. A reação utiliza dois oligonucleotídeos iniciadores complementares que se hibridizam em fitas opostas e flanqueiam a seqüência de DNA a ser amplificada.

A PCR é realizada submetendo a mistura de reagentes a vários ciclos de amplificação que consistem em desnaturação do DNA (94°C a 96°C por 1 a 5 minutos), anelamento (50°C a 65°C por 30 segundo a 1 minuto) e extensão dos oligonucleotídeos, pela *Taq* polimerase (72°C por 2 a 5 minutos) resultando em um acúmulo exponencial de um fragmento específico de DNA.

Detecção de mutante homozigoto para Hb S por PCR-RFLP (BONINI-DOMINGOS, 2006)

As amostras com perfil eletroforético e cromatográfico compatíveis com HbSS foram submetidas à PCR seguida de análise de restrição para detecção da mutação. Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação que envolve o códon 6 foram: oligonucleotídeo P 277 (sense): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' oligonucleotídeo P 278 (antisense): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'.

A PCR foi realizada em um volume final de 25,0µL contendo 200 ng/µL de DNA genômico, 0,05 mM de cada dNTP, 1X de tampão sem MgCl₂, 6 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 0,06 U de Taq Polimerase (Invitrogen). As condições da reação de amplificação incluiu desnaturação prévia de 95°C por 5', acrescida de 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 63°C por 1 minuto para anelamento, 72°C por 1 minuto para extensão, e extensão final de 1 ciclo de 72°C por 1 minuto e 4°C ∞. Após a amplificação, o fragmento de 382 pb foi digerido a 37 °C *over night* no "mix" que 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. 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.

Detecção de mutante heterozigoto para Hb S por PCR-AE (BONINI-DOMINGOS, 2006)

As amostras com perfil eletroforético e cromatográfico compatíveis com HbAS foram submetidas à PCR-AE. Esta técnica permite detectar diretamente a mutação responsável pelas doenças genéticas, tendo como vantagem a não utilização de enzimas de restrição, e os resultados são visualizados após uma simples migração eletroforética.

Para detecção do genótipo AS foram utilizados dois tubos para cada amostra de DNA. A reação ocorreu em um volume final de 25 µL com tampão (1X); 0,16mM de cada dNTP; 3mM de MgCl₂; 1,2% de dimetilsufóxido (DMSO); 0,02U de TaqDNApolimerase; 200ng/µL de DNA genômico; e 0,3 µM de cada *primer*, sendo

no tubo 1 adicionados os oligonucleotídeos B5a:5' – GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A – 3', B5b: 5' – AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A –3' e BA: 5' – CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCT C – 3'; e no tubo 2 os mesmos oligonucleotídeos; com a substituição do BA pelo BS: 5' – CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCA – 3'.

O processo de amplificação foi realizada por uma desnaturação prévia de 94°C por 3 minutos, acrescida de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos, e seguida de uma extensão final a 72°C por 10 minutos e 4°C ∞. A análise do produto amplificado foi verificada em gel de agarose 1,5% sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, evidenciado com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. Observou-se como produto de amplificação uma banda controle de 660 pb, presente nos dois tubos, que caracteriza a validade e efetividade da reação, e uma banda de 216pb que aparece na dependência do oligonucleotídeo utilizado, o que permite caracterizar os diferentes genótipos. Isto é, a não amplificação deste trecho, 216 pb, significa não haver trecho pesquisado. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Perkin Elmer 2400.

1.6.3 Análise dos Haplótipos do grupamento de gene β^S (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989)

A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR – RFLP. Para os haplótipos β^S foram analisados seis sítios polimórficos, segundo Sutton, Bouhassira, Nagel (1989). 5' γ^G (*XmnI*), γ^G (*Hind III*), γ^A (*Hind III*), $\psi\beta$ (*Hinc II*), 3' $\psi\beta$ (*Hinc II*) e 5' β (*Hinf I*). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação de regiões do grupamento do gene β descritas por Sutton, Bouhassira, Nagel (1989) estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos para amplificação de regiões do grupamento β^S : localização referente ao grupamento β^S no cromossomo 11 depositados no banco de dados NCBI (ID: U01317).

<i>Primer</i>	<i>Sequência do Primer (5' - 3')</i>	<i>Direção</i>	<i>Posição</i>	
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	33862	5' γ^G
H1	AGGAGCTTATTGATAACCTCAG	←	34518	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	→	36203	γ^G
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	←	35422	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	40358	γ^A
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	41119	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	46426	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	47126	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	49476	3' $\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	50089	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	60906	5' β
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	61291	

→: sense; ← anti-sense.

A PCR foi realizada em um volume final de 25,0 μ L contendo 120 ng/ μ L de DNA genômico. As concentrações finais de reagentes utilizadas em volume final de reação, bem como as condições de amplificação estão representadas na Tabela 3 e 4 respectivamente.

Tabela 2. Distribuição da concentração final de reagentes utilizada na reação de amplificação para cada sítio polimórfico do grupamento gene β^S

<i>Componentes</i>	Xmnl	Hind III	Hind III	Hinc II	Hinc II	Hinf I
	5' γ^G	γ^G	γ^A	$\psi\beta$	3' $\psi\beta$	5' β
Tampão	1X	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	2,5mM	2mM	2mM	2mM	2mM	2,5mM
dNTPs	0,2mM	0,3mM	0,3mM	0,3mM	0,3mM	0,2mM
<i>Primer 5'</i>	0,25 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M
<i>Primer 3'</i>	0,25 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 μ M
TaqPolimerase	0,04U	0,05U	0,05U	0,05U	0,05U	0,03U

Tabela 3. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do grupamento do gene da globina β^S

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"	60	1'	72	1'	72	7'
γ^A	94	5'	94	30"	60	1'	72	1'	72	7'
$\psi\beta$	94	5'	94	30"	60	1'	72	1'	72	7'
3' $\psi\beta$	94	5'	94	30"	57	1'	72	1'	72	7'
5' β	94	10'	94	45"	57	45"	72	1'30"	72	10'

O produto da PCR foi digerido a 37°C *over night*, 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%, sob corrente constante de 100V por 40 minutos, evidenciado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Cada amostra foi marcada pela presença (+) ou ausência (-) dos sítios de restrição. O tamanho dos produtos de amplificação e de fragmentos de restrição podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Oligonucleotídeos e enzimas para detecção dos haplótipos de Hb S; regiões dos sítios polimórficos; tamanho dos fragmentos gerados antes e após a clivagem.

Primers	Enzima	Região	Tamanho Fragmento	Fragmentos após clivagem
H0 e H1	<i>XmnI</i>	5' γ^G	650 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>HindIII</i>	γ^G	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>HindIII</i>	γ^A	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>HincII</i>	$\psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>HincII</i>	3' $\psi\beta$	590 pb	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>HinfI</i>	5' β	380 pb	240 pb + 140 pb

De acordo com o perfil de restrição para as regiões polimórficas do grupamento do gene da globina β^S , é possível definir os haplótipos do gene da globina β^S . A reação de amplificação foi realizada no termociclador Biosystems.

1.6.4 PCR-Multiplex para identificação da deleção $-\alpha^{3.7}$

Esta técnica permite identificar o alelo normal (gene α_2) e deleção $-\alpha^{3.7}$ em uma mesma reação de amplificação. Foi realizada a amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos (figura 1). O oligonucleotídeo $\alpha_2/3.7F$, 5' CTGGCCAAACCATCACTTTT 3', localiza-se a 5' do gene α_2 (nt.32684-32699, GI 14523048 do GenBank), enquanto que o oligonucleotídeo α_2R , 5' GTGCAAGGAGGGGAGGAG 3', está localizado a 3' do gene α_2 (nt. 34515-34530, GI 14523048 GenBank) e o oligonucleotídeo 3.7R, 5' CTCCACTTTCCTCCTCCAT 3', anela no extremo 3' do gene α_1 (nt. 38517-38532, GI 14523048 GenBank). Na presença do alelo normal (gene α_2) os oligonucleotídeos $\alpha_2/3.7F$ e α_2R geram um fragmento de 1.8Kb, enquanto que na presença do alelo $-\alpha^{3.7}$ os oligonucleotídeos $\alpha_2/3.7F$ e 3.7R geram um fragmento de 2.1kb.

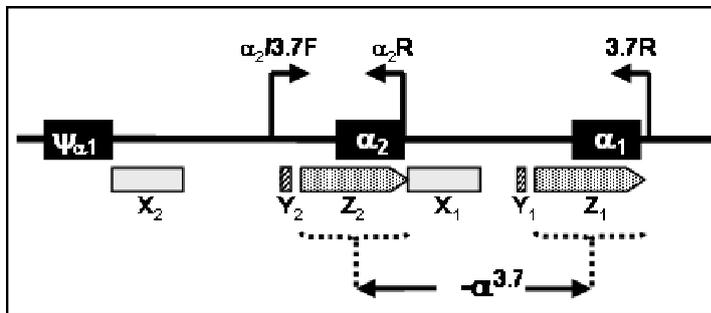


Figura 1. Representação gráfica das localizações dos oligonucleotídeos específicos para a identificação da deleção $-\alpha^{3.7}$ por PCR-multiplex (Adaptado de Mendiburu, 2005).

A reação de PCR-multiplex ocorreu em um volume final de 25 μ L com tampão sem $MgCl_2$ (1X); 0,1 mM (A+T) e 0,2 mM (C+G) de dNTP; 4 mM de $MgCl_2$; 8% de dimetilsulfóxido (DMSO); 10mM de β -mercaptoetanol; 0,05U de TaqDNA Polimerase (Biotools); aproximadamente 240ng/ μ L de DNA genômico; 1,6 μ M de oligonucleotídeo $\alpha_2/3,7F$; 0,8 μ M de oligonucleotídeo α_2R e 3.7R. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por 5 minutos, acrescida de 35 ciclos de 95°C por 45", 63°C por 60", 72°C por 2 minutos e extensão

final de 72°C por 5 minutos. A reação de amplificação foi realizada no termociclador Biosystems.

Dez microlitros de produtos amplificados foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 0,8%, em tampão TEB (Tris Borato EDTA) 1X, a 80V por 50 minutos, evidenciados com brometo de etídio e visualizados sob transiluminador.

A presença de duas bandas, uma de 1.8Kb e outra de 2.1Kb no gel de agarose indica heterozigoto para a deleção $-\alpha^{3.7}$, enquanto que a presença de uma única banda, de 1.8kb ou 2.1Kb, indica um genótipo normal ou a homozigose para a deleção $-\alpha^{3.7}$, respectivamente.

1.7 Análises da peroxidação lipídica e da capacidade antioxidante

1.7.1 Dosagem de TBARS (MIHARA; UCHIYAMA, 1978; PERCÁRIO; VITAL; JABLONKA, 1994).

Fundamento:

A dosagem de TBARS é baseada 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. Esta dosagem pode ser realizada em soro, plasma, líquidos corporais e homogenados de tecido.

Reagentes:

Água ultrapura ou água destilada

Cloreto de Potássio (KCl) 1,15%

Fosfato Monobásico de Potássio (KH₂PO₄) – Tampão fosfato 75mM (pH 2,5)

Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10nM

Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20µM

Alcool n-Butílico.

Procedimentos:

Preparo de plasma:

1. As amostras de sangue foram coletadas em tubo heparinizado e permaneceram por um período de 20 minutos em repouso em Banho Maria a 38°C.

2. Foram centrifugadas a 1500rpm por 20 minutos; após, 1mL ou mais de plasma foram separados em criotubos de 3mL devidamente identificados (quantidade mínima aceitável 800 µL) e acondicionados no freezer -20°C.

Preparo dos controles e amostras

1. A solução de TBA não deve ser estocada. Desse modo, a mesma foi preparada no dia em que foi realizada a dosagem.
2. Foram separados 2 tubos de ensaio (11x100mm, parede de 2mm) para cada amostra teste (ensaio em duplicata). Devem ser preparados também tubos para o branco e padrão.
3. Pipetou-se 1 mL do reagente TBA para cada tubo.
4. Os tubos de ensaio 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.
5. A partir dos tubos número 3 foram adicionadas 500 µL das amostras testes.
6. Os tubos devidamente vedados para evitar a contaminação foram colocados em Banho Maria a 94°C por 1h.
7. Após, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Em seguida pipetou-se 4 mL de álcool n Butílico em cada tubo.
9. Os tubos com respectivas amostras foram tampados com rolhas apropriadas e homogeneizados com agitador de tubo tipo vórtex.
10. Centrifugou-se os tubos a 2500 rpm durante 10 minutos.
11. Formou-se duas fases, uma ao fundo transparente e límpida e outra superficial, de coloração rósea.
12. Foram retiradas 3 mL da fase superficial e realizou-se a leitura espectrofotométrica em 535 nm.

Cálculo do valor de TBARS da amostra:

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

TBARS = A média x F, no qual:

$$A \text{ média} = (A1+A2)/2$$

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

$F = ([\text{padrão TBARS}] \times 440,61) / A \text{ padrão TBARS}$, como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10nM temos:

$F = 10 \times 440,61 / A \text{ padrão TBARS}$,

$F = 4406,1 / A \text{ padrão TBARS}$

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

1.7.2 Dosagem da Capacidade Antioxidante Total em Equivalência ao Trolox (TEAC) modificado (MILLER et al., 1993; RE et al., 1999).

O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Trata-se de 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 $ABTS^{\bullet+}$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815 nm.

A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes 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 $ABTS^{\bullet+}$, é determinada como a atividade antioxidante 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 miliomoles por litro (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.

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

H₂O destilada 1000 mL

Ajustar em pHmetro para pH 7.2, acrescentar mais Na₂HPO₄ ou Ácido Acético se necessário. Volume final: 1000mL.

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.

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

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

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

(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):

$$19,648 \text{ ml de (A) + } 352 \mu\text{L}^* \text{ de (B) }^{**}$$

* pipetar 176 μL + 176 μL

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

1. Foram preparados 20 mL da solução de estoque ABTS•+.
2. A mesma deve permanecer no escuro, em temperatura ambiente (em bancada) durante 12-16h para formar o radical cátion ABTS•+.
3. O radical é estável por cerca de dois dias estocado desta forma, no escuro, à temperatura ambiente.

Solução de Trabalho de ABTS•+

1. 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.

2. A expectativa é diluir 2289 μL da solução de estoque ABTS em 200 mL de PBS.
3. Calibrar espectrofotômetro na leitura de 734 nm, zerando com PBS.
4. Preparar Erlenmeyer com 200 mL de PBS.
5. 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.
6. 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 1000 mL de PBS.
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

1. Colher o sangue em heparina.
2. Centrifugar a 1500 rpm durante 20 minutos.
3. Pipetar o sobrenadante (correspondente ao plasma) e acondicionar em tubo limpo.
4. Estocar em freezer a -20°C ou em gelo caso seja prontamente analisado.

Rotina de Dosagem

1. Adequamos o método para leitura em espectrofotômetro em temperatura ambiente: 25°C .
2. O volume final de cada amostragem para leitura foi de 3 mL (3000 μL).
3. Se a capacidade antioxidante 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.

4. 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 em triplicatas.
5. A leitura foi feita em espectrofotômetro, a 734 nm.

Leitura

1. Em uma cubeta colocou-se com pipeta automática 2970 µL da solução de trabalho ABTS•+ outrora preparada. Realizou-se leitura da absorbância a 734 nm e o valor (correspondente a T0) foi anotado.
2. Retirou-se a cubeta e imediatamente acrescentou-se 30 µL da solução de trolox, acionando neste exato momento o cronômetro.
3. Homogeneizou-se a mistura manualmente por 20 segundos e re-iniciou a leitura (734nm) anotando o valor, decorridos exatos 5 minutos (corresponderá a T5).
4. Foram realizadas 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.
5. Foi realizado também um controle branco (com 30 µL de PBS) e um padrão (com 30µL de Trolox 1mM).

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:

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

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

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

1.8 Dosagem de Melatonina

Método: HPLC segundo Laganà et al. (1995); modificado por Shimauti et al. (2010)

Amostra biológica:

1. Amostra de sangue foi colhida em tubo seco (sem anticoagulante), envolvido no papel alumínio;
2. Amostra colhida foi incubada a BM 37°C por 15 a 30 minutos para obtenção de soro;
3. Após, centrifugou-se a 3.000 r.p.m. por 10 minutos (sem remover o papel alumínio do tubo) e transferiu-se o sobrenadante para tubo limpo e seco envolvido em papel alumínio, devidamente identificado.

OBS.: O soro foi armazenado a -80°C até a análise;

O soro foi descongelado e antes da análise esperou-se adquirir a temperatura ambiente;

Reagentes:

Padrão de Melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamina) – Sigma (conservar a – 20°C)

Metanol P.A.

Acetonitrila

Diclorometano P.A. (Sigma Aldrich)

Acetato de sódio

Ácido acético P.A.

Acetonitrila P.A. para uso em HPLC

Solução fase móvel da detecção eletroquímica

- a. Tampão acetato de sódio acetonitrila (85:15 v/v)

Solução de acetato de sódio pH 4,2	850 mL
Acetonitrila	150 mL

Para o preparo do tampão acetado de sódio acetonitrila, é necessário ter a solução de acetato de sódio pH4,2

b. Solução de acetato de sódio a pH 4,2:

- 50 mM de acetato de sódio
- 100 mM de ácido acético
- 0,1 mM de EDTA Na₂
- H₂O ultra pura q.s.p. 1000 mL

Obs. Filtrar antes de misturar com acetonitrila.

Outros materiais:

- Tubo de polipropileno, capacidade para 10 mL, graduado, para centrifuga.
- Microtubo tipo eppendorf, capacidade para 2,0 mL
- Micropipetas automáticas de 1000 µL, 200 µL, 100 µL, 10 µL
- Ponteiras para respectivas micropipetas
- Micro seringa de vidro
- Nitrogênio

Equipamentos:

- HPLC detector eletroquímico Coulochem III “esa”; modelo 526 UV detector; modelo 584 HPLC Pump shimadzu; coluna 250 x 4,6 mm de cromatograma ACE 5C 18; constitui-se de um condicionador celular mantido a um potencial de +100 mV e um equipamento de análise celular (coulométrico – amperométrico) a +350 mV (1^a célula) e a +500 mV (2^a célula). Identificação e quantificação de pico de melatonina foram realizadas usando um computador integrado do laboratório Windows XP.
- Centrifuga refrigerada
- Balança analítica
- pHmetro

Condição cromatográfica:

1. Passou-se a solução de fase móvel pelo aparelho HPLC, para aclimatar a coluna de C18 (pré coluna), por cerca de duas horas;

2. Taxa de fluxo de $0,900 \text{ mL min}^{-1}$ (fase móvel da detecção eletroquímica) a 500 nA . Nessas condições o tempo de eluição para cada amostra foi de 30 minutos.

Curva de calibração de Melatonina:

Preparou-se padrão de 1 pmol em $20 \text{ }\mu\text{L}$

PM melatonina = $232,28$

12 mg de Padrão de melatonina = 50 pmol/mL ($50 \text{ }\mu\text{mol}/1000 \text{ }\mu\text{L}$; $50 \text{ nmol}/\mu\text{L}$)

1. Pesar 12 mg de Melatonina e dissolver em $1000 \text{ }\mu\text{L}$ de metanol = $0,05 \text{ mmol}$ ou $50 \text{ }\mu\text{mol}/1000 \text{ }\mu\text{L}$; $1 \text{ }\mu\text{L}$ – 50 nmol .
2. Pipetar $1 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de $50 \text{ }\mu\text{mol}/1000 \text{ }\mu\text{L}$ (item 1) e completar para $1000 \text{ }\mu\text{L}$ com solução de “fase móvel” (agitar – vórtex) = 50 nmol/mL ;
3. Pipetar $1 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de 50 nmol/mL (item 2) e completar para $1000 \text{ }\mu\text{L}$ com solução de “fase móvel” (agitar – vórtex) = 50 pmol/mL ;
4. Pipetar $10 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de 50 nmol/mL (item 2) e completar para $1000 \text{ }\mu\text{L}$ com solução de “fase móvel” (agitar – vórtex) = 500 pmol/mL .
5. Injetar $20 \text{ }\mu\text{L}$ de padrão de melatonina.

Obs. Preparar no gelo.

Extração de melatonina da amostra sérica:

OBS.:Todas as etapas do procedimento foram realizadas no gelo.

1. Pipetou-se 2 mL de soro em microtubo envolto em papel alumínio e adicionar 1 mL de diclorometano;
2. Agitou-se vigorosamente por aproximadamente 30 segundos para assegurar a extração de melatonina;
3. Centrifugou-se a 6.500 rpm por 10 minutos a 4°C ;
4. Após a centrifugação ocorreu formação de duas fases. Descartou-se o sobrenadante (fase aquosa) e adicionou-se mais 1 mL de diclorometano sobre a fase de diclorometano (fase inferior) para extrair completamente a melatonina residual;
5. Centrifugou-se a 6500 rpm por 10 minutos a 4°C ;

6. Após a centrifugação ocorreu formação de duas fases (aquosa e diclorometano), fase aquosa (fase superior) foi descartada, e a de diclorometano (fase inferior) transferida para o tubo de hemólise.
7. Submeteu-se o diclorometano a fluxo de nitrogênio até a completa secagem;
8. Ressuspendeu-se o extrato em 100 μL de solução de fase móvel (Tampão acetato de sódio acetonitrila - 85/15 v/v);
9. Agitou-se o tubo no agitador de tubo tipo vórtex por aproximadamente 10 segundos ou até a completa dissolução;
10. Após, filtrou-se através do *Millex syringe filter units* (0,22 μm) (Sigma Aldrich), e o volume obtido foi injetado no sistema HPLC.
11. Efetuou-se a leitura da área de pico; confrontou-se com área de pico da curva de calibração e transformou-se em pmol/mL; A concentração da melatonina foi calculada fundamentada numa curva padrão previamente construída injetando o padrão de referência de melatonina no sistema HPLC;
12. O resultado foi expresso em pg mL^{-1} de acordo com a seguinte fórmula:

$$n = \frac{m}{MM} \quad n = \text{número de moles em pmol/mL}$$

$m = \text{massa}$

$MM = \text{massa molecular do padrão de melatonina (232,28 pg)}$

Apêndice

APÊNDICE A - Planilhas

Planilha 1. Resultados de perfil eletroforético, cromatográfico, estado oxidativo, biologia molecular, parâmetros hematológicos e outras informações coletadas dos prontuários e questionário dos portadores de Hb SS da região noroeste do estado do Paraná

ID	Idade	Gên	Data	Eletroforese			HPLC			Biologia molecular					conclusão
				pH8,6	pH 6,2	pH 7,1	Hb H	Hb A	Hb F	A2	Hb S	Hb S	haplótipo	- α 3.7	
SS1	36	F	17/6/2008	SSA	SSA	ausente	N	33	3,8	4,9	55,3	homo	BAN/BAN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS2	26	F	17/6/2008	SSF	SS	ausente	N	0	9,4	5,6	85	homo	BAN/Atp	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS3	12	M	27/6/2008	SSF	SSF	presente	N	0	14,3	4,8	81,7	homo	BAN/BEN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS4	32	F	11/6/2008	SSF	SSF	ausente	N	0	10,2	4,9	84,9	homo	BAN/BAN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS5	15	F	4/6/2008	SSF	SSF	ausente	N	0	10,3	4,3	85,4	homo	BAN/BAN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS6	11	M	14/11/2008	SSF	SSF	ausente	N	0	11,8	5	83,5	homo	BAN/BEN	normal	SS/ $\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS7	10	M	22/11/2008	SSF	SSF	ausente	N	0	15,1	4,7	80,2	homo	BAN/BEN	hetero	SS(- $\alpha/\alpha\alpha$)
SS8	22	F	22/11/2008	SSF	SSF	ausente	N	0	23	4,4	72,6	homo	BAN/BEN	homo	SS/(- α - α)
SS9	13	F	13/2/2009	SSF	SSF	ausente	N	0	6,4	4,6	89	homo	BAN/BAN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS10	17	M	5/2/2009	SSF	SS	ausente	N	0	8,8	5,5	86,2	homo	BAN/BAN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS11	29	F	5/2/2009	SSF	SS	ausente	N	0	7,9	5,4	87,1	homo	BEN/BEN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS12	26	F	17/2/2009	SSF	SSF	ausente	N	0	24,2	4,3	71,7	homo	BAN/BEN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS13	28	F	18/2/2009	SS	SSF	ausente	N	0	1,2	5	93,9	homo	BAN/BEN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS14	25	M	18/2/2009	SSF	SSF	ausente	N	0	15,9	4,3	79,8	homo	BAN/BAN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS15	39	M	2/4/2009	SS	SS	ausente	N	0	4,4	4,6	91,4	homo	BAN/Atp	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)
SS16	21	M	25/3/2009	SSF	SSF	ausente	N	0	13	4,5	83	homo	BEN/BEN	hetero	SS/(- $\alpha/\alpha\alpha$)
SS17	16	F	22/4/2009	SSF	SS	ausente	N	0	5,4	5,1	88,8	homo	BAN/BEN	normal	SS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)

Legenda: ID: identificação; Gên: gênero; HPLC: cromatografia líquida de alta performance; homo: homozigoto; Hb H: pesquisa intraeritrocitária de Hemoglobina H; N: negativo; BAN: Bantu; BEN: Benin; Atp: atípico; hetero: heterozigoto; Hb F, Hb A, Hb S e Hb A₂ em %; - α ^{3.7}: talassemia alfa causada por deleção de 3.7 kb.

Continuação da Planilha 1.

ID	Perfil oxidativo			medicamentos			Parâmetros hematológicos						
	TBARS	TEAC	MEL	HU	Ac Fólico	DFP	reticulóc	Eritróc	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM
SS1	911	2	98,35	N	S	N	37	2,13	7,1	22	101,6	33,3	32,8
SS2	2097	1,9	234,98	S	S	N	17	3,45	9	28	80,7	26	32,3
SS3	1652	2	65,24	N	S	N	14,5	2,34	7,6	23	96,8	32,4	33,6
SS4	1207	2	164,37	S	S	N	9,5	1,8	6,9	21	118,6	38,3	32,3
SS5	1970	2,1	41,02	S	S	N	7,3	2,58	9,1	26	103,8	36,9	35,6
SS6	720	2	9,63	S	S	N	11	1,89	5,9	19	100,2	31,2	31,2
SS7	974	2	39,29	N	S	N	12	2,51	7,6	22	88,1	30,2	34,3
SS8	636	2	15,07	N	S	N	6,3	3,62	9	29	79,5	24,8	31,3
SS9	648	2	47,03	N	N	N	29	2,12	6,4	20	92,8	30,1	32,6
SS10	497	2,1	17,08	S	S	N	17	3,43	9,7	30	89,1	28,2	31,8
SS11	821	2	36,20	S	S	N	11	1,98	6,7	20	103	33,8	33
SS12	756	2	74,18	S	S	N	9,6	2,2	8,9	27	121,9	40,4	33,2
SS13	842	1,9	9,85	N	S	N	7,6	2,22	6,7	19	87	30,1	34,7
SS14	648	2	42,62	S	S	S	6,8	2,58	9,2	30	114,8	35,6	31
SS15	863	2	71,73	N	S	N	12	2,74	7,9	25	89,6	28,8	32,2
SS16	994	2,1	27,78	S	N	N	11	2,18	8,6	26	117,2	39,4	33,7
SS17	2203	2,1	69,85	N	S	N	29	2,24	6,7	21	92,9	29,9	32,2

Legenda: ID: identificação; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng/mL); TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox (mM/L); MEL: melatonina (pg/mL); HU: hidroxiuréia; DFP: deferiprona; reticulóc: reticulócitos %; eritróc: eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$); Hb: hemoglobina (g/dL); Ht: hematócrito (%); VCM: volume corpuscular médio (fL); HCM: hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média (%); S: sim; N: não.

Continuação da Planilha 1.

ID	Parâmetros hematológicos													
	leucóc	neutróf	linfóc	monóc	plaq	anisoci	macroci	microci	policrom	hipocro	drepanóc	corp.HJ	esferóc	
SS1	18.800	11.904	5.076	1.316	433.000	3	2	0	3	0	2	1	1	
SS2	13.400	6.164	6.164	268	374.000	3	3	2	3	2	3	3	1	
SS3	15.500	8.370	5.115	1.085	490.000	2	2	0	2	0	3	1	0	
SS4	11.700	7.488	2.925	936	380.000	2	3	0	2	0	2	1	0	
SS5	10.800	4.644	4.644	540	423.000	2	2	0	2	0	2	1	1	
SS6	12.000	6.240	4.440	600	448.000	3	2	0	1	0	3	1	1	
SS7	14.500	6.090	5.945	725	380.000	3	2	2	2	2	3	1	0	
SS8	9.700	4.850	4.268	291	280.000	2	2	2	2	0	2	2	0	
SS9	18.800	11.280	3760	2.256	394.000	3	2	2	3	0	3	1	1	
SS10	12.600	6.426	4.662	1.260	249.000	3	2	0	3	0	3	1	2	
SS11	11.600	5.336	4.872	696	514.000	2	2	0	3	0	3	1	2	
SS12	8.600	4.472	3.784	172	325.000	2	3	0	2	0	2	2	0	
SS13	13.100	5.502	6.681	655	369.000	2	2	0	3	0	4	1	2	
SS14	8.800	4.576	2.728	1.144	354.000	2	3	2	2	0	2	1	0	
SS15	9.400	5.546	2.538	940	365.000	2	2	2	2	0	3	1	0	
SS16	13.900	10.147	2.085	1.251	284.000	2	3	0	2	0	2	1	0	
SS17	13.100	5.895	6.026	655	280.000	2	2	2	3	0	3	1	1	

Legenda: ID: identificação; Leucóc: leucócitos ($/\text{mm}^3$); neutróf: neutrófilos ($/\text{mm}^3$); linfóc: linfócitos ($/\text{mm}^3$); monóc: monócitos ($/\text{mm}^3$); plaq: plaquetas ($/\text{mm}^3$); anisoc: anisocitose; macroci: macrocitose; microci: microcitose; policrom: policromasia; hipocro: hipocromia; drepanóc drepanócitos; corp HJ: corpúsculos de Howell Jolly; esferóc: esferócitos; 0: ausente; 1: raros; 2: discreta; 3: moderada; 4: acentuada

Continuação da Planilha 1.

ID	parâmetros hematológicos						Manifestações clínicas						
	codóc	eritrob	mac poli	ulcer	pneu	osteon	ple	esplene	colecis	coelilit	card	dores	Inf urin
SS1	1	1	3	N	N	S	N	N	N	N	N	N	S
SS2	2	3	0	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
SS3	1	1	0	N	N	N	N	S	S	N	S	S	N
SS4	1	1	0	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N
SS5	1	1	1	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N
SS6	2	2	1	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N
SS7	2	1	1	S	N	N	N	N	S	N	S	S	N
SS8	2	1	0	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
SS9	1	1	1	N	N	N	S	S	N	N	S	S	N
SS10	2	1	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
SS11	1	1	2	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N
SS12	2	1	0	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
SS13	2	1	1	N	N	N	N	N	S	N	N	S	N
SS14	2	1	0	N	S	S	N	N	N	N	N	S	N
SS15	2	1	0	N	S	N	N	N	N	S	N	N	N
SS16	2	1	1	N	S	S	N	N	N	N	S	S	N
SS17	1	1	1	N	S	N	N	N	N	N	S	S	N

Legenda: ID: identificação; Codóc: codócitos; eritrob: eritroblastos; mac poli: macrócitos policromáticos; ne Hip: neutrófilos hipersegmentados; ulcer: ulcera de perna; pneu: pneumonia; osteon: osteonecrose; ple: derrame pleural; esplene: esplenectomia; colecis: colecistectomia; card: complicações cardíacas; dores: dores articulares, musculares; inf uri: infecção urinária; S: sim; N: não; 0: ausente; 1: raro; 2: discreta; 3: moderada.

Continuação da Planilha 1

ID	Manifestações clínicas				
	STA	IVAS	osteom	U.T. Dias	cri alg
SS1	N	N	N	60	0-2
SS2	S	N	N	1835	0-2
SS3	N	N	N	365	0-2
SS4	N	S	N	N	3-5
SS5	N	N	N	N	0-2
SS6	N	N	N	365	0-2
SS7	N	N	N	120	0-2
SS8	N	N	N	3204	0-2
SS9	N	N	N	73	0-2
SS10	N	N	N	1095	0-2
SS11	N	N	N	730	0-2
SS12	N	N	S	370	0-2
SS13	N	N	N	270	3-5
SS14	N	S	N	300	3-5
SS15	N	N	N	9720	0-2
SS16	N	S	N	210	6≥
SS17	N	S	N	360	3-5

Legenda: ID: identificação; STA: síndrome torácica aguda; IVAS: infecção de via aérea superior; osteom: osteomielite; U.T. Dias: última transfusão em dias; cri alg: crise algica por ano nos últimos três anos; S: sim; N: não.

Planilha 2. Resultados de perfil eletroforético, cromatográfico, estado oxidativo, biologia molecular e parâmetros hematológicos de portadores de Hb AS da região noroeste do estado do Paraná

ID	idade	Gên	Data	EH		HPLC		Biol mol		Perfil oxidativo			TBARS	TEAC	MEL
				pH 8,6	Hb A	Hb F	A2	Hb S	HbS	- $\alpha^{3.7}$	conclusão				
AS1	15	F	24/6/2008	AS	61,8	0	3,5	33,6	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	529,6	2,03	68,5	
AS2	14	F	24/6/2008	AS	61,8	0	5	33,2	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	444,8	1,98	86,8	
AS3	19	F	17/6/2008	AS	59,2	0	5	36,4	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	1446,5	1,98	125	
AS4	44	F	11/6/2008	AS	59,0	0	3,3	38,3	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	953,2	1,94	99	
AS5	24	M	16/6/2008	AS	57,0	0	4,6	37,2	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	614,3	2	47,9	
AS6	42	F	10/6/2008	AS	65,5	0	3,2	28,7	hetero	hetero	AS /(- $\alpha/\alpha\alpha$)	932,1	1,94	6,64	
AS7	19	F	26/6/2008	AS	62,5	0	3,2	34,3	hetero	hetero	AS / (- $\alpha/\alpha\alpha$)	783,8	1,92	305	
AS8	49	M	26/6/2008	AS	61,5	0	3,6	35,4	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	762,6	1,92	108	
AS9	38	M	23/6/2008	AS	61,5	0	3	36	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	783,8	1,99	
AS10	43	M	27/6/2008	AS	60,0	3	3	34,5	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	2796,1	1,98	435	
AS11	39	F	27/6/2008	AS	62,1	0	3,4	35	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	868,5	2	
AS12	25	M	11/9/2008	AS	57,7	0	4	38,3	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	932,1	1,94	394	
AS13	42	F	22/9/2008	AS	59,2	0	3,8	37	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	487,2	2,03	363	
AS14	21	F	19/9/2008	AS	58,9	0	3	38,1	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	466	2	
AS15	44	F	22/11/2008	AS	61,3	1,1	4,8	33,1	hetero	hetero	AS / (- $\alpha/\alpha\alpha$)	338,9	1,89	156	
AS16	45	M	22/11/2008	AS	61,9	0	5	33,4	hetero	hetero	AS /(- $\alpha/\alpha\alpha$)	699	1,94	633,8	
AS17	28	F	3/2/2008	AS	57,5	0	5,1	37,6	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	410,4	1,94	106	
AS18	39	F	3/3/2009	AS	55,5	0,6	4,2	39,7	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	475,2	1,97	135	
AS19	35	F	4/3/2009	AS	56,4	0,7	4,5	38,5	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	280,8	1,85	553	
AS20	20	F	4/3/2009	AS	55	0,3	4,3	40,5	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	410,4	1,83	83,7	
AS21	20	M	10/3/2009	AS	55,4	0,9	5	38,9	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	345,6	1,84	41,5	
AS22	40	M	6/5/2009	AS	58,9	0	4,8	36,7	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	367,2	1,98	67,7	
AS23	14	M	6/5/2009	AS	58,8	0	5	36,5	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	302,4	2,02	428	
AS24	43	F	22/4/2009	AS	58,2	0	4,5	37,7	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	367,2	1,74	
AS25	50	F	22/4/2009	AS	55,6	0	4,3	40,3	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	367,2	1,83	69,2	
AS26	53	F	9/6/2009	AS	56,9	0,7	4,9	37,1	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	415,7	1,87	132	
AS27	36	M	10/6/2009	AS	58,6	0	4,8	36,3	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	394,9	1,96	585,5	
AS28	52	M	17/6/2009	AS	62,4	0	4,6	32,7	hetero	hetero	AS / (- $\alpha/\alpha\alpha$)	353,3	1,9	229	
AS29	34	M	16/6/2009	AS	57,3	0,6	5,2	36,5	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	519,6	1,95	64,1	
AS30	30	F	19/6/2009	AS	57,7	0,3	4,8	37,7	hetero	normal	AS/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	353,3	1,93	54,5	

Legenda: ID: identificação; EH: eletroforese de hemoglobina; HPLC: cromatografia líquida de alta performance; Biol mol: biologia molecular; Gen: gênero; hetero: heterozigoto; - $\alpha^{3.7}$: talassemia alfa causada por deleção de 3.7 kb; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng/mL); TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox (mM/L); MEL: melatonina (pg/mL).

Continuação da Planilha 2.

Parâmetros hematológicos											
ID	eritrócitos	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	leucócitos	neutrófilos	linfócitos	monócitos	plaquetas
AS1	4,24	11,6	34,5	81,6	27,3	33,6	5.800	2.610	2.726	232	162.000
AS2	4,17	11,5	33,9	81,3	27,5	33,9	8.700	6.090	2.088	348	199.000
AS3	4,49	13,3	39,6	88,4	29,6	33,5	10.900	5.450	3.379	545	304.000
AS4	3,93	12,3	36,8	94,0	31,0	33,4	6.300	3.465	2.205	378	147.000
AS5	4,95	13,8	41,9	84,7	27,8	32,9	6400	3.072	2.624	320	215.000
AS6	5,3	13,1	42,2	79,2	24,5	31,0	9.900	6.534	2.871	396	184.000
AS7	3,99	10	30,4	76,2	25,0	32,8	8.300	3.403	3.818	332	186.000
AS8	4,53	12,8	38,7	85,6	28,2	33,0	9.000	5.490	2.970	270	196.000
AS9	5,06	14,1	43,1	85,3	27,8	32,7	6.000	2.820	2.340	600	288.000
AS10	4,52	11,5	36,2	80,2	25,4	31,7	7.500	4.950	1.725	600	260.000
AS11	4,67	12,4	38,4	82,3	26,5	32,2	9.800	5.096	3.430	784	241.000
AS12	4,62	13,4	39,9	86,4	29	33,5	7.400	3.478	3.108	296	285.000
AS13	4,4	12,2	38,2	87,0	27,7	31,9	8.300	4.980	2.075	830	171.000
AS14	4,42	13,1	39,9	90,4	29,6	32,8	7.800	3.198	3.822	234	260.000
AS15	4,31	11,9	37,1	86,3	27,3	32,0	4.500	2.250	1.800	225	128.000
AS16	5,43	13,8	43,2	79,6	25,4	31,9	6.500	3.900	1.885	585	150.000
AS17	4,2	11,7	37,7	88,2	27,3	31	7.900	4.424	2.528	237	177.000
AS18	4,19	12,8	38,5	91,9	30,5	33,2	8.100	4.617	2.916	243	200.000
AS19	3,86	10,4	31,4	81,6	26,9	33,1	7.700	5.159	1.617	539	165.000
AS20	4,72	12,1	36,9	78,3	25,6	32,7	5.900	3.245	2.242	295	208.000
AS21	5,17	15,1	44,3	85,7	29,2	34,0	8.100	6.156	1.377	486	148.000
AS22	5,53	13,4	42,0	76,0	24,2	31,9	7.100	3.053	3.337	355	230.000
AS23	5,58	14,7	44,5	80,0	26,3	33,0	8.200	5.002	2.296	410	221.000
AS24	4,1	12,3	37,5	91,6	30,0	32,8	8.900	4.806	3.293	534	223.000
AS25	3,86	10,8	32,7	84,7	27,9	33,0	7.600	4.104	2.584	456	164.000
AS26	4,25	12,1	36,8	86,7	28,4	32,8	4.300	2.279	1.376	258	197.000
AS27	4,4	12,4	37,7	85,7	28,1	32,8	5.100	3.366	1.275	357	225.000
AS28	5,01	12,8	40,2	80,4	25,5	31,8	7.700	4.466	2.233	616	243.000
AS29	5,19	13,8	42,6	82,1	26,5	32,3	7.200	3.096	3.456	360	180.000
AS30	4,02	11,5	34,1	84,8	28,6	33,7	4.600	2.530	1.794	138	180.000

Legenda: ID: identificação; eritrócitos ($\times 10^6 / \text{mm}^3$); Hb: hemoglobina (g/dL); Ht: hematócrito (%); VCM: volume corpuscular médio (fL); HCM: hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média (%); leucócitos ($/\text{mm}^3$); neutrófilos ($/\text{mm}^3$); linfócitos ($/\text{mm}^3$); monócitos ($/\text{mm}^3$); plaquetas ($/\text{mm}^3$).

Contin. Planilha 2.

Parâmetros hematológicos						
ID	anisocitose	macrocitose	microcitose	policromasia	hipocromia	drepanócitos
AS1	0	0	0	0	0	2
AS2	0	0	0	0	0	1
AS3	0	0	0	0	0	1
AS4	0	0	0	0	0	2
AS5	0	0	0	0	0	1
AS6	2	0	2	0	2	1
AS7	2	0	2	0	2	1
AS8	0	0	0	0	0	1
AS9	0	0	0	0	0	0
AS10	2	0	2	2	2	1
AS11	0	0	0	0	0	0
AS12	0	0	0	0	0	1
AS13	0	0	0	0	0	0
AS14	0	0	0	0	0	0
AS15	0	0	0	0	0	0
AS16	2	0	2	0	0	0
AS17	0	0	0	0	0	1
AS18	0	0	0	0	0	0
AS19	2	0	0	0	0	1
AS20	2	0	2	0	0	1
AS21	0	0	0	0	0	0
AS22	0	0	2	0	2	0
AS23	0	0	0	0	0	0
AS24	0	0	0	0	0	1
AS25	0	0	0	0	0	0
AS26	0	0	0	0	0	1
AS27	0	0	0	0	0	1
AS28	2	2	2	0	0	0
AS29	0	0	0	0	0	1
AS30	0	0	0	0	0	1

Legenda: ID: identificação; neutróf hipers: neutrófilos hipersegmentados; 0: ausente; 1: raro; 2 discreta.

Planilha 3. Resultados de perfil eletroforético, cromatográfico, estado oxidativo, biologia molecular e parâmetros hematológicos de portadores de Hb AA da região noroeste do estado do Paraná

ID	idade	gên	data	EH		HPLC		Biol mol		Perfil oxidativo			
				pH8,6	Hb A	Hb F	HbA2	HbS	- $\alpha^{3.7}$	Conclusão	TBARS	TEAC	MEL
AA1	25	F	14/8/2008	AA	97,4	0	2,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	676,3	1,86	156,6
AA2	31	M	12/8/2008	AA	95,3	2,5	2,2	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	392,6	1,94	399,3
AA3	23	M	14/8/2008	AA	95,3	2,1	2,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	471,4	1,99	166,1
AA4	32	M	14/8/2008	AA	97,6	0	2,4	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	588,9	1,96	158,6
AA5	22	M	14/8/2008	AA	94,8	2,5	2,7	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	655,8	1,96	146,5
AA6	40	F	12/8/2008	AA	95,0	2,6	2,4	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	414,4	1,88	88,8
AA7	41	F	12/8/2008	AA	95,4	2,4	2,2	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	458	1,88	354,6
AA8	28	M	21/8/2008	AA	95,2	2,5	2,3	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	414,4	1,73
AA9	55	F	21/8/2008	AA	97,6	0	2,4	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	458	1,89	44,4
AA10	23	M	22/8/2008	AA	95,0	2,3	2,7	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	588,9	1,98
AA11	43	M	22/8/2008	AA	95,1	2,3	2,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	676,3	1,94	126,7
AA12	13	M	22/8/2008	AA	95,0	2,5	2,5	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	624,8	1,93	286,9
AA13	19	M	22/8/2008	AA	94,8	2,4	2,8	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	436,2	1,95	45,0
AA14	23	M	22/8/2008	AA	95,2	2,3	2,5	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	523,5	1,84	155,6
AA15	20	M	22/8/2008	AA	95,1	2,3	2,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	676,2	2,07	119,8
AA16	26	M	28/8/2008	AA	95,0	2,4	2,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	676,2	1,96	39,9
AA17	26	M	28/8/2008	AA	95,5	1,9	2,6	normal	hetero	AA /(- $\alpha/\alpha\alpha$)	436,2	1,94	119,3
AA18	35	M	5/9/2008	AA	95,6	1,9	2,5	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	676,3	1,99	115,2
AA19	32	M	11/9/2008	AA	95,0	2,5	2,5	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	414,4	1,95	72,29
AA20	31	M	11/9/2008	AA	95,0	2,2	2,8	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	635,3	1,93	43,4
AA21	23	F	11/9/2008	AA	95,0	2,4	2,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	491,8	1,91	156,1
AA22	37	F	11/9/2008	AA	97,3	0	2,7	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	567,1	2	70,7
AA23	40	M	12/9/2008	AA	97,2	0	2,8	normal	hetero	AA /(- $\alpha/\alpha\alpha$)	501,7	1,97	148,6
AA24	41	M	9/9/2008	AA	97,4	0	2,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	573,8	1,92	294,7
AA25	13	M	20/11/2008	AA	96,7	0	3,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	479,9	2,04	69,3
AA26	50	M	26/6/2009	AA	96,2	0,5	3,6	normal	hetero	AA /(- $\alpha/\alpha\alpha$)	270,2	1,96	153,7
AA27	11	M	23/6/2009	AA	96,2	0,5	3,7	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	374,1	1,94	437,6
AA28	17	M	30/6/2009	AA	96,6	0,3	3,5	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	311,8	2,08	146,3
AA29	49	F	30/6/2009	AA	96,8	0	3,7	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	374,1	1,95	671,6
AA30	16	F	1/7/2009	AA	96,8	0	3,6	normal	normal	AA/($\alpha\alpha/\alpha\alpha$)	394,9	1,98	213,4

Legenda: ID: identificação; EH: eletroforese de hemoglobina; HPLC: cromatografia líquida de alta performance; Biol mol: biologia molecular; Gen: gênero; hetero: heterozigoto; - $\alpha^{3.7}$: talassemia alfa causada por deleção de 3.7 kb; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng/mL); TEAC: capacidade antioxidante equivalente ao trolox (mM/L); MEL: melatonina (pg/mL).

Continuação da planilha 3.

Parâmetros hematológicos

ID	eritróc	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	leucócitos	neutrófilos	linfócitos	monócitos	plaquetas
AA1	4,34	12	38,1	87,8	27,6	31,4	4.500	2.250	1.935	225	161.000
AA2	5,05	14,4	43,7	86,6	28,5	32,9	6.100	2.501	2.806	305	163.000
AA3	5,24	14,8	44,6	85,3	28,2	33,1	5.900	2.065	3.363	295	168.000
AA4	4,95	14,1	42,2	85,4	28,4	33,4	5.200	2.808	2.184	156	215.000
AA5	5,01	15,1	45,7	91,4	30,1	33	5.800	3.364	1.914	232	221.000
AA6	4,4	12,5	38,7	88,1	28,4	32,2	7.000	3.640	2.660	280	276.000
AA7	4,09	11,8	35,6	87,1	28,8	33,1	7.100	3.621	2.556	639	269.000
AA8	5,25	15,4	47,6	90,8	29,3	32,3	8.900	5.785	2.403	356	193.000
AA9	4,91	13,5	41	83,6	27,4	32,9	4.300	2.451	1.634	86	272.000
AA10	4,44	13,2	39	88	29,7	33,8	7.800	5.616	1.326	468	210.000
AA11	4,72	14,1	41,1	87,2	29,8	34,3	3.800	2.242	1.140	380	109.000
AA12	4,55	13,1	38,8	85,4	28,7	33,7	7.500	4.125	2.700	600	196.000
AA13	4,83	13,8	40,9	84,8	28,5	33,7	6.200	3.410	2.418	310	149.000
AA14	4,53	13	38,9	85,9	28,6	33,5	6.800	2.312	3.944	340	160.000
AA15	5,14	15,4	44,8	87,2	29,9	34,5	8.200	4.510	3.280	328	233.000
AA16	5,1	14,6	44,4	87,1	28,6	32,8	7.200	3.960	2.520	360	308.000
AA17	4,74	13,1	39,2	82,7	27,6	33,4	10.500	5.565	3.885	735	546.000
AA18	5,16	14,6	43,4	84,3	28,2	33,6	6.500	3.575	2.275	325	178.000
AA19	5	13,8	41	82	27,6	33,6	4.300	2.150	1.892	172	236.000
AA20	5,38	15,3	45,3	84,3	28,4	33,7	6.300	3.843	1.953	441	230.000
AA21	4,52	12,7	38,1	84,5	28	33,3	6.000	3.120	2.340	360	258.000
AA22	3,98	11,7	35,6	89,5	29,3	32,8	7.200	3.600	2.880	432	241.000
AA23	5,44	14,7	47,1	86,7	27	31,2	4.700	1.504	2.773	235	322.000
AA24	4,83	14,5	43,7	90,5	30	33,1	6.600	3.498	2.376	594	205.000
AA25	4,88	13,9	41,2	84,6	28,4	33,7	9.200	4.416	3.772	552	293.000
AA26	4,89	13,2	40,4	82,8	27	32,6	5.600	2.856	2.128	280	310.000
AA27	4,04	11,5	35,1	86,8	28,4	32,7	6.300	3.150	2.457	441	261.000
AA28	4,56	13	38,8	85	28,5	33,5	7.100	2.911	3.763	355	208.000
AA29	4,14	12	35,8	86,4	28,9	33,5	9.400	7.144	1.692	282	246.000
AA30	3,95	12	35,8	87,9	29,4	33,5	7.400	3.774	3.256	222	255.000

Legenda: ID: identificação; eritrócitos ($\times 10^6 / \text{mm}^3$); Hb: hemoglobina (g/dL); Ht: hematócrito (%); VCM: volume corpuscular médio (fL); HCM: hemoglobina corpuscular média (pg); CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média (%); leucócitos ($/\text{mm}^3$); neutrófilos ($/\text{mm}^3$); linfócitos ($/\text{mm}^3$); monócitos ($/\text{mm}^3$); plaquetas ($/\text{mm}^3$).

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNESP - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “**Capacidade antioxidante na Hb S: influência de talassemia alfa, haplótipos do gene β^S globina e melatonina**” sob responsabilidade da Pós-Graduada Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti. O estudo será realizado com uma amostra de seu sangue para avaliar a variabilidade clínica de indivíduos com anemia e traço falciforme, por meio da capacidade antioxidante e influência de possível interferente genético (mutação de talassemia alfa e de subtipos de Hb S). Haverá um risco mínimo para a sua saúde caracterizado pela possibilidade de mancha roxa no local da picada da agulha de coleta. Você poderá consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição (UNESP), 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 por seu médico 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. Este estudo é importante porque seus resultados poderão contribuir para o entendimento da anemia falciforme e de possíveis novas opções no tratamento. 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 será utilizado mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 347/2005.

Assim, totalmente esclarecido consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome: _____ R.G.: _____

Endereço: _____ Fone: _____

_____, _____ de _____ de 200__.

Usuário / responsável legal

Pesquisador responsável

OBS.: este termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador.

<p>Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti Cargo/Função: Estudante de Doutorado Instituição: 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: (0xx17) 3221-2392</p>
--

APÊNDICE C – Questionário

Questionário do projeto de Pesquisa “Capacidade antioxidante na Hb S: influência de talassemia alfa, haplótipos do gene β^S globina e melatonina”

Data: ____/____/____

Nome

completo: _____

Sexo: () feminino () masculino

Endereço: _____

Cidade e estado aonde mora: _____

CEP: _____

Telefone residencial: (____) _____

Telefone comercial: (____) _____

Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Etnia: _____

Local de nascimento (indicar cidade, estado e país): _____

Profissão atual: _____

Tem contato com produtos químicos ? (Exemplos: solvente, cola, tinta, pesticida, herbicida, fertilizante, óleo de motor, gasolina, fumaça, material radioativo, outras substâncias)

() não

() sim Quais ? _____

Fuma ?

() não

() sim A quanto tempo ? _____

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

Toma bebidas alcoólicas ?

() não () sim A quanto tempo ? _____

Com que freqüência você toma ? _____ Que tipo de bebida você toma?

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

Dados Clínicos:

Crises de dor por ano nos últimos 3 anos: () 0 a 2 () 3 a 5 () maior ou igual a 6

Síndrome Torácica Aguda () sim () não
 Complicações cardíacas () sim () não
 Colectomia/ cálculo biliar () sim () não
 Esplenectomia () sim () não ; AVC () sim () não
 Osteonecrose () sim () não Úlcera na perna () sim () não
 Priapismo () sim () não ; Retinopatia () sim () não
 Diabetes Mellitus () sim () não
 Outras: _____

Data de última transfusão: _____

Medicamentos:

Hidroxiuréia () não () sim quanto tempo? _____
 Desferroxamina () não () sim quanto tempo? _____
 Deferasirox () não () sim quanto tempo? _____
 Deferiprona () não () sim quanto tempo? _____
 Vitamina E () não () sim quanto? _____ início (data) _____
 Outros (vitamina C, chá verde,...)
 () sim () não quais? _____

Como é a sua alimentação? Com que frequência consome?

Carne () sim () não
 Legumes e verduras () sim () não
 Frutas () sim () não
 Cereais () sim () não
 Leite e derivados () sim () não

Outros: _____

Muito obrigado por sua consideração em dispor o seu tempo para preencher este questionário.

MSc. Eliana L. Tomimatsu Shimauti

Cargo/função: Pós-graduanda

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, 01/07/2011.

Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti