



**Willian Marcel Barberino**

Polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 da enzima  
Glutationa *S*-transferase como fatores moduladores do  
fenótipo na anemia falciforme

Willian Marcel Barberino

Polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 da enzima  
Glutathione *S*-transferase como fatores moduladores do  
fenótipo na anemia falciforme

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP  
2014

Barberino, Willian Marcel.

Polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 da enzima Glutathione S-transferase como fatores moduladores do fenótipo na anemia falciforme / Willian Marcel Barberino. -- São José do Rio Preto, 2014  
93 f. : il., tabs.

Orientador: Cláudia Regina Borini Domingos

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular humana. 2. Anemia falciforme – Aspectos genéticos. 3. Polimorfismo (Genética) 4. Glutathione transferase. 5. Stress oxidativo. 6. Dano ao DNA. I. Domingos, Cláudia Regina Borini. II. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU–575.1

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

Willian Marcel Barberino

Polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 da enzima Glutathione *S*-transferase  
como fatores moduladores do fenótipo na anemia falciforme

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

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos  
UNESP- São José do Rio Preto  
Departamento de Biologia - Orientadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez  
UNESP- São José do Rio Preto  
Departamento de Química e Ciências Ambientais

Profa. Dra. Nicola Amanda Conran Zorzetto  
UNICAMP - Campinas

São José do Rio Preto, 28 de Fevereiro de 2014.

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do Ministério da Saúde, FUNDARJ, CAPES e FAPESP.**

*A meus pais Josué e Maria Lucia, simplesmente pelo favorecimento, compreensão e exemplo de coerência e idoneidade; ao meu irmão Klauter pelo incentivo e aos meus avós Osvaldo e Laurentina, grandes amores da minha vida. Por fim, dedico especialmente às pessoas com Doença Falciforme, que me serviram de inspiração para a pesquisa e permitiram que eu me tornasse um pesquisador mais humano e compreensivo acerca de suas respectivas dificuldades e anseios.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao favorecimento que obtive, seja ele físico ou apenas em votos.*

*À minha família, sanguínea ou não: **Angela e Cleusa** por todo amor que tem por mim;  
**Milene, Antonio de Padua, Juliana, Alex, Leandro, Robert, Lucas e Phamela.***

*Aos meus amigos **Luis Felipe, Vinicius, Renan, Ana Gauy, Gisele e Yuri**, simplesmente  
pelo fato de terem cruzado meu caminho.*

*Aos meus amigos que me conquistaram e estiveram em momentos inesquecíveis: **Ivã,  
Maitê, Lidiane, Larissa, Marcela, Alice, Cassio, Fabio, Rodolfo, Rogério, Nathalia,  
Lara, Rafael, Kaio e Poatan.***

*A **Turma Francisco Langeani-Neto**, nas pessoas de **Mariana, Bruna, Camila, Fernanda,  
Karina e Bianca** pelo convívio intenso.*

*Aos **mestres.***

*Aos companheiros do **LHGDH/CEQ** pelo trabalho em conjunto, diversão, ajudas e  
consolo nos momentos difíceis: **Belini, Danilo, Larissa, Gisele, Tiago, Bel, Lidiane,  
Isabela, Jéssika, Renan, Nathalia, Tayrone, Jéssica, Vinicius, Barbara, Vanessa “Urbs”,  
Vanessa Leiko, Marina, Giovana, Mariana, Paula, Lucas, Gabriela e Edoardo.***

*À **AIASEC São José do Rio Preto (@SJ)** nas pessoas de **Renata Bitencourt, Gabriel Giglio,  
Sidnei Emilio e Talita Montalvão** por ter me proporcionado todo o conhecimento,  
realizações e grandes conquistas.*

*A todos os grupos de extensão que participei. Na qual eu cito o **GEDbioética** por ter feito  
parte significativa na minha formação crítica.*

*A minha orientadora, **Claudia Regina Bonini Domingos** pela confiança e por grandes  
ensinamentos que servirão sempre de inspiração.*

## Resumo

A anemia falciforme (AF) é uma anemia hemolítica hereditária que acarreta ao portador manifestações clínicas complexas e diversificadas. Na AF o estresse oxidativo é um dos fatores que interferem no fenótipo do portador, uma vez que influencia nos processos de vaso-oclusão aumentando as propriedades adesivas dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio. Durante a transformação do eritrócito discóide com hemoglobina (Hb) S em eritrócito afoiçado, dentre os eventos bioquímicos e polimerizantes da célula, ocorre a degradação oxidativa dessa Hb, com a liberação agentes pró-oxidantes. Estes promovem a oxidação de lipídeos e também de proteínas e DNA, modificando mecanismos celulares que levam a célula a apoptose e, conseqüentemente, causam danos aos tecidos. Neste contexto, os principais meios de defesa no organismo são divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Entre as enzimas detoxificantes de fase II mais estudadas estão as GSTs, que pertencem a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de GSH e possuem papel fundamental em mecanismos de defesa contra compostos endo e xenobióticos. Considerando a grande incidência da AF em nosso país e as manifestações clínicas diferenciadas nos portadores, o presente trabalho pretendeu investigar os polimorfismos das GSTs (GSTM1, GSTT1 e GSTP1) e verificar sua influência sob parâmetros oxidativos – peroxidação lipídica por TBARS, e lesão de DNA pela avaliação de Corpos de Howell-Jolly e Ensaio Cometa em portadores da AF. Foram avaliadas amostras de 91 indivíduos com AF com e sem o uso de HU e 99 amostras de um grupo controle. Para o desenvolvimento do trabalho, as amostras foram separadas em três grupos: indivíduos portadores de anemia falciforme em uso de hidroxiureia (AF + HU: 46 indivíduos), indivíduos portadores de anemia falciforme sem uso de hidroxiureia (AF – HU: 45 indivíduos) e o grupo controle (CG: 99 indivíduos) para verificar a influência ou não da medicação nos parâmetros avaliados. Apenas o perfil genotípico que expressa a isoforma M e T (genótipo MT) demonstrou-se mais frequente nos indivíduos com AF comparado ao GC ( $p = 0,008$ ). As frequências dos outros genótipos demonstraram-se semelhantes em ambos os grupos (de estudo e controle). As análises para lesão do DNA pela técnica do ensaio cometa e Corpos de Howell-Jolly (CHJ) demonstraram aumento de lesão no grupo de estudo, tanto para AF + HU, como para AF – HU, quando comparados ao GC ( $p < 0,01$ ), porém, quando realizada a comparação entre os grupos com e sem o uso de HU, esta diferença não foi significativa ( $p = 0,43$  e  $0,07$ , respectivamente). O mesmo foi observado para a avaliação de peroxidação lipídica, que evidenciou ausência de diferença estatística significativa entre os grupos AF + HU e AF – HU ( $p = 1,0$ ), porém ambos diferiram do grupo controle ( $p < 0,01$ ). Não foi evidenciada relação entre os diferentes biomarcadores avaliados e os genótipos para GSTP e GSTMT. Esta passagem demonstra ausência de interferência da HU nos marcadores avaliados. Os resultados obtidos demonstram uma leitura importante do genótipo da GST nos grupos estudados e evidencia importância da lesão de DNA e peroxidação lipídica na fisiopatologia da AF.

**Palavras chave:** Hemoglobina S, Anemia Falciforme, Glutathione S-transferase, Estresse Oxidativo, Lesão de DNA, Hidroxiureia.



## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited hemolytic disease that leads complex and diverse clinical manifestations. In SCA, oxidative stress is one of the factors that affect the phenotype of the carrier, in response of its influences on vaso-occlusion processes that increases the adhesive properties of erythrocytes, leukocytes and platelets to the endothelium. During the transformation of discoid erythrocytes with hemoglobin (Hb) S into sickle cells, among the biochemical and polymerizing events, the oxidative degradation of this Hb occurs, releasing pro-oxidants agents. They promote oxidation of lipids and proteins and modify cellular mechanisms that lead to cell apoptosis and cause tissue damage. In this context, the main means of body defense are divided in two groups: enzymatic and non-enzymatic. Among the phase II detoxifying enzymes, the most studied are Glutathione *S*-transferases (GSTs), which belong to a family of multifunctional enzymes that catalyze the combination of the glutathione (GSH) molecule and have a central role in mechanisms of defense against xenobiotic compounds. Considering the high incidence of SCA in our country and the different clinical manifestations in patients, this study aimed to investigate polymorphisms of GSTs (GSTM1 , GSTT1 and GSTP1 ) and determine its influence on oxidative parameters - lipid peroxidation by TBARS and DNA damage by evaluation of Howell -Jolly bodies (HJB) and comet assay in patients with SCA. Samples of 91 patients with SCA with and without hydroxyurea (HU) use and 99 samples of a control group were evaluated. For the work development, the samples were separated into three groups: individuals with sickle cell anemia using hydroxyurea (SCA + HU: 46 individuals), individuals with sickle cell disease without use of hydroxyurea (SCA - HU: 45 individuals) and control group (CG: 99 individuals) to verify the influence of medication on the evaluated parameters. Only the genotypic profile that expresses isoforms M and T (MT genotype ) showed up more frequently in individuals with SCA compared to the CG ( $p = 0.008$  ). The frequencies of the other genotypes were similar in both groups (study and control). Tests for DNA damage by the comet assay and HJB demonstrated increased of lesions in the study group, both SCA + HU and SCA - HU when compared to the CG ( $p < 0.01$ ), but when realized the comparison between the groups with and without the use of HU, this difference was not significant ( $p = 0.43$  and  $0.07$ , respectively). The same was observed for the evaluation of lipid peroxidation, which showed no significant statistical difference between SCA + HU and SCA - HU ( $p = 1.0$  ), but both differed from the control group ( $p < 0.01$ ) . There was no significant relationship between the biomarkers evaluated and genotypes for GSTP and GSTMT. The results demonstrate absence of interference of HU in lipid peroxidation and DNA damage biomarkers. Results also show an important overview of the GST genotype groups and highlight the importance of DNA damage and lipid peroxidation in the pathophysiology of AF.

**Key-words:** Hemoglobin S, Sickle Cell Anemia, Glutathione *S*-transferase, Oxidative Stress, DNA damage, hydroxyurea.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da expressão dos genes da globina ao longo do desenvolvimento.....	18
<b>Figura 2.</b> Micropartículas derivadas de diversos tipos celulares (eritrócitos, plaquetas, monócitos, granulócitos) em portadores de AF no cenário de hemólise e ativação da coagulação.....	20
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo da fisiopatologia na AF..	21
<b>Figura 4.</b> Três principais efeitos da hidroxíureia no organismo e seus benefícios na prevenção da vaso-oclusão e vasculopatias.....	24
<b>Figura 5.</b> Esquema representando a formação de inclusões celulares (micronúcleo) em célula somática devido à irregularidades durante a divisão mitótica.....	30
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática dos produtos da PCR - RFLP para <i>GSTP1</i> ..	44
<b>Figura 7.</b> Foto do gel de agarose a 3,5% mostrando os fragmentos de DNA obtidos após a digestão enzimática para confirmação dos genótipos do polimorfismo <i>GSTP1</i> .....	46
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática dos produtos da PCR MULTIPLEX para <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	48
<b>Figura 9.</b> Nucleóides após a corrida eletroforética da técnica de ensaio cometa em amostras de sangue periférico de indivíduos portadores de AF e em um grupo controle...	49
<b>Figura 10.</b> Gráfico referente aos dados da mediana de CHJ nos três grupos estudados em nº de CHJ/3000 células..	57
<b>Figura 11.</b> Resultado com os valores da mediana do Índice de Dano (ID) obtido a partir dos valores individuais de lesão no ensaio cometa.....	58
<b>Figura 12.</b> Resultado da dosagem de TBARS em indivíduos do grupo teste e do GC.....	60
<b>Figura 13.</b> Análise da correlação entre a peroxidação lipídica (TBARS) e lesão de DNA (ID) no grupo teste (91 indivíduos) e no grupo controle (53 indivíduos).....	61

**Figura 14.** Análise da correlação entre peroxidação lipídica (TBARS) e lesão de DNA (CHJ) no grupo teste (91 indivíduos) e no grupo controle (99 indivíduos).....62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo no gene para a enzima GSTP1 no grupo de estudo e no grupo controle.....	55
<b>Tabela 2.</b> Frequências genótípicas para o polimorfismo GSTM/T encontradas no grupo de estudo e no grupo controle. ....	56
<b>Tabela 3.</b> Análise da lesão de DNA pela avaliação dos CHJ e pelo ensaio cometa (ID) nos três grupos estudados. ....	59
<b>Tabela 4.</b> Valores de lesão de DNA por ID (ensaio cometa) e contagem de CHJ e peroxidação (TBARS) lipídica expressos em mediana $\pm$ amplitude interquartis em cada genótipo de GSTMT no grupo de estudo. ....	63
<b>Tabela 5.</b> Valores de lesão de DNA por ID (ensaio cometa) e contagem de CHJ e peroxidação lipídica (TBARS) expressos em mediana $\pm$ amplitude interquartis para cada genótipo de GSTP no grupo de estudo.....	64
<b>Tabela 6.</b> Ocorrência das manifestações com relação aos genótipos de GSTMT e GSTP e uso de HU no grupo de estudo.....	66
<b>Tabela 7.</b> Análise de risco para os diferentes genótipos da GSTMT e GSTP em relação a três manifestações clínicas da AF U. ....	68
<b>Tabela 8.</b> Frequências genótípicas e alélicas da enzima GSTP no grupo teste, no grupo controle, e as encontradas do trabalho de Rossini e colaboradores (2002) e Watson e colaboradores (1998).....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF	anemia falciforme
DF	doença falciforme
Hb	hemoglobina
Hb A	hemoglobina A (normal)
Hb F	hemoglobina fetal
Hb S	hemoglobina S (falcêmica)
Hb S/beta	interação Hb S e beta talassemia
Hb SC	duplo heterozigoto para a Hb S e Hb C
Hb SS	homozigoto para a Hb S (anemia falciforme)
GST	Glutathione S-transferase
GSTM1 ou M	isoforma $\mu$ da Glutathione
GSTT1 ou T	isoforma $\theta$ da Glutathione
GSTP1 ou P	isoforma $\pi$ da Glutathione
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
CHJ	Corpos de Howell-Jolly
HU	hidroxiureia
GC	Grupo Controle
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
NO	Óxido Nítrico
HBZ	Gene Zeta
HBA1 e A2	Genes Alfa1 e 2
HBE	Gene Épsilon
HBG1	Gene Gama Guanina
HBG2	Gene Gama Alanina
HBD	Gene Delta
HBB	Gene Beta
HBB <sup>Glu6Val</sup>	Mutação para Hb S
MPs	Micropartículas
PS	Fosfatidilserina
TF	Fator Tecidual
STA	Síndrome Torácica Aguda
cGMP	Guanosina Monofosfato Cíclica

ERN

Espécies Reativas de Nitrogênio

PNTN

Programa Nacional de Triagem Neonatal

LHGDH

Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças  
Hematológicas

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\zeta$	zeta
$\epsilon$	épsilon
$\delta$	delta
$\gamma$	gama
$\theta$	teta
$\kappa$	kapa
$\pi$	pi
$\mu$	mi
$\omega$	ômega
$\cdot\text{OH}$	radical hidroxil
$\text{O}_2^{\cdot-}$	radical superóxido
$\text{H}_2\text{O}_2$	peróxido de hidrogênio
GSH	glutathiona
GPx	glutathiona peroxidase
GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona dissulfeto
GO	glutathiona oxidase
GR	glutathiona redutase

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1. Hemoglobinas Humanas.....	17
1.2. Doença Falciforme e Anemia Falciforme .....	18
1.3. Complicações clínicas da anemia falciforme.....	22
1.4. Tratamento .....	23
1.5. Estresse Oxidativo na Doença Falciforme.....	25
1.6. Sistema de Defesa Antioxidante e Glutathione <i>S</i> -transferase.....	26
1.6.1. Lesão ao DNA.....	28
1.7. Hipótese .....	31
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos .....	33
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
3.1. Casuística.....	35
3.2. Métodos .....	36
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>8. APÊNDICE 1 .....</b>	<b>78</b>



## **1. Introdução**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Hemoglobinas Humanas

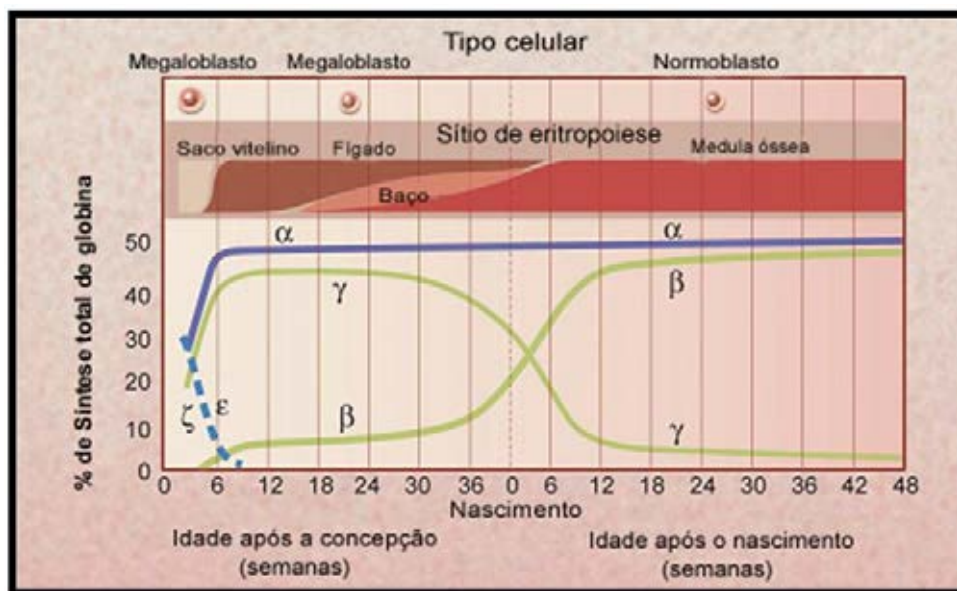
A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular tetramérica que possui, como principal função, o transporte de oxigênio entre pulmões e tecidos e, da maior parte do gás-carbônico disponível, dos tecidos de volta para o pulmão (NELSON; COX, 2006). Atua, também, no equilíbrio ácido-base intraeritrocitário, na detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e no transporte de óxido nítrico (NO) – participante dos eventos de vasodilatação dos capilares do organismo (SCHECHTER, 2008; BALLAS, 2012). Forma-se por quatro subunidades constituídas de duas frações: uma proteica que consiste nas cadeias globínicas, geneticamente determinadas, e uma parte não proteica (prostética), constituída pelo grupo heme, sítio de ligação do átomo de oxigênio. (HONIG; ADAMS III, 1986; MANCA; MASALA, 2008).

A fração proteica da Hb Adulta (Hb A) é formada por quatro cadeias globínicas que são divididas em dois grupos: do tipo alfa ( $\alpha$ ) e do tipo beta ( $\beta$ ). São codificadas por genes organizados em famílias, ou *clusters* gênicos, da seguinte maneira: os genes da família tipo alfa ( $\alpha$ ) - um zeta (HBZ) e dois alfas (HBA1 e HBA2) localizam-se no braço curto do cromossomo 16p 13.3 humano e os genes da família tipo beta ( $\beta$ ) - épsilon (HBE), gama guanina (HBG1), gama alanina (HBG2), delta (HBD) e beta (HBB), localizam-se no braço curto do cromossomo 11p 15.5 humano. Estes genes expressam-se na mesma ordem em que se localizam nos respectivos cromossomos (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Predominam no período embrionário, as Hb: Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ), Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e Portland II ( $\zeta_2\beta_2$ ) e no período fetal, a Hb Fetal (Hb F) ( $\alpha_2\gamma_2$ ), gradualmente substituída pela Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), majoritária, e Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), minoritária. Estabilizadas as taxas de produção das cadeias na fase adulta, um indivíduo apresenta 96% a 98% de Hb A, de 2,5% a 3,5% de Hb A<sub>2</sub> e Hb F em concentrações mínimas, que vão da inexpressão total (0%) a 1,0% (MANCA; MASALA, 2008). A figura 1 ilustra a ontogenia das cadeias globínicas. Pacientes portadores de doenças causadas por alguma mutação nos genes do *cluster* beta apresentarão manifestações clínicas graves após o primeiro ano de vida, período em que ocorre a substituição da Hb F pela Hb com alterações. (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Mutações que acarretam em mudanças na estrutura proteica das Hb alteram, também, as características físico-químicas e originam as Hb variantes. Consistem, em geral, de mutações pontuais que podem alterar a matriz de leitura e resultam na

substituição de um aminoácido por outro de carga diferente (STEINBERG et al., 2001; BAIN, 2011).



**Figura 1.** Representação esquemática da expressão dos genes da globina ao longo do desenvolvimento. Destaca-se a produção de cadeias em cada uma das fases do desenvolvimento, embrionário, fetal e pós-nascimento, além dos tipos celulares e os principais locais de síntese (modificado de SCHECHTER, 2008).

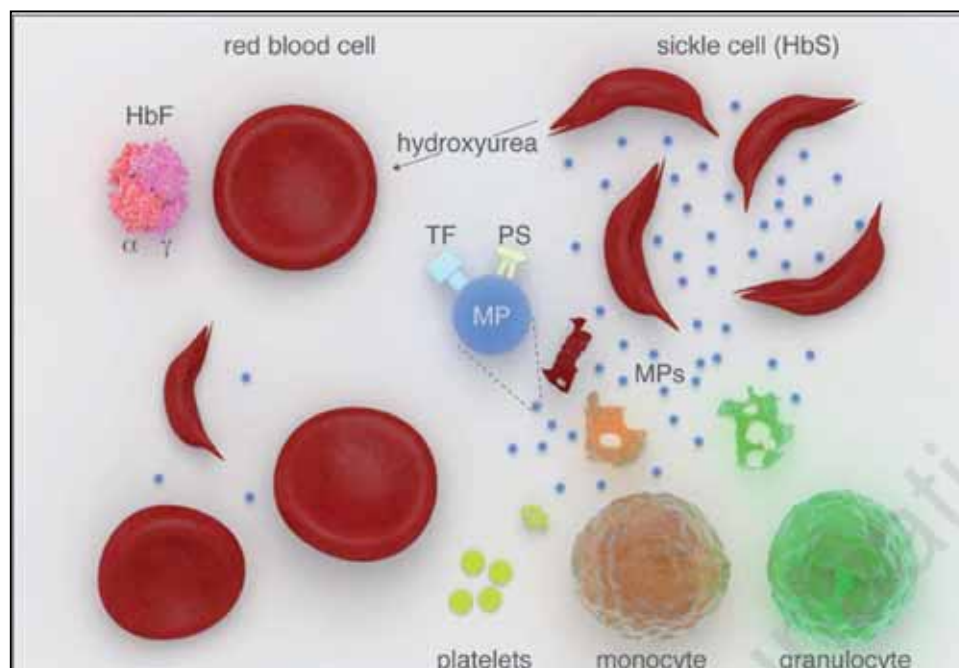
## 1.2. Doença Falciforme e Anemia Falciforme

A doença das células falciformes é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. Inclui a anemia falciforme (AF), homozigose para Hb S, as interações com talassemias (Hb S/beta-talassemia) e as associações com outras variantes de Hb, formando duplos heterozigotos, como a Hb SC. A homozigose para a mutação (Hb SS) é responsável pela mais comum e grave variação da doença falciforme (FRENETTE; ATWEH, 2007; REES, 2010).

A Hb S é originada por uma mutação pontual no gene da beta globina, que leva à substituição de um ácido glutâmico por valina ( $GAG \rightarrow GTG$ ), na posição seis da cadeia beta ( $HBB^{Glu6Val}$ ), acarretando em diferenças estruturais e bioquímicas comparadas à Hb normal, que caracterizam a Hb S (NUSSBAUM et al., 2002). A mudança de carga elétrica do ácido glutâmico, com ponto isoelétrico negativo, para um ponto isoelétrico neutro, como o da valina, favorece a polimerização em condições de baixa tensão de oxigênio, com alteração do eritrócito, que se torna rígido (WEATHERALL; CLEGG, 2001;

FRENETTE; ATWEH, 2007). Os polímeros causam danos à membrana dos eritrócitos, com rompimento do citoesqueleto e originam estruturas salientes, modificando o formato da célula para o de foice, que dá nome à doença (falciforme = formato de foice). Este processo afeta as proteínas do citoesqueleto as quais ficam expostas, com a troca entre os fosfolipídeos de membrana do interior para o exterior celular (FRENETTE; ATWEH, 2007, LABIE; ELTON, 1999 apud ODIÉVRE et al., 2011).

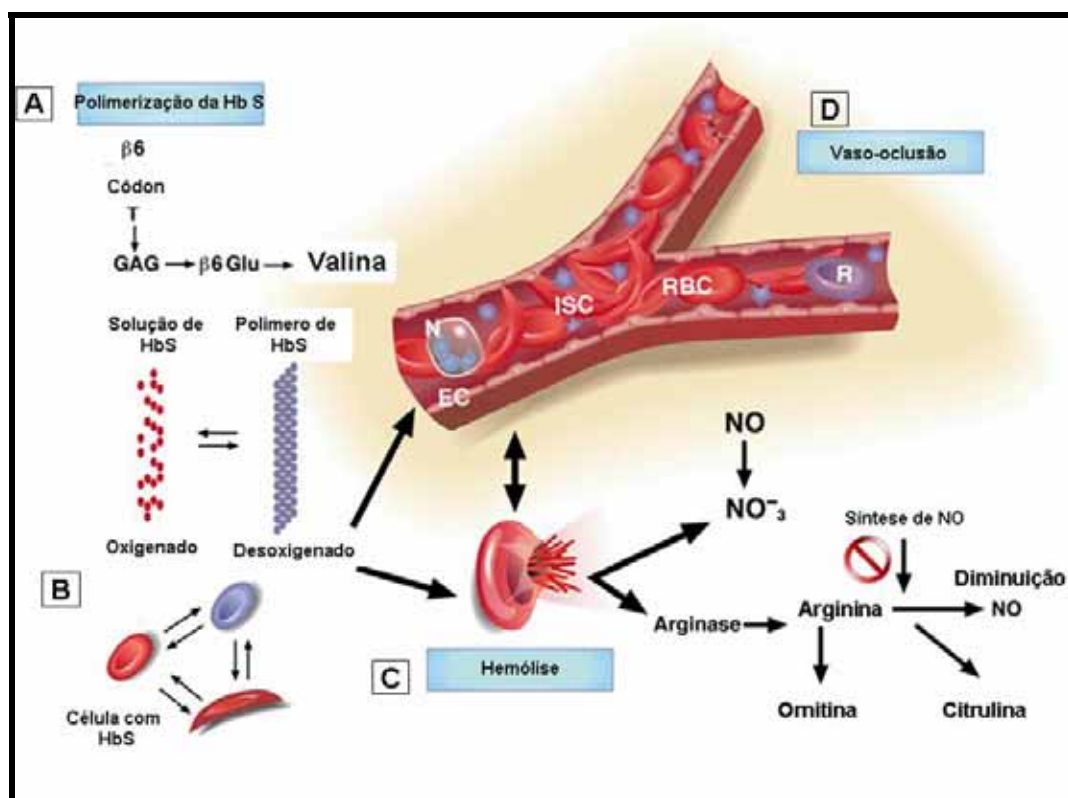
De forma importante neste cenário, há, em pacientes portadores da AF, aumento elevado de micropartículas (MPs) circulantes. As micropartículas são vesículas de menos de 1  $\mu\text{m}$  que resultam de membranas de células pré-apoptóticas ou que já sofreram apoptose e que exercem função na expressão de fosfolipídeos (fosfatidilserina – PS) e proteínas (fator tecidual) em suas superfícies, fatores modulantes da vasoclusão e coagulação. MPs em quantidades elevadas estão associadas a complicações vasculares como alto risco de trombose, aterosclerose, síndrome coronária e infarto do miocárdio. Especificamente na AF, MPs de eritrócitos favorecem a coagulação intensa nos capilares e com isso, apresentam, também correlação positiva com os processos de hemólise e polimerização da hemoglobina. (NIEUWLAND, 2000; TRAPPENBURG, 2009; FALANGA 2012; GEROTZIAFAS; 2012). A figura 2 mostra a participação das MPs na fisiopatologia da AF.



**Figura 2.** Micropartículas derivadas de diversos tipos celulares (eritrócitos, plaquetas, monócitos, granulócitos) em portadores de AF no cenário de hemólise e ativação da coagulação. São liberadas em hemólise e apoptose e ativação de células sanguíneas. A hemólise aumenta quando a Hb F é substituída pela Hb adulta e células falciformes são produzidas. De modo antagônico, a hemólise diminui quando a terapia com hidroxiureia é iniciada, com o subsequente aumento da produção de Hb F. Nas superfícies das MPs, são expostas fosfolípidos procoagulantes (fosfatidilserina) e proteínas (fator tecidual) que ativam outras células sanguíneas (plaquetas, monócitos) e homeostase. O aumento da Hb F é inversamente proporcional ao de MPs circulantes (modificado de FALANGA, 2013). MP = Micropartículas; TF: Fator Tecidual; PS: Fosfatidilserina.

A polimerização da Hb S desencadeia dois dos processos fisiopatológicos principais: vaso-oclusão, com isquemia e reperfusão, e a anemia hemolítica. Entretanto, os eventos polimerizantes por si só não são suficientes para explicar processos fisiopatológicos tão complexos (CHIANG; FRENETTE, 2005; STEINBERG, 2008; REES, 2010). Como resultado, há múltiplas alterações, como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e a interrupção da ligação da membrana com proteínas do citoesqueleto. Assim, as principais alterações que ocorrem no interior da célula refletem-se na membrana e têm como consequências: aumento da adesão de hemácias ao endotélio o que desencadeia fenômenos inflamatórios; enrijecimento da membrana, encurtamento de sua sobrevida na circulação; lesões microvasculares; inflamação e ativação da coagulação. Tais eventos favorecem e permitem a ocorrência da hemólise (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

A hemólise intravascular, por sua vez, libera a Hb, que passa a ser depletora de óxido nítrico (NO), cuja biodisponibilidade é reduzida, desencadeando mecanismos que facilitam a vaso-constricção e a atividade de moléculas de adesão. Além disso, a hemólise libera arginase, uma enzima que degrada a L-arginina - substrato enzimático para a produção de NO – levando à redução na síntese pela destruição do seu precursor (ODIÊVRE et al., 2011; CHIRICO; PIALOUX, 2011). A liberação da Hb contribui também com o estresse oxidativo, pois esta molécula na condição livre traz à tona o grupo heme, que abriga o átomo de ferro. O ferro em excesso é tóxico ao organismo e participa de vias de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (KRUSZEWSKI, 2003; ROTHER, et al. 2005). Este processo pode ser visualizado na figura 3.



**Figura 3.** Esquema representativo da fisiopatologia na AF. A. A troca do sexto aminoácido da cadeia beta-globina acarreta na produção de Hb S, que, quando desoxigenada leva à polimerização. B. O eritrócito falcizado pode voltar à conformação normal quando em normóxia. C. A polimerização causa danos ao eritrócito e sua membrana. Esta célula passa a ter uma curta vida levando a hemólise com consumo de NO. D. A interação dos eritrócitos falcizados com os leucócitos e o endotélio vascular desencadeiam processos que resultam na vaso-oclusão. N (neutrófilo); EC (células endoteliais); ISC (isquemia); RBC (eritrócito); R (reperfusão); NO: óxido nítrico (modificado de STEINBERG, 2008).

### 1.3. Complicações clínicas da anemia falciforme

As manifestações da doença são mediadas, principalmente, pelos processos de vaso-occlusão e anemia hemolítica. Crises vaso-oclusivas são causadas pelo aprisionamento de eritrócitos e leucócitos na microcirculação, levando à obstrução vascular e isquemia tecidual, evento que tem início, geralmente, devido a processos inflamatórios. Assim como a vaso-occlusão, a hemólise também é impulsionada pela polimerização da Hb S, e pode contribuir para uma vasculopatia progressiva (REES et al, 2010).

O acidente vascular encefálico (AVE) corresponde a uma síndrome neurológica aguda, secundária à oclusão de artéria ou hemorragia, que resulta em isquemia e sintomas e sinais neurológicos; no entanto, infartos silenciosos também são comuns na AF (BALLAS et al., 2010).

A ulceração de membros inferiores é uma complicação comum da DF, mas que ocorre principalmente em indivíduos com genótipo SS e tem início, geralmente, entre 10 e 25 anos de idade. Obstrução mecânica por hemácias densas, insuficiência venosa, infecções bacterianas, vaso-constricção, anemia com diminuição da capacidade de transporte de oxigênio e diminuição da biodisponibilidade de NO, levando à deficiência da função endotelial, são fatores que podem contribuir para a ocorrência de úlceras de perna nesses indivíduos. As úlceras são dolorosas, recorrentes e mais comuns em locais com pouco tecido subcutâneo e fluxo sanguíneo reduzido (MACK; KATO, 2006; MINNIT et al., 2010).

A dor aguda é a principal causa de admissão hospitalar e, embora não resulte em danos permanentes a órgãos, é uma importante complicação da doença, estando sua frequência associada à morte mais precoce dos pacientes (PLATT et al., 1991). A segunda maior causa de internação hospitalar em pacientes com AF é a síndrome torácica aguda (STA), caracterizada por infiltrado alveolar envolvendo pelo menos um dos segmentos dos pulmões, causando combinação de fatores como infecção, embolismo e vaso-occlusão pulmonar (GLADWIN; VICHINSKY, 2008).

Sequestro esplênico agudo é uma das principais causas de morte em crianças com AF. Nesses pacientes, a prevalência está entre 7% e 30%. Trata-se de uma complicação caracterizada pelo rápido crescimento do baço devido ao aprisionamento de hemácias falcizadas e outros componentes do sangue, podendo levar o paciente ao choque, devido à retenção de um grande volume de sangue circulante. A detecção da diminuição da concentração de hemoglobina em pelo menos 2 g/dL do nível basal do indivíduo,

geralmente com evidências de reticulocitose (aumento da contagem de reticulócitos em cerca de 25%), é de grande importância para o reconhecimento imediato do sequestro esplênico e seu tratamento (BALLAS, 2012).

#### **1.4. Tratamento**

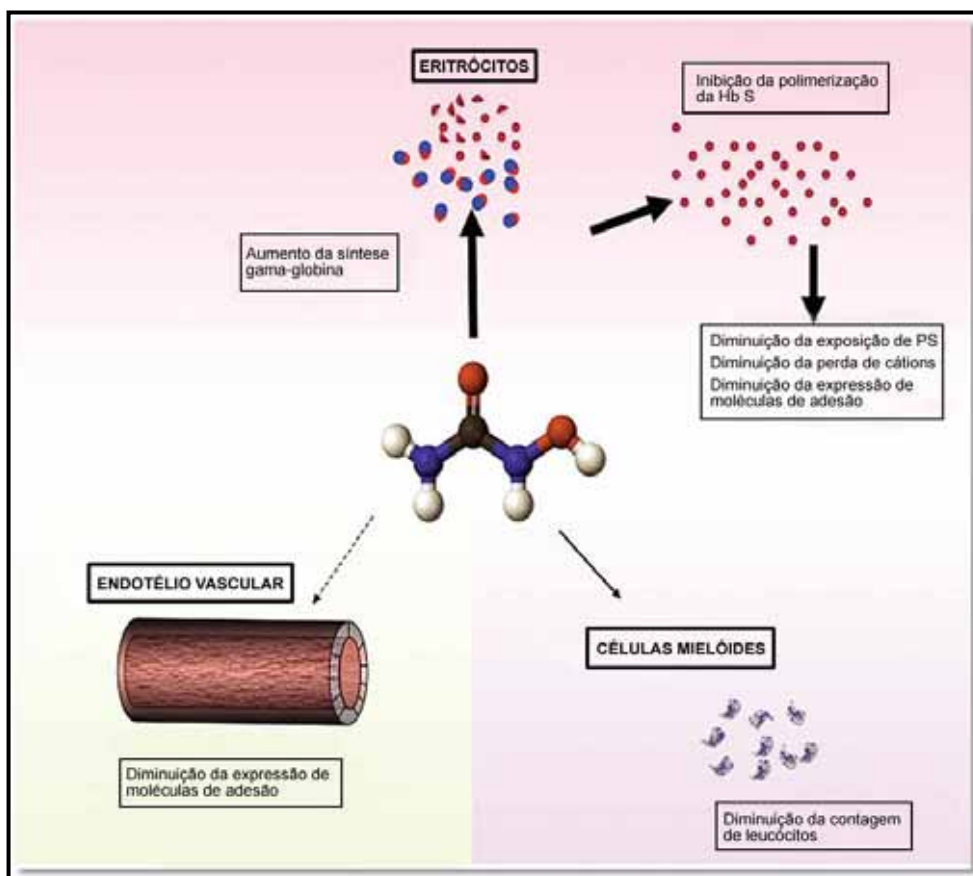
O tratamento para indivíduos portadores de AF é baseado em três abordagens: transfusão sanguínea, o uso de analgésicos no combate das crises dolorosas e terapia medicamentosa a base de hidroxycarbamida (REES, 2011). A HU é um derivado do ácido hidroxâmico e consiste em um medicamento de administração oral. Tem, como principal efeito, em pacientes com AF, o aumento na síntese de Hb F. Esta, por sua vez, envolvida na redução da frequência de episódios vaso-oclusivos, crises de dor, transfusões e hospitalizações (LANZKRON et al., 2008; LIU et al., 2010). Por ser de fácil administração, baixo custo e apresentar efeitos benéficos, é considerada a terapia padrão ouro pelos clínicos, demonstrando-se segura e bem tolerada pela maioria dos pacientes (WARE; AYGUN, 2009; KOVACIC, 2011).

A HU tem sido utilizada por muitos anos no tratamento de doenças mieloproliferativas, como alguns tipos de leucemias (FRENETTE; ATWEH, 2007). Em 1998, foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de adultos com AF que apresentam frequentes episódios clínicos graves da doença (STROUSE; HEENEY, 2012). A medicação previne danos a órgãos cruciais como fígado, rins e cérebro e melhora a sobrevida nos adultos com DF e, apesar do estabelecimento deste como o principal medicamento no tratamento de indivíduos portadores de anemia falciforme, os possíveis malefícios são controversos e a eficácia e a segurança no tratamento a longo prazo, ainda geram discussões e questionamentos (STEINBERG, 2010; WARE, 2013).

Os mecanismos de atuação da HU não são totalmente esclarecidos, mas sabe-se que é um agente que atua na fase S do ciclo celular, interrompendo a divisão celular pela inibição da atividade da enzima ribonucleotídeo redutase. Dessa forma, reduz a síntese de DNA, alterando o mecanismo de reparo, o que pode vir a conferir um possível potencial tóxico nesta etapa do ciclo celular. A interrupção do ciclo celular gerada é, provavelmente, a principal responsável pela promoção da síntese de Hb F. Em cultura, demonstrou-se que doses de HU em células eritróides progenitoras podem aumentar a quantidade de hemoglobina intracelular total, mRNA de cadeias gama e os níveis de Hb F. Também há



evidências de que a HU atue como um doador de NO, aumentando os níveis de guanosina monofosfato cíclica (cGMP), que acelera a tradução dos genes gama e ainda favorece a vasodilatação (COKIC et al., 2003; REES, 2011). Atua, também, na diminuição da adesão de eritrócitos e leucócitos no endotélio vascular permitindo melhor fluxo sanguíneo (ALMEIDA et al., 2012). Os principais pontos de atuação da medicação em AF estão representados na figura 4.



**Figura 4.** Três principais efeitos da hidroxiureia no organismo e seus benefícios na prevenção da vaso-oclusão e vasculopatias. A hidroxiureia tem ação direta nas células eritróides, na contagem de neutrófilos e na expressão de moléculas de adesão. PS: Fosfatidilserina (modificado de REES, 2011).

### 1.5. Estresse Oxidativo na Doença Falciforme

O estado oxidativo das células é determinado pelo equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Durante o metabolismo celular as ERO, de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, são geradas por processos naturais do metabolismo observadas em diversas condições fisiológicas como no controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, apoptose e fagocitose de agentes patogênicos (SCHAFER; BUETTNER, 2001; VASCONCELOS et al., 2007). No aumento das ERO e/ou diminuição da capacidade antioxidante, tais espécies são capazes de agir sobre componentes celulares lesionando-os direta ou indiretamente, podendo reagir com biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, modificando suas respectivas estruturas e/ou funções e, com isso, gerando o estresse oxidativo, por meio da capacidade das ERO em extrair elétrons de fontes celulares para tornarem-se estáveis. Além disso, podem gerar outras formas de ERO por processos de oxidorredução como, por exemplo, a formação de radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) pela dismutação de radical superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que, posteriormente, é convertido em radical hidroxil pelas reações de Fenton e Harber-Weiss (CHIRICO et al., 2011)

As lesões celulares causadas por (ERO), tais como o radical ânion superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) estão associadas com a diminuição da sobrevivência do eritrócito em vários tipos de anemias hemolíticas, sejam de ordem adquirida, hereditária, induzida por drogas oxidantes ou metais pesados. Os eritrócitos falcêmicos têm suas lesões intensificadas em relação direta com a concentração de Hb S intraeritrocitária, sendo que em alguns casos, quando a concentração de Hb S é superior a 90%, a média de vida dos eritrócitos é de aproximadamente 30 dias (FRENETTE; ATWEH, 2007).

Os eritrócitos estão sujeitos aos efeitos nocivos de ERO, que são produzidos por fatores exógenos como drogas e infecções, e também formados dentro dos eritrócitos, como consequência da reação da Hb com o oxigênio. Como esses agentes oxidantes acumulam-se nos eritrócitos, a Hb e outras proteínas são oxidadas levando à perda de função e destruição das células, existindo desta forma, importante relação entre o estresse oxidativo e a anemia (REISCHL et al., 2007). Durante a mudança de conformação do eritrócito com Hb S, entre os eventos bioquímicos e polimerizantes, ocorre a degradação oxidativa da Hb S, com liberação das espécies ativadas de oxigênio, que alteram a distribuição das moléculas de imunoglobulinas G (IgG) na superfície da membrana. As

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

Pacientes com AF estão sujeitos a intensos processos de estresse oxidativo particularmente durante as crises vaso-oclusivas. Diversos aspectos das anormalidades na AF são resultantes de estresse oxidativo dos eritrócitos, células brancas, células endoteliais e ativação de plaquetas. Devido aos eventos intravasculares ocasionarem estresse oxidativo, além da fisiopatologia anteriormente destacada, é necessário que haja eficiente utilização de sistemas de defesa, para neutralizar os radicais livres formados (MANFREDINI et al., 2008).

### **1.6. Sistema de Defesa Antioxidante e Glutathione S-transferase**

Os principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathione, particularmente a glutathione peroxidase. Outras enzimas antioxidantes, como glutathione redutase e glicose-6-fosfato-dehidrogenase, apresentaram propriedades protetoras similares à glutathione peroxidase (ROVER-JÚNIOR, 2001).

Outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes operando em conjunto com as enzimas citadas anteriormente incluem a superóxido dismutase (SOD), dependente de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  como cofatores, que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, bem como a catalase, que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular nas hemácias. Há ainda a proteção não enzimática, dentre as mais utilizadas estão as vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol), e C (ácido L-ascórbico) (MEISTER et al., 1983; ROVER-JÚNIOR, 2001).

A glutathione (GSH) é considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, pois em conjugação com as enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferases (GST) desempenha papel central na defesa das células contra o estresse oxidativo, na biotransformação e eliminação de diversos agentes xenobióticos e mutagênicos (KUMARAGURUPARAN et al., 2005; RAJNEESH et al.,

2008). Consiste em um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e dissulfeto (GSSG) e possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo e produtos de lipoperoxidação (JOSEPH et al, 1997).

A GPx é uma proteína de 80kDa composta por quatro subunidades idênticas e apresentam distribuição tecido-específica (TOWNSEND et al., 2003). Utiliza a GSH como doador de elétrons, para redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ). A inativação de um agente oxidante como o ( $O_2^-$ ) é inicialmente catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando  $H_2O_2$ , o qual é convertido em  $H_2O$  pela GPx. Esse processo resulta na conversão da GSH à sua forma oxidada, Glutathiona dissulfeto (GSSG), que é catalisada pela enzima Glutathiona oxidase (GO) (BALLATORI et al., 2009).

Para que a atividade antioxidante da GSH seja mantida, a GSSG precisa ser regenerada pela ação da Glutathiona redutase (GR). Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, ocorre a regeneração da GSH, entretanto quando há excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema antioxidante, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, ocorrendo o estresse oxidativo (VALKO et al., 2006; HADZIC et al., 2010).

As GST são divididas em oito classes:  $\zeta$ ,  $\alpha$ ,  $\theta$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$  e  $\omega$ . O gene *GSTM1* ( $\mu$ ) está localizado no cromossomo 1q13.3 humano e sua expressão tem sido descrita como de herança autossômica dominante. Este polimorfismo está envolvido na detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros mutágenos, e 20% a 50% dos indivíduos não expressam a enzima, devido deleção completa (ROSSINI et al., 2002). O gene *GSTT1* ( $\theta$ ) está localizado no cromossomo 22q11.23 humano e, assim como no caso da *GSTM1*, devido a deleções completas, 20% a 60% dos indivíduos não expressam a enzima por ele codificada (ROSSINI et al., 2002). O genótipo *GSTT1* nulo é outra combinação comum. A falta da enzima foi relatada por Landi (2000) como um fator de risco para ocorrência de carcinoma basocelular. Indivíduos com ambos os genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* são particularmente predispostos ao agravamento oxidativo e diminuição da capacidade antioxidante (STRANGE, 2001).

A *GSTP1* ( $\pi$ ) é expressa em grande quantidade em todos os tecidos (ZUNTAR et al., 2004). Seu polimorfismo foi descrito pela primeira vez no cromossomo 11q13 humano, e constataram uma transição do nucleotídeo 313 (A  $\rightarrow$  G) no éxon 5 e outra no nucleotídeo 341 no éxon 6 (G  $\rightarrow$  T), envolvendo a substituição de dois aminoácidos no sítio de

atividade da enzima (Ile → Val). Essa variação alélica parece reduzir a atividade de GSTP1 em muitos tecidos, assim como a capacidade de inativar compostos mutagênicos, indicando o envolvimento dessa enzima na suscetibilidade para cânceres (HARRIES et al., 1997; TANDINGHER et al., 1999).

Em geral, as reações catalisadas pelas GST são consideradas detoxificantes e protegem macromoléculas celulares dos danos causados por vários carcinógenos ambientais, encontradas nos alimentos, fumo, ar, medicamentos e compostos endógenos, tais como peroxilipídios, além de inativarem metabólitos secundários formados durante o estresse oxidativo (HIRVONEN, 1995; STRANGE et al., 2001).

### **1.6.1. Lesão ao DNA**

Agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, induzindo alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA, com isso, possuem a habilidade de alterar a replicação do DNA e interferir na transmissão gênica às células filhas. Em grande parte dos casos, a lesão é reparada pelo próprio organismo e a célula alterada é eliminada. Caso essa lesão seja fixada, provoca alterações hereditárias - mutações - que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação; o agente desencadeador desse processo é denominado mutagênico (REKHA et al., 2006; ABHILASH et al., 2009).

A mutagenicidade refere-se à indução de alterações permanentes e transmissíveis, na quantidade ou na estrutura, do material genético das células ou organismos. Estas alterações podem envolver um único gene (mutações pontuais), um bloco de genes ou cromossomos inteiros (aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas). Genotoxicidade é um termo mais amplo e refere-se a processos que alteram a estrutura, o conteúdo da informação e a segregação do DNA e que não são necessariamente associados à mutagenicidade. Tais processos incluem síntese do DNA, troca de cromátides irmãs, quebras de cadeia de DNA e recombinação mitótica (SERAFIMOVA, et al 2010).

O termo citotoxicidade refere-se aos efeitos adversos que ocorrem a partir da interação de um agente tóxico com as estruturas e/ou processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função celular (BAKAND et al, 2005). Por ser difícil monitorar os efeitos sistêmicos *in vivo*, assim, a maioria dos ensaios citotóxicos determinam os efeitos em nível celular (FRESHNEY, 2010). O desenvolvimento de ensaios de citotoxicidade *in vitro* tem sido impulsionado pela necessidade de avaliar

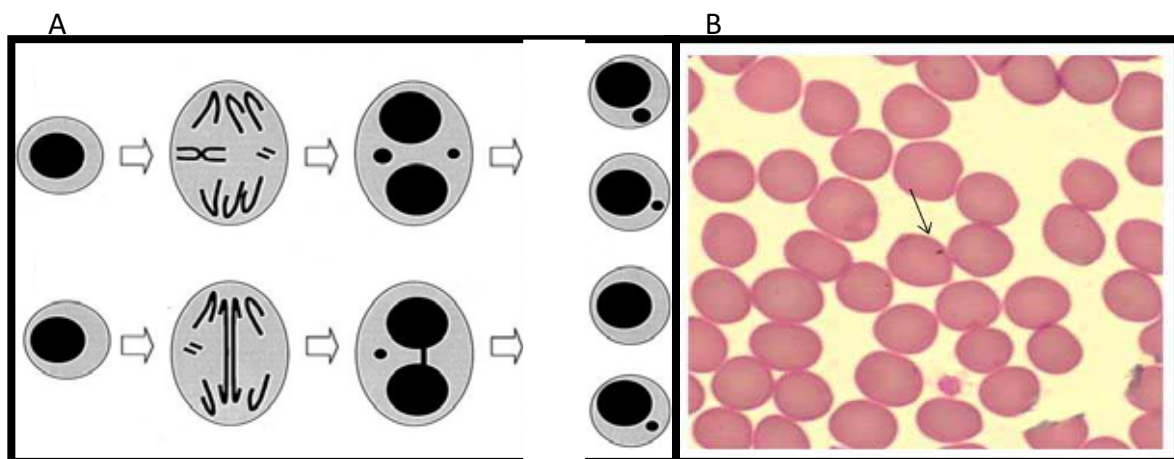
rapidamente o potencial de toxicidade de compostos, para assim, limitar, sempre que possível, a experimentação animal e realizar testes com pequenas quantidades de compostos. Os ensaios de citotoxicidade avaliam as alterações induzidas por drogas em vias metabólicas ou de integridade estrutural, que podem ou não estar diretamente relacionadas com a morte celular (MASTERS, 2000).

Um grande número de técnicas para detectar dano ao DNA têm sido utilizadas com o objetivo de identificar substâncias com atividade genotóxica. Desde a introdução do Ensaio Cometa em meio alcalino (pH 13), em 1988, a gama de aplicações e o número de pesquisadores que utilizam esta técnica tem crescido exponencialmente (TICE, 2000; COLLINS, 2013). É uma metodologia sensível, permitindo a avaliação de dano ao DNA em células isoladas. São estabelecidas classes de dano de acordo com o grau da lesão em cada célula. O núcleo lisado, corado por um intercalante de DNA, após a corrida eletroforética, adquire a forma de um cometa e a cauda deste é classificada de acordo com o tamanho em classes, de 0 a 3, de acordo com o grau de lesão evidenciada de acordo com o tamanho da cauda do cometa, consistindo o número 0, ausência de lesão e o número 3, maior grau de lesão (TICE et al, 2000). O Ensaio Cometa é um teste preconizado não para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem estabelecidas, podem resultar em mutação. Também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, visto que as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção (COLLINS, 2013). Embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (TICE et al, 2000; SILVA et al., 2007).

O Ensaio Cometa tem aplicações nas áreas biomédicas e de ciências ambientais, no biomonitoramento de populações humanas submetidas a exposições ocupacionais ou ambientais, a diferentes agentes genotóxicos, incluindo radiação, compostos químicos e também ao estresse oxidativo, com isso, a informação obtida pode fornecer dados individuais de mudança nos hábitos de vida a fim de aprimorar a saúde e fornecer dados de riscos relativos a medicamentos (COLLINS, A. R., 2008).

Micronúcleos (MN) são pequenos núcleos adicionais, originados de aberrações estruturais, rapidamente identificáveis por microscopia de luz. Em hematologia, as inclusões em eritrócitos recebem o nome de Corpos de Howell-Jolly (CHJ), e são resultantes da incompleta maturação dos eritrócitos. Ainda, é sugerido que estas inclusões são formadas durante a divisão celular mitótica. (WANG et al., 1983). Originam-se por

dois mecanismos predominantes: quebras cromossômicas e disfunção do aparato mitótico. Certas substâncias, dessa forma, podem induzir a quebras cromossômicas e produzir fragmentos acêntricos. Estes fragmentos são incluídos no micronúcleo (FALK et al., 2002). A figura 5 demonstra a formação de um micronúcleo em uma célula somática. No caso dos eritrócitos, o núcleo é expelido e a inclusão permanece, podendo ser visualizada em sangue periférico.



**Figura 5.** A: Esquema representando a formação de inclusões celulares (micronúcleo) em célula somática devido à irregularidades durante a divisão mitótica (Modificado de TICE, 2000). B: Em eritrócitos, essas inclusões recebem o nome de “Corpos de Howell-Jolly” (foto do autor).

Tendo em vista que a anemia falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum no Brasil e que apresenta fisiopatologia diferenciada, grave e individual; que ocorre predominantemente entre afrodescendentes e possui distribuição heterogênea, sendo mais frequente nas populações do Nordeste do país; que baseado nos dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), calcula-se que nasçam por ano, cerca de 3.500 crianças com Doença Falciforme (homozigoto SS ou Hb S combinada com outras Hb anormais, como Hb C e beta-talassemia) e 200 mil portadores de traço (Hb AS), tal panorama permite tratar essa doença como problema de saúde pública em nosso País.

Entender os mecanismos que influenciam a fisiopatologia e/ou a resposta ao uso de medicações são fundamentais e a carência de trabalhos na literatura envolvendo os polimorfismos e biomarcadores a serem avaliados em indivíduos portadores da AF, justificam a hipótese proposta.

### **1.7. Hipótese**

Na anemia falciforme, os polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 interferem no perfil oxidativo e de lesão de DNA e, com isso, conferem variação fenotípica (clínica) em portadores da anemia falciforme.



## **2.Objetivos**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Em indivíduos homocigotos para a mutação  $HBB^{(Glu6Val)}$  avaliar a influência da coerência dos polimorfismos M1, T1 e P1 do gene *GST* na peroxidação lipídica, possível efeito citotóxico ou de lesão de DNA e perfil fenotípico frente ao uso de medicação específica.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Analisar a distribuição de alelos e genótipos de GSTP, GSTM e GSTT da Glutathione S-transferase em pessoas com AF e em um GC;
- Avaliar a lesão no DNA e peroxidação lipídica nos referidos grupos;
- Correlacionar os genótipos encontrados com os valores dos marcadores e com o perfil fenotípico da AF em três manifestações (Acidentes Vasculares Encefálicos – AVE, Síndromes Torácicas Agudas – STA e Úlceras de perna).

### **3. Material e Métodos**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Casuística

O número amostral inicialmente proposto, de 100 indivíduos portadores da AF, independente do gênero, em acompanhamento clínico no Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti” – HEMORIO, Rio de Janeiro – RJ, foi 91% atingido. 91 amostras de sangue (8 mL) foram coletadas por punção venosa, por equipes do HEMORIO, em dois tubos de 5 mL, contendo EDTA a 5%, para testes de triagem de hemoglobinas, biologia molecular e testes bioquímicos, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Todos os pacientes foram selecionados por meio de entrevista e aplicação de questionário sobre informações clínicas e uso de outros medicamentos.

A presença da homozigose para Hb S, para confirmação da AF, foi feita por meio de testes de triagem básica e investigação molecular de todos os pacientes. Aqueles que não se enquadraram no perfil genético desejado, foram excluídos do grupo amostral.

O grupo amostral foi selecionado de acordo com os seguintes critérios de inclusão: indivíduos com idade acima de dez anos, independentes do gênero, homozigotos para hemoglobina S (Hb SS), acima 80% para Hb S e até de 5% para Hb A, de forma que estas variáveis não venham a influenciar os valores dos biomarcadores avaliados.

Um grupo de 428 amostras foram genotipadas, sendo que destas, 332 possuíam homozigose para hemoglobina (Hb) S. A partir deste número, um grupo de 91 amostras foi constituído como teste e que satisfatoriamente corresponderam aos critérios de inclusão, sendo 46 indivíduos em regime terapêutico com HU, por 931 dias em média; e 45 sem contato prévio com o medicamento. Das 91 amostras selecionadas, 56 eram do gênero feminino, 35, do gênero masculino e a média de idade do grupo foi de 24 anos.

Os indivíduos do grupo controle consistiram de amostras de voluntários coletadas no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE), Campus de São José do Rio Preto por profissional capacitado. As análises do grupo controle foram submetidas aos testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinas para a confirmação de perfil hemoglobínico normal (Hb AA). Do total de 100 amostras inicialmente propostas, foram analisadas 99 amostras para o grupo controle, com média de idade de 22 anos, compatíveis com os seguintes critérios de inclusão: isentos de medicação nas últimas 24 horas (Vitaminas, Analgésicos e Antibióticos); não uso de substâncias alcoólicas e fumígenas, com perfil de hemoglobinas normais.

### 3.2. Métodos

#### Seletivos para perfil de hemoglobinas

##### 3.2.1. Preparação de hemolisados (NAOUM, 1990)

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e bioquímicos, as células foram lisadas para a obtenção da solução de hemoglobina utilizando-se da metodologia do hemolisado rápido com saponina.

##### *Hemolisado Rápido com Saponina:*

Reativo hemolisante:

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

Procedimento: Adicionou-se o volume de 100 µL de sangue periférico ao volume de 100 µL de reativo hemolisante em uma placa de *Kline*. Logo após, realizou-se a homogeneização até obtenção da hemólise total da mistura. Este hemolisado foi utilizado logo após o preparo.

##### 3.2.2. Resistência globular osmótica em cloreto de sódio a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)

Princípio: Esta técnica avalia a resistência dos eritrócitos à hemólise. Resultados positivos para este teste são encontrados em heterozigose para hemoglobina C e, principalmente, em casos de beta talassemia heterozigota (97%), onde os eritrócitos microcíticos presentes são mais resistentes ao processo de hemólise.

Reagentes:

##### *Solução Estoque NaCl a 10% pH 7,4:*

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

*Solução trabalho:*

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

Procedimento: Em um tubo de ensaio, foram colocados 2,0 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total, com posterior agitação por inversão. A leitura foi feita após 10 minutos.

Interpretação: O tubo de ensaio com a solução foi colocado a 2,0 cm de uma folha branca com listras negras. Amostras negativas para o teste permitiram fácil visualização das listras, enquanto amostras positivas não permitiram essa visualização, já que a resistência aumentada à hemólise torna a amostra opaca.

**3.2.3. Análise da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)**

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

- Alterações discretas (+).
- Alterações moderadas (++)
- Alterações acentuadas (+++).
- Células normais (N)

**3.2.4. Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino (MARENGO-ROWE, 1965)**

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

Reagentes:

*Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB) pH 8,6:*

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

Corante *Ponceau*:

- Ponceau S ..... 0,5 g.

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

Solução descorante:

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

Procedimento: Após estarem submersas em tampão TEB, durante 15 minutos, as fitas de acetato de celulose foram secas, com auxílio de papel absorvente. Depois de secas, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese e os compartimentos eletrolíticos foram conectados com auxílio de papel filtro. O hemolisado de Hb foi aplicado nas fitas de celulose com distância de 1,0 cm da extremidade da fita que estava em contato com o pólo negativo, recebendo 300 volts por 30 minutos. As frações globínicas formadas foram, primeiramente, observadas sem qualquer coloração sendo, depois, coradas com Ponceau. Para a coloração, as fitas foram submersas no corante durante cinco minutos e, posteriormente, embebidas em solução descorante por 30 minutos.

### **Testes clássico, complementares à triagem, para perfil de hemoglobinas**

#### **3.2.5. Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido (VELLA, 1968)**

Princípio: Técnica para diferenciar alguns tipos de Hb, que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino, e caracterização semi-quantitativa de Hb F.

Reagentes:

*Tampão Fosfato pH 6,2 (Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel)*

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

*Gel de Ágar-Fosfato:*

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

Procedimento: Misturou-se o ágar-fosfato e o tampão fosfato em um erlenmeyer de 250 mL até a completa dissolução do primeiro. A mistura foi levada ao microondas para que o gel pudesse ser formado. Pipetou-se 5,0 mL do gel em uma lâmina de microscópio,

deixando-as gelificar à temperatura ambiente. Após a gelificação, as amostras foram aplicadas na porção média da lâmina. Utilizou-se papel filtro para promover a conexão entre o gel e os compartimentos eletrolíticos, passando 100 volts durante 30 minutos. As lâminas foram coradas, com Ponceau, a fim de permitir melhor observação e interpretação das frações de Hb obtidas.

### **3.2.6. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) (Instruction Manual Of Bio-Rad, 1999)**

**Princípio:** O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. O método consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorvância 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 absorvância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorvância *versus* tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da 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 impressos.

**Procedimento:** Foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise em um tubo. Após hemólise total dos eritrócitos, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento. Os procedimentos foram realizados conforme a pré-programação de leitura das amostras.

**Interpretação:** A quantificação das diferentes frações de Hb em cada amostra foi realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparada com os valores de calibração específicos, fornecidos pelo fabricante, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Os valores de Hb A<sub>2</sub> considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,0%, de acordo com os valores normais estabelecidos pelo laboratório.



### Para análise molecular

#### 3.2.7. Extração de DNA (SAMBROOK; FRITCSH; MANATIS, 1989 – modificado por BONINI-DOMINGOS, 2006)

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico, segundo a técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol.

Princípio: Este método promove a extração de DNA de sangue periférico utilizando-se fenol/clorofórmio e precipitação com etanol. Neste procedimento, as proteínas contaminantes sofrem desnaturação e são mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. À mistura de fenol/clorofórmio é adicionado álcool isoamílico. A adição de etanol faz com que os sais e outros solutos, como os resíduos da extração com fenol/clorofórmio, permaneçam em solução, enquanto os ácidos nucleicos precipitam-se e podem ser separados facilmente por centrifugação. O DNA obtido deste processo de extração é adequado para aplicação em métodos de biologia molecular como a amplificação por PCR.

#### Reagentes:

##### 1. Solução de lise 1 para extração de DNA (tampão utilizado na lise de células vermelhas):

- Sacarose 0,32 M ..... 10,95g.
- Tris HCl 10 mM ..... 1mL.
- MgCl<sub>2</sub> 5mM ..... 0,5 mL.
- Triton 1% 100x ..... 1 mL.
- Água ultrapura autoclavada ..... 100 mL.

##### 2. Solução de lise 2 para extração de DNA (tampão utilizado na lise de células brancas):

- NaCl 0,075 M ..... 2,19 g.
- EDTA 0,02 M (solução estoque pH 8,0) ..... 20 mL.
- Água ultrapura ..... 500 mL.

##### 3. Proteinase K (20 mg/mL):

- Proteinase K ..... 20 mg.
- Água ultrapura ..... 1 mL.

## 4. Clorofórmio/álcool isoamílico 24:1:

- Clorofórmio..... 24 mL.
- Álcool isoamílico ..... 1 mL.

## 5. SDS 10%:

- SDS ..... 10 g.
- Água ultrapura ..... 100 mL.

## 6. Etanol 70%

## 7. Fenol

## 8. KCl 2M:

- KCl (peso molecular 74,55 g) ..... 14,91 g.
- Água ultra pura autoclavada q.s.p. .... 100 mL.

Procedimento: Cerca de 500 a 800  $\mu$ L de amostras de sangue periférico, colhidas em tubos contendo EDTA, foram colocados em tubos *eppendorf* e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 6500 rpm.

O sobrenadante foi descartado, deixando-se aproximadamente 300  $\mu$ L de pellet no tubo, e a esse precipitado adicionou-se novamente solução de lise 1, até completar 1,0 mL. As amostras foram agitadas até dissolução do *pellet* e descansaram por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente antes de serem centrifugadas novamente por cinco minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento de lavagem foi realizado mais uma vez.

Ao *pellet* foram adicionados 450  $\mu$ L de solução de lise 2, 25  $\mu$ L de SDS 10% e 5  $\mu$ L de proteinase K (20 mg/mL). Após homogeneização, as amostras ficaram incubadas em banho-maria a 37°C overnight ou a 42°C por 3 horas. Após o período de incubação, foram adicionados 500  $\mu$ L de fenol e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 6500 rpm durante cinco minutos.

A fase superior foi transferida para outro tubo e foram adicionados 500  $\mu$ L de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por mais cinco minutos a 6500 rpm e o procedimento foi repetido por mais

uma vez.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 50 µL de KCL gelado e 500 µL de etanol 100%, também gelado, foram adicionados. O tubo foi invertido várias vezes, até ocorrer a precipitação do DNA, e centrifugado por 30 segundos a 14000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o DNA, que ficou aderido ao tubo, com 200 µL de etanol 70% gelado. As amostras foram centrifugadas por 30 segundos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e os tubos passaram cerca de 15 minutos secando.

O DNA foi re-hidratado com 50 µL de água ultra pura e ficou descansando overnight em temperatura ambiente, para total solubilização da amostra. As amostras foram estocadas a -20°C para posterior análise.

### 3.2.8. Identificação da Hb S por PCR-RFLP (SAIKI et al., 1985)

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguida de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação, que envolvem o códon 6, foram:

- *primer sense* P 277: 5' - GGCAGAGCCATCTATTGCTTA - 3'

- *primer antisense* P 278: 5' - ACCTTAGGGTTGCCCATTAAC - 3'

Para cada tubo de reação, foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

H <sub>2</sub> O Mili Q .....	14,3 µL.
<i>Primer</i> P 277 10 µM .....	1,5 µL.
<i>Primer</i> P 278 10 µM .....	1,5 µL.
dNTP 1,25 mM .....	1,0 µL.
Tampão sem MgCl <sub>2</sub> .....	2,5 µL.
MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....	3,0 µL.
Taq Polimerase 5U .....	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL .....	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições:

- Ciclo de 35 repetições:

- Desnaturação durante 30 segundos a 94°C.
- Anelamento durante 30 segundos a 55°C.
- Extensão de 1 minuto a 72°C.
- Extensão de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento de 376 pb foi digerido com a enzima DdeI a 37°C por 5 minutos. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi:

H <sub>2</sub> O Mili Q .....	9,0 µL.
Enzima Fast Digest <i>Dde</i> I (C↓TNAG) .....	1,0 µL.
Tampão Fast Digest .....	1,0 µL.
Produto da PCR .....	5,0 µL.

A mutação HBB<sup>Glu6Val</sup> elimina um sítio de restrição, assim, após a digestão, alelos normais geraram três fragmentos: 201 pb, 88 pb e 87 pb; enquanto alelos mutantes geraram dois fragmentos 288 pb e 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 visualizada sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

### 3.2.9. Identificação dos Polimorfismos de GST

#### Identificação do Polimorfismo *GSTP1* (ISHII *et al.*, 1999; PINHEL *et al.*, 2008)

Para a amplificação do segmento que codifica o polimorfismo do gene *GSTP1* foram utilizados os seguintes iniciadores:

105F – 5' – ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA – 3' (*sense*)

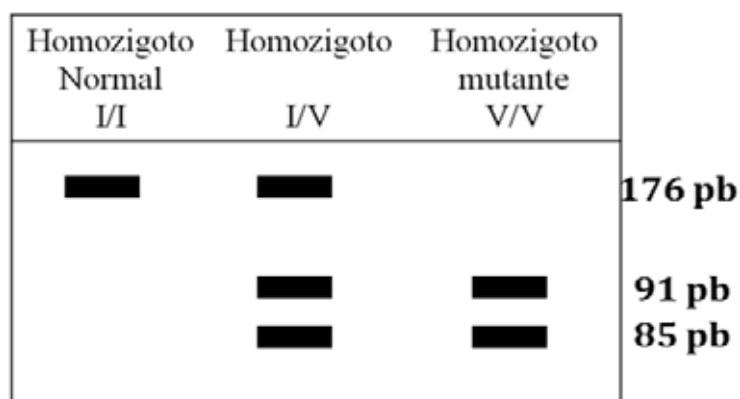
105R – 5' – TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT – 3' (*antisense*)

Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 µL:

- H <sub>2</sub> O Mili Q .....	10,0 µL;
- <i>Primer</i> P1 .....	2,5 µL;
- <i>Primer</i> P2 .....	2,5 µL;
- dNTP 1,25 mM .....	2,0 µL;
- DMSO 10% .....	2,5 µL;
- Tampão sem MgCl <sub>2</sub> .....	2,5 µL;
- MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....	0,75 µL;
- Taq Polimerase 5U .....	0,25 µL;
- DNA 100 ng/µL .....	2,0 µL.

O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por cinco minutos, acrescida de 40 ciclos de 94°C por um minuto, 62°C por três minutos, 72°C por um minuto e meio, seguida de uma extensão final a 72°C por sete minutos.

O produto de amplificação da PCR foi submetido à enzima de restrição *Bsm*I, isômero da enzima *Alw* 26I (5U) (New England BioLabs). O produto da amplificação após o adição da enzima é colocado em banho maria à 37° C, por 4 horas, para clivagem das sequências em regiões específicas. Após digestão, o alelo normal gera um fragmento de 176 pb e o alelo mutante gera dois fragmentos, um de 91 pb e outro 85 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3,0% sob corrente constante de 80 V por 45 minutos e evidenciados com brometo de etídio sob luz UV (Figura 6).



**Figura 6.** Representação esquemática dos produtos da PCR - RFLP para *GSTP1*. I/I= presença dos alelos isoleucina (homozigoto selvagem); I/V= presença do alelo isoleucina e alelo valina (heterozigoto); V/V= presença dos alelos valina (homozigoto mutante).

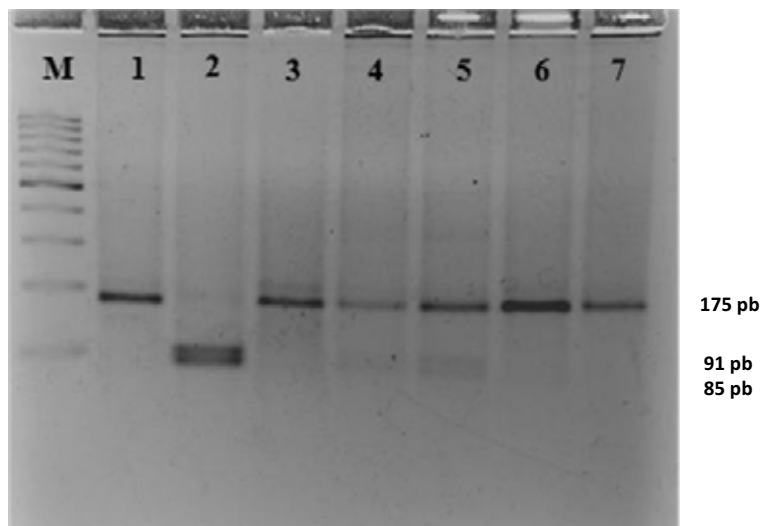
### **Identificação do Polimorfismo *GSTP1* (ISHII *et al.*, 1999; PINHEL *et al.*, 2008, modificado)**

Para a genotipagem dos pacientes para o polimorfismo *GSTP1* foi necessário modificar o protocolo utilizado pelo laboratório, pois não era possível diferenciar as bandas de 85 e 91 pb em gel de agarose. Portanto, foram realizados testes com diferentes preparos de *mix*, com intuito de que fosse possível a visualização e distinção dessas bandas em gel de agarose mais concentrado. Contudo, os melhores resultados foram obtidos quando reduzimos a quantidade dos *primers* e aumentamos a quantidade de água, como proposto a seguir:

- H<sub>2</sub>O Mili Q ..... 12,0 µL;

- <i>Primer</i> P1 .....	1,5 $\mu$ L;
- <i>Primer</i> P2 .....	1,5 $\mu$ L;
- dNTP 1,25 mM .....	2,0 $\mu$ L;
- DMSO 10% .....	2,5 $\mu$ L;
- Tampão sem MgCl <sub>2</sub> .....	2,5 $\mu$ L;
- MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....	0,75 $\mu$ L;
- Taq Polimerase 5U .....	0,25 $\mu$ L;
- DNA 100 ng/ $\mu$ L .....	2,0 $\mu$ L.

Dessa maneira, não houve necessidade de modificarmos os processos de amplificação e, nem mesmo, o da digestão enzimática, sendo que este foi feito como proposto no protocolo original. Posteriormente, os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3,5% sob corrente constante de 100 V por 45 minutos e evidenciados com brometo de etídio sob luz UV (Figura 7).



**Figura 7.** Foto do gel de agarose a 3,5% mostrando os fragmentos de DNA obtidos após a digestão enzimática para confirmação dos genótipos do polimorfismo *GSTP1*. M (Marcador molecular 100 pares de base). Linhas 1, 3, 6 e 7 representam indivíduos homocigotos selvagens (II). Linhas 4 e 5 representam indivíduos heterocigotos (IV) para a mutação. A linha 2 representa os indivíduos mutantes (VV). M de 100 pb.

#### **Identificação do Polimorfismo *GSTM1* e *GSTT1* (ARAND et al., 1996; PINHEL et al., 2008)**

A pesquisa dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada de forma simultânea pela reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex. Os fragmentos foram amplificados a partir dos seus oligonucleotídeos iniciadores específicos e necessitaram de uma banda controle, gerada pela amplificação do gene *housekeeping CYP1*.

Para a amplificação dos segmentos que codifica os polimorfismos do gene *GST* (*GSTM1* e *GSTT1*) foram utilizados os seguintes iniciadores:

CYP1 – 5' – GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT – 3' (*sense*)

CYP2 – 5' – CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC – 3' (*antisense*)

*GSTM1* – 5' – GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C – 3' (*sense*)

*GSTM2* – 5' – GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G – 3' (*antisense*)

*GSTT1* – 5' – TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC – 3' (*sense*)

*GSTT2* – 5' – TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA – 3' (*antisense*)

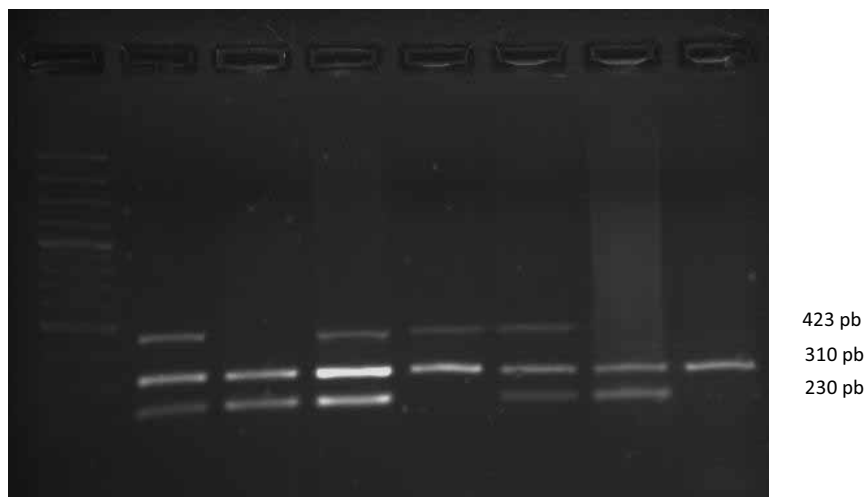
Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25  $\mu$ L:

- H<sub>2</sub>O Mili Q ..... 7,0  $\mu$ L;

- <i>Primer M1</i> .....	1,25 $\mu$ L;
- <i>PrimerM2</i> .....	1,25 $\mu$ L;
- <i>Primer T1</i> .....	1,25 $\mu$ L;
- <i>Primer T2</i> .....	1,25 $\mu$ L;
- <i>CYP 1</i> .....	1,25 $\mu$ L;
- <i>CYP 2</i> .....	1,25 $\mu$ L;
- dNTP 1,25 mM .....	5,0 $\mu$ L;
- Tampão sem MgCl <sub>2</sub> .....	2,5 $\mu$ L;
- MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....	0,75 $\mu$ L;
- Taq Polimerase 5U .....	0,20 $\mu$ L;
- DNA 100 ng/ $\mu$ L .....	2,0 $\mu$ L.

O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por quatro minutos, acrescida de 30 ciclos de 94°C por dois minutos, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, seguida de uma extensão final a 72°C por dez minutos. Os genótipos nulos (ambos os alelos com deleção) para os genes *GSTM1* e *GSTT1* foram identificados pela ausência dos fragmentos de amplificação de 230 pb e 423 pb, respectivamente, separado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 80V por 45 minutos e evidenciados com brometo de etídio sob luz UV (Figura 8).





**Figura 8.** Representação esquemática dos produtos da PCR MULTIPLEX para *GSTM1* e *GSTT1*. M/M= presença do alelo para *GSTM1* e ausência de alelo para *GSTT1*; T/T= presença do alelo para *GSTT1* e ausência de alelo para *GSTM1*; M/T= presença dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*; NULO= ausência para os alelos de *GSTM1* e *GSTT1*.

### 3.3. Avaliação do dano ao DNA

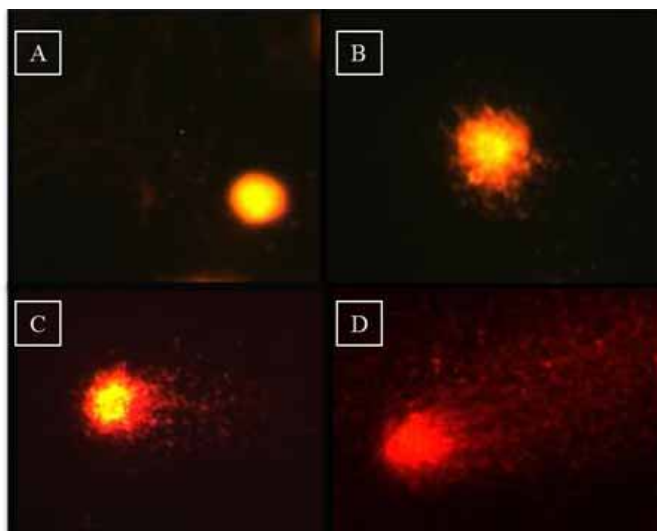
#### 3.3.1. Ensaio Cometa (TICE et al., 2000, com modificações):

As amostras de sangue total foram submetidas à centrifugação por, em média, 10 minutos. Uma alíquota de 10  $\mu$ L do *pellet* de leucócitos foi coletada e transferida para um tubo contendo 130  $\mu$ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. Esta solução foi homogeneizada e transferida para uma lâmina pré-gelatinizada com agarose comum. Estas lâminas permaneceram em solução de lise (1 mL de triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 - solução estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, para 1 L) na geladeira por uma hora. Após o processo de lise celular, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal. Para que a corrida fosse realizada, acrescentou-se tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH~13), por 20 minutos, na ausência de luz. Após o período de descanso, as lâminas foram submetidas a eletroforese, por 20 minutos a 25 V e 300 mA. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4M, por 15 minutos e fixadas em etanol por mais 10 minutos. No momento da análise das lâminas a coloração foi realizada com brometo de etídio (0,02 mg.mL<sup>-1</sup>).

Para cada amostra, foram analisados 100 nucleóides, com a utilização de microscopia de fluorescência, em aumento de 200x. Os cometas foram classificados

visualmente, de acordo com a migração de seus fragmentos, sendo classificados em classes de 0 a 3, sendo 0 a representação de ausência de lesão e 3 o grau máximo de lesão de acordo com a classificação sugerida por Kobayashi e colaboradores (1995).

Os resultados de cada classe foram convertidos em índice de dano (ID), da seguinte forma:  $ID = (\text{células em classe } 0 \times 0) + (\text{células em classe } 1 \times 1) + (\text{células em classe } 2 \times 2) + (\text{células em classe } 3 \times 3)$  (figura 9). Dessa maneira, se todas as células fossem classificadas em classe 0,  $ID = 0$  (mínimo) e no caso da totalidade de células classificadas em classe 3,  $ID = 300$  (máximo). Utilizamos esta fórmula matemática a fim de eliminar subjetividades na interpretação dos resultados (KOBAYASHI et al., 1995).



**Figura 9.** Nucleóides após a corrida eletroforética da técnica de ensaio cometa em amostras de sangue periférico de indivíduos portadores de AF e em um grupo controle. Em A, apresenta-se um nucleóide classificado como dano de classe 0; em B, classe 1; em C, classe 1 e em D, classe 3. A e B correspondem a amostras de indivíduos do grupo controle e C e D, amostras do grupo teste. Aumento: 200X.

### 3.3.2. Técnica de Corpos de Howell-Jolly (micronúcleo) (JOLLY, 1907 apud SEARS; UDDEN, 2012):

A avaliação de micronúcleos pela presença de Corpos de Howell-Jolly se deu da seguinte forma: das amostras coletadas foram confeccionados esfregaços sanguíneos comuns e depois submetidos à coloração por Panótico Rápido para Análises Hematológicas. Após coloração, contou-se 3000 células, alternando-se os campos, em microscópio de luz no máximo aumento (1000X), e o valor de micronúcleos foi fornecido pela razão nº de MN/3000 células.

### **3.3.3. Avaliação bioquímica da peroxidação lipídica – Dosagem de espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (PERCARIO et al., 2004 – com modificações)**

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

#### Reagentes:

- Água ultra-pura (deionizada e destilada) ou Água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>);
- Cloreto de Potássio (KCl) 1,15%;
- Fosfato Monobásico de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) – Tampão fosfato 75 Mm (pH 2,5);
- Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10 mM;
- Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20 µM;
- Álcool N-Butílico.

#### Preparo do Plasma

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

#### Procedimentos:

##### Preparo final dos controles e amostras

- O TBA foi preparado no mesmo dia da leitura;
- Foi separado 2 tubos de ensaio para cada amostras (ensaio em duplicata);
- Pipetou-se 1 mL do reagente TBA para cada tubo;
- Os tubos de número 1 receberam 500 µL de Água destilada – controle branco, e os tubos de número 2 receberam 500 µL de solução padrão TBARS – controle padrão TBA;

- A partir dos tubos de número 3 foram adicionadas 500 uL das amostras a serem analisadas;

- Os tubos foram colocados em banho maria a 94°C durante 1h;
- Após 1h resfriamos os tubos a temperatura ambiente por 15 minutos;
- Pipetou-se 4 mL de álcool n-Butílico em cada tubo;
- Tampamos os tubos com rolhas apropriadas e homogeneizamos as amostras com um vórtex;
- Centrifugou-se os tubos 2500 rpm durante 10 minutos.

#### Leitura em Espectrofotômetro

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

#### Cálculo do valor de TBARS da amostra

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

TBARS = A média x F, no qual:

- A média =  $(A1+A2)/2$

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

- $F = ([\text{padrão TBARS}] \times 440,61) / \text{A padrão TBARS}$

Como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10nM temos:

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

$$F = 4406,1 / \text{A padrão TBARS}$$

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

### 3.4. Análise Estatística

Aos resultados obtidos foram aplicados testes estatísticos para sua interpretação. Para a comparação das frequências genotípicas da enzima GST, foi aplicado o teste do Chi-quadrado; para comparações entre os indivíduos do grupo teste (AF + HU e AF – HU); para comparações entre os biomarcadores nos três grupos (AF + HU, AF – HU e GC) efetuou-se, para normalidade, Shapiro-Wilk e homogeneidade, Levene. A partir daí, para dados paramétricos foi aplicado o teste ANOVA One Way, com *post hoc* Tukey; para dados não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, complementado por Dunn; os dados de correlação entre peroxidação lipídica e lesão de DNA foram obtidos pelo teste estatístico de Spearman. Para todos foi utilizado o programa estatístico STATISTICA 8.0. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## **4. Resultados**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Presença dos polimorfismos GSTP1, GSTM1 e GSTT1 da Glutathione S-transferase

#### Identificação do polimorfismo GSTP1

Nas detecções do gene *GSTP1*, os valores entre as frequências genotípicas, em relação aos grupos avaliados, de maneira geral, mostraram-se semelhantes. Para o genótipo II, os valores foram próximos em ambos os grupos (53,8% ocorrência no grupo de estudo e 51,5% no grupo controle); o mesmo ocorreu para o genótipo IV, em que as frequências foram as que mais diferenciaram-se entre si – 27,5% para o grupo de estudo e 36,4% para o GC; a frequência do genótipo VV consistiu de 18,7% no grupo de estudo e 12,1% GC. A comparação entre as frequências genotípicas do grupo teste e do grupo controle não diferiram estatisticamente ( $p = 0,24$ ). Considerando as respectivas frequências alélicas, os valores também foram semelhantes (para o alelo I: 0,67 no grupo teste e 0,70 no grupo controle; para o alelo V: 0,33 e 0,30, respectivamente). A tabela 1 ilustra as comparações entre o grupo de estudo e o grupo controle para a frequência genotípica e alélica encontrada.

Para os polimorfismos GSTM1 e GSTT1, dos 91 pacientes com AF encontramos 41 (45,1%) indivíduos com ambos os polimorfismos (GSTM1/T1); 19 (20,9%) pacientes apresentaram genótipo MM; 18 (19,8%) pacientes apresentaram genótipo TT e 13 (14,2%) foram nulos para ambos os polimorfismos. No grupo controle, foi observado que 22 (22,2%) indivíduos apresentaram ambos os polimorfismos (GSTM1/T1); 23 (23,2%) pacientes demonstraram genótipo MM; 35 (35,4%) indivíduos TT e 19 (19,2%) nulos para ambos os polimorfismos.

Considera-se, a partir deste resultado, que os portadores nulos para GSTM1 são a soma do genótipo TT mais os indivíduos nulos para os dois polimorfismos; e os nulos para GSTT1 como a soma do genótipo MM mais os indivíduos nulos para os dois polimorfismos. Observamos, então, no grupo de estudo, 31 (34,1%) indivíduos nulos para GSTM1 e 32 (35,2%) indivíduos nulos para GSTT1; no grupo controle, observa-se, assim, 54 (54,5%) indivíduos nulos para GSTM1 e 42 (42,4%) indivíduos nulos para GSTT1. A tabela 2 mostra a diferença entre as frequências encontradas no grupo de estudo e no GC.

**Tabela 1.** Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo no gene para a enzima GSTP1 no grupo de estudo e no grupo controle.

Polimorfismo			Grupo		
GSTP1	AF		GC		p
Genótipos	N	%	N	%	-
II	49	53,8	51	51,5	0,81
IV	25	27,5	36	36,4	0,33
VV	17	18,7	12	12,1	0,69
Total	91	100	99	100	-

Alélos	N	Freq	N	Freq	P
I	61,5	0,67	69	0,70	0,87
V	29,5	0,33	30	0,30	0,98
Total	91	1,00	99	1,00	-

Legenda: II: genótipo homocigoto selvagem; IV: genótipo heterocigoto; VV: genótipo homocigoto mutante; I: alelo Isoleucina; V: alelo Valina; AF: grupo de indivíduos com anemia falciforme; GC: grupo controle; Freq: frequência. Teste realizado: Chi-quadrado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.



**Tabela 2.** Frequências genotípicas para o polimorfismo GSTM/T encontradas no grupo de estudo e no grupo controle.

GSTMT	Grupos		Comparações entre AF e GC (valor de p)
	AF (n = 91)	GC (n = 99)	
MT	41 (45,1%)	22 (22,2%)	p = 0,008*
MM	19 (20,9%)	23 (23,2%)	p = 0,70
TT	18 (19,8%)	35 (35,4%)	p = 0,17
Nulo	13 (14,2%)	19 (19,2%)	p = 0,37
Nulos para GSTM	31 (34,1%)	34 (64%)	p = 0,37
Nulos para GSTT	32 (35,4%)	22 (42%)	

Legenda: MT: presença de ambos os polimorfismos; MM: homozigoto para GSTM/nulo para GSTT; TT: homozigoto para GSTT/nulo para GSTM; Nulo para ambos os polimorfismos. \* significa análise estatística significativa. Valores significativos:  $p < 0,05$ . Teste Chi-quadrado. Intervalo de confiança: 95%. AF: grupo de estudo com anemia falciforme; GC: grupo controle.

## 4.2. Análise da lesão ao DNA

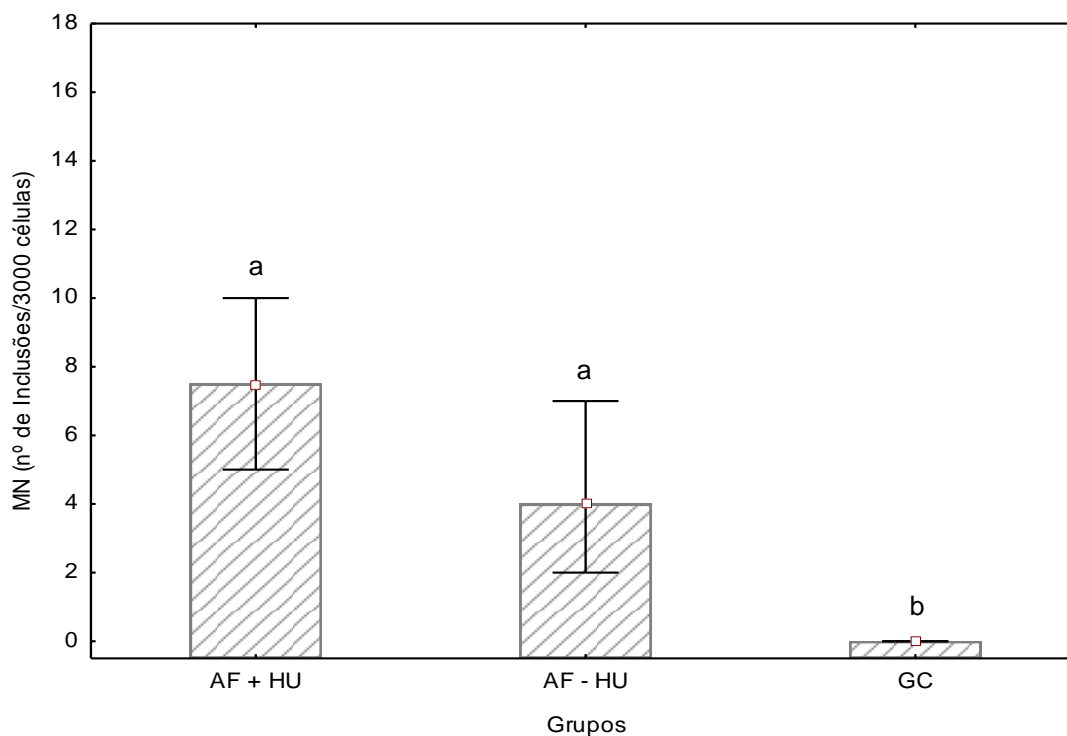
### Corpos de Howell-Jolly

No grupo de estudo (indivíduos com AF, com e sem o uso de HU), o número de CHJ encontrado foi de  $5,00 \pm 5,50$ , enquanto no GC, esse número foi significativamente menor ( $0,00 \pm 0,33$ ) ( $p < 0,05$ ). Se considerarmos apenas entre os indivíduos com anemia falciforme, os pacientes que fazem o uso de HU (AF + HU) tiveram quantidade maior de CHJ ( $7,50 \pm 5,00$ ) do que o grupo AF - HU ( $4,00 \pm 5,00$ ).

Na comparação entre os três grupos (AF + HU, AF - HU e GC), a diferença foi significativa ( $p < 0,01$ ), apenas na comparação entre ambos os grupos de estudo e o GC. Os valores para indivíduos em uso de HU e sem HU não diferiram estatisticamente ( $p = 0,07$ ). A figura 10 ilustra a distribuição desses valores, com a comparação estatística, evidenciando a diferença entre os pacientes e o grupo controle.

O grupo de estudo, com ou sem uso de HU, apresentou maior presença de CHJ, quando comparado ao grupo controle, sendo mais de oito vezes maior em AF + HU do que no GC. O teste realizado não mostrou relação estatística entre o grupo AF + HU e AF - HU ( $p = 0,07$ ),

apesar dos valores aumentados (cerca de duas vezes maior) de CHJ nos indivíduos do grupo AF + HU.



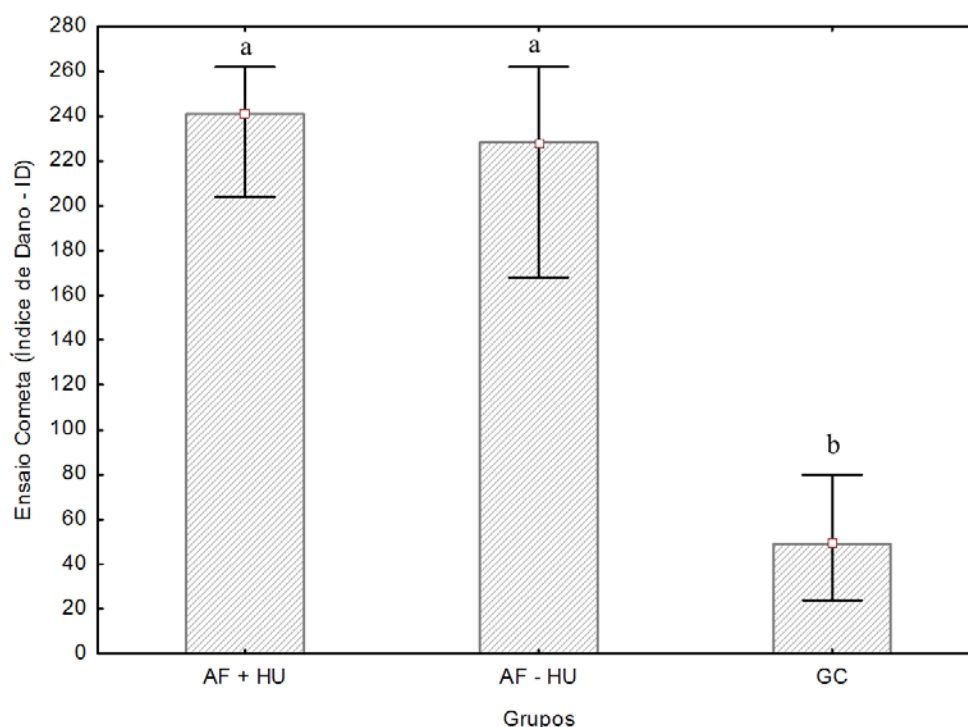
**Figura 10.** Gráfico referente aos dados da mediana de CHJ nos três grupos estudados em nº de CHJ/3000 células. Observa-se maiores médias de CHJ nos indivíduos com AF e em uso de HU. O grupo teste, em geral, é diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). A comparação entre os grupos com e sem uso de HU não mostrou diferença estatística ( $p = 0,09$ ). Letras diferentes representam diferença estatística. AF + HU: pacientes em uso de HU; AF - HU: pacientes sem uso de HU e GC: grupo controle. CHJ: Corpos de Howell-Jolly. Intervalo de Confiança: 95%. Número de indivíduos em cada grupo: AF + HU = 42, AF - HU = 49, GC = 99.

### Ensaio Cometa

Os resultados do Ensaio Cometa evidenciam que indivíduos portadores de anemia falciforme apresentam, em sua maioria, células em classes de dano 2 e 3, enquanto que indivíduos do grupo controle, células em classes de dano 0 e 1. O índice de dano é uma fórmula matemática utilizada para converter os valores de cada grau de lesão, avaliados individualmente, a fim de minimizar a subjetividade da interpretação. É calculado pela seguinte fórmula:  $ID = (\text{células em grau de lesão } 0 \times 0) + (\text{células em grau de lesão } 1 \times 1) + (\text{células em grau de lesão } 2 \times 2) + (\text{células em grau de lesão } 3 \times 3)$ . Dessa forma, avalia-se 100 núcleóides para cada indivíduo;

se todos os nucleóides avaliados mostrarem ausência de lesão (grau 0) o ID deste indivíduo é 0 (zero); se todos os nucleóides avaliados apresentarem grau de lesão 3, o ID deste indivíduo é o máximo, ou seja, 300 (trezentos).

De acordo com essa avaliação, obtivemos, em AF + HU, ID médio de  $241,00 \pm 27,00$ ; em AF - HU: ID =  $228,00 \pm 20,00$  e no GC: ID =  $49,00 \pm 17,00$ . A figura 11 ilustra a distribuição gráfica dos valores de mediana  $\pm$  amplitude interquartis de ID e respectivos desvios para cada um dos grupos estudados.



**Figura 11.** Resultado com os valores da mediana do Índice de Dano (ID) obtido a partir dos valores individuais de lesão no ensaio cometa. Teste utilizado: Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, com  $p < 0,01$ . Sinais diferentes representam diferença estatística significativa. AF + HU: indivíduos portadores de AF em uso de hidroxiureia; AF - HU: indivíduos portadores de AF sem contato com hidroxiureia. AF + HU: ID =  $241,007 \pm 27,00$ ; AF - HU: ID =  $228,00 \pm 17,00$ ; GC: ID =  $49,00 \pm 17,00$ . Intervalo de Confiança: 95%. Número de indivíduos em cada grupo: AF + HU = 42, AF - HU = 49, GC = 99.

Os indivíduos em tratamento com HU possuíam em média, 716.5 dias de uso da medicação. O resultado para a técnica do ensaio cometa entre os dois grupos teste não mostrou diferença ( $p = 0.43$ ). No entanto, quando comparados ao GC essa diferença foi significativa ( $p < 0.01$ ), com cinco vezes mais lesão entre os portadores da mutação para Hb S. A tabela 3 mostra os dados encontrados para lesão de DNA, pelo teste de quantificação de CHJ e pelo ensaio cometa no grupo teste e no GC, mostrando o aumento de lesão no grupo teste, em relação ao GC. Apesar da diferença não significativa para o uso ou não de HU, nesses parâmetros é evidente a ação da presença da Hb S na lesão ao DNA.

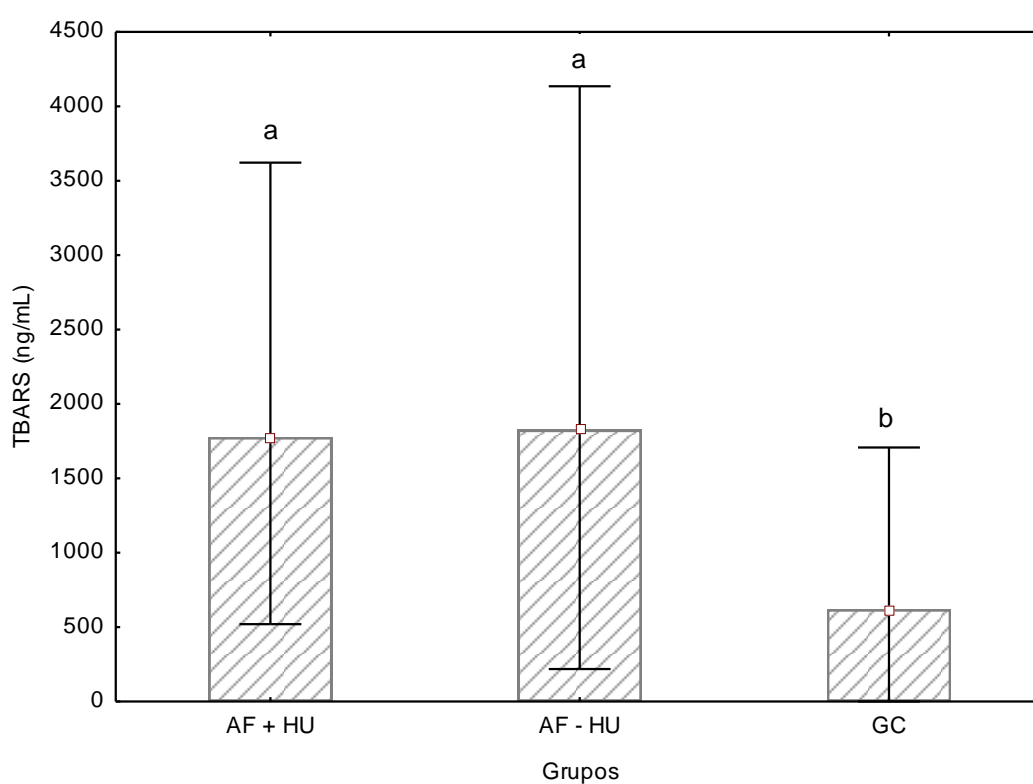
**Tabela 3.** Análise da lesão de DNA pela avaliação dos CHJ e pelo ensaio cometa (ID) nos três grupos estudados

Dano ao DNA	AF + HU (n = 42)	AF – HU (n = 49)	GC (n = 99)	Valores de p
				$p_{a,b} = 0,07$
CHJ	$7,5 \pm 5,0^a$	$4,0 \pm 5,0^b$	$0,0 \pm 0,3^c$	$p_{a,c} < 0,01$ $p_{b,c} < 0,01$
Ensaio Cometa (ID)	$237,7 \pm 16,5^a$	$227 \pm 16,4^b$	$47,6 \pm 8,7^c$	$p_{a,b} = 0,43$ $p_{a,c} < 0,01$ $p_{b,c} < 0,01$

Legenda: AF + HU: indivíduos portadores de anemia falciforme em uso de hidroxiureia; AF – HU: indivíduos portadores de anemia falciforme sem uso de hidroxiureia; GC: grupo controle; CHJ: Corpos de Howell-Jolly; ID: índice de dano levantado a partir da avaliação da técnica de ensaio cometa. Intervalo de Confiança: 95%.

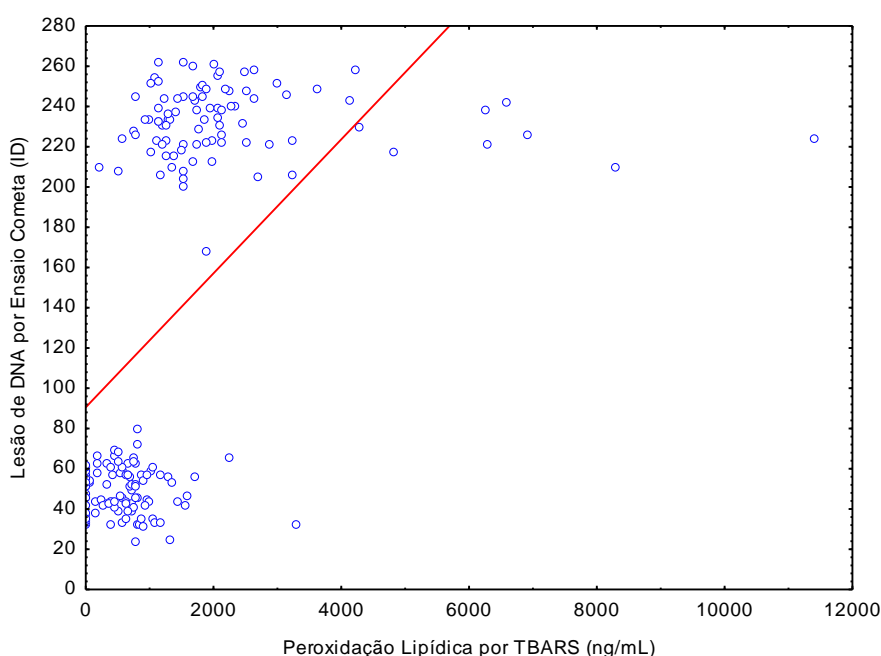
### Peroxidação Lipídica

Avaliando-se a peroxidação lipídica, por meio da dosagem de TBARS, observamos valores elevados no grupo teste em relação ao grupo controle, conforme esperado ( $p < 0,01$ ). Enquanto a média e desvio padrão de TBARS para o grupo controle foram de  $618,77 \pm 629,81$  ng/mL, para o grupo AF + HU foram de  $1176,30 \pm 988,20$  ng/mL e para o grupo AF - HU,  $1825,00 \pm 1181,60$  ng/mL. Os valores entre os grupos AF + HU e AF - HU não diferiram na comparação estatística ( $p = 1,0$ ) (Figura 12).

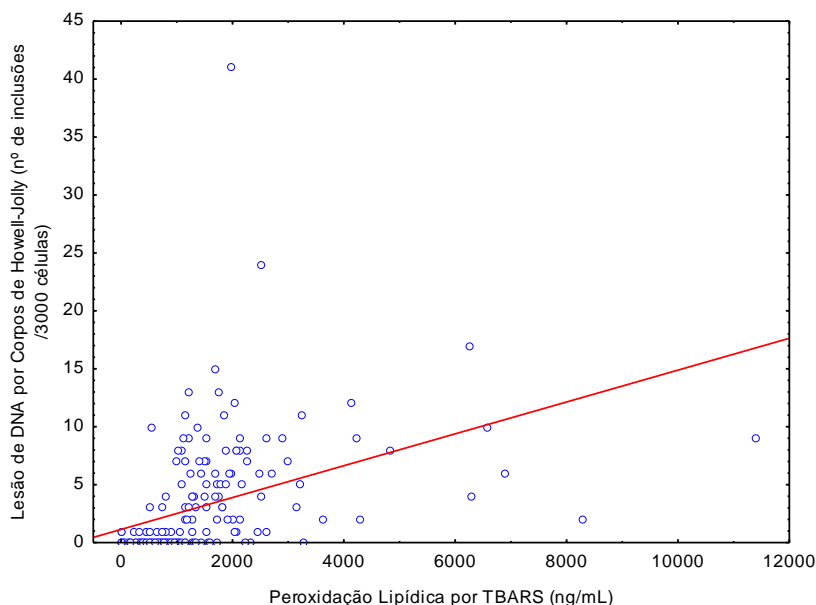


**Figura 12.** Resultado da dosagem de TBARS em indivíduos do grupo teste e do GC. Teste utilizado: Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn, com  $p < 0,01$ . Sinais diferentes representam diferença estatística significativa. AF + HU: indivíduos portadores de AF em uso de hidroxiureia; AF - HU: indivíduos portadores de AF sem contato com hidroxiureia; GC: Grupo Controle. Valores individuais para GC:  $618,77 \pm 629,81$  ng/mL; AF + HU:  $1176,30 \pm 988,55$  ng/mL e AF - HU:  $1825,00 \pm 1181,60$  ng/mL. Intervalo de Confiança: 95%.

Entendendo, dessa forma, a ação oxidativa nos doentes falciformes, é possível relacionar a taxa de peroxidação lipídica (TBARS) com a lesão de DNA, uma vez que a peroxidação lipídica leva à danos celulares, podendo agir também sobre outras moléculas e DNA. Avaliando a correlação entre os valores de TBARS e a lesão de DNA (ID e CHJ) por meio do Teste de Correlação de Spearman, encontramos uma taxa de relação de 53,3% da ocorrência deste tipo de lesão evidenciada pela técnica do ensaio cometa e com 41,83% evidenciada pela avaliação de CHJ ( $p < 0,01$ ), considerando o grupo teste em relação ao grupo controle. As figuras 13 e 14 ilustram as correlações positivas evidenciadas nos grupos de estudo e controle.



**Figura 13.** Análise da correlação entre a peroxidação lipídica (TBARS) e lesão de DNA (ID) no grupo teste (91 indivíduos) e no grupo controle (53 indivíduos). A análise mostra correlação positiva entre estes dois marcadores. Taxa de correlação: 53,3%, com  $p < 0,05$ . Teste realizado: Teste de Correlação de Spearman.



**Figura 14.** Análise da correlação entre peroxidação lipídica (TBARS) e lesão de DNA (CHJ) no grupo teste (91 indivíduos) e no grupo controle (99 indivíduos). A análise mostra correlação positiva entre estes dois marcadores. Taxa de correlação de 41,83% com  $p < 0,05$ . Teste realizado: Teste de Correlação de Spearman.

### **Genótipos GSTP e GSTMT comparados aos marcadores de lesão de DNA (CHJ e Ensaio Cometa) e peroxidação lipídica no grupo de estudo**

Como último objetivo específico, propusemos avaliar a influência dos polimorfismos das GSTs investigados no grupo de estudo a fim de verificar se estes influenciam nos marcadores de lesão de DNA e peroxidação lipídica e no perfil fenotípico nestes indivíduos. Após levantados os dados dos genótipos dos polimorfismos avaliados neste trabalho para as enzimas GSTP e GSTMT e dos marcadores de lesão de DNA – CHJ e Ensaio Cometa e peroxidação lipídica - TBARS, foi realizada a análise estatística para verificar influência dos determinados genótipos nestes marcadores. A análise estatística anterior a esta etapa não demonstrou influência da HU nos parâmetros avaliados, dessa forma, o grupo de estudo não foi separado em AF + HU e AF – HU, tornando possível considerar o grupo de estudo como um todo. Apenas o genótipo MM para os polimorfismos da enzima demonstrou diferença estatística significativa ( $p = 0,026$ ) para o marcador de lesão de DNA evidenciada pelo Ensaio Cometa. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Os dados para cada genótipo e marcadores e respectivos valores de  $p$  estão disponíveis na tabela 4 e 5.

**Tabela 4.** Valores de lesão de DNA por ID (ensaio cometa) e contagem de CHJ e peroxidação (TBARS) lipídica expressos em mediana ± amplitude interquartis em cada genótipo de GSTMT no grupo de estudo

Polimorfismo	Marcador					
	(ID)		(CHJ)		(TBARS)	
GSTMT	Mediana ± amplitude interquartis	Mediana ± amplitude interquartis	Mediana ± amplitude interquartis	Mediana ± amplitude interquartis	Mediana ± amplitude interquartis	Mediana ± amplitude interquartis
MM(a)	240,26 ± 13,39	4,0 ± 5,0	1825,18 ± 855,55			
MT(b)	231,27 ± 18,82	6,0 ± 6,0	1898,01 ± 1267,97			
TT(c)	233,56 ± 14,08	5,5 ± 8,0	1800,94 ± 1245,40			
NULO(d)	224,70 ± 17,29	5,0 ± 5,0	1247,97 ± 798,51			
p valor	axb axc axd bxc bxd cxd 0,23 0,22 <b>0,026</b> 0,67 0,23 0,24	axb axc axd bxc bxd cxd 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0	axb axc axd bxc bxd cxd 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0	axb axc axd bxc bxd cxd 1,0 1,0 0,92 1,0 0,32 0,25		

Legenda: MM – Genótipo que expressa apenas a isoforma M; MT – genótipo que expressa ambas isoformas M e T; TT – genótipo que expressa apenas a isoforma T; NULO – genótipo que não expressa nenhuma das isoformas; ID: índice de dano, método de avaliação da técnica de ensaio cometa; CHJ: Corpos de Howell-Jolly. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. IC: 95%. Teste realizado: ANOVA One Way para dados paramétricos – cometa/Kruskall-Wallis seguido de Dunn para dados não-paramétricos – CHJ e TBARS.



**Tabela 5.** Valores de lesão de DNA por ID (ensaio cometa) e contagem de CHJ e peroxidação lipídica (TBARS) expressos em mediana  $\pm$  amplitude interquartis para cada genótipo de GSTP no grupo de estudo.

Polimorfismo	Marcador								
	(ID)			(CHJ)			(TBARS)		
GSTP	mediana $\pm$ amplitude interquartis			mediana $\pm$ amplitude interquartis			mediana $\pm$ amplitude interquartis		
II(a)	234,00 $\pm$ 19,00			5,0 $\pm$ 5,0			1825,18 $\pm$ 855,55		
IV(b)	232,00 $\pm$ 14,16			6,0 $\pm$ 7,0			1898,01 $\pm$ 1267,97		
VV(c)	238,00 $\pm$ 14,94			6,0 $\pm$ 5,0			1800,94 $\pm$ 1245,40		
p valor	axb	axc	bxc	axb	axc	bxc	axb	axc	bxc
	1,0	0,55	0,85	1,0	1,0	0,99	1,0	0,97	1,0

Legenda: II: homozigoto normal; IV: heterozigoto; VV: homozigoto mutante; ID: índice de dano, método de avaliação da técnica de ensaio cometa; CHJ: Corpos de Howell-Jolly. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. IC: 95%. Teste realizado: Kruskal-Wallis seguido de Dunn.

### Polimorfismos da GST e perfil fenotípico em AF

Por fim, realizamos a comparação dos genótipos das GSTs avaliadas nos indivíduos do grupo de estudo com o perfil fenotípico relacionado às características clínicas. Conduzimos as análises em dois grupos: indivíduos em uso de HU (AF + HU) e indivíduos que não faziam uso do medicamento (AF – HU), pois sabe-se que a HU é a principal terapia medicamentosa e exerce influencia direta no fenótipo dos indivíduos com AF. Realizamos a análise estatística entre os diferente genótipos de GSTMT e GSTP contra ocorrência de Acidentes Vasculares Encefálicos (AVEs), Síndromes Torácicas Agudas (STAs) e Úlceras de perna.

Algumas análises estatísticas não foram possíveis devido ao pequeno número amostral dentro de cada uma das subdivisões. Chamamos a atenção para a baixa ocorrência de Acidentes Vasculares Encefálicos, o que prejudicou a análise estatística por Odds Ratio. Devido a isso, não foi possível todas as análises desta manifestação relacionada ao polimorfismo GSTP1. Mantivemos a análise desta ocorrência que pôde ser avaliada em relação aos genótipos de GSTMT.

A distribuição das manifestações clínicas em função do genótipo e do uso ou não de HU encontram-se detalhadas na Tabela 6 a fim de verificar se a expressão diferencial das GSTs exerce influência no perfil fenotípico da AF. Os valores mostram que, apesar de análises estatísticas não significantes, há maiores ocorrências das determinadas de manifestações levantadas em indivíduos com genótipo homozigoto mutante, comparados àqueles com genótipo homozigoto selvagem ou heterozigoto.

**Tabela 6.** Ocorrência das manifestações com relação aos genótipos de GSTMT e GSTP e uso de HU no grupo de estudo.

Grupos/Genótipo	HU+					HU-				
	n	AVE+	AVE-	STA+	STA ULC ULC	n	AVE+	AVE-	STA+	STA ULC ULC
MM	7	0	7	3	4 0 7	11	2	9	5	6 1 10
MT	17	1	16	8	9 4 13	24	1	23	10	14 4 20
TT	10	2	8	8	2 2 8	8	1	7	8	0 2 6
NULO	8	0	8	6	2 2 6	5	0	5	1	4 2 3
Total				42		48				
II	23	2	21	11	12 5 18	25	4	21	12	13 8 17
IV	10	1	9	7	3 1 9	15	0	14	8	6 1 13
VV	9	0	9	6	3 2 7	8	0	8	4	4 0 8
Total				42		48				

Legenda: MM – Genótipo que expressa apenas a isoforma M; MT – genótipo que expressa ambas isoformas M e T; TT – genótipo que expressa apenas a isoforma T; NULO – genótipo que não expressa nenhuma das isoformas; II – homozigoto selvagem para GSTP; IV: heterozigoto para GSTP; VV: homozigoto mutante para GSTP; HU+ indivíduos em uso de medicação específica - hidroxureia; HU-: indivíduos que não faziam uso de medicação específica – hidroxureia; n: número de indivíduos com determinado genótipo; AVE+: indivíduos que apresentaram Acidentes Vasculares Encefálicos; AVE -: indivíduos que não apresentaram Acidentes Vasculares Encefálicos; STA+: indivíduos que apresentaram Síndromes Torácicas Agudas; STA-: indivíduos que não apresentaram Síndromes Torácicas agudas; ULC+: indivíduos que apresentaram úlceras de perna; ULC-: indivíduos que não apresentaram úlceras de perna.

Para o polimorfismo GSTMT, conduzimos as análises separando os genótipos MM e MT de TT e Nulo – M[+] para verificar a influência de GSTM, ou seja, a presença da isoforma  $\mu$ ; TT e MT de MM e Nulo – T[+] para verificar a influência de GSTT, ou seja, da isoforma  $\theta$  e, por fim, separou-se MM, MT e TT do genótipo Nulo - M[+]T[+], para verificar a influência da presença de pelo menos uma das isoformas *versus* o genótipo que não apresenta nenhuma delas.

Para o polimorfismo GSTP, conduzimos as análises da seguinte maneira: IIxVV – para evidenciar a influência do genótipo selvagem *versus* genótipo mutante; II + IVxVV – para evidenciar a influência dos genótipos selvagem e heterozigoto *versus* o mutante e IIxIV + VV – para evidenciar a influência do fenótipo selvagem *versus* os genótipos heterozigoto e homozigoto mutante. Os dados das análises estão dispostos na tabela 6.

Os valores não mostram participação dos polimorfismos avaliados no perfil fenotípico das pessoas com AF, visto pela ausência de relação estatística significativa na análise realizada.

**Tabela 7.** Análise de risco para os diferentes genótipos da GSTMT e GSTP em relação a três manifestações clínicas da AF.

Genótipo/Clinica	HU+																	
	AVE				STA				ULC									
	p	OR	IC	p	OR	IC	p	OR	IC	p	OR	IC						
GSTMT																		
M[+]	0,80	0,35	-	0,08	0,24	0,06-0,95	0,95	0,70	0,15-3,28	0,62	1,13	-	0,19	0,33	0,09-1,29	0,38	0,37	0,08-1,70
T[+]	--	--	--	0,78	0,97	0,27-3,51	0,77	1,86	0,32-10,62	0,85	0,47	0,06-3,67	0,36	2,14	0,67-7,33	0,73	1,04	0,22-4,85
M[+][T][+]	--	--	--	0,45	0,42	0,07-2,4	0,98	0,64	0,10-3,97	--	--	--	0,34	4,6	0,47-44,60	0,50	0,29	0,04-2,08
GSTP																		
IIxVV	--	--	--	0,57	0,46	0,09-2,29	0,66	0,97	0,15-6,23	--	--	--	0,83	0,86	0,18-4,19	--	--	--
II+IVxVV	--	--	--	0,78	0,60	0,13-2,82	0,91	0,57	0,095-3,41	--	--	--	--	--	--	--	--	--
IIxIV+VV	0,86	1,7	-	0,30	0,42	0,12-1,50	0,93	1,48	0,30-7,21	--	--	--	0,77	0,71	0,23-2,23	0,92	0,78	0,23-2,59

Legenda: M[+]: MM e MT *versus* TT e Nulo – para verificar a influência de GSTM, ou seja, a presença da isoforma  $\mu$ ; T[+]: TT e MT *versus* MM e Nulo – para verificar a influência de GSTT, ou seja, da isoforma  $\theta$ ; M[+][T][+]: MM, MT e TT *versus* Nulo – para verificar a influência da presença de pelo menos uma das isoformas *versus* o genótipo que não apresenta nenhuma delas; IIxVV: genótipo selvagem II *versus* genótipo mutante VV; II + IVxVV: genótipo selvagem II + genótipo heterozigoto IV *versus* genótipo mutante VV; IIxIV + VV: genótipo selvagem II *versus* genótipo heterozigoto IV + genótipo mutante VV; HU+: indivíduos em uso de medicação específica – hidroxuireia; HU-: indivíduos sem uso de medicação específica – hidroxuireia; AVE: Acidentes Vasculares Encefálicos; STA: Síndromes Torácicas Agudas; ULC: Úlceras de perna; --: número de casos insuficientes para o teste; -: dado não fornecido pelo teste. OR: *Odds Ratio* (equivalente ao risco relativo de desenvolver a manifestação clínica sendo portador do polimorfismo em questão). IC: Intervalo de Confiança. OR>1: polimorfismo associado positivamente com a manifestação; OR<1: polimorfismo associado negativamente com a manifestação; OR=1: polimorfismo não associado com a manifestação. Nível de significância estatística adotado: p<0,05.

## **5. Discussão**

## 5. DISCUSSÃO

### Polimorfismos GSTP1, GSTM1 e GSTT1

Os resultados das frequências dos polimorfismos aqui demonstrados assemelham-se, em frequência, aos de ROSSINI et al., (2002) em 591 indivíduos, sem distinção de etnia, do Rio de Janeiro, porém, diferem do encontrado por Watson et al., (1998), realizado com populações de outras regiões fora do país (tabela 8).

**Tabela 8.** Frequências genotípicas e alélicas da enzima GSTP no grupo teste, no grupo controle, e as encontradas do trabalho de Rossini e colaboradores (2002) e Watson e colaboradores (1998).

GSTP	AF (n = 91)	GC (n = 53)	Rossini et al., 2002 (n = 591)	Watson et al., 1998 (n = 116)
<b>Frequência Genotípica</b>				
II	53,8%	51,5%	49,7%	67%
IV	27,5%	36,4%	38,1%	30%
VV	18,7%	12,1%	12,2%	3%
<b>Frequência Alélica</b>				
Ile	0,67	0,70	0,69	0,82
Val	0,33	0,30	0,31	0,18
Procedência	Rio de Janeiro <sup>a</sup>	São Paulo <sup>a</sup>	Rio de Janeiro <sup>a</sup>	Taiwan <sup>b</sup>
Valor de p	p = 0,38		p = 0,18	p < 0,05*

Legenda: AF: grupo teste, portadores de anemia falciforme; GC: grupo controle; II: homocitoto normal para GSTP; IV: heterocitoto; VV: homocitoto mutante; Ile: alelo isoleucina; Val: alelo valina. Entre AF e GC, p = 0,38; em relação ao trabalho de Rossini et al. (2002), p = 0,18 e por fim, em comparação ao trabalho de Watson et al. (1998), p < 0,05, demonstrando diferença entre as frequências. Letras sobrescritas (a e b) mostram diferença estatística entre as frequências genotípicas dos trabalhos. Teste Chi-quadrado. Intervalo de confiança: 95%.

Apesar de consistir de populações provenientes de diferentes regiões do país (AF – proveniente do Rio de Janeiro e GC – provenientes de São Paulo), as frequências genotípicas e alélicas mostram ser semelhantes são reforçadas pela ausência de relação estatística significativa.

Na AF, a coherança de polimorfismos associados pode modular a expressão fenotípica dos indivíduos portadores de Hb S (MO et al., 2009). Diferenças nas frequências genotípicas e alélicas, observadas em grupos distintos, sugerem a suscetibilidade a compostos tóxicos, efetividade para o uso de medicamentos ou outros compostos que são inativados na via de biotransformação da GSTP, o que pode levar à diferença no quadro oxidativo de determinados indivíduos (COLE et al., 1990; BAI et al., 1996). As frequências encontradas por Rossini e colaboradores (2002), em indivíduos sem hemoglobinopatias, na região do Rio de Janeiro, mostraram valores semelhantes aos encontrados neste trabalho. Esta relação sugere um possível perfil genotípico, para a herança destes polimorfismo, na região sudeste do Brasil.

Os resultados do presente trabalho mostram frequências similares e sugerem que a resposta antioxidante, mediada pela GSTP, nos indivíduos com AF assemelha-se à dos indivíduos do grupo controle. Os dados da comparação dos genótipos da GSTP com marcadores de lesão de DNA e peroxidação lipídica neste trabalho reforçam a ausência de efeito desta enzima nestes marcadores avaliados e no fenótipo da AF. Assim, a GSTP demonstra não interferir na expressão diferencial da anemia falciforme.

Comparando nossos resultados com Watson et al. (1998), que avaliaram 540 voluntários (asiáticos, africanos, americanos e europeus), as frequências encontradas diferem daquelas encontradas em sul-africanos, euro-africanos e euro-americanos e acredita-se que essa diferença pode estar relacionada a heterogeneidade da população brasileira, devido ao intenso processo de miscigenação, uma vez que a distribuição e a frequência desses polimorfismos é dependente de variações intrínsecas a determinados grupos étnicos.

A importância dessa classe de enzimas e, de maneira geral, de todas as enzimas da família da GST tem sido cada vez mais destacada pela sua relação em diversos processos do metabolismo e propriedades catalíticas e de detoxificação. Entretanto, nos últimos anos, têm-se demonstrado outras funções biologicamente importantes a essa família de isoenzimas como, por exemplo, nas interações proteína-proteína; envolvimento com chaperonas e mecanismos de quinases; e, principalmente, possíveis propriedades



mieloproliferativas (TEW et al., 2012), aproximando-as da realidade das doenças hematológicas. A GSTP especificamente, tem-se mostrado relevante por possuir um sítio de ligação específico para regulação da sinalização mediada por TNF- $\alpha$  (WU et al., 2006), importante via de sinalização em processos inflamatórios, podendo, de certa forma, estar relacionado aos processos fisiopatológicos inflamatórios da anemia falciforme, porém, os resultados deste afastam a relação desta enzima como possíveis fatores protetores de estresse oxidativo e lesão de DNA na anemia falciforme.

ARRUDA et al. (1998) encontraram valores semelhantes aos do presente trabalho quanto à frequência genotípica, quando avaliaram um grupo de origem africana (33% de indivíduos nulos para GSTM1), porém, sugerem que as frequências deste polimorfismo são dependentes da origem étnica de cada população e os valores podem flutuar de acordo com o grupo em que ele foi avaliado.

Segundo Hiragi et al. (2007), avaliando afrodescendentes do DF, a frequência de indivíduos nulos para GSTM1 flutua entre 17% e 35% e para o polimorfismo GSTT1 demonstra ser de 22% a 44%. Ressaltamos mais uma vez que, variações nos valores das frequências desses polimorfismos, podem estar relacionados à heterogeneidade étnica da população brasileira (ROSSINI et al., 2002). Assim, consideramos que as frequências de polimorfismos genéticos relacionados à enzimas de metabolização, podem ser específicas para uma população multiétnica, como a brasileira.

Deleções em homozigose (para ambos os alelos M e T) podem diminuir ou inibir totalmente a expressão de isoformas da GST, levando à inabilidade de determinadas células em metabolizar compostos tóxicos ao organismo (GAO et al., 2010). A glutathione é o maior agente intracelular envolvido na detoxificação e a forma reduzida (GSH) atua como importante antagonista a efeitos pró-inflamatórios ocasionados, principalmente, pelo peróxido de hidrogênio - produto evidente do desequilíbrio oxidativo na anemia falciforme (McCARTY, 2010). Prejuízos no sistema da glutathione podem resultar na diminuição da GSH total na AF e resultar em efeitos como o aumento do estresse oxidativo resultado da instabilidade, desoxigenação, desnaturação e precipitação da Hb S, assim como altas taxas de concentração de ferro, devido à hemólise. Dessa forma, os níveis de GSH influenciam a atividade da glutathione peroxidase e atuam como um importante composto de detoxificação, especialmente quando é conjugada a xenobióticos pela GST (GIZI et al., 2011). Os resultados aqui apresentados mostram diferenças no genótipo MT, ou seja, aquele que possui a expressão de ambas as classes de enzimas GSTM e GSTT, quando

comparados grupo teste e grupo controle. Tal achado para este gene pode ser devido à coherença variável dos genes na AF falciforme, tendo em vista que o genótipo MT é o genótipo positivo para ambas enzimas, e pode consistir de um fator protetor intrínseco nestes indivíduos.

Neste trabalho apenas o genótipo MM esteve associado com o aumento de lesão de DNA evidenciado pela técnica do ensaio cometa, o que não é esperado, pois o ID neste genótipo se demonstrou maior que o genótipo NULO, que não expressa nenhuma das isoformas da GSTMT. Esse dado reforça o encontrado por Silva e colaboradores (2011) num trabalho em que não houve associação significativa dos polimorfismos de GSTMT e GSTP com marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em AF e que todo o aumento de lesão nestes pacientes é devido ao intenso processo oxidativo intrínseco gerado pela mutação HBB<sup>Glu6Val</sup>.

A ausência de relação dos polimorfismos da GST com os marcadores de lesão e com o fenótipo da anemia falciforme pode significar ausência da participação desta enzima de detoxificação nos intensos processos de estresse oxidativo sofridos pelas pessoas com anemia falciforme. Esta relação permite compreender que a cascata oxidativa ocorrida nestes indivíduos trata-se de um assunto que deva ser cada vez mais investigado.

### **Lesão de DNA**

Os resultados do GC mostram ausência de inclusões no eritrócito e sugerem que nestes indivíduos a ocorrência dos processos de divisão celular acontece de maneira adequada, sem interferência de eventos que resultem em alterações cromossômicas. Em relação ao grupo de estudo, observamos aumento no número de CHJ, que condiz com o que se sabe em relação à função do baço nos indivíduos com doença falciforme (LANE, et al., 1995). Células com estas inclusões são removidas pelo baço e, em muitos indivíduos com AF, em decorrência de complicações clínicas, como sequestro esplênico, há frequente aumento dessa estrutura, remetendo muitos casos à cirurgia de remoção (eplenectomia). O valor aumentado de CHJ em indivíduos com AF é consistente com a disfunção esplênica decorrente da doença, que acomete o paciente desde os primeiros anos de vida. A remoção cirúrgica do baço elimina a função de filtro primário de CHJ circulantes, e o aumento dessas inclusões pode, ainda, vir a ser aumentada de acordo com o uso de HU. Dessa forma, a esplenectomia, o uso de HU e o estresse oxidativo podem ser fatores positivos para o aumento dessas inclusões nos eritrócitos de pacientes com AF.

A HU atua na inibição da ribonucleotideo redutase, enzima que converte ribonucleotideos em desoxiribonucleotideos, essencial para a síntese e reparo do DNA, o que afeta a fase S e interrompe o ciclo celular nas fases G2 e S (STEINBERG, 1999). Seu uso em AF traz melhora nos eventos clínicos e fisiopatológicos por aumentar a taxa de Hb total e com isso, diminuir os eventos de polimerização e vasocclusão.

Harrod et al. (2007) avaliaram, por citometria de fluxo, eritrócitos que continham corpos de Howell-Jolly em  $10^6$  células. Pacientes que faziam uso de HU apresentaram, em valores totais/1.000.000 células avaliadas,  $3.533 \pm 2.665$  CHJ, enquanto o grupo sem uso de HU mostraram  $1.263 \pm 1.193$  inclusões. Em nosso grupo de estudo, também encontramos duas vezes mais CHJ em AF + HU do que nos pacientes que não faziam uso do medicamento. De Lima et al., (2003) avaliaram a citotoxicidade da HU assim como sua característica de induzir aberrações cromossômicas no aparato mitótico, em culturas de linfócitos que foram submetidas a diferentes concentrações de HU. Os efeitos foram analisados em diversas fases do ciclo celular. Houve aumento significativo de citotoxicidade em G1 e G1/S, assim como na fase G2 do ciclo celular. O efeito citotóxico dependente da fase S, se deu devido à conhecida atividade da HU na inibição da difosfato redutase. Esse mecanismo promove a redução de dNTP disponível dentro da célula, por meio da inibição de enzimas como a difosfato redutase, que atuam no reparo do DNA juntamente com a falta de nucleotídeos para a ação da DNA polimerase. Assim, o DNA acumula-se dentro das células e gera as inclusões celulares (LI; KAMINSKAS, 1987).

A formação de micronúcleos durante a divisão celular é resultado da quebra de cromossomos devido a lesões não reparadas ou reparadas de forma incorreta, ou, ainda, devido à segregação desigual dos cromossomos e má função mitótica. Esses eventos podem ser induzidos por estresse oxidativo ou exposição a agentes genotóxicos. Essa heterogeneidade na formação de inclusões pode refletir a presença de múltiplas exposições, externas e internas, e ao grande número de alterações cromossômicas possíveis que, eventualmente, resulta na formação de micronúcleos (FENECH, 2006). Dessa forma, os micronúcleos são usados como biomarcadores de instabilidade cromossômica, fixação de mutações e suscetibilidade genética, fatores que podem explicar a sua associação com os riscos de câncer e outras doenças. Em eritrócitos, são representados pelos CHJ. Os resultados do presente trabalho não mostraram relação significativa do efeito da hidroxiureia no aumento de CHJ, em anemia falciforme, mas evidenciou efeito de lesão do DNA para a presença da mutação HBB<sup>Glu6Val</sup>.

Silva-Rocha e colaboradores (2012) mostraram, pela técnica do ensaio cometa, que pacientes com anemia falciforme em tratamento com HU apresentavam aumento de dano ao DNA, porém, sem diferença significativa. Nossos resultados são semelhantes aos desse autor, para esse mesmo parâmetro. Friedrisch et al. (2008), sugerem que a HU tem potencial tóxico apenas no início do tratamento, mas o uso por longos períodos (> 42 semanas), essa toxicidade é diminuída. Os pacientes aqui analisados fazem uso de HU em média, há 102.4 semanas e possivelmente o efeito tóxico da medicação já tenha sido minimizado, prevalecendo somente o estresse e lesão decorrentes dos eventos da AF.

Em relação aos danos ao DNA induzidos por fármacos, o DNA pode ser o alvo de drogas que reagem diretamente com o DNA ou indiretamente pela incorporação de nucleotídeos análogos, ou bloqueando funções metabólicas, tais como as DNA polimerases e topoisomerases relacionados às quebras de fitas simples e duplas, passíveis de serem detectados na versão alcalina do ensaio cometa (FAIRBAIRN et al., 1995). Apesar de alguns danos ao DNA serem reparados, seria ideal o permanente biomonitoramento de genotoxicidade a vários agentes químicos, com o uso de biomarcadores, para a prevenção de futuras lesões, as quais podem induzir crescimentos neoplásicos em células somáticas danificadas. O monitoramento dos efeitos genotóxicos de químicos em humanos, com o objetivo de avaliar os riscos, tem aumentado e, como resultado, têm sido identificados marcadores de exposição humana a mutágenos e carcinógenos (VALVERDE; ROJAS, 2009). Nos resultados levantados, apesar dos indivíduos em uso de HU terem apresentado maiores índices de lesão de DNA, esta relação não foi significativa. Tal achado sugere mais uma vez que esta ocorrência pode ser devida ao intenso processo de estresse oxidativo que pode afetar membranas e ácidos nucleicos que ocorre nos indivíduos com AF.

### **Peroxidação Lipídica**

O estresse oxidativo é um dos fatores que podem modelar a lesão ao DNA, tendo ou não possível influência no uso de medicamentos. A maior peroxidação lipídica encontrada no grupo AF, em relação ao GC, permite inferir que nos eritrócitos falcêmicos, o estresse oxidativo é decorrente da alta taxa de meta Hb S, menos estável que a meta Hb A, resultando na hemólise como já evidenciado por Fibach et al. (2008). Dessa forma, há a formação de radicais superóxido e hidroxil que, juntamente com o grupo heme, iniciam uma via de oxidação da Hb, resultando em danos aos eritrócitos. A membrana celular sofre

peroxidação lipídica e, dessa forma, a dosagem de TBARS é um bom indicador de estímulos pró-oxidantes, uma vez que quantifica as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, como o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos (HEBBEL et al., 1982; CIGHETTI et al., 2002; SCOTT, 2006; WOOD; GRANGER, 2007).

Com a hemólise e consequente liberação do grupo heme, o ferro livre, atuará como um catalisador de outras vias oxidativas, com consequente síntese de radicais superóxidos e hidroxilas. Logo, a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio, pela superóxido dismutase, leva à peroxidação de lipídios da membrana e a danos celulares e consequentemente de DNA como os observados pelos testes de CHJ e ensaio cometa.

A peroxidação lipídica, naturalmente mais alta nos indivíduos com AF, está relacionada com as taxas de lesão de DNA encontradas. Considerando a ação do estresse oxidativo no organismo e sua influência sobre as células, tecidos e moléculas, sabe-se que a peroxidação – resultado deste estresse – pode estar diretamente relacionada à formação de agentes oxidantes, que, por sua vez exercem influência em outras células e moléculas de DNA. Com isso, a maior taxa de lesão de DNA em pacientes com anemia falciforme é, de certa forma, um fator intrínseco associado à doença, sem influencia da HU, como evidenciado pelos resultados em que os pacientes portadores de AF tiveram maior taxa de lesão de DNA e peroxidação lipídica quando comparados ao GC.

Moghbeli-Nejad et al. (2012) sugerem a existência de fragilidade genômica em diferentes tipos celulares, e que é possível ser evidenciadas por CHJ. Esta relação pode indicar que indivíduos portadores de anemia falciforme possuem fragilidade genômica, agravada pelo intenso processo de estresse oxidativo, com os subprodutos atuando como fatores pró-oxidantes. O estresse oxidativo, desta forma, pode ser indicativo de precursor de lesão no DNA em indivíduos portadores de AF. Temos demonstrado como resultados desta avaliação, a relevância da peroxidação lipídica e lesão de DNA nos portadores da mutação (HBB<sup>glu6val</sup>). Muitos eventos na anemia falciforme são favorecidos pelas chamadas micropartículas, fragmentos de 0.1 a 1µm originários da ativação celular e apoptose (HUGEL, et al. 2005). Níveis elevados de micropartículas na circulação sanguínea têm sido relacionadas com doenças vasculares e associadas com altos riscos de trombose (BOULANGER, et al., 2001). Fica claro que o cenário celular nos indivíduos com AF pode estar comprometido pela mutação que gera a doença e, com isso, a alta taxa de peroxidação lipídica e lesão de DNA que favorece ainda mais a cascata hemolítica, e de

vasoclusão, que levará à piora da fisiopatologia e ocorrência de eventos de coagulação, inflamação e disfunção vascular.

A mutação que origina a Hb S, leva a alterações que modificam o equilíbrio entre radicais livres e capacidade antioxidante, provocando diminuição na capacidade antioxidante, o que gera maiores taxas de peroxidação (FASOLA, F, et al , 2007). Esses eventos sofrem interferência do uso de medicação. Silva et al. (2011) encontraram, num grupo de pacientes com anemia falciforme, diferença na taxa de peroxidação lipídica (TBARS) em indivíduos que faziam uso de HU, comparados a um grupo sem uso do medicamento, devido ao efeito benéfico deste, em aumentar a taxa de Hb total, e com o aumento de Hb F. Em nosso trabalho esta relação não foi evidenciada, para os parâmetros avaliados, por tratar-se de um grupo mais homogêneo e com maior tempo de uso de medicação.

A HU consiste, hoje, na alternativa medicamentosa para o tratamento da AF, pois apresenta efeitos clínicos favoráveis quanto à melhora do fenótipo, porém, seu efeito em longo prazo, ainda permanece em questão (STEINBERG, 2010). A Associação Internacional de Enfermeiras e Assistentes da Doença Falciforme constatou 52 casos de câncer em um grupo de mais de 16 mil pacientes com anemia falciforme, sendo praticamente todos em fase pré-HU, ou seja, sem contato com o medicamento. Dos casos encontrados, apenas três tiveram contato prévio com a HU; entre crianças, 21 apresentaram algum tipo de câncer entre eles leucemias e linfomas. Estes dados demonstram baixa frequência de câncer associado ao uso de HU.

Como a HU tem sido usada em crianças, o que remete a um longo tempo de uso, estudos adicionais devem ser realizados e a confiabilidade quanto aos efeitos malignos ou pré-malignos deve ser comprovada.

## **6. Conclusões**

## 6. CONCLUSÕES

- A avaliação das frequências dos genótipos da GSTP1 não demonstram diferença estatística significativa entre os grupos de estudo e controle, porém, esta relação é significativa no genótipo MT da GSTM1 e GSTT1.
- As avaliação da lesão de DNA demonstra ausência de efeito citotóxico da HU, reforçando o achado da literatura e coloca a mutação HBB<sup>Glu6Val</sup> como o principal fator responsável para a ocorrência deste tipo de lesão.
- A peroxidação lipídica mostra, como esperado, estar aumentada nos indivíduos com AF, sem diferença entre os que fazem ou não o uso de HU e permite ser associada com a ocorrência de lesão de DNA.
- Apenas o polimorfismo MM da GSTM demonstra associação positiva com o marcador de lesão de DNA evidenciado pela técnica do ensaio cometa.
- Nenhum polimorfismo mostra associação com manifestações clínicas na AF, sugerindo ausência de parte da GST na fisiopatologia da AF.



## **7. Referências**

## 7. Referências

- ABHILASH, P. C.; SINGH, N. Seasonal variation of HCH isomers in open soil and plant-rhizospheric soil system of a contaminated environment. **Environ Sci Pollut Res**, v.16, p.727-40. 2009
- ALMEIDA, C.B.; SCHEIERMANN, C.; JANG, J.E.; PROPHETE, C.; COSTA, F.F.; CONRAN, N.; FRENETTE, P.S Hydroxyurea and a cGMP- amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**. v.120, n.14, p. 2879-2888, 2012.
- BAI, F., NAKANISHI, Y.; KAWASAKI, M.; TAKAYAMA, K.; YATAUNAMI, J., PEI, X.H., TSURUTA, N., WAKAMATSU, K.; HARA, N. Immunohistochemical expression of glutathione S-transferase Pi can predict chemotherapy response in patients with non-small cell lung carcinoma. **Cancer**, v.78, p. 416–421, 1996.
- BAIN, B. J. Haemoglobinopathy diagnosis: Algorithms, lessons and pitfalls. **Blood Reviews**. v. 25, p. 205-213, 2011.
- BALLAS, S. K. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. v. 85, n. 1, p. 6-13, 2010.
- BALLAS, S. K.; KESEN M. R., GOLDBERG, M. F. et al. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. **ScientificWorldJournal**. 2012.
- BALLATORI, N.; KRANCE, S. M.; NOTENBOOM, S. et. al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol. Chem**. v.390, p.191-214, 2009.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial. São José do Rio Preto, 1993. 232 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemia. Editora HN, 121 p, 2006.
- BOULANGER, C. M.; SCOAZEC, A.; EBRAHIMIAN, T.; HENRY, P.; MATHIEU, E.; TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. **Circulation**. v. 104, p. 2649-52, 2001.
- CHIANG E. Y, FRENETTE P. S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol Oncol Clin North Am**. v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005.
- CHIRICO, E.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB life**. v. 64, p. 72–80, 2011.

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

COKIC, V.P.; SMITH, R.D.; BELESLIN-COKIC, B.B.; NJOROGE, J.M.; MILLER, J.L.; GLADWIN, M.T.; SCHECHTER, A.N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent action of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest**. v.111, n.2,p.231-239, 2003.

COLE,S. P., DOWNES, H. F., MIRSKI, S. E; CLEMENTS, D. J. Alterations in glutathione and glutathione related enzymes in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. **Mol. Pharmacol.**, v.37, p.192–197,1990.

COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**. v. 23, p. 143–151, 2008.

DE LIMA, P. D. et al. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. **Genet Mol Res**. v. 30, p. 328-33, 2003.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE P. L., O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res**. v. 339, p. 37-59, 1995.

FASOLA, F. Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. **J Natl Med Assoc**. v. 99, p. 891-4, 2007.

FALANGA, A; TARTARI, C. J.; MARCHETTI, M. Microparticles in tumor progression. **Thromb Res**, v. 129. 2012

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat Res**. v. 600, p. 58-66, 2006.

FIBACH E, RACHMILEWITZ, E.The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Curr Mol Med**. v. 8, p. 609-19, 2008.

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

FRIEDRISCH, J. R. et al. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Mutation Research**. v. 649. p. 213-220. 2008.

GAO, Y.; CAO, Y.; TAN A., LIAO, C.; MO, Z.; GAO, F.; Glutathione S-transferase M1 polymorphism and sporadic colorectal cancer risk: an updating meta-analysis and HuGE review of 36 case-control studies, **Ann. Epidemiol**. v.20, p.108–121, 2010.

GEROTZIAFAS, G. T.; VAN DREDEN, P.; CHAARI, M. et al. The acceleration of the propagation phase of thrombin generation in patients with steady-state sickle cell disease is associated with circulating erythrocyte-derived microparticles. **Thromb haemostasis**. v.107, p.1044-52, 2012.

- GIZI, A.; PAPASSOTIRIOU, I.; APOSTOLAKOU, F. et al. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: the glutathione system and the oxidant–antioxidant status. **Blood Cells Mol. Dis.** v.46, p.220–225, 2011.
- GLADWIN, M. T., VICHINSKY, E. Pulmonary complications of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine.** v. 359, n. 21, p. 2254–2265, 2008.
- HADZIC, T. Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism enhances breast cancer cell killing via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v.48, p. 1024–33, 2010.
- HARRIES, L.W; STUBBINS, M. J; FORMAN, D.; HOWARD, G.C.; WOLF, C. R. Identification of genetics polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular, and prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 641–644, 1997.
- HARROD, V. L. Quantitative analysis of Howell-Jolly bodies in children with sickle cell disease. **Exp Hematol.** v. 35, p. 179–83. 2007.
- HEBBEL, R.P. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 70, p. 1253–1259, 1982.
- HIRAGI, C. O.; OLIVEIRA, S. F.; HATAGIMA, A.; FERREIRA, L. B.; GRISOLIA, C. K.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Brazilian African descendants. **Hum Biol.** v.79, p.131–40, 2007.
- HIRVONEN, A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *Journal of Occupational Environmental Medicine*, v. 37, p. 37–43, 1995.
- HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. Human hemoglobin genetics. **Wien: Springer**, p.19–36, 1986.
- HUGEL, B.; MARTÍNEZ, M. C.; KUNZELMANN, C.; FREYSSINET, J. M. Membrane microparticles: two sides of the coin. **Physiology (Bethesda)**. v.20, p.22–27, 2005.
- INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante  $\beta$ -Thalassemia Short Program **Instruction Manual.** Bio-Rad Laboratories, 1999.
- JOSEPH, J. A.; STRAIN, J. G.; JIMENEZ, N. D.; FISHER, D. Oxidant injury in PC12 cells - a possible model of calcium "dysregulation" in aging: I. Selectivity of protection against oxidative stress. **J Neurochem.** v.69(3), p.1252–8. 1997.
- KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. **MMS Comm.** v. 3, p. 103–115, 1995.
- KONOPACKA, M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. **Neoplasma.** v. 50, p. 380–382, 2003.

KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 1, p. 24-31, 2011.

KRUSZEWSKI, M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. **Mutat. Res.**, v.531, n. 1-2, p.81-92, 2003.

KUMARAGURUPARAN, R.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B.M. et al. Altered oxidant-antioxidant profile in canine mammary tumours. **Vet Res Commun**; v. 29, p. 287-96, 2005

LANE, P. A; O'CONNELL, J. L.; LEAR, J. L., et al. Functional asplenia in hemoglobina SC disease. **Blood**. v.85, p.2238–2244, 1995

LANZKRON, M. D. S. et al. Systematic Review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Annals of Internal Medicine**. v. 148, n. 12, p. 939-955, 2008.

LI, J. C.; KAMINSKAS, E. DNA fragmentation in permeabilized cells. **Biochem J**. v.247 p. 805-6, 1987

LIU, Y. H. et al. Antioxidant and amine oxidase inhibitory activities of hydroxyurea. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 74, n. 6, p. 1256-1260, 2010.

MACK, A. K.; KATO, G. J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 38, n. 8, p. 1237-1243, 2006.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of Human Fetal Hemoglobin. **IUMB Life**, v. 60, n. 2, p. 94-111, 2008.

MANFREDINI, V. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in Steady State. **Journal of the national medical association**. v. 10, 2008

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

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

MCCARTY, M. F. Potential utility of full-spectrum antioxidant therapy, citrulline, and dietary nitrate in the management of sickle cell disease. **Med. Hypotheses**. v.74, p.1055–1058. 2010

MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. **Science**. v.29, p.4727.1983

MINNITI C. P. et al. Leg ulcers in sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. v. 85, n. 10, p. 831-833, 2010.

MO, Z.; GAO, Y.; CAO, Y. et al. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. **Prostate**, v.69, p.662–688. 2009

MOGHBELI-NEJAD, S.; MOZDARANI, H.; ALEYASIN, A. Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: a possible sign of genomic instability. **J Assist Reprod Genet**. v.29, p. 89-94, 2012.

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

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

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

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

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

NELSON, D.L.; COX, M.M.; **Lehninger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2006.

NIEUWLAND, R., BERCKMANS, R. J., MCGREGOR, S. et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. **Blood**. v. 95(3) p.930-935. 2000

NUSSBAUM, R.L. et al. Thompson & Thompson: **Genética Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

NZOUAKOU, R.; BACHIR, D.; LAVAUD, A.; HABIBI, A.; LEE, K.; LIONNET, F.; HULIN, A.; JOUAULT, H.; PRÉHU, C.; ROUDOT-THORAVALE, F.; GIROT, R.; GALACTÉROS, F. Clinical follow-up of hydroxyurea-treated adults with sickle cell disease. **Acta Haematol**. v.125, n.3, p.145-152, 2011.

ODIÈVRE, M.H.; VERGER, E.; SILVA-PINTO, A.C.; ELION, J. **Pathophysiological insights in sickle cell disease**. Indian J Med Res. v. 134, p. 532-537, 2011.

PERCÁRIO, S. et al. Dosagem do dialdeído malônico. **NewsLab**. v. 6, 2004; 46-50p.

RAJNEESH, C.P.; MANIMARAN, A.; SASIKALA, K.R. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with breast cancer. **Singapore Med J**. v. 49, p. 640-3, 2008.

REES, D. C. The rationale for using hydroxycarbamide in the treatment of sickle cell disease. **Haematologica**. v. 96, n. 4, p. 488-491, 2011.

REES, D.C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**. v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.

REISCHL, E. et al. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative biochemistry and Physiology**. Part C. v.146, p.22-53, 2007.

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

ROSSINI, A.; RAPOZO, D.C.; AMORIM, L.M. et al. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. **Genet Mol Res**, v. 1, p. 233-240, 2002.

ROTHER, R.P.; BELL,L.;GLADWIN, M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**. v.293, n.13, p.1653-1662, 2005.

ROVER-JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova**. v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

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

SAMANTA, S.; DEY, P., Micronucleus and Its Applications. **Diagnostic Cytopathology**. v.40, n.1, p. 84-90, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITCSH, E.F.; MANATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

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

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

SCOTT, M. D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. **Free radical biology & medicine**, v. 40, n. 7, p. 1264-1272, 2006.

SEARS, D. A.; UDDEN M. M., Howell-Jolly Bodies: a brief historical review. **Am J Med Sci**. v. 343, p. 407-9.2012

SILVA, D. G.; BELINI-JUNIOR, E.; TORRES, L. S.; RICCI-JÚNIOR, O.; LOBO, C. L. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R., ALMEIDA, E. A. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis.** v. 47, p. 23-8, 2011.

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

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

SILVESTRONI, E; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics.** v. 27, n. 12, p. 198-212, 1975.

STEINBERG, M. H. et al. **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management.** New York: Cambridge University Press, 2001.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Clinical Haematology.** v.11, p. 163 - 184, 1999.

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

STEINBERG, M. H. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.** v. 85. p. 1362-1369. 2010.

STRANGE, R. C.; SPITERI, M. A.; RAMACHANDRAN, S.; *et al.* Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research,** v. 482, p. 21–26, 2001.

STROUSE, J.J.; HEENEY, M.M. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease: efficacy, barriers, toxicity, and management in children. **Pediatr Blood Cancer.** v.59, n.2, p.365-371, 2012.

TRAPPENBURG, M. C.; VAN SCHILFGAARDE, M.; MARCHETTI, M. et al. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. **Haematologica.** v. 94(7); p. 911-8. 2009.

TANINGHER, M.; MALACARNE, D.; IZZOTTI, A.; UGOLINI, D., PARODI, S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. **Mutat Res.** v.436, p. 227-61, 1999.

TEW, K.; TOWNSEND, D. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. **Antioxidants & redox signaling.** v.17, p.1728–37, 2012.



- TICE, R.R. et. al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.35, p.206-21, 2000.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.** v.3, p. 44-84, 2007
- VALVERDE, M; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutat Res.** v.681, p. 93-109, 2009
- VASCONCELOS et. al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v.30, n.5, p. 1323-1338, 2007.
- VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis oh human hemoglobins. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 1968.
- WANG, Z. B.; NAGASAWA, T.; KOMIYA, M. DNA content of Howell–Jolly bodies. **Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi.** v.46, p. 1165–1170. 1983.
- WARE, R. E., AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **Hematology American Society of Hematology Education Program Book.** p. 62–9, 2009.
- WARE, R. E. Hydroxycarbamide: clinical aspects. **C R Biol.** v. 336, p.177-82, 2013.
- WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B., Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.
- WOOD, K. C.; GRANGER, N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 926-932, 2007.
- YARBRO, J.W., Mechanism of action of hydroxyurea, **Semin. Oncol.** v.19, p.1–10, 1992
- ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.
- ZUNTAR, I.; KALANJ-BOGNAR, S.; TOPIC, E. et al. The glutathione S-transferase polymorphisms in a control population and in Alzheimer's disease patients. **Clin Chem Lab Med.** v.42, p.34-9. 2004.

## **8. Apêndice**

## 8. Apêndice 1

**Manuscrito de Artigo a ser submetido à revista “Mutation Research” – FI: 2.2**

**Lesão de DNA e peroxidação lipídica na anemia falciforme com e sem interferência de medicação específica comparado a um grupo controle sem hemoglobinopatias**

BARBERINO, W. M.; OLIVEIRA, R. G.; TEIXEIRA, V. U.; OKUMURA, J. V.; TORRES, L. S.; SILVA, D. G. H.; BELINI-JUNIOR, E.; ALMEIDA, E. A.; LOBO, C. L. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R.

### Resumo

A anemia falciforme (AF) é a alteração genética monogênica mais comum do mundo. Tem como principais eventos na fisiopatologia: a hemólise intravascular com liberação do conteúdo eritrocítico, vasclusão e isquemia-reperfusão. O estresse oxidativo recorrente e o uso de medicação são fatores que podem influenciar a lesão de DNA e peroxidação lipídica na doença falciforme. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar marcadores de lesão de DNA e peroxidação lipídica em indivíduos portadores de anemia falciforme e verificar a influência do uso de medicação específica. As análises para lesão do DNA pela técnica do ensaio cometa e Corpos de Howell-Jolly (CHJ) demonstraram aumento de lesão no grupo teste, tanto para AF + HU, como para AF – HU, quando comparados ao GC ( $p < 0,05$ ), porém, quando realizada a comparação entre os grupos com e sem o uso de HU, esta diferença não foi significativa ( $p = 0,43$  e  $0,07$ , respectivamente). O mesmo foi observado para a avaliação de peroxidação lipídica, que evidenciou ausência de diferença estatística significativa entre os grupos AF + HU e AF – HU ( $p = 1,0$ ), porém ambos diferiram do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Com isto, foi possível estabelecer relação entre a peroxidação lipídica e a lesão de DNA pelas técnicas de ensaio cometa e CHJ, mostrando que esta se fez positiva para ambas comparações, com  $R = 53,3$  para a correlação entre TBARS x ensaio cometa e  $R = 41,8$  para a correlação entre TBARS e CHJ. Os resultados demonstram, então, ausência de interferência da HU nos marcadores avaliados e colocam a mutação HBB<sup>Glu6Val</sup> com principal fator precursor de lesão de membranas e DNA e sugerindo a ocorrência de fragilidade genômica em indivíduos portadores de AF.

## 1. Introdução

A doença das células falciformes é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. Inclui a Anemia Falciforme (AF), homozigose para hemoglobina (Hb) S, as interações com talassemias (Hb S/beta-talassemia) e as associações com outras variantes de hemoglobina, formando duplos heterozigotos, como a Hb SC. A homozigose para a mutação (Hb SS) é responsável pela mais comum e grave variação da doença falciforme (FRENETTE; ATWEH, 2007; REES, 2010).

A polimerização da Hb S desencadeia dois dos processos fisiopatológicos principais: vaso-oclusão, com isquemia e reperfusão, e a anemia hemolítica. Entretanto, os eventos polimerizantes por si só não são suficientes para explicar processos fisiopatológicos tão complexos (CHIANG; FRENETTE, 2005; STEINBERG, 2008; REES, 2010). Como resultado, há múltiplas alterações, como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e a interrupção da ligação da membrana com proteínas do citoesqueleto. Assim, as principais alterações que ocorrem no interior da célula refletem-se na membrana e têm como consequências: aumento da adesão de hemácias ao endotélio o que desencadeia fenômenos inflamatórios; enrijecimento da membrana, encurtamento de sua sobrevivência na circulação; lesões microvasculares; inflamação e ativação da coagulação. Tais eventos favorecem e permitem a ocorrência da hemólise (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

O estado oxidativo das células é determinado pelo equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Durante o metabolismo celular, as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, são geradas por processos naturais do metabolismo e são observada em diversas condições fisiológicas como no controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose e na fagocitose de agentes patogênicos (SCHAFER; BUETTNER, 2001; VASCONCELOS et al., 2007). No aumento das ERO e/ou diminuição da capacidade antioxidante, tais espécies são capazes de agir sobre componentes celulares lesionando-os direta ou indiretamente, podendo reagir com biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, modificando suas respectivas estruturas e/ou funções e, com isso, gerando o estresse oxidativo, por meio da capacidade das ERO em extrair elétrons de fontes celulares para tornarem-se estáveis. Além disso, podem gerar outras formas de ERO por processos de oxidorredução como, por exemplo, a formação de radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) pela dismutação de

radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que, posteriormente, é convertido em radical hidroxil pelas reações de Fenton e Harber-Weiss (CHIRICO et al., 2011)

As lesões celulares causadas por (ERO), tais como o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $\cdot OH$ ) estão associados com a diminuição da sobrevivência do eritrócito em vários tipos de anemias hemolíticas, sejam de ordem adquirida, hereditária, induzida por drogas oxidantes ou metais pesados. Os eritrócitos falcêmicos têm suas lesões intensificadas em uma relação direta com a concentração de Hb S intraeritrocitária, sendo que em alguns casos, quando a concentração de Hb S é superior a 90%, a média de vida dos eritrócitos é de aproximadamente 30 dias (FRENETTE; ATWEH, 2007).

A hidroxiureia (HU) é um derivado do ácido hidroxâmico e consiste em um medicamento de administração oral. Tem, como principal efeito, em pacientes com AF, o aumento na síntese de Hb F. Esta, por sua vez, envolvida na redução da frequência de episódios vaso-oclusivos, crises de dor, transfusões e hospitalizações (LANZKRON et al., 2008; LIU et al., 2010). Por ser de fácil administração, baixo custo e apresentar efeitos benéficos, é considerada a terapia padrão ouro pelos clínicos, demonstrando-se segura e bem tolerada pela maioria dos pacientes (WARE; AYGUN, 2009; KOVACIC, 2011).

A medicação previne danos a órgãos cruciais como fígado, rins e cérebro e melhora a sobrevivência nos adultos com DF e, apesar do estabelecimento deste como o principal medicamento no tratamento de indivíduos portadores de anemia falciforme, os possíveis malefícios são controversos e a eficácia e a segurança no tratamento a longo prazo, ainda gera discussões e questionamentos (STEINBERG, 2010; WARE, 2013).

Este estudo avaliou a lesão de DNA e a peroxidação lipídica em indivíduos com AF e em um grupo controle a fim de verificar a influência do uso de medicação específica nos marcadores avaliados.

## 2. Material e Métodos

### **Separação dos grupos e amostras**

O grupo amostral foi selecionado de acordo com os seguintes critérios de inclusão: indivíduos com idade acima de dez anos, independentes do gênero, homocigotos para hemoglobina S (Hb SS), acima 80% para Hb S e até de 5% para Hb A, de forma que estas variáveis não venham a influenciar os valores dos biomarcadores avaliados.

Um grupo de 91 amostras que satisfatoriamente corresponderam aos critérios de inclusão foi constituído como grupo de estudo, sendo 46 indivíduos em regime terapêutico com HU, por 716 dias em média; e 45 sem contato prévio com o medicamento. Das 91 amostras selecionadas, 56 eram do gênero feminino, 35, do gênero masculino e a média de idade do grupo foi de 24 anos.

Os indivíduos do grupo controle (GC) consistiram de amostras de voluntários coletadas no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/IBILCE), Campus de São José do Rio Preto por profissional capacitado. As análises do grupo controle foram submetidas aos testes clássicos de diagnóstico de hemoglobinas para a confirmação de perfil hemoglobínico normal (Hb AA). Foi constituído um grupo com 99 amostras compatíveis com os seguintes critérios de inclusão: isentos de medicação nas últimas 24 horas (Vitaminas, Analgésicos e Antibióticos); não uso de substâncias alcoólicas e fumígenas, com perfil de hemoglobinas normais.

### **Contagem de Corpos de Howell-Jolly**

Das amostras coletadas foram confeccionados esfregaços sanguíneos comuns e depois submetidos à coloração por Panótico Rápido para Análises Hematológicas para a localização de inclusões no eritrócito. Após coloração, contou-se 3000 células, alternando-se os campos, em microscópio ótico no máximo aumento (1000X), e o valor de inclusões foi fornecido pela razão nº de CHJ/3000 células.

### **Ensaio Cometa**

As amostras de sangue total foram submetidas à centrifugação por, em média, 10 minutos. Uma alíquota de 10 µL do *pellet* de leucócitos foi coletada e transferida para um tubo contendo 130 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C. Esta solução foi homogeneizada e transferida para uma lâmina pré-gelatinizada com agarose comum. Estas lâminas permaneceram

em solução de lise (1 mL de triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH 10,0 - solução estoque: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, para 1 L) na geladeira por uma hora. Após o processo de lise celular, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal. Para que a corrida fosse realizada, acrescentou-se tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH~13), por 20 minutos, na ausência de luz. Após o período de descanso, as lâminas foram submetidas a eletroforese, por 20 minutos a 25 V e 300 mA. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4M, por 15 minutos e fixadas em etanol por mais 10 minutos. No momento da análise das lâminas a coloração foi realizada com brometo de etídio (0,02 mg.mL<sup>-1</sup>).

Para cada amostra, foram analisados 100 nucleóides, com a utilização de microscopia de fluorescência, em aumento de 200x. Os cometas foram classificados visualmente, de acordo com a migração de seus fragmentos, sendo classificados em classes de 0 a 3, sendo 0 a representação de ausência de lesão e 3 o grau máximo de lesão de acordo com a classificação sugerida por Kobayashi e colaboradores (1995).

Os resultados de cada classe foram convertidos em índice de dano (ID), da seguinte forma:  $ID = (\text{células em classe } 0 \times 0) + (\text{células em classe } 1 \times 1) + (\text{células em classe } 2 \times 2) + (\text{células em classe } 3 \times 3)$  (figura 9). Dessa maneira, se todas as células fossem classificadas em classe 0,  $ID = 0$  (mínimo) e no caso da totalidade de células classificadas em classe 3,  $ID = 300$  (máximo). Utilizamos esta fórmula matemática a fim de eliminar subjetividades na interpretação dos resultados (KOBAYASHI et al., 1995).

### **Peroxidação Lipídica – TBARS**

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica ocorrida nos eritrócitos. O método é baseado na reação do malondialdeído (MDA) e outros aldeídos, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo MDA-TBA de cor rosa com absorção máxima em 535 nm. Valores até 440 ng/mL são considerados normais. (PERCARIO, 2004).

### **Análises Estatísticas**

Para comparações entre os biomarcadores nos três grupos (AF + HU, AF – HU e GC) efetuou-se, para normalidade, Shapiro-Wilk e homogeneidade, Levene. A partir daí, para dados paramétricos foi aplicado o teste ANOVA One Way, com *post hoc* Tukey; para dados não paramétricos, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, complementado por Dunn; os dados de correlação entre peroxidação lipídica e lesão de DNA foram obtidos pelo teste estatístico ANOVA fatorial. Para todos foi utilizado o programa estatístico STATISTICA 8.0. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significantes.

## **3. Resultados**

No grupo de estudo (indivíduos com AF, com e sem o uso de HU), o número de CHJ encontrado foi de  $5,00 \pm 5,50$ , enquanto no GC, esse número foi significativamente menor ( $0,00 \pm 0,33$ ) ( $p < 0,05$ ). Se considerarmos apenas entre os indivíduos com anemia falciforme, os pacientes que fazem o uso de HU (AF + HU) tiveram quantidade maior de CHJ ( $7,50 \pm 5,00$ ) do que o grupo AF - HU ( $4,00 \pm 5,00$ ).

Na comparação entre os três grupos (AF + HU, AF – HU e GC), a diferença foi significativa ( $p < 0,01$ ), apenas na comparação entre ambos os grupos de estudo e o GC. Os valores para indivíduos em uso de HU e sem HU não diferiram estatisticamente ( $p = 0,07$ ).

O grupo teste, com ou sem uso de HU, apresentou maior presença de CHJ, quando comparado ao grupo controle, sendo mais de oito vezes maior em AF + HU do que no GC. O teste realizado não mostrou relação estatística entre o grupo AF + HU e AF – HU ( $p = 0,07$ ), apesar dos valores aumentados (cerca de duas vezes maior) de CHJ nos indivíduos do grupo AF + HU.



Os resultados do Ensaio Cometa evidenciam que indivíduos portadores de anemia falciforme apresentam, em sua maioria, células em classes de dano 2 e 3, enquanto que indivíduos do grupo controle, células em classes de dano 0 e 1.

De acordo com essa avaliação, obtivemos, em AF + HU, ID médio de  $241,00 \pm 27,00$ ; em AF – HU: ID =  $228,00 \pm 2000$  e no GC: ID =  $49,00 \pm 17,00$ . A figura 13 ilustra a distribuição gráfica dos valores de mediana de ID e respectivos desvios para cada um dos grupos estudados.

Os indivíduos em tratamento com HU possuíam em média, 716,5 dias de uso da medicação. O resultado para a técnica do ensaio cometa entre os dois grupos teste não mostrou diferença ( $p = 0,43$ ). No entanto, quando comparados ao GC essa diferença foi significativa ( $p < 0,01$ ), com quase cinco vezes mais lesão entre os portadores da mutação para Hb S. A tabela 3 mostra os dados encontrados para lesão de DNA, pelo teste de quantificação de CHJ e pelo ensaio cometa no grupo teste e no GC, mostrando o aumento de lesão no grupo teste, em relação ao GC. Apesar da diferença não significativa para o uso ou não de HU, nesses parâmetros é evidente a ação da presença da Hb S na lesão ao DNA.

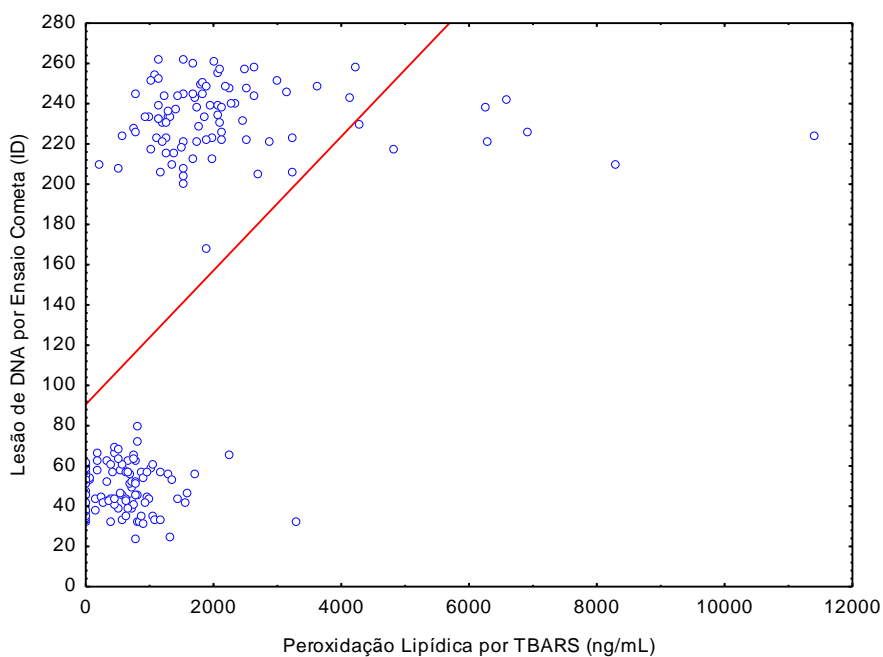
**Tabela 3.** Análise da lesão de DNA pela avaliação dos CHJ e pelo ensaio cometa (ID) nos três grupos estudados

Dano ao DNA	AF + HU (n = 42)	AF – HU (n = 49)	GC (n = 99)	Valores de p
				$p_{a,b} = 0,07$
CHJ	$7,5 \pm 5,0^a$	$4,0 \pm 5,0^b$	$0,0 \pm 0,3^c$	$p_{a,c} < 0,01$ $p_{b,c} < 0,01$
Ensaio Cometa (ID)	$237,7 \pm 16,5^a$	$227 \pm 16,4^b$	$47,6 \pm 8,7^c$	$p_{a,b} = 0,43$ $p_{a,c} < 0,01$ $p_{b,c} < 0,01$

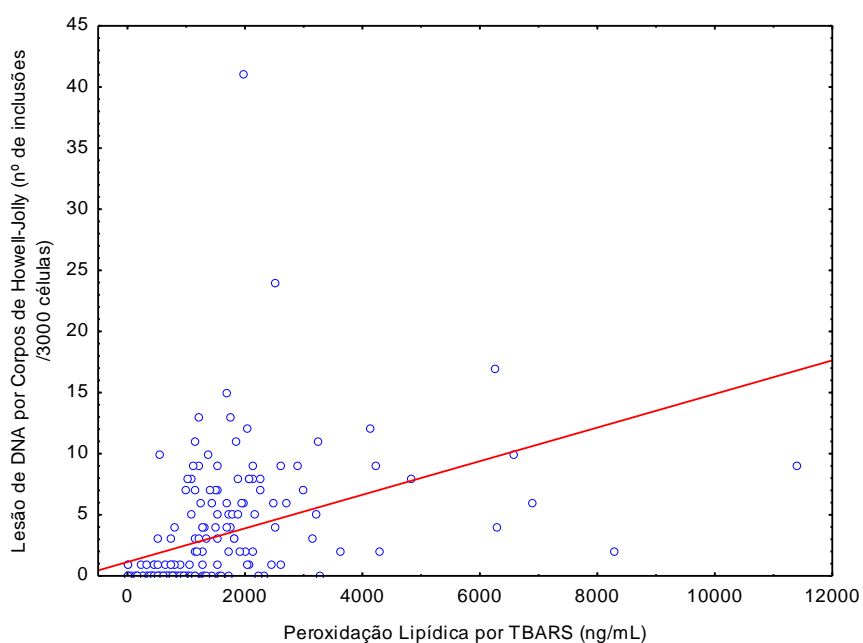
Legenda: AF + HU: indivíduos portadores de anemia falciforme em uso de hidroxiureia; AF – HU: indivíduos portadores de anemia falciforme sem uso de hidroxiureia; GC: grupo controle; CHJ: Corpos de Howell-Jolly; ID: índice de dano levantado a partir da avaliação da técnica de ensaio cometa. Intervalo de Confiança: 95%.

Avaliando-se a peroxidação lipídica, por meio da dosagem de TBARS, observamos valores elevados no grupo teste em relação ao grupo controle, conforme esperado ( $p < 0,01$ ). Enquanto a média e desvio padrão de TBARS para o grupo controle foram de  $618,77 \pm 629,81$  ng/mL, para o grupo AF + HU foram de  $1.176,30 \pm 988,20$  ng/mL e para o grupo AF – HU,  $1.825,00 \pm 1.181,60$  ng/mL. Os valores entre os grupos AF + HU e AF – HU não diferiram na comparação estatística ( $p = 1,0$ ).

Entendendo, dessa forma, a ação oxidativa nos doentes falciformes, é possível relacionar a taxa de peroxidação lipídica (TBARS) com a lesão de DNA, uma vez que a peroxidação lipídica leva à danos celulares, podendo agir também sobre outras moléculas e DNA. Avaliando a correlação entre os valores de TBARS e a lesão de DNA (ID e CHJ) por meio do Teste de Correlação de Spearman, encontramos uma taxa de relação de 53,3% da ocorrência deste tipo de lesão evidenciada pela técnica do ensaio cometa e com 41,83% evidenciada pela avaliação de CHJ ( $p < 0,01$ ), considerando o grupo teste em relação ao grupo controle. As figuras 1 e 2 ilustram as correlações positivas evidenciadas nos grupos de estudo e controle.



**Figura 1.** Análise da correlação entre a peroxidação lipídica (TBARS) e lesão de DNA (ID) no grupo teste (91 indivíduos) e no grupo controle (53 indivíduos). A análise mostra correlação positiva entre estes dois marcadores. Taxa de correlação: 53,3%, com  $p < 0,05$ . Teste realizado: Teste de Correlação de Spearman.



**Figura 2.** Análise da correlação entre peroxidação lipídica (TBARS) e lesão de DNA (CHJ) no grupo teste (91 indivíduos) e no grupo controle (99 indivíduos). A análise mostra correlação positiva entre estes dois macadores. Taxa de correlação de 41,8% com  $p < 0,05$ . Teste realizado: Teste de Correlação de Spearman.

#### 4. Discussão

Os resultados do GC mostram ausência de inclusões no eritrócito e sugerem que nestes indivíduos a ocorrência dos processos de divisão celular acontece de maneira adequada, sem interferência de eventos que resultem em alterações cromossômicas. Em relação ao grupo de estudo, observamos aumento no número de CHJ, que condiz com o que se sabe em relação à função do baço nos indivíduos com doença falciforme (LANE, et al., 1995). Células com estas inclusões são removidas pelo baço e, em muitos indivíduos com AF, em decorrência de complicações clínicas, como sequestro esplênico, há frequente aumento dessa estrutura, remetendo muitos casos à cirurgia de remoção (eplenectomia). O valor aumentado de CHJ em indivíduos com AF é consistente com a disfunção esplênica decorrente da doença, que acomete o paciente desde os primeiros anos de vida. A remoção cirúrgica do baço elimina a função de filtro primário de CHJ circulantes, e o aumento dessas inclusões pode, ainda, vir a ser aumentada de acordo com o uso de HU. Dessa forma, a esplenectomia, o uso de HU e o estresse oxidativo podem ser fatores positivos para o aumento dessas inclusões nos eritrócitos de pacientes com AF.

A HU atua na inibição da ribonucleotideo redutase, enzima que converte ribonucleotideos em desoxiribonucleotideos, essencial para a síntese e reparo do DNA, o que afeta a fase S e interrompe o ciclo celular nas fases G2 e S (STEINBERG, 1999). Seu uso em AF traz melhora nos eventos clínicos e fisiopatológicos por aumentar a taxa de Hb total e com isso, diminuir os eventos de polimerização e vasclusão.

Harrod et al. (2007) avaliaram, por citometria de fluxo, eritrócitos que continham corpos de Howell-Jolly em  $10^6$  células. Pacientes que faziam uso de HU apresentaram, em valores totais/1.000.000 células avaliadas,  $3.533 \pm 2.665$  CHJ, enquanto o grupo sem uso de HU mostraram  $1.263 \pm 1.193$  inclusões. Em nosso grupo de estudo, também encontramos duas vezes mais CHJ em AF + HU do que nos pacientes que não faziam uso do medicamento. De Lima et al., (2003) avaliaram a citotoxicidade da HU assim como sua característica de induzir aberrações cromossômicas no aparato mitótico, em culturas de linfócitos que foram submetidas a diferentes concentrações de HU. Os efeitos foram analisados em diversas fases do ciclo celular. Houve aumento significativo de citotoxicidade em G1 e G1/S, assim como na fase G2 do ciclo celular. O efeito citotóxico dependente da fase S, se deu devido à conhecida atividade da HU na inibição da difosfato redutase. Esse mecanismo promove a redução de dNTP disponível dentro da célula, por meio da inibição de enzimas como a difosfato redutase, que atuam no reparo do DNA juntamente

com a falta de nucleotídeos para a ação da DNA polimerase. Assim, o DNA acumula-se dentro das células e gera as inclusões celulares (LI; KAMINSKAS, 1987).

A formação de micronúcleos durante a divisão celular é resultado da quebra de cromossomos devido a lesões não reparadas ou reparadas de forma incorreta, ou, ainda, devido à segregação desigual dos cromossomos e má função mitótica. Esses eventos podem ser induzidos por estresse oxidativo ou exposição a agentes genotóxicos. Essa heterogeneidade na formação de inclusões pode refletir a presença de múltiplas exposições, externas e internas, e ao grande número de alterações cromossômicas possíveis que, eventualmente, resulta na formação de micronúcleos (FENECH, 2006). Dessa forma, os micronúcleos são usados como biomarcadores de instabilidade cromossômica, fixação de mutações e suscetibilidade genética, fatores que podem explicar a sua associação com os riscos de câncer e outras doenças. Em eritrócitos, são representados pelos CHJ. Os resultados do presente trabalho não mostraram relação significativa do efeito da hidroxiureia no aumento de CHJ, em anemia falciforme, mas evidenciou efeito de lesão do DNA para a presença da mutação  $HBB^{Glu6Val}$ .

Silva-Rocha e colaboradores (2012) mostraram, pela técnica do ensaio cometa, que pacientes com anemia falciforme em tratamento com HU apresentavam aumento de dano ao DNA, porém, sem diferença significativa. Nossos resultados são semelhantes aos desse autor, para esse mesmo parâmetro. Friedrich et al. (2008), sugerem que a HU tem potencial tóxico apenas no início do tratamento, mas o uso por longos períodos (> 42 semanas), essa toxicidade é diminuída. Os pacientes aqui analisados fazem uso de HU em média, há 102.4 semanas e possivelmente o efeito tóxico da medicação já tenha sido minimizado, prevalecendo somente o estresse e lesão decorrentes dos eventos da AF.

Em relação aos danos ao DNA induzidos por fármacos, o DNA pode ser o alvo de drogas que reagem diretamente com o DNA ou indiretamente pela incorporação de nucleotídeos análogos, ou bloqueando funções metabólicas, tais como as DNA polimerases e topoisomerases relacionados às quebras de fitas simples e duplas, passíveis de serem detectados na versão alcalina do ensaio cometa (FAIRBAIRN et al., 1995). Apesar de alguns danos ao DNA serem reparados, seria ideal o permanente biomonitoramento de genotoxicidade a vários agentes químicos, com o uso de biomarcadores, para a prevenção de futuras lesões, as quais podem induzir crescimentos neoplásicos em células somáticas danificadas. O monitoramento dos efeitos genotóxicos de químicos em humanos, com o objetivo de avaliar os riscos, tem aumentado e,

como resultado, têm sido identificados marcadores de exposição humana a mutágenos e carcinógenos (VALVERDE; ROJAS, 2009). Nos resultados levantados, apesar dos indivíduos em uso de HU terem apresentado maiores índices de lesão de DNA, esta relação não foi significativa. Tal achado sugere mais uma vez que esta ocorrência pode ser devida ao intenso processo de estresse oxidativo que pode afetar membranas e ácidos nucleicos que ocorre nos indivíduos com AF.

O estresse oxidativo é um dos fatores que podem modelar a lesão ao DNA, tendo ou não possível influência no uso de medicamentos. A maior peroxidação lipídica encontrada no grupo AF, em relação ao GC, permite inferir que nos eritrócitos falcêmicos, o estresse oxidativo é decorrente da alta taxa de meta Hb S, menos estável que a meta Hb A, resultando na hemólise como já evidenciado por Fibach et al. (2008). Dessa forma, há a formação de radicais superóxido e hidroxil que, juntamente com o grupo heme, iniciam uma via de oxidação da Hb, resultando em danos aos eritrócitos. A membrana celular sofre peroxidação lipídica e, dessa forma, a dosagem de TBARS é um bom indicador de estímulos pró-oxidantes, uma vez que quantifica as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, como o malondialdeído (MDA) e outros aldeídos (HEBBEL et al., 1982; CIGHETTI et al., 2002; SCOTT, 2006; WOOD; GRANGER, 2007).

Com a hemólise e consequente liberação do grupo heme, o ferro livre, atuará como um catalisador de outras vias oxidativas, com consequente síntese de radicais superóxidos e hidroxilas. Logo, a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio, pela superóxido dismutase, leva à peroxidação de lipídios da membrana e a danos celulares e consequentemente de DNA como os observados pelos testes de CHJ e ensaio cometa.

A peroxidação lipídica, naturalmente mais alta nos indivíduos com AF, está relacionada com as taxas de lesão de DNA encontradas. Considerando a ação do estresse oxidativo no organismo e sua influência sobre as células, tecidos e moléculas, sabe-se que a peroxidação – resultado deste estresse – pode estar diretamente relacionada à formação de agentes oxidantes, que, por sua vez exercem influência em outras células e moléculas de DNA. Com isso, a maior taxa de lesão de DNA em pacientes com anemia falciforme é, de certa forma, um fator intrínseco associado à doença, sem influência da HU, como evidenciado pelos resultados em que os pacientes portadores de AF tiveram maior taxa de lesão de DNA e peroxidação lipídica quando comparados ao GC.

Moghbeli-Nejad et al. (2012) sugerem a existência de fragilidade genômica em diferentes tipos celulares, e que é possível ser evidenciadas por CHJ. Esta relação pode indicar que indivíduos portadores de anemia falciforme possuem fragilidade genômica, agravada pelo intenso processo de estresse oxidativo, com os subprodutos atuando como fatores pró-oxidantes. O estresse oxidativo, desta forma, pode ser indicativo de precursor de lesão no DNA em indivíduos portadores de AF. Temos demonstrado como resultados desta avaliação, a relevância da peroxidação lipídica e lesão de DNA nos portadores da mutação ( $HBB^{glu6val}$ ). Muitos eventos na anemia falciforme são favorecidos pelas chamadas micropartículas, fragmentos de 0.1 a 1 $\mu$ m originários da ativação celular e apoptose (HUGEL, et al. 2005). Níveis elevados de micropartículas na circulação sanguínea têm sido relacionadas com doenças vasculares e associadas com altos riscos de trombose (BOULANGER, et al., 2001). Demonstramos aqui que o cenário celular nos indivíduos com AF pode estar comprometido pela mutação que gera a doença e, com isso, a alta taxa de peroxidação lipídica e lesão de DNA que favorece ainda mais a cascata hemolítica, e de vasclusão, que levará à piora da fisiopatologia e ocorrência de eventos de coagulação, inflamação e disfunção vascular.

A mutação que origina a Hb S, leva a alterações que modificam o equilíbrio entre radicais livres e capacidade antioxidante, provocando diminuição na capacidade antioxidante, o que gera maiores taxas de peroxidação (FASOLA, F, et al , 2007). Esses eventos sofrem interferência do uso de medicação. Silva et al. (2011) encontraram, num grupo de pacientes com anemia falciforme, diferença na taxa de peroxidação lipídica (TBARS) em indivíduos que faziam uso de HU, comparados a um grupo sem uso do medicamento, devido ao efeito benéfico deste, em aumentar a taxa de Hb total, e com o aumento de Hb F. Em nosso trabalho esta relação não foi evidenciada, para os parâmetros avaliados, por tratar-se de um grupo mais homogêneo e com maior tempo de uso de medicação.

A HU consiste, hoje, na alternativa medicamentosa para o tratamento da AF, pois apresenta efeitos clínicos favoráveis quanto à melhora do fenótipo, porém, seu efeito em longo prazo, ainda permanece em questão (STEINBERG, 2010). A Associação Internacional de Enfermeiras e Assistentes da Doença Falciforme constatou 52 casos de câncer em um grupo de mais de 16 mil pacientes com anemia falciforme, sendo praticamente todos em fase pré-HU, ou seja, sem contato com o medicamento. Dos casos encontrados, apenas três tiveram contato prévio

com a HU; entre crianças, 21 apresentaram algum tipo de câncer entre eles leucemias e linfomas. Estes dados demonstram baixa frequência de câncer associado ao uso de HU.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho sugerem ausência de interferência da HU em marcadores de lesão de DNA e peroxidação lipídica e colocam a mutação  $HBB^{Glu6Val}$  como principal fator indutor destes tipos de ocorrências. Os dados sugerem também que indivíduos com AF apresentam instabilidade genômica, evidenciado pelo aumento de lesão de DNA no grupo de estudo comparado ao grupo controle. Porém, como a HU tem sido usada em crianças, o que remete a um longo tempo de uso, estudos adicionais devem ser realizados e a confiabilidade quanto aos efeitos malignos ou pré-malignos deve ser comprovada.



## 5. Referências

- BOULANGER, C. M.; SCOAZEC, A.; EBRAHIMIAN, T.; HENRY, P.; MATHIEU, E.; TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. **Circulation**. v. 104, p. 2649-52, 2001.
- CHIANG E. Y, FRENETTE P. S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol Oncol Clin North Am**. v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005.
- CHIRICO, E.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB life**. v. 64, p. 72-80, 2011.
- CIGHETTI, G. et al., Oxidative status and malondialdehyde in  $\beta$ -thalassemia patients. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 32, p. 55-60, 2002.
- DE LIMA, P. D. et al. Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. **Genet Mol Res**. v. 30, p. 328-33, 2003.
- FASOLA, F. Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. **J Natl Med Assoc**. v. 99, p. 891-4, 2007.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat Res**. v. 600, p. 58-66, 2006.
- FIBACH E, RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Curr Mol Med**. v. 8, p. 609-19, 2008.
- FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850-858, 2007.
- FRIEDRISCH, J. R. et al. DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Mutation Research**. v. 649. p. 213-220. 2008.
- HARROD, V. L. Quantitative analysis of Howell-Jolly bodies in children with sickle cell disease. **Exp Hematol**. v. 35, p. 179-83. 2007.
- HEBBEL, R.P. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 70, p. 1253-1259, 1982.
- HUGEL, B.; MARTÍNEZ, M. C.; KUNZELMANN, C.; FREYSSINET, J. M. Membrane microparticles: two sides of the coin. **Physiology (Bethesda)**. v.20, p.22-27, 2005.
- KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. **MMS Comm**. v. 3, p. 103-115, 1995.

KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 1, p. 24-31, 2011.

LANE, P. A; O'CONNELL, J. L.; LEAR, J. L., et al. Functional asplenia in hemoglobina SC disease. **Blood**. v.85, p.2238–2244, 1995

LANZKRON, M. D. S. et al. Systematic Review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Annals of Internal Medicine**. v. 148, n. 12, p. 939-955, 2008.

LI, J. C.; KAMINSKAS, E. DNA fragmentation in permeabilized cells. **Biochem J**. v.247 p. 805-6. 1987

LIU, Y. H. et al. Antioxidant and amine oxidase inhibitory activities of hydroxyurea. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 74, n. 6, p. 1256-1260, 2010.

MOGHBELI-NEJAD, S.; MOZDARANI, H.; ALEYASIN, A. Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of infertile males after exposure to gamma irradiation: a possible sign of genomic instability. **J Assist Reprod Genet**. v.29, p. 89-94, 2012.

PERCÁRIO, S. et al. Dosagem do dialdeído malônico. **NewsLab**. v. 6, p. 46-50, 2004.

REES, D.C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet**. v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.

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

SCOTT, M. D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. **Free radical biology & medicine**, v. 40, n. 7, p. 1264-1272, 2006.

SILVA, D. G.; BELINI-JUNIOR, E.; TORRES, L. S.; RICCI-JÚNIOR, O.; LOBO, C. L. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R., ALMEIDA, E. A. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**. v. 47, p. 23-8, 2011.

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

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Clinical Haematology**. v.11, p. 163-184, 1999.

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

STEINBERG, M. H. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.** v. 85. p. 1362-1369. 2010.

VALVERDE, M; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutat Res.** v.681, p. 93-109, 2009

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

WARE, R. E., AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **Hematology American Society of Hematology Education Program Book.** p. 62–9, 2009.

WARE, R. E. Hydroxycarbamide: clinical aspects. **C R Biol.** v. 336, p.177-82, 2013.

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

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