



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Édis Belini Júnior

**Determinantes genéticos, bioquímicos e clínicos na resposta ao
uso de hidroxiureia na doença falciforme**

São José do Rio Preto - SP
2014

Édis Belini Júnior

**Determinantes genéticos, bioquímicos e clínicos na resposta ao
uso de hidroxiureia na doença falciforme**

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

Orientadora: Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP
2014

Belini Júnior, Édis.

Determinantes genéticos, bioquímicos e clínicos na resposta ao uso de hidroxureia na doença falciforme / Édis Belini Júnior. -- São José do Rio Preto, 2014

174 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Claudia Regina Bonini Domingos

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

1. Genética molecular humana. 2. Anemia falciforme – Aspectos genéticos. 3. Glutathion transferase. 4. Marcadores biológicos. 5. Óxido nítrico. 6. Polimorfismo (Genética) 7. TBARs. I. Domingos, Claudia Regina Bonini. 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

Édis Belini Júnior

**Determinantes genéticos, bioquímicos e clínicos na resposta ao
uso de hidroxiureia na doença falciforme**

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

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
UNESP – São José do Rio Preto-SP
Orientadora

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
FAMERP – São José do Rio Preto-SP

Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva
UNESP – São José do Rio Preto-SP

Prof. Dr. Paulo Caleb Junior de Lima Santos
InCor-HC/FMUSP – São Paulo-SP

Prof^a. Dr^a. Isabeth da Fonseca Estevão
UFSCAR – São Carlos-SP

São José do Rio Preto
24 de fevereiro de 2014

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, Departamento de Biologia, e no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática, Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do Ministério da Saúde e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Dedico este trabalho a minha amada e admirada família

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela minha existência, por me amparar nos momentos difíceis, por ser responsável pela minha fé e por sempre ouvir minhas orações.

Aos meus pais **Édis Belini** e **Iris Maria dos Santos Belini**, meus exemplos de vida, que dignamente me apresentaram à importância da família e o caminho da honestidade. Sou muito grato por todo o carinho e amor compartilhado.

Aos meus irmãos **Leonardo Belini** e **Glaucia C. Belini Chaves**, pelo carinho, amor, respeito e admiração. Ao meu cunhado, **Luis Adolfo Chaves**, e a minha cunhada, **Daniele Oliveira Belini**, que sempre transmitiram forças, alegria e carinho.

Aos meus tios, **José Antonio Queiroz** e **Maria de Fátima Belini**, que estiveram do meu lado desde o primeiro dia em São José do Rio Preto-SP. Agradeço pelo carinho e respeito mútuo. Sempre serei grato por tudo que fizeram por mim.

À minha namorada **Patrícia P. Nascimento** pela companhia, momentos de alegria, amor e por ter segurado a “barra” nesse último semestre. Ao **Paulo Nascimento**, **Vera Pereira**, **Carol Nascimento** e **Tiago Rastelli** pelo carinho e atenção.

Aos membros da minha grande e amada família, o qual tem muito orgulho e admiração, **avô Miguel**, **avó Maria**, **Tia Rosária**, **Tio Reinado**, **Tia Mara**, **Tio Toninho**, **Tio Edilson**, **Tia Zulmira**, **Tia Lourdes**, **Tia Celinha**, **Tio Osmar**, **Tio Edson**, **Tia Elis**, **Tio José**, **Pedro**, **Nayara**, **Felipe**, **Rayane**, **Guilherme**, **Ana Carolina**, **Elisângela**, **Élder**, **Juliana**, **Léo** e **Lívia**.

Às minhas amadas sobrinhas **Lívia** e **Ana Laura**. São as princesas mais lindas que amo muito e foram responsáveis por muita alegria para nossa família.

Aos meus amigos das antigas, **Flávio C. Arantes** e **Renan Ap. Rodrigues**, que não importa a distância geográfica, sempre estiveram ao meu lado transmitindo carinho, respeito e enriquecendo cada vez mais a nossa amizade.

Aos meus grandes amigos **Humer J. Santos, Danilo Grunig e Gisele C. S. Carrocini** pela amizade valiosa, pelos momentos de alegria, discussões e respeito.

Ao **Luiz Henrique, Ana Luiza e Lucas**, sempre que possível, foram responsáveis por muitas gargalhadas em momentos de alegria e descontração.

Aos meus amigos e a treinadora do Handebol Unesp/Rio Preto, **Paulo Galão, Elton Boina, Lucas Santos, Tiago Haruo, Wesley Oliveira, Natan Santos, Renan Ventura, Matheus Goyos, Fabrício Watanabe, Fernando Zilio, Yagor Carvalho, Luccas Amaral, Guilherme Morsoleto, Carlos Fossa, Rodolfo Pelinson, Danilo Grunig e Luciane Barcelos**, que sem dúvidas, foram os responsáveis pelos pequenos momentos de lazer e por fazer do esporte momentos de alegria e vitórias.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), que na verdade, são considerados como meus irmãos, **Danilo, Gisele, Larissa, Tiago, Isabel, Vinicius, Lidiane, Wilian, Isabela, Jéssika, Jéssica, Lucas, Nathalia, Gabriela, Vanessa Urbinati, Vanessa Cardoso, Renan, Mariana, Luis Felipe, Edoardo, Dayane** e àqueles que passaram pelo laboratório, pelos momentos de discussão, aprendizagem, amizade e diversão.

Aos amigos de final de semana **Guilherme Sabino, Tomás e Raduan** pelos momentos de descontração e alegria.

Aos **professores e alunos da Unilago** que me receberam de braços abertos nessa nova etapa. Principalmente o **Prof. Marcus Belloto e Prof. Carlos Fábian**.

Ao **Nelson Tukamoto Júnior** pela amizade, pelos ensinamentos e por compartilhar a sua experiência de vida. A **Camila Soccio** pelo carinho e ensinamentos.

Aos **colegas do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática** pelos momentos de trabalho e por terem me aturado em alguns momentos.

Ao **Prof. Dr. Flávio Naoum e a Prof. Dra. Doroteia R. Souza** pela valiosa colaboração durante o exame de qualificação.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida** que gentilmente cedeu o seu laboratório para realizar as análises bioquímicas desse projeto, além disso, muito obrigado pelos ensinamentos, pelos artigos, pela parceria e pelas piadas que sempre quebraram a tensão no laboratório.

À **Paula J. A. Zamaro** pela amizade e por ter contribuído significativamente na minha formação profissional.

A **Dra Clarice Lobo** pela parceria, ensinamentos e oportunidade de trabalhar com uma pessoa que sempre lutou pela melhoria do sistema de saúde e pela vida das pessoas com doença falciforme.

À **equipe do HEMORIO**, principalmente a **Thais Oliveira** e **Elisabeth Pereira**, pela contribuição preciosa nas coletas e todo o apoio.

Às **pessoas com doença falciforme** que gentilmente aceitaram a participar do projeto de pesquisa cedendo as suas amostras e me mostraram o “outro lado da moeda”.

Ao **CNPq, Ministério da Saúde e a Fundarj** pelos auxílios financeiros concedidos durante todos esses anos.

Aos **professores, técnicos e funcionários da Unesp** e do **Programa de Pós Graduação em Genética** pela oportunidade de desenvolver o meu projeto.

Aos membros da banca examinadora **Dr. Luiz C. Mattos, Dra. Ana Elizabete Silva, Dr. Paulo C. J. Lima Santos e Dra. Isabeth da Fonseca Estevão**, que nobremente aceitaram o convite para participar da minha banca e por avaliarem o meu trabalho.

À **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho e por contribuir ativamente na minha formação profissional e pessoal. Agradeço pelos ensinamentos, amizade, confiança, paciência e pelo carinho durante todos esses anos. Levarei comigo sempre essa admiração como pessoa e pesquisadora.

"Havia 15 anos que eu não sabia o que era dormir uma semana inteira sem acordar nas madrugadas com priapismo ou com dor. Nunca me tinha visto com olhos brancos e minha pele com coloração natural. Não tinha mais úlceras no tornozelo. Era incrível!"

(Elvis Silva Magalhães, relato pós transplante de medula óssea)

RESUMO

A doença falciforme (DF) é caracterizada por heterogeneidade clínica variando de pessoas com relativamente poucas complicações clínicas e expectativa de vida normal, até aqueles com complicações graves, como hipertensão pulmonar, priapismo, acidente vascular cerebral (AVC), úlceras de perna, episódios de dor, síndrome torácica aguda (STA) e osteonecrose. O tratamento com a hidroxiureia (HU) tem conquistado espaço na terapia adotada pelos clínicos e sua experiência na DF vem sendo acumulada ao longo dos últimos 25 anos. Porém, muitos estudos têm sido elaborados para investigar as variações genéticas que possam explicar o porquê de alguns pacientes tolerarem e respondem ao uso de HU, enquanto, outros ainda precisam ser tratados por terapias alternativas. Diante disso, nosso objetivo foi avaliar a resposta ao tratamento com a HU considerando a influência dos polimorfismos genéticos envolvidos na fisiopatologia da DF. Para isso, usamos a calculadora de gravidade da DF (CGDF); rastreamos os polimorfismos -509C/T (*TGFB1*), -308G/A (*TNFA*), 313 A/G (*GSTP1*), -786T/C (*NOS3*), nulos (*GSTM1* e *GSTT1*); e avaliamos os marcadores de estresse oxidativo (catalase, glutationala peroxidase-GPx, glutationala S-transferase-GST, glutationala redutase-GR e as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBARS). O estudo envolveu 520 pacientes, acima de cinco anos de idade, provenientes do Instituto de Hematologia do Rio de Janeiro/RJ-HEMORIO. A CGDF foi validada para os pacientes brasileiros e os escores de gravidade foram relacionados com os marcadores de estresse oxidativo. Em relação aos polimorfismos, a presença do alelo nulo do gene *GSTM1* aumentou a chance de ocorrência de priapismo em pacientes com a DF. A mutação do gene *TGFB1* mostrou efeito protetor na ocorrência de STA e úlceras de perna, e à presença do alelo mutante para o gene *NOS3* diminuiu a chance de ocorrência de retinopatia e priapismo. Para os marcadores bioquímicos, verificamos que a diminuição da atividade das enzimas: catalase, Gpx e GR e o aumento da GST, foram associadas com maior gravidade da DF. Além disso, os níveis de peroxidação lipídica foram maiores nos pacientes do que os valores de referência, sendo que, o aumento dos valores de TBARS é influenciado pela alta concentração de Hb S. Verificamos que as mutações nos genes *GSTM1* e *GSTP1* foram responsáveis pela diminuição da atividade da GST total, e as mutações nos genes das GSTs resultaram na elevada atividade da GR. Os pacientes não portadores dos polimorfismos -509C/T no gene *TGFB1*, -308G/A no gene *TNFA* e nulo para *GSTM1* responderam melhor ao uso de HU quando comparados aos pacientes com os alelos mutantes dos mesmos genes. Os efeitos da HU no aumento da Hb F e do volume corpuscular médio (VCM), bem como, na diminuição da bilirrubina total foram independente dos polimorfismos estudados. Este estudo demonstra que a resposta diferenciada ao uso de HU tem a influência dos polimorfismos avaliados, o que garante , uma importante informação e direcionamento para o tratamento da DF.

Palavras-chave: TNFA, TGFB1, óxido nítrico, glutationala s-transferase, TBARS

Abstract

Sickle cell disease (SCD) is characterized by a very heterogeneous clinical ranging from patients who have normal life expectancy with relatively few complications; others can have severe complications such as pulmonary hypertension, priapism, stroke, leg ulceration, recurrent painful episodes, acute chest syndrome (ACS) and avascular necrosis of bone (AVN). Treatment with hydroxyurea (HU) has become more adopted by medical and HU experience in DF has been accumulated over the last 25 years. However, many studies have been designed to investigate the genetic variations that may explain why some patients tolerate and respond to the use of HU, while others still need to be treated with alternative therapies. In view of this, we aimed to evaluate the response to HU treatment considering the genetic polymorphisms influence involved in the pathophysiology of SCD. For this, we used the calculator severity of DF (CGDF); detected the polymorphisms -509C/T (*TGFB1*), -308G/A (*TNFA*), 313 A/G (*GSTP1*), -786T/C (*NOS3*), null (*GSTM1* and *GSTT1*), we assessed markers of oxidative stress (catalase, glutathione peroxidase-GPx, glutathione S-transferase-GST, glutathione reductase-GR and the thiobarbituric acid reactive species-TBARS). The study involved 520 patients older than 5 years, from the Instituto de Hematologia do Rio de Janeiro/RJ-HEMORIO. The CGDF was validated for Brazilian patients and severity scores were related to oxidative stress markers. The presence of the *GSTM1* null allele increased the occurrence chance of priapism in SCD patients. *TGFB1* gene mutation had a protective effect on the occurrence of STA and leg ulcers, and the presence of the mutant allele for the *NOS3* gene decreased the occurrence chance of retinopathy and priapism. For biochemical markers, we found that the decreased of enzymes activity (catalase, Gpx and GR), and the increased in GST activity were associated with greater SCD severity. In addition, lipid peroxidation levels were higher in patients than the reference values and the TBARS values increase is influenced by high HbS concentration. We found that mutations in *GSTM1* and *GSTP1* genes decreased the GST activity and the GSTs gene mutations resulted in elevated GR activity. Patients without polymorphisms: -509C/T (*TGFB1*), -308G/A (*TNFA*) and *GSTM1* null responded better to HU use compared to patients with mutant alleles of the same genes. The HU effects on HbF and mean corpuscular volume (MCV) increase, as well as in the total bilirubin reduction were independently of studied polymorphisms. This study shows that genetic polymorphisms evaluated influence the response to treatment with HU, and in some specific clinical complications DF. This study demonstrates that HU use response has influence of polymorphism evaluated and thus is an important information and guidance for the treatment of SCD.

Key-words: *TNFA* gene, *TGFB1* gene, nitric oxide, glutathione s-transferase.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DOENÇA FALCIFORME	13
1.2 MODULADORES GENÉTICOS NA DOENÇA FALCIFORME	15
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA FALCIFORME	19
1.3 TERAPIA FARMACOLÓGICA COM A HIDROXIUREIA	22
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 CASUÍSTICA	28
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	29
3.3 ESTATÍSTICA	29
3.4 MÉTODOS	30
3.4.1 Diagnóstico da Doença falciforme	30
3.4.2 Detecção dos Polimorfismos	37
3.4.3 Avaliação da capacidade antioxidante e de marcador de dano oxidativo	41
3.4.4 Calculadora da gravidade da doença falciforme	42
4. RESULTADOS	45
4.1 GENÓTIPOS DA DOENÇA FALCIFORME E CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO	45
4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM A CALCULADORA DE GRAVIDADE DA DOENÇA FALCIFORME	48
4.3 POLIMORFISMOS ENVOLVIDOS NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS, NA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE OXIDATIVO DA DOENÇA FALCIFORME	56
4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE, GPX, GST, GR) E O DANO OXIDATIVO (TBARS)	61
4.5 RESPOSTA AO USO DE HIDROXIUREIA PERANTE OS MARCADORES BIOQUÍMICOS E LABORATORIAIS, FENÓTIPO DA DOENÇA E OS POLIMORFISMOS GENÉTICOS AVALIADOS	66
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÕES	90
8. REFERÊNCIAS	92
APÊNDICE A - PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA OS TESTES BIOQUÍMICOS	111
APÊNDICE B - PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA FALCIFORME, IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS.	118
APÊNDICE C- ARTIGOS	144

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA FALCIFORME

A doença falciforme (DF) é uma das afecções monogênicas mais frequentes em todo o mundo; caracterizada pela presença de uma hemoglobina (Hb) com características diferentes da Hb normal, denominada de Hb S, acarreta aos portadores heterogeneidade clínica variando de pessoas com a expectativa de vida normal, com relativamente poucas complicações clínicas, até aqueles com complicações graves, como hipertensão pulmonar, priapismo, acidente vascular encefálico (AVE), úlceras de perna, episódios dolorosos recorrentes, síndrome torácica aguda (STA) e necrose óssea avascular (KLINGS; FARBER, 2001; WEATHERALL et al., 2005; FRENETTE; ATWEH, 2007b; STEINBERG, 2008; DRISS et al., 2009; AKINSHEYE; KLINGS, 2010)

O termo DF denota todos os diferentes genótipos que causam as características clínicas da doença (STUART; NAGEL, 2004). A anemia falciforme (AF) refere-se aos homozigotos para a Hb S e representa a forma mais grave e comum da DF. Outros genótipos também são encontrados com menor frequência que incluem as interações com talassemias (Hb S/Beta talassemia) e associações com outras variantes de Hb formando os duplos heterozigotos, como a Hb SC, Hb SD, Hb SE e Hb SO Arab. (BONINI-DOMINGOS, 1993; STEINBERG, 2009).

A Hb S é resultado de uma mutação pontual do tipo transversão, em que há a troca de uma base purínica (adenina) por uma pirimídica (timina) no códon do gene β globina que corresponde ao sexto aminoácido. Devido a esta mutação, o aminoácido ácido glutâmico é substituído por uma valina na cadeia beta globina, originando uma Hb com características físicas e bioquímicas alteradas (STEINBERG, 1998; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Em condição de hipóxia, desidratação ou acidose, o motivo hidrofóbico presente nos tetrâmeros de Hb S se ligam formando polímeros rígidos e caracteriza o primeiro evento indispensável na patogênese molecular da DF (STEINBERG, 1999; FRENETTE; ATWEH, 2007a). Esse processo chamado de polimerização da Hb S, dentro dos eritrócitos, tem como consequência múltiplas alterações da célula:

efluxo de íons monovalentes como o potássio, desidratação celular, aumento da densidade dos eritrócitos, rompimento do citoesqueleto eritrocitário, formação de protruções na membrana, exposição de epítomos proteicos e lipídicos, e por fim podendo ocorrer a hemólise (ZAGO; PINTO, 2007; FRENETTE; ATWEH, 2007a).

Os eritrócitos alterados induzem a expressão de mediadores inflamatórios e de coagulação ativando o endotélio vascular, além disso, podem estimular as células endoteliais a recrutar leucócitos por expressarem quimiocinas e moléculas de adesão celular, tais como as selectinas e imunoglobulinas. Todas essas alterações podem desencadear processos vaso-oclusivos e isquemia, e quando é restabelecido o fluxo sanguíneo, promove ainda mais a lesão tissular mediada por reperfusão (EMBURY et al., 2004; WOOD; GRANGER, 2007; CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009; BELINI JUNIOR et al., 2011; MANWANI; FRENETTE, 2013).

Outro evento envolvido na fisiopatologia da DF é a hemólise, também desencadeado pela polimerização da Hb S, contribui para o desenvolvimento de vasculopatia. Cerca de dois terços de toda hemólise na DF ocorre principalmente extravascularmente devido à fagocitose de eritrócitos falcizados por células reticuloendoteliais (HEBBEL; MILLER, 1984; KATO et al., 2006). Entretanto, a destruição dos eritrócitos pode ocorrer por via intravenosa. O resultado da hemólise intravascular libera o conteúdo intraeritrocitário como a Hb livre no plasma, espécies reativas de oxigênio (ERO), radicais hidroxil ($\bullet\text{OH}$) e superóxido (O_2^-), que depletam o óxido nítrico (NO), o que acarreta a sua biodisponibilidade e também disfunção do endotélio vascular (REPKA; HEBBEL, 1991; REITER et al., 2002; GLADWIN, 2006).

O fenômeno de vasoconstrição, por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo e favorece a falcização dos eritrócitos falciformes. Em resposta a estímulos inflamatórios, de hipóxia e estresse oxidativo, as células endoteliais liberam endotelina-1, um peptídeo pró-inflamatório e potente vasoconstritor de grandes e pequenas artérias e veias (ERGUL et al., 2004). Além da ação vasoconstritora, esse peptídeo aumenta as concentrações de molécula de adesão celular-vascular-1 (VCAM-1) e molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) solúveis e também estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como as interleucina (IL)-1, IL 6, IL 8, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos (GRAIDO-GONZALEZ et al., 1998; KATO et al., 2009).

Os processos fisiopatológicos, assim como as consequências vasculares, presentes na DF podem ser visualizados na Figura 1.

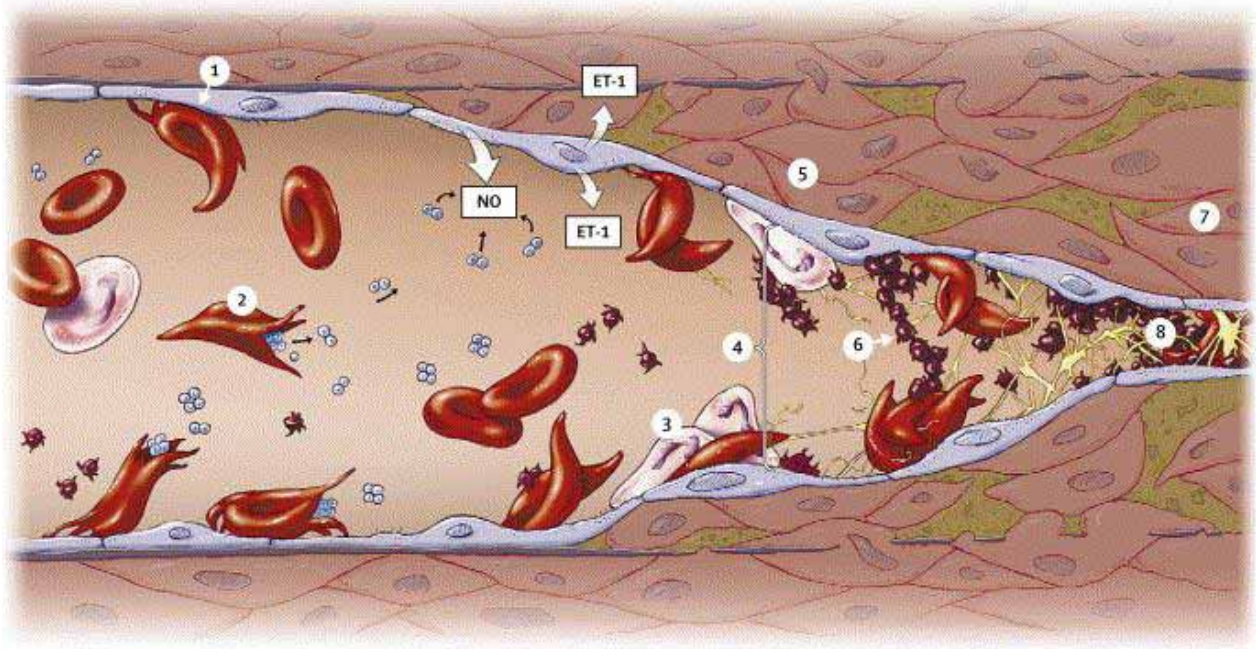


Figura 1. Processos fisiopatológicos na doença falciforme. Os eritrócitos falciformes são os principais responsáveis no desenvolvimento de vasculopatias como resultado da adesão anormal ao endotélio vascular (1) e hemólise (2). Esses fatores desencadeiam um estado pró-inflamatório que se manifesta, em parte, pela adesão de leucócitos (3) e agregação de plaquetas (6). O aumento da secreção de endotelina 1 (ET-1) e sequestro do óxido nítrico (NO) por dímeros de hemoglobina livre resulta no aumento do tônus vascular (4). O estreitamento do lúmen ocorre após a proliferação de células de músculo liso e fibroblastos no interior da camada da íntima (5). O resultado final é a vasculopatia (7) e a vaso-oclusão (8). (modificado de (SWITZER et al., 2006))

1.2 MODULADORES GENÉTICOS NA DOENÇA FALCIFORME

A base molecular para a formação da Hb S, assim como, a origem dos alelos β^S mutante, são conhecidos, mas apenas a mutação para a Hb S não é suficiente para explicar a heterogeneidade fenotípica encontrada nas pessoas com DF (STEINBERG, 2009; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Diante disso, diferentes estudos têm sido propostos para a busca de moduladores genéticos associados aos fenótipos da DF. Com os resultados do Projeto Genoma Humano e a caracterização de elementos da variação genética humana, pelos projetos emblemáticos, tais como, o Projeto de Mapa de Haplótipos (*Haplotype Map – HapMap*) e o Projeto 1000 Genomas, foi possível estabelecer

associação das variantes genéticas com doenças humanas e características complexas pelos Estudos de Associação Genômica Ampla (*genome-wide association studies* – GWAS) (THE INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT, 2003; LETTRE, 2012)

A Hb F e a coerança da alfa talassemia são os dois moduladores genéticos mais conhecidos na DF. A variação na concentração de Hb F entre as pessoas com DF pode variar de 0,1% a 30% e altas concentrações, em geral, reduz a gravidade da doença (STEINBERG, 2005a). Estudos tem demonstrado efeito protetor da Hb F em eventos como episódios de dor (PLATT et al., 1991; BAILEY et al., 1992), retinopatia (FOX et al., 1990), úlceras de perna (KOSHY et al., 1989), AVE (OHENE-FREMPONG et al., 1998), função esplênica (WALI et al., 2002), entre outros. A expressão da Hb F envolve a atuação de três loci de característica quantitativa (*quantitative trait locus-QTL*): a região do cromossomo 2 no gene BCL11A, a região intergênica entre os genes HBS1L e MYB e o polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism-SNP*) na posição - 158 do gene $\zeta\gamma$ globina (GARNER et al., 2004; SANKARAN; ORKIN, 2013). Estudos recentes identificaram que as variantes genéticas nesses QTLs explicam 50% da variação dos níveis de Hb F em pessoas com DF (GALARNEAU et al., 2010).

A alfa talassemia associada com a DF faz com que os portadores tenham menos hemólise, maior hematócrito, menor volume corpuscular médio (VCM), baixa contagem de reticulócitos, baixa concentração de Hb S e conseqüentemente menos processos de polimerização da Hb S (HIGGS et al., 1982; STEINBERG et al., 1984; HIGGS, 2013). Clinicamente, o efeito da alfa talassemia na DF tem mostrado efeito protetor para AVE (OHENE-FREMPONG et al., 1998; NEONATO et al., 2000), úlceras de perna (KOSHY et al., 1989), função esplênica (WALI et al., 2002), para cardiopatias (BRADEN; COVITZ; MILNER, 1996), albuminúria (GUASCH et al., 1999) e colelitíase (ADEKILE et al., 1996; HAIDER et al., 1998).

Vários estudos foram publicados descrevendo associações genéticas entre polimorfismos de DNA e genes candidatos que potencialmente afetam a patogênese da DF (LETTRE, 2012). Estes genes, que incluem: mediadores da inflamação, lesão oxidante, biologia do NO, vasorregulação, interação célula-célula, coagulação do sangue, hemostasia, fatores de crescimento, citocinas e reguladores de transcrição, podem agir, por exemplo, independentemente da polimerização da Hb S e interferem no fenótipo do portador da DF (STEINBERG, 2005b; DRISS et al., 2009).

Em revisões atuais, vários SNPs nesses genes estão associados não só com o grau de anemia, mas também com crises de dor, prevalência de AVE, úlceras de perna, hipertensão pulmonar, osteonecrose, complicações hepatobiliares e priapismo, entre outros aspectos clínicos (FERTRIN; COSTA, 2010).

Dentre os polimorfismos associados a DF, destacamos os que serão abordados nesse estudo, portanto, temos os envolvidos nos processos inflamatórios: o SNP -509C/T (rs1800469) no gene do fator de crescimento transformante – β_1 (*transforming growth factor β_1 - TGFB1*) e o SNP -308G/A (rs1800629) no gene do fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor- α TNFA*); no estresse oxidativo: o SNP 313A/G (rs1695) no gene da glutationa S-transferase pi₁ (*Glutathione S-transferase - GSTP1*) e os polimorfismos da GST mu1 e theta 1 (*GSTM1* e *GSTT1*); e na biologia do ON: o SNP – 786T/C (rs2070744) no gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial (*endothelial nitric oxide synthase-eNOS* ou *nitric oxide synthase 3 - NOS3*).

TGF- β_1 é considerada uma citocina principalmente pró-inflamatória, mas que também desempenha papel crucial na angiogênese, juntamente com outros moduladores, como o fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF*) (CRIVELLATO, 2011). É derivado da família gênica *TGFB*: *TGFB1*, *TGFB2* e *TGFB3*, que está localizada na região cromossômica 19q13.1-13.3 e codifica três isoformas da citocina, sendo a TGF- β_1 mais abundante na circulação (WATANABE et al., 2002). Polimorfismos no gene *TGFB* estão envolvidos no desenvolvimento de úlcera de perna (NOLAN et al., 2006), episódios de dor, ocorrência de infecção, infarto, priapismo, STA, hipertensão pulmonar e falência renal (FERTRIN; COSTA, 2010).

A proteína TNF- α , descoberta em 1975, é uma molécula pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e células T. O seu excesso na circulação pode produzir efeitos deletérios sobre as células endoteliais, como apoptose e supressão de reparação endotelial (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2011). O *cluster* de genes *TNF* está localizado na região cromossômica 6p21.3, dentro da região do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe III (HAJEER; HUTCHINSON, 2001). A presença do SNP -308G/A na região promotora do gene *TNFA* demonstrou, em estudos com portadores da DF, que o alelo mutante teve associação com a ocorrência do sequestro esplênico em

crianças (CAJADO et al., 2011), já o alelo selvagem teve um efeito protetor contra o AVE (HOPPE et al., 2007).

A família de enzimas da óxido nítrico sintase consiste em três isoformas distintas, sendo que a eNOS é expressa em todas as células endoteliais e seus níveis variam em resposta a estímulos mecânicos, fator de crescimento e citocinas (QIAN; FULTON, 2013). O gene da eNOS está localizado na região cromossômica 7q36 e vários SNPs tem sido relacionado com alterações vasculares tais como AVC e doença renal em população sem DF (WANG; WANG, 2000; ENDRES et al., 2004). O SNP rs2070744 foi associado com a ocorrência de STA em crianças com DF do Mediterrâneo (CHAAR et al., 2006) e em mulheres afrodescendentes (SHARAN et al., 2004). Outro estudo indiano mostrou alta frequência do SNP em indivíduos com o fenótipo grave da doença, bem como, baixas concentrações de nitrito em 150 pacientes com DF (NISHANK et al., 2013).

A família de enzimas da GSTs são codificadas por pelo menos oito *loci* distintos: alfa (GSTA), mu (GSTM), theta (GSTT), pi (GSTP), sigma (GSTS), kapa (GSTK), omega (GSTO) e zeta (GSTZ), cada qual composta por uma ou mais isoformas, homodimérica ou heterodimérica (TEW; TOWNSEND, 2012). Estão envolvidas nas reações de conjugação da glutathiona (GSH) a uma variedade de compostos eletrofílicos potencialmente tóxicos e carcinogênicos (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Os genes das classes *GSTM1* e *GSTT1*, localizados respectivamente nas regiões 1q13.3 e 22q11.23, apresentam as deleções como as variantes mais comuns (genótipo nulo) o que leva a perda de atividade enzimática, impedindo a desintoxicação e, finalmente, aumenta o risco de várias doenças (HAYES; STRANGE, 2000).

O gene da classe *GSTP1*, localizado na região cromossômica 11q13, tem o SNP rs1695 mais estudado e quando a mutação está presente a enzima codificada possui menor atividade catalítica e possivelmente, atua de forma diferente na metabolização de eletrólitos resultantes do estresse oxidativo e de outros processos de biotransformação (BERNARDINI et al., 2005; HUANG et al., 2013).

Na literatura, as informações sobre a associação dos polimorfismos das GSTs com complicações clínicas da DF são escassas, o único trabalho existente demonstra que, em pacientes do Brasil, com a nulidade para os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* há associação com AVE, úlceras maleolares e STA (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2013).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA FALCIFORME

Com o surgimento de novos estudos, os processos de estresse oxidativo têm sido cada vez mais relacionados com a fisiopatologia da DF (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). O aumento da produção de elementos pró-oxidantes é causado por mecanismos intrínsecos da doença, como o aumento da atividade de várias oxidases (NADPH oxidase e xantina oxidase endotelial) (ASLAN et al., 2001; WOOD; HEBBEL; GRANGER, 2005), auto-oxidação da Hb S (HEBBEL et al., 1982), a liberação de ferro heme, aumento da dimetilarginina assimétrica (ADMA) (XIA et al., 1996; LANDBURG et al., 2010), desacoplamento de óxido nítrico sintase (NOS), e diminuição dos níveis de NO (MORRIS; KATO; POLJAKOVIC, 2005).

À medida que os sistemas de defesa antioxidantes na DF são afetados e/ou não são eficientes o suficiente para neutralizar a produção excessiva de espécies oxidantes (SCHACTER et al., 1988; AMER et al., 2006), o estresse oxidativo crônico é estabelecido, sendo um fator crítico para a disfunção endotelial, inflamação e lesão de múltiplos órgãos (HEBBEL; OSAROGIAGBON; KAUL, 2004)[16].

Por outro lado, existem sistemas de defesa antioxidante que podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathiona reduzida (GSH), a glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona S-transferase (GST), glutathiona redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Além da superóxido dismutase (SOD), que promove a dismutação do superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), bem como a catalase (CAT), que converte o H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2), impossibilitando a formação do radical hidroxila ($\bullet OH$). Há ainda a proteção não enzimática promovida, principalmente, pelas vitaminas E (α -tocoferol), C (ácido L-ascórbico) e glutathiona reduzida (GSH) (STEVEN et al., 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Na DF foi demonstrado que a atividade da SOD eritrocitária, em alguns estudos, é aumentada e isso pode ser devido a resposta ao estresse oxidativo (DAS; NAIR, 1980; GIZI et al., 2011), porém outros trabalhos mostraram que a diminuição da atividade da SOD está relacionada com a gravidade da doença quando comparada com indivíduos sem a DF (SCHACTER et al., 1988; ALSULTAN et al., 2010).

A remoção do H_2O_2 eritrocitário é realizada por duas principais enzimas antioxidantes: a GPx e CAT. A CAT é geralmente mais importante do que a GPx porque degrada o H_2O_2 sem consumir redutores celulares como a GSH ou NADPH, ou seja, é uma maneira energeticamente eficiente de ação (MORRIS et al., 2008; PANDEY; RIZVI, 2011).

A glutationa, um cofator para a GPx reduzir o H_2O_2 , é facilmente oxidado em glutationa dissulfeto (GSSG) por compostos oxidantes. Para que ela volte na forma reduzida (GSH), uma enzima chave, a GR, regenera a GSH a partir de GSSG usando elétrons da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). A concentração de GSH e a atividade de GPx são significativamente reduzida em pacientes com DF (NATTA; CHEN; CHOW, 1990; REID et al., 2006; ALSULTAN et al., 2010), porém a atividade de GR não apresentam diferenças entre indivíduos com e sem a DF (GIZI et al., 2011).

Na figura 2, é possível observar as principais vias de redução em eritrócitos. Além das que foram citadas, existe a via das glutaredoxinas que pode reduzir o ascorbato e proteínas oxidadas, as GPX que também atuam na redução dos peróxidos de lipídios/alquil (lado direito da figura) e as GSTs que atuam na detoxificação de xenobióticos (topo da figura). A GR, para ser ativa, recebe os NADPH por ação das tioredoxinas redutase (Trx) e com a participação da peroxiredoxina deixa o estado da Trx oxidado removendo H_2O_2 (abaixo da figura). Por sua vez, o NADPH é mantido sob a forma reduzida pelas enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PH) e 6-fosfogliconato desidrogenase de (6PGD) por reações desencadeadas pela via das pentoses fosfatos (lado esquerdo da figura). Outros redutores, não enzimáticos, tais como a vitamina C hidrofílica e a vitamina E lipofílico, são absorvidos por eritrócitos e contribuem para a proteção contra danos na membrana (lado superior direito). (MCCORD; FRIDOVICH, 1969; SCHRODER; PONTING, 1998; MAY, 1998; JOHNSON et al., 2010; VAN; VERHOEVEN; ROOS, 2013)

Altos níveis de peroxidação lipídica têm sido amplamente descritos na DF, seja pela dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ou pela quantificação direta do malondialdeído (MDA). Esse aumento se deve aos eritrócitos falcêmicos aumentarem a produção endógena de lipídios oxidados e também aumentar a susceptibilidade de promover a peroxidação lipídica comparado a eritrócitos normais (KLINGS; FARBER, 2001; MANFREDINI et al., 2008; SHIMAUTI

et al., 2010; SILVA et al., 2011; TORRES et al., 2012). Além da peroxidação lipídica, o aumento do estresse oxidativo intra e extraeritrocitário induz a instabilidade da membrana com elevada exposição de fosfatidilserina (PS). Com isso, contribui para a hemólise intravascular impulsionando a geração de pró-oxidantes endotelial, e a externalização de PS induz a interação de vários fatores de coagulação com os eritrócitos resultando em estado de hipercoagulabilidade (REPKA; HEBBEL, 1991; WOOD; GRANGER, 2007; WALTER et al., 2008).

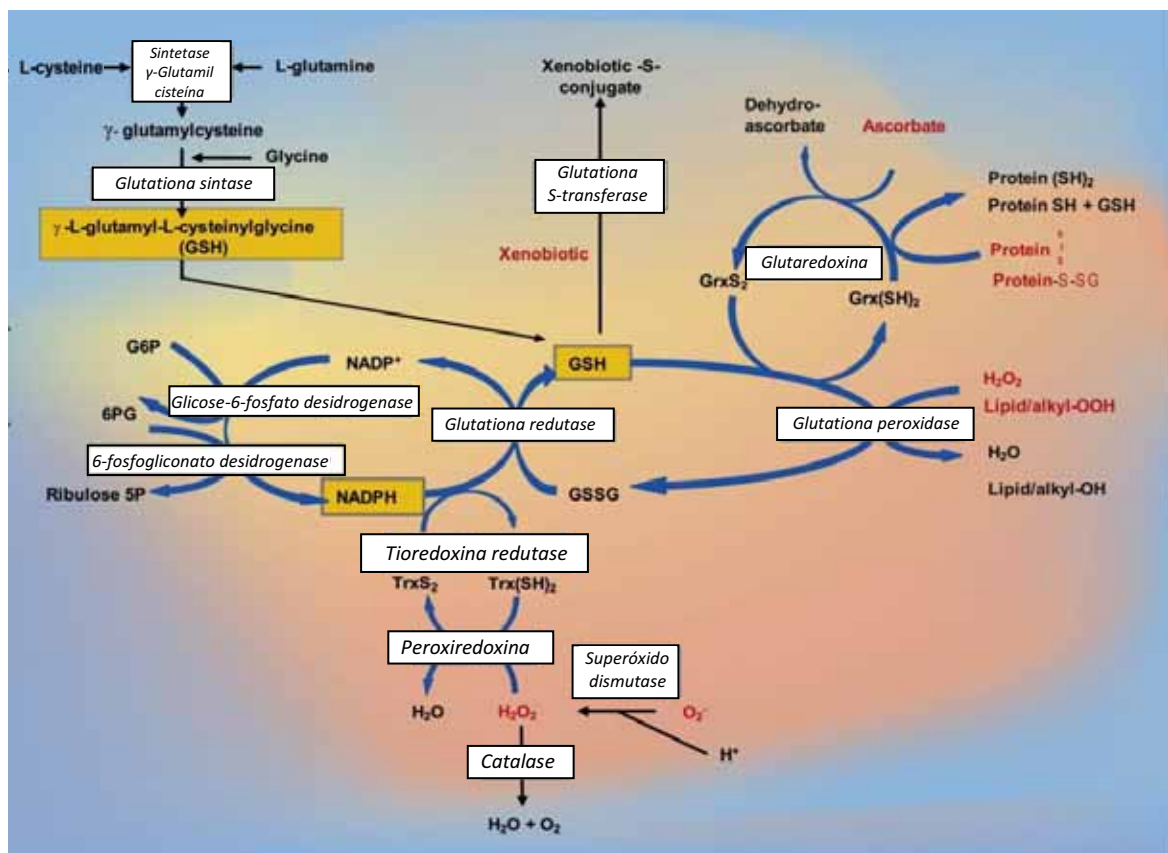


Figura 2. Principais vias de proteção do eritrócito contra danos oxidativos. Os eritrócitos possuem uma série de enzimas de detoxificação contra as espécies reativas de oxigênio (ERO) e também de xenobióticos. Trx: tioiredoxina redutase, TrxS₂: tioiredoxina redutase na forma oxidada, Trx(SH)₂: tioiredoxina redutase na forma reduzida, GrxS₂: glutaredoxina reduzida, Grx(SH)₂: glutaredoxina reduzida na forma oxidada (modificado de (VAN; VERHOEVEN; ROOS, 2013)

O processo repetido de polimerização/despolimerização da Hb S pode conduzir a um ciclo vicioso incitando a adesão de células sanguíneas, hemólise, vaso-oclusão e a lesão por isquemia – reperfusão (CHIRICO; PIALOUX, 2012), em outras palavras, as várias fontes de processos pró-oxidantes levam ao estresse oxidativo crônico e sistêmico. Por este motivo, os novos agentes terapêuticos podem ter como alvo o estresse oxidativo e, assim, atuam na prevenção ou retardamento

do desenvolvimento de complicações em órgãos (WOOD; GRANGER, 2007; NUR et al., 2011).

1.3 TERAPIA FARMACOLÓGICA COM A HIDROXIUREIA

A história natural da DF, em indivíduos com altos níveis basais de Hb F, é conhecida por ter um fenótipo mais brando e com menor comprometimento de órgãos associados às complicações da doença. Essa observação foi demonstrada pelo Estudo Cooperativo da Doença Falciforme em 1994 (PLATT et al., 1994), portanto, o fato de que o aumento da quantidade de Hb F inibe o processo de polimerização da Hb S, e, conseqüentemente, a falcização dos eritrócitos, levou à utilização de agentes que possam promover a síntese de Hb F nos pacientes com DF (SHETH; LICURSI; BHATIA, 2013).

A hidroxiureia, um derivado do ácido hidroxâmico, é um medicamento de administração oral, cujo maior efeito associado ao tratamento de pacientes com DF é o aumento na síntese de Hb F, 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, baixa toxicidade, baixo custo e ter múltiplos efeitos, a HU tem ganhado espaço como terapia frequentemente adotada pelos clínicos, e sua experiência na AF vem sendo acumulada ao longo dos últimos 25 anos, sendo segura e bem tolerada pela maioria dos pacientes adultos (WARE; AYGUN, 2009; KOVACIC, 2011).

Os mecanismos de atuação da HU ainda não são totalmente esclarecidos, mas sabe-se que é um agente que atua na fase S do ciclo celular, interrompendo o ciclo pela inibição da atividade da ribonucleotídeo redutase e, dessa forma, reduzindo a síntese de DNA. Essa interrupção não específica do ciclo celular é, provavelmente, a principal responsável pela promoção da síntese de Hb. Em cultura de células demonstrou-se que doses de HU em células progenitoras eritróides podem aumentar a quantidade de Hb 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 cGMP (Guanosina Monofosfato cíclica), o que acelera a tradução dos genes gama (COKIC et al., 2003; COVAS et al., 2004; REES;

WILLIAMS; GLADWIN, 2010; ALMEIDA et al., 2012) (Figura 3).

Estudos mostram que redução na gravidade das manifestações clínicas de pacientes tratados com HU ocorre concomitante à diminuição da contagem e da expressão de moléculas de adesão em leucócitos (KAUL; HEBBEL, 2000; FINNEGAN et al., 2007; LAURENCE et al., 2011). Os efeitos do uso de HU são dose – dependentes e, além do aumento nos níveis de Hb F, que pode chegar a cerca de 60% nos pacientes submetidos ao tratamento, também observaram aumento no volume do eritrócito e quantidade de Hb em seu interior, redução na contagem de reticulócitos (KINNEY et al., 1999; COVAS et al., 2004; CHO et al., 2010), maior hidratação dos eritrócitos e diminuição da adesividade celular ao endotélio (WILES; HOWARD, 2009; KOVACIC, 2011) e diminuição da peroxidação lipídica (BELINI JUNIOR et al., 2011).

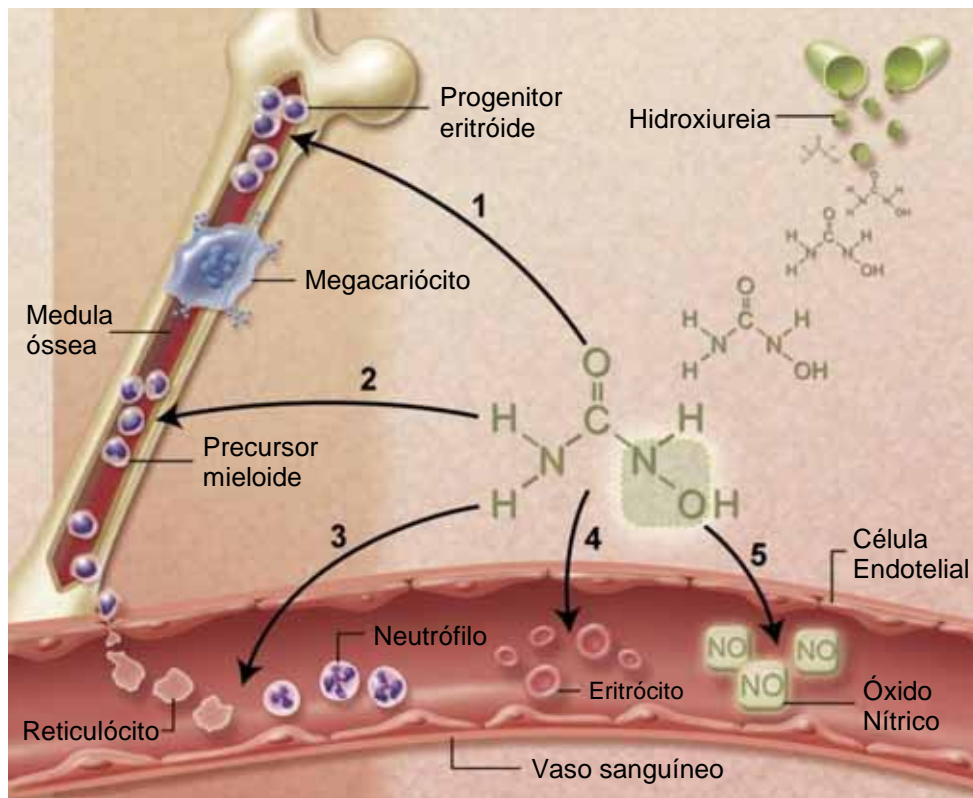


Figura 3. Múltiplos efeitos benéficos da hidroxiureia na doença falciforme. (1) Indução da Hb fetal por meio da ativação da guanilato ciclase alterando a cinética dos precursores eritróides; (2) baixos valores de neutrófilos e reticulócitos por inibição da ribonucleotídeo redutase e citotoxicidade da medula; (3) diminuição da adesividade e melhora da reologia dos neutrófilos e reticulócitos circulantes; (4) redução da hemólise pela melhor hidratação dos eritrócitos, macrocitose, e redução da falcização; (5) o óxido nítrico (NO) é liberado e como potente vasodilatador local, melhora a resposta vascular (modificado de (WARE, 2010)

Além de estudos envolvendo adolescentes e adultos, a HU tem demonstrado resultados positivos em crianças de 9 a 18 meses de idade. O ensaio clínico

multicêntrico randomizado e controlado por placebo, chamado BABY HUG, avaliou 193 crianças de 9 a 18 meses e verificou que o grupo placebo teve o dobro de episódios de dor, cinco vezes o número de episódios de dactilite, e três vezes mais episódios de STA, e eram mais propensos a necessitar de transfusão em comparação com o grupo com HU (WANG et al., 2011). Além disso, os autores sugerem que os dados deste estudo devem tranquilizar hematologistas, pois o tratamento com a HU é seguro e eficaz quando iniciado precocemente (THORNBURG et al., 2012).

O tratamento com a HU tem variações de eficácia tanto no aumento da Hb F quanto na melhora clínica e em outras evidências laboratoriais. Muitos estudos têm como objetivo investigar as variações genéticas que possam explicar o porquê de alguns pacientes tolerarem e respondem ao uso de HU, enquanto, outros ainda precisam ser tratados com estratégias baseadas em transfusão de sangue. (CHARACHE et al., 1995; STEINBERG et al., 1997; ZIMMERMAN et al., 2004; BAKANAY et al., 2005; MA et al., 2007)

Devido à importância das complicações vasculares na fisiopatologia da AF, os polimorfismos genéticos associados com os processos inflamatórios e oxidativo são potenciais modificadores na manifestação fenotípica do paciente e podem apresentar resposta diferenciada ao uso de HU.

A capacidade de prever eventos fenotípicos na AF permite direcionar procedimentos e antever um prognóstico como linha diretriz de decisão terapêutica. Fatores de risco individuais para complicações clínicas são conhecidos, mas insuficientes para uma precisão diagnóstica sem se conhecer o perfil genético e a influência ambiental sobre esses genes. Estudos genéticos de associação que consideram a ligação de polimorfismos gênicos com subfenótipos conhecidos, podem eventualmente fornecer caminhos para prevenção de eventos clínicos complicadores e permitem um tratamento mais individualizado aos pacientes, atendendo às suas características.

Diante da resposta diferenciada ao tratamento com a HU na DF, da influência do processo inflamatório, da biologia do NO e do estresse oxidativo na manifestação clínica do paciente, a avaliação de genes e enzimas que atuam nestes processos é importante para conhecer a resposta individual dos pacientes e relacionar os diferentes aspectos, genéticos e ambientais, em uma vertente da farmacogenômica.

Objetivos

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Em portadores da doença falciforme, avaliar a resposta ao tratamento com a hidroxiureia considerando a influência de polimorfismos genéticos envolvidos nos processos inflamatórios e oxidativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar e separar os portadores da doença falciforme de acordo com a gravidade clínica da doença (moderada, intermediária ou grave) analisada por meio da “calculadora de gravidade da doença falciforme”;

- Rastrear os polimorfismos envolvidos nos processos inflamatórios, na síntese do óxido nítrico e no estresse oxidativo: -509C/T no gene *TGFB1*, -308G/A no gene *TNFA*, 313A/G no gene *GSTP1*, -786T/C no gene *NOS3* e os polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1*; e investigar a associação com as complicações clínicas da doença falciforme

- Analisar a atividade das enzimas catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e glutathione S-transferase e os marcadores de peroxidação lipídica de cada paciente;

- Avaliar a resposta ao uso de hidroxiureia perante os marcadores bioquímicos e laboratoriais, fenótipo da doença falciforme e os polimorfismos genéticos.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O estudo envolveu 520 pessoas com a doença falciforme provenientes do Instituto Estadual de Hematologia “Arthur de Siqueira Cavalcanti” – Rio de Janeiro/RJ – HEMORIO, sendo 236 (45,4%) do gênero masculino e 284 (54,6%) do gênero feminino, com a média de idade de $25,2 \pm 13,9$ anos. Todos os pacientes estavam em acompanhamento clínico seguindo os Protocolos e Diretrizes Terapêuticas para pessoas com DF estabelecido pelo Ministério da Saúde (BRAZIL, 2010; BRAZIL, 2011).

A seleção dos pacientes foi randomizada, porém, alguns critérios de exclusão foram: pacientes menores de cinco anos de idade, fumantes, pacientes que faziam o uso regular de bebidas alcoólicas e gestantes.

Para a validação da calculadora de gravidade da DF foram utilizados 500 pacientes (440 Hb SS e 60 Hb SC) seguindo os mesmos critérios de exclusão.

Para as análises dos marcadores de estresse oxidativo, além dos critérios de exclusão descritos acima, foram atribuídos critérios adicionais: pacientes que fizeram o uso de antibióticos, analgésicos e vitaminas, ingestão de álcool nas últimas 24 horas antecedentes a data de coleta e aqueles que tiveram AVE ou crises de dor dois meses antecedentes a data de coleta. Diante disso, o número amostral envolvendo esses marcadores foi reduzido para 490 pacientes.

Um grupo com 100 doadores de sangue, sem hemoglobinopatias, com os mesmos critérios de exclusão para as pessoas com DF, foi criado para obtermos os valores de referência para os marcadores de estresse oxidativo avaliados nesse estudo. Esse grupo foi incluído devido a escassez de grupos de controle fidedignos para tais marcadores, com as mesmas técnicas e condições laboratoriais que utilizamos para o grupo de pacientes.

Após consentimento livre e informado, as amostras de sangue foram colhidas por punção venosa, pela equipe do HEMORIO, em dois tubos contendo EDTA a 5%. Um tubo foi coletado e sob-refrigeração a -4°C trouxemos para o Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, na UNESP

de São José do Rio Preto-SP, para confirmar o diagnóstico da DF e para o rastreamento dos polimorfismos. As amostras do outro tubo passaram por três tipos de processamento (ver APÊNDICE A – Padronização dos métodos de coleta e preparo das amostras para os testes bioquímicos) e sob-refrigeração a -80°C trouxemos para o Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática para as análises dos marcadores de estresse oxidativo.

Dados hematológicos e bioquímicos e informações sobre o uso de HU, eventos clínicos e transfusões sanguíneas, foram obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e também ao Sistema de Administração do Serviço de Hematologia (SASH).

Os 212 pacientes, considerados como em uso de hidroxiureia, foram aqueles que estavam em uso de droga acima de 90 dias com média de 41,1 meses e a dose média por paciente era de 26 mg/kg/dia.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) sob o protocolo número 006/11 e CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 0030.0.229.000-10, obedecendo aos princípios estabelecidos na Resolução 196/96 e 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

3.3 ESTATÍSTICA

As amostras foram avaliadas quanto à normalidade e a homoscedasticidade pelo *teste Shapiro-Wilk* e *teste de Levene*, respectivamente. Para os dados que atenderam as premissas para a utilização de testes paramétricos foram empregados: *Teste t independente* e a Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo teste de comparações múltiplas de *Newman-Kills*; para os dados não paramétricos foram utilizados o teste *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* complementado pelo *teste de Dunn*.

Para as análises de correlações foi utilizado o *teste de correlação de Pearson*; para dados paramétricos, e *correlação de Spearman*, para dados não paramétricos,

com a seguinte classificação: correlação perfeita (=1), forte (>0,75), média (>0,5), fraca (<0,5) e inexistente (=0).

As análises de frequência foram realizadas pelo teste do Qui-quadrado (para n amostras independentes dispostas em tabelas de contingências $l \times c$) ou exato de Fisher (para duas amostras independentes dispostas em tabelas de contingências 2×2). O teste de proporção de Goodman foi utilizado quando os dados não obedeceram as premissas do Qui-quadrado.

A análise da associação entre genótipos e predisposição aos eventos clínicos da DF foi realizado pelo cálculo de *Odds Ratio* (OR) obedecendo o intervalo de confiança (IC), além disso, os valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a maior chance de desenvolver a característica em questão e valores abaixo de 1, menor chance.

A ANOVA fatorial foi utilizada para as análises que incluíram mais de uma variável independente calculando os principais efeitos para cada variável dependente, bem como, a interação entre elas.

O software utilizado nas análises estatísticas foi o *Statistica*, versão 10.0 e o alfa fixado foi de 5%.

3.4 MÉTODOS

Os protocolos completos de cada metodologia utilizada para o diagnóstico da DF e para o rastreamento dos polimorfismos encontram-se no APÊNDICE B – Protocolos de diagnóstico da doença falciforme, identificação dos polimorfismos e análises bioquímicas. Entretanto, de forma resumida, as técnicas usadas estão abaixo descritas.

3.4.1 Diagnóstico da Doença falciforme

O fluxo de metodologias para o diagnóstico da DF seguiu os seguintes passos: Análise da morfologia eritrocitária → Resistência globular osmótica em NaCl a 0,36% → Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino → Eletroforese de hemoglobina em pH ácido → Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) para avaliação dos valores de hemoglobina A₂ e hemoglobina F → Extração de DNA → Reação em cadeia da polimerase (PCR) seguido por análise de polimorfismo do

comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) ou alelo específica (AE) para a identificação das mutações e definição dos genótipos da DF.

Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados ao microscópio de luz, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36 %

A técnica foi utilizada como um dos testes de triagem para detectar a talassemia do tipo beta, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise, nesta solução. No entanto, a resistência globular não é específica para talassemia beta, pois resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e em outras hemoglobinopatias, como nos heterozigotos para Hb C e esferocitose (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)

Eletroforese em pH alcalino

As amostras de sangue, previamente hemolisadas por saponina a 1% (NAOUM, 1990), foram submetidas à eletroforese de Hb em tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) em pH 8,6. A técnica foi utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais (MARENCO-ROWE, 1965)

Eletroforese em pH ácido

As amostras de sangue, foram previamente hemolisadas por saponina a 1% (NAOUM, 1990) e submetidas à eletroforese de Hb em tampão fosfato em pH 6,2. Essa técnica foi específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a Hb A, como por exemplo: Hb S e Hb D; Hb C e Hb E que em eletroforese alcalina, migram em posições semelhantes, dificultando a correta identificação (VELLA, 1968).

Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. O equipamento consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância versus tempo e os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb. Cada Hb tem um tempo de retenção e um pico característico favorecendo identificação e quantificação precisa das Hb normais e anormais (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 2006)

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico, segundo o método de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol. O DNA obtido neste processo foi utilizado para a identificação dos genótipos da DF e também para o rastreamento dos polimorfismos envolvidos no estudo (SAMBROOK; FRITCSH; MANATIS, 1989)

Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP

A detecção da mutação HBB:c.20A>T foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. O fragmento obtido da PCR foi de 382 pb. A mutação no códon 6 (GAG → GIG) elimina um sítio de restrição da enzima *DdeI*, portanto, quando o fragmento amplificado foi submetido a digestão enzimática, o alelo normal gerou quatro fragmentos: 201 pb, 88 pb, 87 pb e 6 pb, e o alelo mutante gerou três fragmentos: 288 pb, 88 pb e 6pb, este último não é visualizado (SAIKI et al., 1985; BELINI; CANCADO; DOMINGOS, 2010). Os fragmentos gerados foram visualizados

em gel de agarose a 2,0% sob luz UV e os padrões encontrados estão demonstrados na Figura 4.

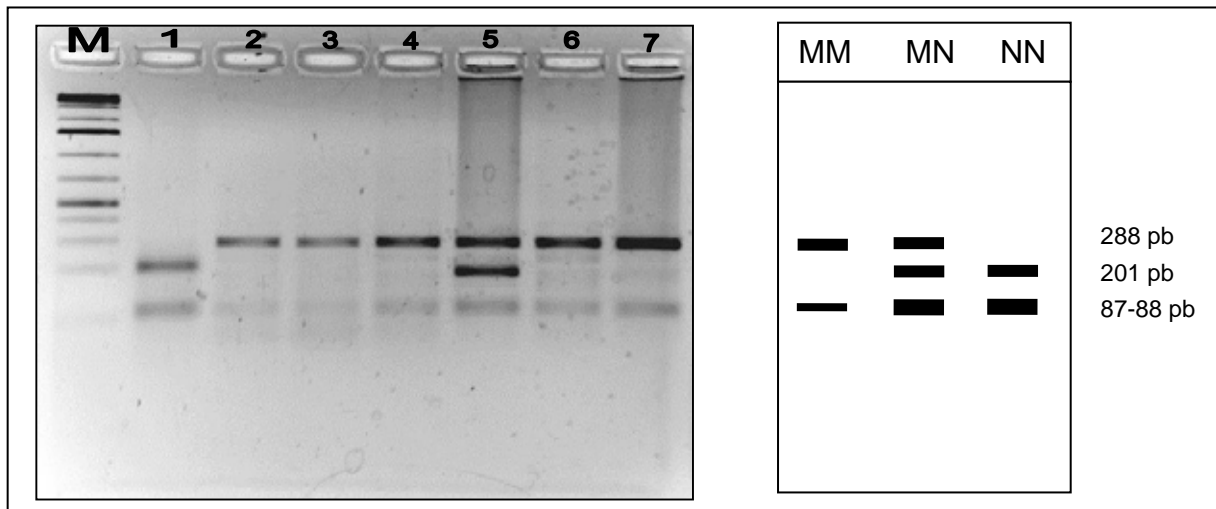


Figura 4. Interpretação da análise molecular para a Hb S por PCR-RFLP. À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas esperado após a digestão da PCR pela enzima *DdeI*. Amostras 2, 3, 4, 6 e 7 – homozigotos para a mutação Hb S. Amostra 1- ausência da mutação Hb S. Amostra 5: heterozigoto para a Hb S. M = marcador molecular de 100 pb. MM: alelos mutantes. MN: alelo mutante e alelo normal. NN: alelos normais

Análise molecular para Hb D – Los Angeles por PCR-RFLP

A detecção da mutação HBB:c.364G>C foi realizada por PCR seguida de análise de restrição. O fragmento obtido da PCR foi de 564 pb. A mutação no códon 121 (GAA > CAA) elimina um sítio de restrição para a enzima *EcoR I*, portanto, quando o fragmento amplificado foi submetido a digestão enzimática, o alelo normal gerou dois fragmentos: 296 e 268 pb, e o alelo mutante gerou um fragmento: 564 pb. Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose a 2,0% sob luz UV e os padrões encontrados estão demonstrados na Figura 5 (BONINI-DOMINGOS, 2006).

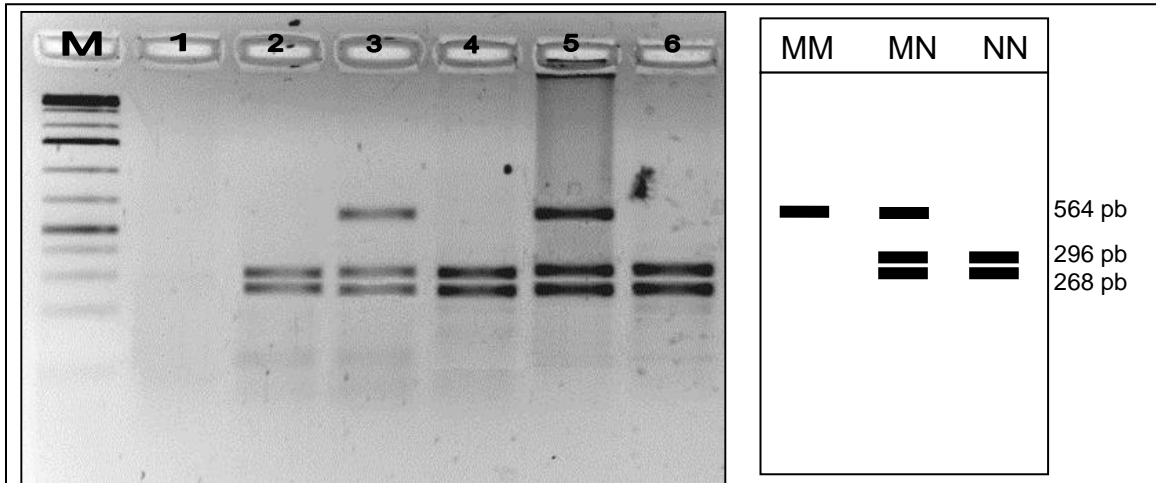


Figura 5. Interpretação da análise molecular para a Hb D por PCR-RFLP. À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas após a digestão da PCR pela enzima *EcoR I*. Amostras 2, 4 e 6 – ausência da mutação para a Hb D. Amostras 3 e 5 - heterozigotos para a Hb D. Amostra 1= branco. M = marcador molecular de 100 pb. MM: alelos mutantes. MN: alelo mutante e alelo normal. NN: alelos normais

Análise molecular para Hb S e Hb C por PCR-AE

As amostras que apresentaram perfil eletroforético e cromatográfico compatível com Hb SC foram submetidas à amplificação gênica alelo-específico (FISCHEL-GHODSIAN; HIRSCH; BOHLMAN, 1990). Nesta técnica foram utilizados 3 tubos para cada paciente. Em todos os tubos foram utilizados os iniciadores controles da reação gerando o fragmento de 660 pb, e especificamente, nos tubos 1, 2 e 3 foram utilizados os primers para os alelos Hb A, Hb S e Hb C, respectivamente, que geraram o fragmento de 216 pb. O resultado das amplificações e os padrões de banda estão representados na Figura 6.

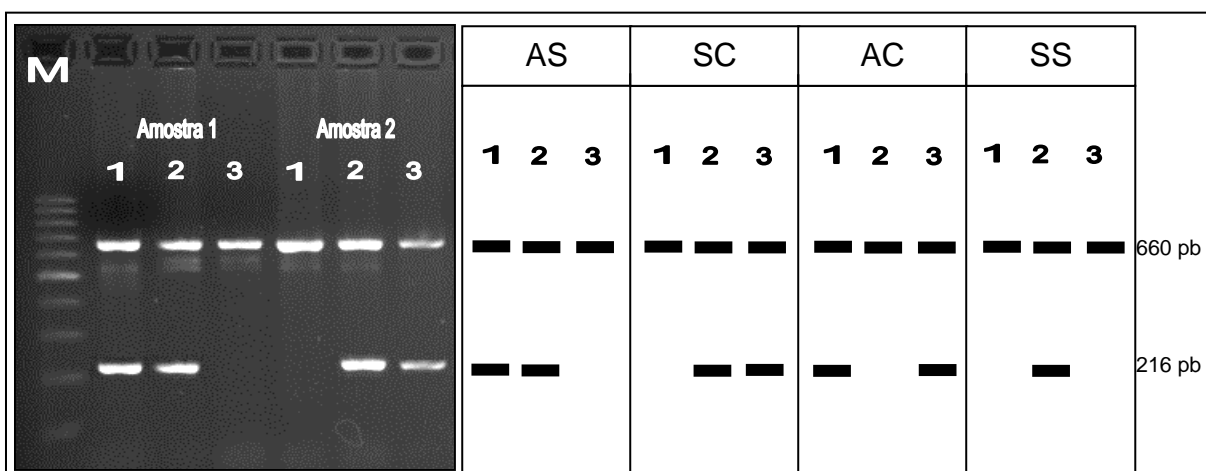


Figura 6. Interpretação da análise molecular para Hb SC por PCR-AE. À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas que possibilita a detecção dos genótipos pela técnica. Amostra 1: heterozigoto para Hb S e Amostra 2: duplo heterozigoto para Hb S e Hb C. Número 1 equivale ao tubo com alelo para Hb A, Número 2 equivale ao tubo com alelo para Hb S e Número 3 equivale ao tubo com alelo para Hb C. M = marcador molecular de 100 pb.

Análises moleculares para identificação das mutações nos alelos beta talassêmicos

As amostras que apresentaram perfil eletroforético e cromatográfico compatível com Hb S/Beta talassemia foram investigadas para as mutações mais frequentes na população brasileira.

Mutação no códon 39 por PCR-AE

A detecção da mutação HBB:c.118C>T foi realizado por PCR-AE. Nesta técnica foram utilizados 2 tubos para cada paciente. Em todos os tubos foram utilizados os iniciadores controles da reação gerando um fragmento de 659 pb, e especificamente, no tubo 1 foram utilizados iniciadores para o alelo sem a mutação e no tubo 2 iniciadores para a mutação CD39 gerando um fragmento de 439 pb. O resultado das amplificações e os padrões de banda estão representados na Figura 7.

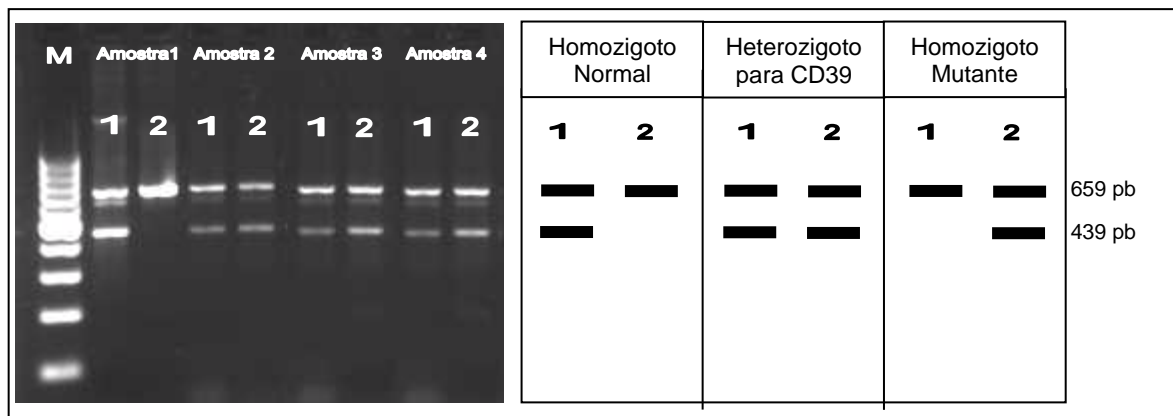


Figura 7. Interpretação da análise molecular para a mutação CD39 por PCR-AE. À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas que possibilita a detecção dos genótipos para a mutação CD39. Amostra 1: homozigoto normal para a mutação CD39, Amostra 2, 3 e 4: heterozigotos para a mutação CD39. Número 1 equivale ao tubo com alelo sem a mutação CD39 e Número 2 equivale ao tubo com alelo para a mutação CD39. M = marcador molecular de 100 pb.

Mutação IVS-I-110 por PCR-AE

A detecção da mutação HBB:c.93-21G>A foi realizado por PCR-AE. Nesta técnica foram utilizados 2 tubos para cada paciente. Em todos os tubos foram utilizados os iniciadores controles da reação gerando um fragmento de 659 pb, e especificamente, no tubo 1 foram utilizados iniciadores para o alelo sem a mutação e no tubo 2 iniciadores para a mutação IVS-I-110 gerando um fragmento de 337 pb. O

resultado das amplificações e os padrões de banda estão representados na Figura 8.

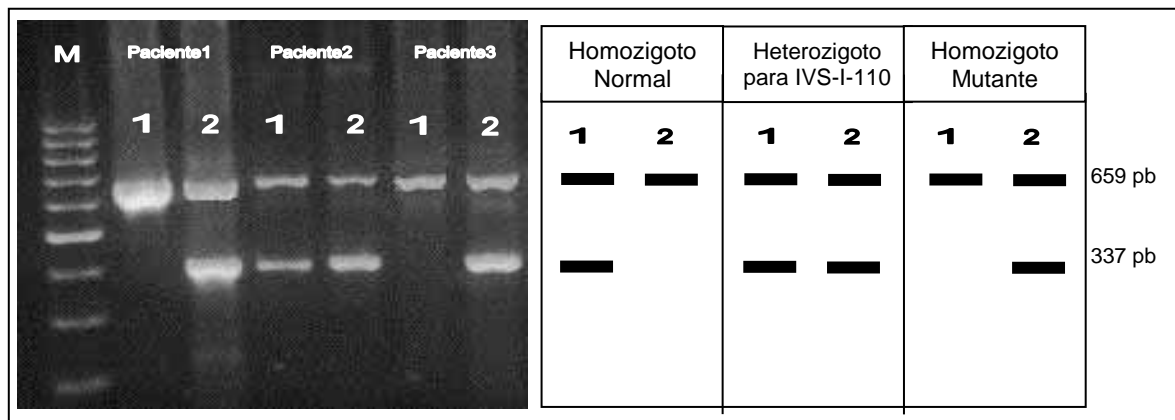


Figura 8. Interpretação da análise molecular para a mutação IVS-I-110 por PCR-AE. À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas que possibilita a detecção dos genótipos para a mutação IVS-I-110. Pacientes 1 e 3: homozigotos para a mutação IVS-I-110, Paciente 2: heterozigoto para a mutação IVS-I-110. Número 1 equivale ao tubo com alelo sem a mutação IVS-I-110 e Número 2 equivale ao tubo com alelo para a mutação IVS-I-110. M = marcador molecular de 100 pb.

Mutação IVS-I-6 por PCR-AE

A detecção da mutação HBB:c.92+6T>C IVS-I-6 foi realizado por PCR-AE. Nesta técnica foram utilizados 2 tubos para cada paciente. Em todos os tubos foram utilizados os iniciadores controles da reação gerando um fragmento de 659 pb, e especificamente, no tubo 1 foram utilizados iniciadores para o alelo sem a mutação e no tubo 2 iniciadores para a mutação IVS-I-6 gerando um fragmento de 337 pb. O resultado das amplificações e os padrões de banda estão representados na Figura 9.

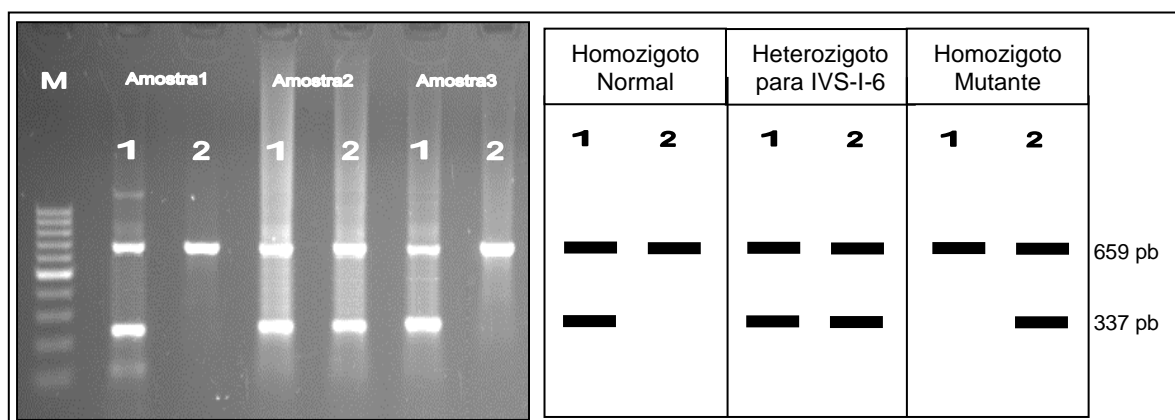


Figura 9. Interpretação da análise molecular para a mutação IVS-I-6 por PCR-AE. À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas que possibilita a detecção dos genótipos para a mutação IVS-I-6. Amostras 1 e 3: ausência da mutação IVS-I-6, Amostra 2: heterozigoto para a mutação IVS-I-6. Número 1 equivale ao tubo com alelo sem a mutação IVS-I-6 e Número 2 equivale ao tubo com alelo para a mutação IVS-I-6. M = marcador molecular de 100 pb.

Mutação IVS-I-1 por PCR-AE

A detecção da mutação HBB:c.92+1G>A IVS-I-1 foi realizada por PCR-AE. Nesta técnica foram utilizados 2 tubos para cada paciente. Em todos os tubos foram utilizados os iniciadores controles da reação gerando um fragmento de 659 pb, e especificamente, no tubo 1 foram utilizados iniciadores para o alelo sem a mutação e no tubo 2 iniciadores para a mutação IVS-I-1 gerando um fragmento de 268 pb. O resultado das amplificações e os padrões de banda estão representados na Figura 10.

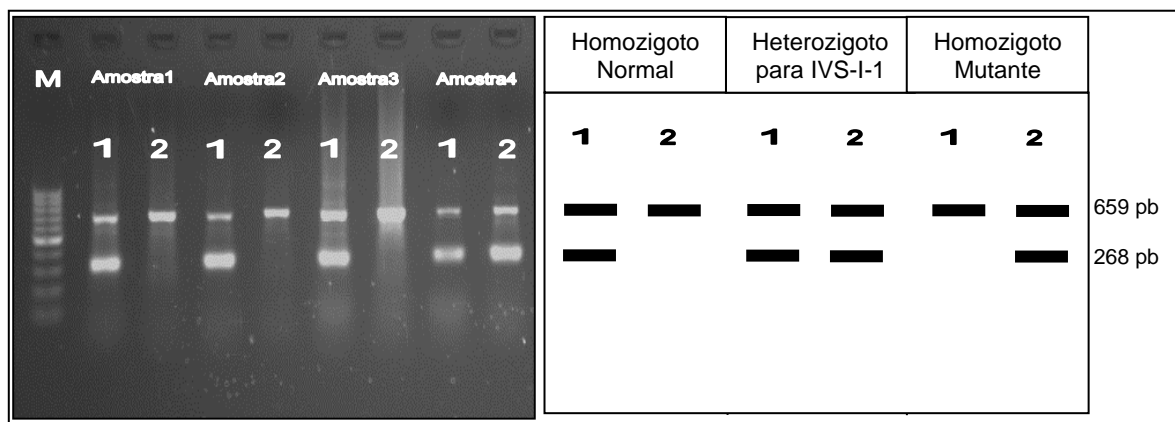


Figura 10. Interpretação da análise molecular para a mutação IVS-I-1 por PCR-AE. À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas que possibilita a detecção dos genótipos para a mutação IVS-I-1. Amostras 1, 2 e 3: ausência da mutação IVS-I-1, Amostra 4: heterozigoto para a mutação IVS-I-1. Número 1 equivale ao tubo com alelo sem a mutação IVS-I-6 e Número 2 equivale ao tubo com alelo para a mutação IVS-I-1. M = marcador molecular de 100 pb.

3.4.2 Detecção dos Polimorfismos

Polimorfismo -509C/T no gene *TGFB1*

A detecção da mutação -509C/T (rs1800469) foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. O fragmento obtido da PCR foi de 406 pb. A mutação na região promotora -509C/T elimina o sítio de restrição da Enzima *Bsu36I*, portanto, quando o fragmento amplificado foi submetido a digestão enzimática, o alelo normal gerou dois fragmentos: 223pb e 183pb, e o alelo mutante apenas um fragmento: 406 pb. (SILVERMAN et al., 2004). Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose a 2,0% sob luz UV e os padrões encontrados estão demonstrados na Figura 11.

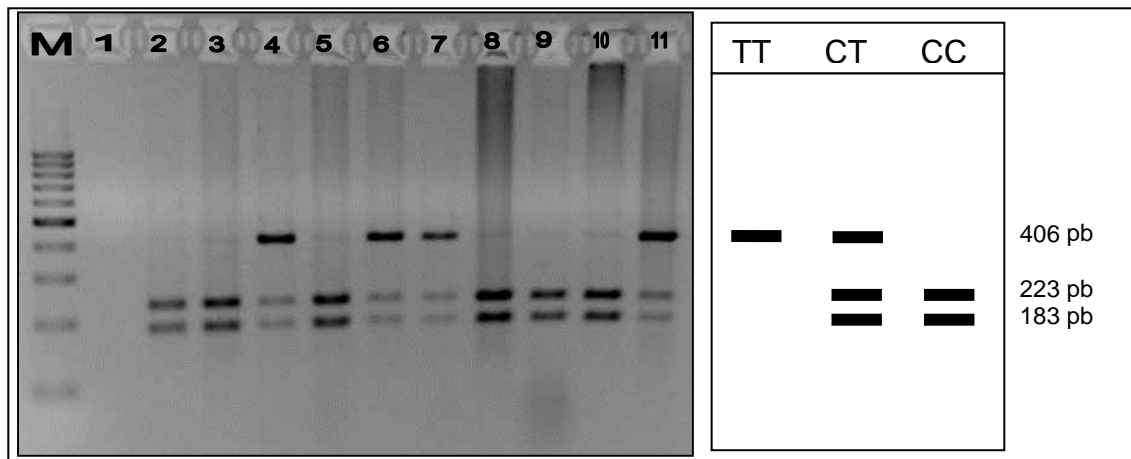


Figura 11. Interpretação da análise molecular para a mutação -509C/T por PCR-RFLP À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas após a digestão da PCR pela enzima *Bsu36I*. Amostras 2, 3, 5, 8, 9 e 10 – ausência da mutação -509C/T. Amostras 4, 6, 7 e 11 – heterozigotos para a mutação -509C/T. Amostra 1 – branco. M= marcador molecular de 100 pb.

Polimorfismo -308G/A no gene *TNFA*

A detecção da mutação -308G/A (rs1800629) foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. O fragmento obtido da PCR foi de 117 pb. A mutação na região promotora -308G/A elimina o sítio de restrição da Enzima *NcoI*, portanto, quando o fragmento amplificado foi submetido a digestão enzimática, o alelo normal gerou dois fragmentos: 97 pb e 20 pb, e o alelo mutante apenas um fragmento: 117 pb. (WILSON et al., 1992). Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose a 4,0% sob luz UV e os padrões encontrados estão demonstrados na Figura 12.

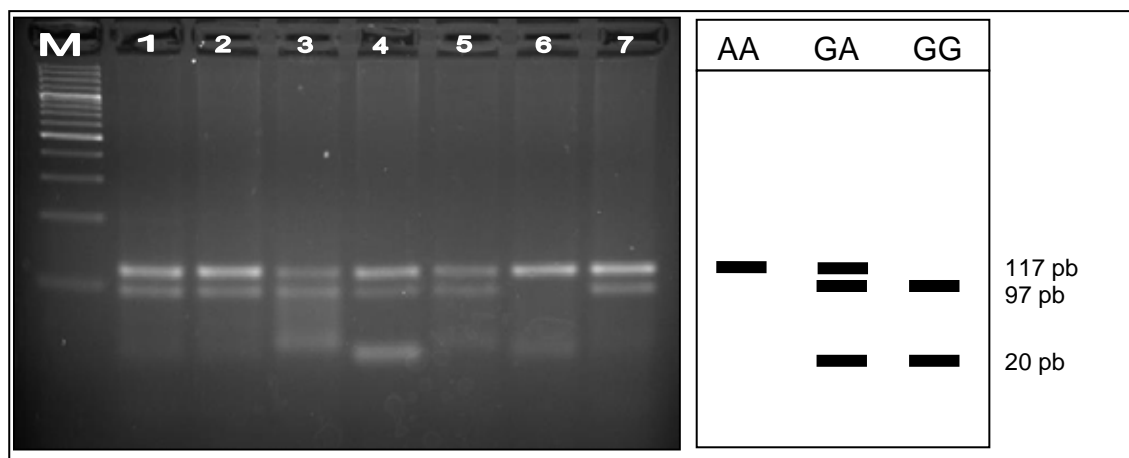


Figura 12. Interpretação da análise molecular para a mutação -308G/A por PCR-RFLP À esquerda, a foto de um gel de agarose a 4,0% e a direita o padrão de bandas após a digestão da PCR pela enzima *NcoI*. Amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 7 – heterozigotos para a mutação -308G/A. Amostra 6 – homozigoto mutante para a mutação -308G/A. O fragmentos de 20 pb não é possível visualizar na concentração desse gel. M= marcador molecular de 100 pb.

Polimorfismo -786T/C no gene *NOS3*

A detecção da mutação -786T/C (rs2070744) foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. O fragmento obtido da PCR foi de 180 pb. A mutação na região promotora -786T/C elimina um sítio de restrição da Enzima *MspI*, portanto, quando o fragmento amplificado foi submetido a digestão enzimática, o alelo normal gerou dois fragmentos: 138 pb e 42 pb, e o alelo mutante três fragmentos: 92 pb, 46 pb e 42 pb. Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose a 2,5% sob luz UV e os padrões encontrados estão demonstrados na Figura 13.

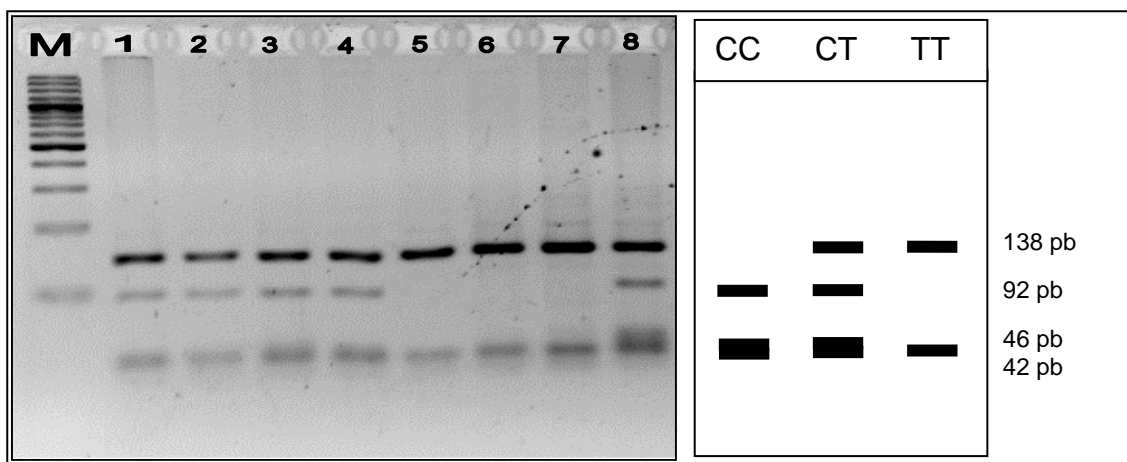


Figura 13. Interpretação da análise molecular para a mutação -786T/C por PCR-RFLP À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,5% e a direita o padrão de bandas após a digestão da PCR pela enzima *MspI*. Amostras 1, 2, 3, 4, e 8 – heterozigotos para a mutação -786T/C. Amostras 5, 6 e 7 – ausência da mutação -786T/C. M= marcador molecular de 100 pb.

Polimorfismo 313A/G no gene da *GSTP1*

A detecção da mutação 313A/G (rs1695) foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. O fragmento obtido da PCR foi de 176 pb. A mutação 313A/G cria o sítio de restrição da enzima *BsmI*, portanto, quando o fragmento amplificado foi submetido a digestão enzimática, o alelo normal gerou um fragmento de 176 pb, e o alelo mutante dois fragmentos: 91 pb e 85 pb (ISHII et al., 1999). Os fragmentos gerados foram visualizados em gel de agarose a 3,5% sob luz UV e os padrões encontrados estão demonstrados na Figura 14.

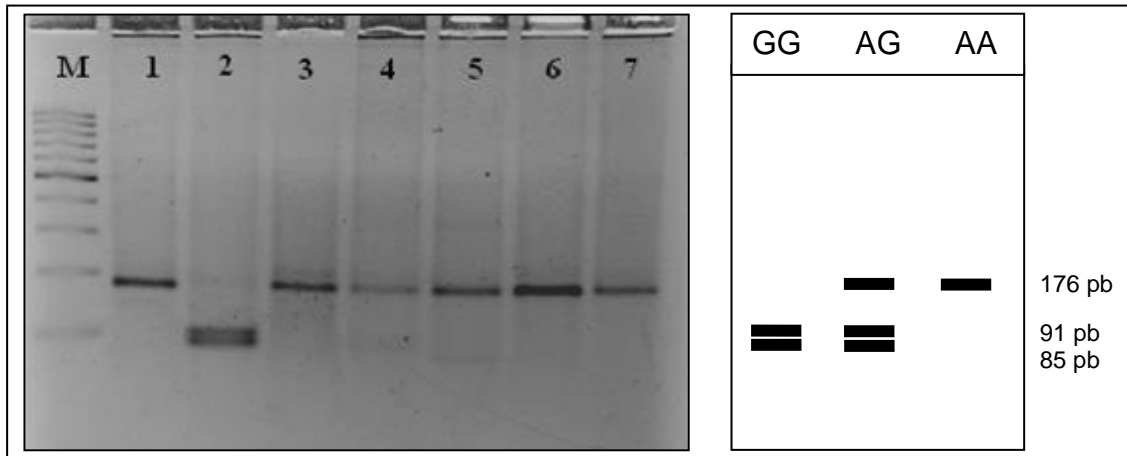


Figura 14. Interpretação da análise molecular para a mutação 313A/G por PCR-RFLP À esquerda, a foto de um gel de agarose a 3,5% e a direita o padrão de bandas após a digestão da PCR pela enzima *BsmI*. Amostras 1, 3, 4, 5, 6 e 7 – ausência da mutação 313A/G. Amostra 2 – homozigoto para a mutação 313A/G. M= marcador molecular de 100 pb.

Polimorfismos no gene da *GSTM1* e *GSTT1*

A identificação das deleções para os genes *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada por PCR Multiplex. Em todos os tubos foram utilizados os iniciadores controles da reação e também os iniciadores específicos (ARAND et al., 1996; PINHEL et al., 2008). O genótipo M/M (presença do alelo para *GSTM1* e ausência do alelo para *GSTT1*) foi identificado pela presença do fragmento controle 310 pb e o específico 230 pb. O genótipo T/T (presença do alelo para *GSTT1* e ausência do alelo para *GSTM1*) foi identificado pela presença do fragmento controle de 310 pb e o específico de 423 pb. O genótipo M/T (presença dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*) foi identificado pela presença do fragmento controle de 310 pb e os dois específicos de 423 pb e 230pb. O genótipo nulo (ausência dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*) foi identificado pela presença do fragmento controle de 310 pb. A foto do gel e o padrão dos fragmentos de DNA estão demonstrados na Figura 15.

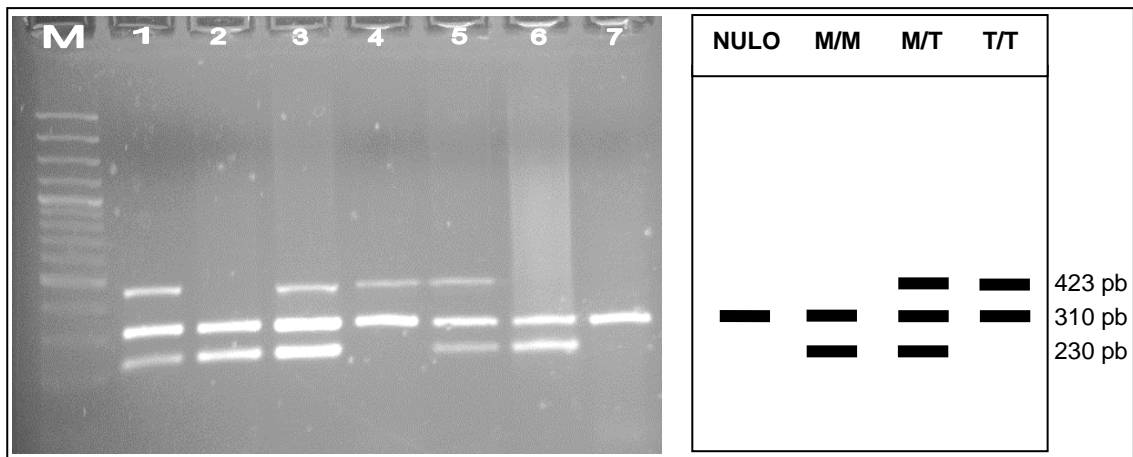


Figura 15. Interpretação da análise molecular para as deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* por PCR-MULTIPLEX À esquerda, a foto de um gel de agarose a 2,0% e a direita o padrão de bandas. Amostras 1, 3 e 5 – genótipo M/T. Amostra 2 e 6 – genótipo M/M. Amostra 4 – genótipo T/T e Amostra 4 – genótipo nulo. M= marcador molecular de 100 pb.

3.4.3 Avaliação da capacidade antioxidante e de marcador de dano oxidativo

Determinação da atividade enzimática da Catalase

Das amostras de sangue foi retirada a papa de eritrócitos e a mesma foi diluída 50 vezes em água destilada. A atividade da catalase foi quantificada pela velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima sendo observada pelo decréscimo de absorbância em 240 nm. A atividade da catalase foi calculada e expressa em U/mL de hemolisado (BEUTLER, 1975).

Determinação da atividade enzimática da Glutathiona S-transferase

As amostras de sangue total foram lavadas e a papa de eritrócito foi adicionada a solução hemolisante tornando a amostra diluída a 100 vezes. A atividade da GST foi avaliada pela reação envolvendo a amostra preparada, o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e GSH. O aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm e a atividade da GST total foi calculada e expressa em U/mL de hemolisado (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976).

Determinação da atividade enzimática da Glutathiona Peroxidase (GPx)

As amostras de sangue total foram lavadas e a papa de eritrócito foi adicionada a solução hemolisante tornando a amostra diluída a 100 vezes. A atividade da GPx foi avaliada pelo decréscimo da absorbância a 340 nm promovido pela detoxificação do hidroperóxido de terc-butilo (tBOOH) e consequentemente oxidação da glutathiona reduzida (GSH). Além disso, foi utilizado no meio de reação NADPH e glutathiona redutase (GR) para aumentar a disponibilidade de GSH, pois é a GR que converte a glutathiona oxidada (GSSG) em GSH. A atividade da GPx foi calculada e expressa em U/mL de hemolisado (SIES et al., 1979).

Determinação da atividade enzimática da Glutathiona Redutase (GR)

As amostras de sangue total foram lavadas e a papa de eritrócitos foi adicionada a solução hemolisante tornando a amostra diluída a 100 vezes. A atividade da GR foi avaliada pelo aumento da absorbância a 340 nm em decorrência da conversão da GSSG a GSH. Portanto, a amostra de sangue preparada foi adicionada em meio de reação contendo GSSG e NADPH e a atividade foi expressa em U/mL de hemolisado (BEUTLER, 1969).

Dosagem de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica das amostras. O método é baseado na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535 nm (MIHARA; UCHIYAMA, 1978; SHIMAUTI et al., 2010). Valores até 440 ng/mL são considerados normais.

3.4.4 Calculadora da gravidade da doença falciforme

Nós usamos a ferramenta "Calculadora da Gravidade da Doença Falciforme", disponível em <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>, para o cálculo dos escores de gravidade e classificação dos pacientes em categorias por

fenótipo (leve, intermediária, grave). Esta ferramenta foi desenvolvida por meio de modelagem de rede Bayesiana usando 25 variáveis clínicas e laboratoriais para estimar a gravidade da DF em um estudo envolvendo 3.380 pacientes acompanhados no Estudo Cooperativo da Doença Falciforme (CSSCD). O modelo de rede calcula o risco de morte dentro de cinco anos e considera este risco como um escore de gravidade da doença, que varia de 0 (menos grave) a 1 (mais grave). O valor preditivo (ou seja, a precisão da previsão de morte com base em um perfil clínico e laboratorial) do modelo foi validado em dois conjuntos independentes de pacientes e mostrou alta especificidade e sensibilidade (SEBASTIANI et al., 2007).

Os escores de gravidade calculados para este estudo incluiu as variáveis exigidas pela calculadora: idade, síndrome torácica aguda (STA), níveis de bilirrubina total, transfusão de sangue, níveis de lactato desidrogenase (LDH), volume corpuscular médio (VCM), crises de dor, priapismo, reticulócitos absoluto, gênero, acidente vascular encefálico (AVE), leucócitos totais, genótipo da doença falciforme e necrose avascular óssea. Dois parâmetros exigidos pela calculadora, sepse e pressão arterial sistólica, não foram utilizados nesse estudo porque esses dados não estavam disponíveis nos prontuários médicos.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 GENÓTIPOS DA DOENÇA FALCIFORME E CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO

A caracterização do genótipo da DF envolveu a análise de 520 pessoas com DF. Foram avaliados 1040 alelos não aparentados e encontramos 433 pacientes (83,3%) homocigotos para a Hb S, 60 (11,5%) com a dupla heterocigose Hb S e Hb C, 17 (3,3%) com a interação Hb S/Beta talassemia e 10 (1,9%) com a dupla heterocigose Hb S e Hb D.

As amostras que apresentaram a interação Hb S/Beta talassemia foram submetidas a análises moleculares para a caracterização da mutação que corresponde ao alelo beta talassêmico. Avaliamos as quatro mutações para beta talassemia mais frequente no Brasil: IVS-I-6, IVS-I-110, IVS-I-1 e CD39. Após a avaliação dos 17 Hb S/Beta talassêmicos, encontramos quatro (23,5%) pacientes Hb S/Beta com a mutação CD39, dois (11,8%) com a mutação IVS-I-6, dois (11,8%) com a mutação IVS-I-110 e nove alelos não apresentaram nenhuma das quatro mutações e deverão ser sequenciadas para a identificação do alelo beta talassêmico.

Após a identificação dos genótipos da DF, separamos os pacientes em três grupos de idade (5 a 17 anos, 18 a 40 anos e maiores que 40 anos) para melhor caracterização demográfica e clínica dos pacientes. Os limites de idade para cada grupo foram estabelecidos de acordo com os resultados que geraram a “calculadora de gravidade para a doença falciforme” e que serão discutidos no próximo item dos resultados.

Na Tabela 1 é possível observar que, independente da idade, do total de 520 pacientes, 212 (41,0%) pessoas faziam o uso de HU, 225 (43,3%) pacientes estavam em regime transfusional sanguíneo, 84 (16,2%) tiveram AVE, 293 (56,3%) tiveram STA, 103 (19,8%) apresentavam úlceras de perna, 45 (8,7%) tinham necrose avascular óssea, 56 (11,0%) pacientes com complicações cardíacas e 118 (21,0%) com complicações renais. De 356 pacientes que foram avaliados pelo

oftalmologista, 49 (14,0%) tiveram retinopatia proliferativa e do total de 236 homens, 46 (19,5%) tiveram episódios de priapismo.

Em relação às crises de dor, levantamos a quantidade de episódios de dor por paciente durante o ano que antecedeu a data de coleta. Consideramos as crises de dor naqueles pacientes que recorreram ao Hemorio e precisaram de cuidados médicos. Destacamos que 333 (64,0%) pacientes tiveram de 0 a 2 crises por ano, 135 (26,0%) tiveram de 3 a 5 crises de dor e 52 (10,0%) tiveram ≥ 6 crises por ano.

O número de internações hospitalares também foi categorizado e, independente da idade, 467 (89,8%) foram internados de 0 a 2 vezes por ano, também, durante o ano que antecedeu a data de coleta. Além disso, 44 (8,5%) pacientes ficaram internados de 3 a 5 vezes e 9 (1,7%) ficaram internados seis ou mais vezes durante um ano.

Quando comparados entre os grupos de idade, a quantidade de pacientes do gênero masculino foi menos frequente nos pacientes acima de 40 anos de idade do que os grupos de 5 a 17 anos e de 18 a 40 anos. O aumento da frequência de pacientes com retinopatia, úlceras de pernas, osteonecrose, complicações cardíacas e complicações renais acompanhou o aumento da idade, sendo que, os pacientes com idade >40 anos apresentaram maior frequência desses eventos quando comparados com os outros dois grupos de idade.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos das pessoas com DF separados de acordo com os grupos de idade

Características	Grupos de Idade			Valor de p
	5 – 17 anos (n=197)	18 - 40 anos (n=231)	> 40 anos (n=92)	
Idade [média ± DP]	12,4 ± 3,3 ^a	26,7 ± 6,8 ^b	48,6 ± 6,4 ^c	p<0,001
Gênero Masculino [n (%)]	112 (56,8%) ^a	96 (41,6%) ^a	28 (30,4%) ^b	p=0,02
Gênero Feminino [n (%)]	85 (43,2%)	135 (58,4%)	64 (69,6%)	p=0,05
Genótipos da DF				
Hb SS [n (%)]	163 (82,7%)	184 (79,7%)	71 (77,2%)	p=0,92
Hb SC [n (%)]	23 (11,7%)	25 (10,8%)	15 (16,3%)	p=0,48
Hb SD [n (%)]	05 (2,5%)	06 (2,6%)	01 (1,1%)	-----
Hb S/Beta talassemia [n (%)]	06 (3,1%)	06 (2,6%)	05 (5,4%)	-----
Regime transfusional [n (%)]	86 (43,6%)	104 (45,0%)	35 (38,1%)	p=0,76
Uso de Hidroxiureia [n (%)]	83 (42,1%)	83 (35,9%)	46 (50,0%)	p=0,31
Complicações clínicas da DF				
AVE [n (%)]	39 (19,8%)	34 (14,7%)	11 (12,0%)	p=0,17
Retinopatia [n/total avaliado (%)]	11/144 (7,6%) ^a	18/144 (12,5%) ^a	20/68 (29,4%) ^b	p=0,01
STA [n (%)]	110 (55,8%)	143 (61,9%)	40 (43,5%)	p=0,26
Priapismo [n/total masc. (%)]	14/112 (12,5%)	27/96 (28,1%)	5/28 (17,8%)	p=0,06
Úlceras de perna [n (%)]	5 (2,5%) ^a	54 (23,4%) ^b	44 (47,8%) ^c	p<0,001
Osteonecrose [n (%)]	3 (1,5%) ^a	19 (8,2%) ^b	23 (25,0%) ^c	p<0,001
Complicações cardíacas [n (%)]	5 (2,5%) ^a	26 (11,2%) ^b	25 (27,2%) ^c	p<0,001
Complicações renais [n (%)]	12 (6,1%) ^a	65 (28,1%) ^b	41 (44,6%) ^c	p<0,001
Crises de dor (crises/ano por paciente no último ano)				
0 a 2 episódios [n (%)]	134 (68,0%)	142 (61,5%)	57 (62,0%)	p=0,89
3 a 5 episódios [n (%)]	50 (25,4%)	60 (26,0%)	25 (27,2%)	p=0,88
≥ a 6 episódios [n (%)]	13 (6,6%)	29 (12,6%)	10 (11,0%)	p=0,11
Internações (número de internações/ano por paciente no último ano)				
0 a 2 internações [n (%)]	176 (89,3%)	208 (90,1%)	83 (90,2%)	p=0,80
3 a 5 internações [n (%)]	18 (9,1%)	19 (8,2%)	7 (7,6%)	p=0,92
≥ a 6 internações [n (%)]	3 (1,5%)	4 (1,7%)	2 (2,2%)	-----

Para as complicações cardíacas foram consideradas: cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e insuficiência cardíaca aguda (ICA). Para complicações renais foram considerados: albuminúria, hematúria e proteinúria. AVE: acidente vascular encefálico, STA: síndrome torácica aguda.

Letras diferentes indicam diferença estatística

4.2 CLASSIFICAÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM A CALCULADORA DE GRAVIDADE DA DOENÇA FALCIFORME

Antes da classificação de gravidade da doença, realizamos várias comparações para verificar se a calculadora de gravidade é indicada para o grupo de pacientes brasileiros. Analisamos a relação dos escores de gravidade com os grupos de idade, que a calculadora preconiza, genótipos da DF, HU e as faixas de escores que resultam na classificação de fenótipos,

Inicialmente, avaliamos a influência da HU em 500 pacientes com a DF separados em três grupos de idade (5 a 17 anos, 18 a 40 anos e acima de 40 anos). Compilamos os dados hematológicos, bioquímicos, clínicos e escores de gravidade; cujos resultados das comparações podem ser verificados na Tabela 2.

Em todos os grupos de idade, as diferenças encontradas foram no aumento do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de Hb F nos pacientes que faziam o uso de HU ($p < 0,05$). Além disso, nesse mesmo grupo observamos diminuição da quantidade de leucócitos e dos níveis de bilirrubina total ($p < 0,05$).

Nos grupos de 5 a 17 anos e 18 a 40 anos de idade, os pacientes em uso de HU apresentaram maior ocorrência de STA, maior frequência de pacientes em regime transfusional, maior quantidade de pacientes do gênero masculino com priapismo e maior número de pacientes com seis ou mais crises de dor ($p < 0,05$).

Por esse tipo de análise não encontramos diferença significativa nos valores médios dos escores de gravidade entre os pacientes que faziam ou não o uso de HU ($p > 0,05$). Portanto, para verificar se realmente a HU interferiu nos escores de gravidade, avaliamos os escores de 72 pacientes randomizados (aderentes e respondedores ao uso de HU) antes e após o uso de HU e, pelo teste t pareado verificamos diminuição estatisticamente significativa dos escores de gravidade [escores antes do uso de HU ($0,641 \pm 0,194$) e escores após o uso de HU ($0,601 \pm 0,223$), $p = 0,02$].

Tabela 2. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais em pacientes com DF separados em grupos de idade com e sem o uso de HU.

Características	5 – 17 anos			18 – 40 anos			> 40 anos		
	- HU (n=108)	+ HU (n=82)	Valor p	- HU (n=143)	+ HU (n=79)	Valor p	- HU (n=43)	+ HU (n=45)	Valor p
Genótipos DF (Hb SS/Hb SC)	89 / 19	79 / 03	---	125 / 17	74 / 5	---	34 / 09	39 / 06	---
Gênero (Feminino/Masculino)	48 / 60	34 / 48	---	87 / 56	42 / 37	---	33 / 10	29 / 16	---
Hemoglobina (g/dL)	9,5 ± 6,4	8,6 ± 1,4	0,15	8,8 ± 1,8	9,0 ± 1,7	0,24	8,5 ± 1,9	8,7 ± 1,9	0,7
Hematócrito (%)	25,9 ± 7,8	24,7 ± 4,4	0,38	25,1 ± 5,5	25,7 ± 5,1	0,31	24,5 ± 6,2	24,4 ± 5,8	0,95
VCM (fL)	84,1 ± 9,0	94,0 ± 9,9	<0,001	87,8 ± 8,2	97,4 ± 12,2	<0,001	87,6 ± 9,1	98,1 ± 22,9	<0,001
Leucócitos total (/mm ³)	10,7 ± 3,3	9,9 ± 3,2	0,04	10,8 ± 3,4	9,9 ± 5,0	<0,001	10,9 ± 4,4	8,2 ± 3,4	0,03
Reticulócito relativo (%)	9,3 ± 3,7	8,8 ± 4,6	0,51	8,9 ± 4,1	9,4 ± 4,4	0,38	7,6 ± 4,0	8,1 ± 4,6	0,67
LDH (U/L)	1081,9 ± 567,3	953,0 ± 343,5	0,12	940,3 ± 482,6	873,3 ± 416,5	0,31	927,7 ± 519,1	750,1 ± 79,2	0,12
Bilirubina total (mg/dL)	3,4 ± 2,2	2,7 ± 1,9	0,01	3,7 ± 2,6	2,8 ± 2,2	0,01	3,1 ± 2,2	2,2 ± 1,4	0,03
ALT (U/L)	23,1 ± 15,3	22,6 ± 13,5	0,58	30,4 ± 29,6	33,6 ± 25,8	0,93	25,2 ± 14,3	26,1 ± 16,3	0,98
AST (U/L)	54,1 ± 22,1	52,9 ± 22,1	0,66	54,7 ± 28,4	56,9 ± 46,0	0,47	50,6 ± 21,2	52,9 ± 30,1	0,65
Creatinina (mg/dL)	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,92	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,12	1,2 ± 1,1	1,1 ± 0,5	0,18
Hb F (%)	5,6 ± 4,8	9,9 ± 5,5	<0,001	4,8 ± 4,6	8,8 ± 7,1	<0,001	5,7 ± 4,8	11,7 ± 9,3	<0,001
Regime transfusional [n (%)]	39 (36,1%)	45 (54,9%)	0,009	53 (37,1%)	47 (59,5%)	0,013	14 (32,5%)	21 (47,0%)	0,17
Número de crises de dor por paciente por ano no último ano antes da coleta [n (%)]									
0 – 2	81 (75,0%)	50 (61,0%)	0,07	101 (70,6%)	33 (41,8)	<0,001	25 (58,1%)	29 (64,4%)	0,38
3 – 5	24 (22,2%)	22 (26,8%)	0,62	29 (20,3%)	30 (38,0%)	<0,001	13 (30,2%)	11 (24,4%)	0,63
≥ 6	03 (2,8%)	10 (12,2%)	0,01	13 (9,1%)	16 (20,2%)	0,02	05 (11,6%)	05 (11,1%)	0,52
Complicações da DF [n (%)]									
AVE	22 (20,4%)	16 (19,5%)	0,71	22 (15,4%)	12 (15,2%)	0,92	07 (16,3%)	04 (8,9%)	0,29
Úlceras de perna	04 (3,7%)	01 (1,2%)	0,26	30 (21,0%)	22 (27,8%)	0,28	19 (44,2%)	25 (55,5%)	0,22
Osteonecrose	02 (1,9%)	01 (1,2%)	0,68	11 (7,7%)	08 (10,1%)	0,56	12 (27,3%)	11 (24,4%)	0,83
STA	47 (43,5%)	58 (70,3%)	<0,001	81 (56,6%)	61 (77,2%)	<0,001	18 (41,0%)	21 (46,7%)	0,51
Complicações cardíacas	02 (1,9%)	03 (3,6%)	0,48	15 (10,5%)	10 (12,6%)	0,66	12 (27,3%)	12 (27,1%)	0,99
Priapismo	04 (7,0%)	10 (20,8%)	0,03	12 (21,4%)	14 (37,8%)	0,04	02 (20,0%)	03 (18,7%)	0,64
Escore de gravidade (média)	0,320 ± 0,147	0,324 ± 0,144	0,85	0,549 ± 0,145	0,585 ± 0,164	0,09	0,795 ± 0,194	0,762 ± 0,161	0,38

VCM (volume corpuscular médio); LDH (lactato desidrogenase); ALT (alanina aminotransferase); AST (aspartato aminotransferase); AVE (acidente vascular encefálico); STA (síndrome torácica aguda); -HU (Pacientes sem o uso de HU); +HU (Pacientes em uso de HU). Complicações cardíacas foram consideradas: cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e insuficiência cardíaca aguda (ICA)

Uma vez que não foi encontrada diferença entre os valores médios dos escores de gravidade para os pacientes que faziam ou não o uso de HU, avaliamos a distribuição desses escores nos três grupos de idade (Figura 16). Os histogramas demonstraram que 90,8% dos pacientes, do grupo maior do que 40 anos de idade, apresentaram escores acima de 0,5. No grupo entre 18 a 40 anos de idade, 60,8% dos pacientes apresentaram escores acima de 0,5 e no grupo entre 5 a 17 anos de idade apenas 13,2%.

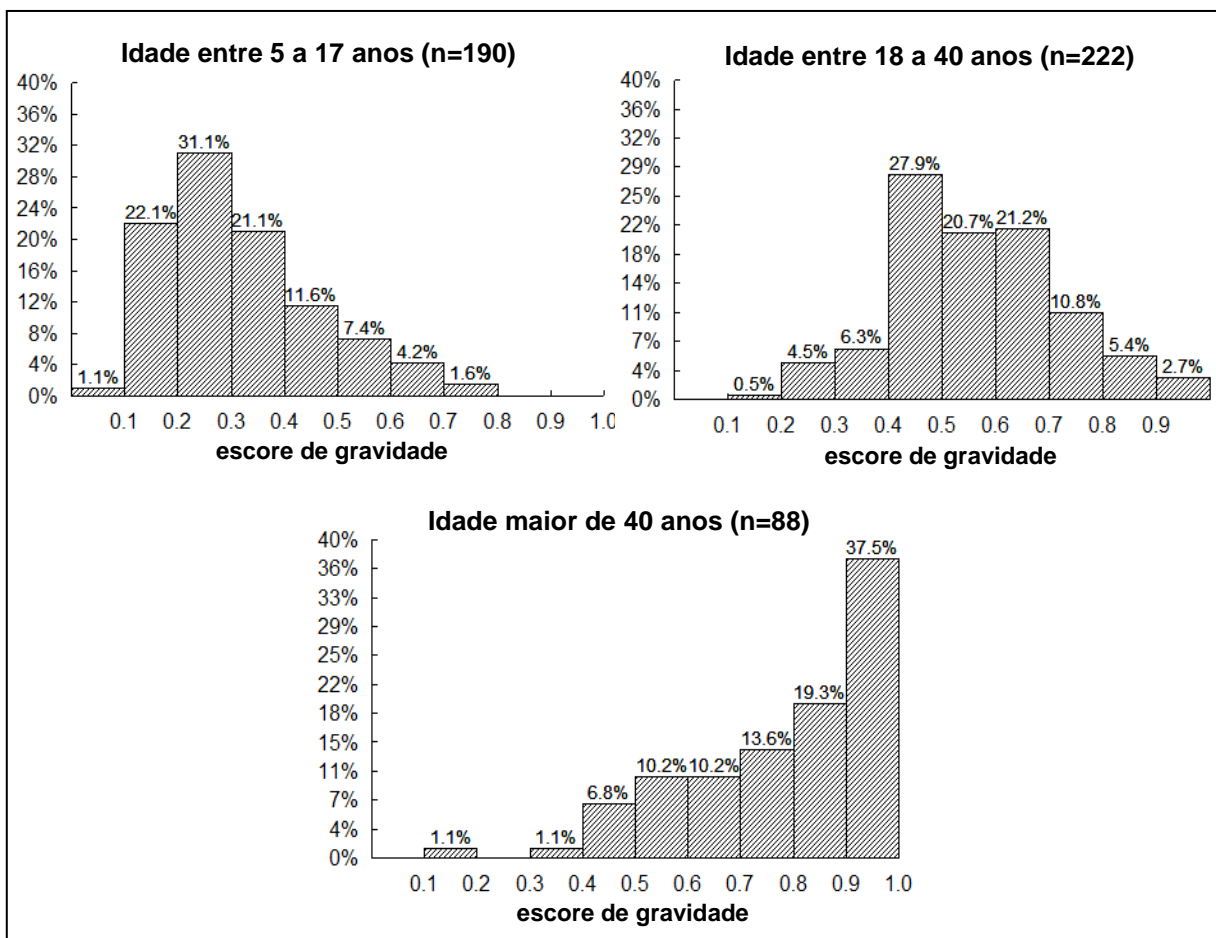


Figura 16. Distribuição dos escores de gravidade dos pacientes com DF. Os histogramas mostram a distribuição dos escores nas três grupos de idade. A frequência de pacientes com escores mais graves foi observada no grupo com idade maior do que 40 anos, seguido pelo grupo de 18 a 40 anos e por último no grupo de 5 a 17 anos.

Outra demonstração do comportamento dos escores de gravidade nos diferentes grupos de idade, separados pelo uso de HU, estão representados na Figura 17-A. É possível observar que os valores médios dos escores não diferenciaram estatisticamente (ver Tabela 1) entre os pacientes que estavam ou não em uso de HU. Porém, quando retiramos a variável HU e comparamos os

escores entre as idades, os pacientes com idade > 40 anos tiveram maior média de escore ($0,778 \pm 0,177$), seguido por pacientes com idade entre 18 a 40 anos ($0,562 \pm 0,152$) e, com a menor média, os pacientes entre 5 a 17 anos ($0,322 \pm 0,145$) ($p < 0,0001$).

Como foi descrito na casuística, a validação da calculadora de gravidade da DF envolveu somente pacientes com dois diferentes genótipos, portanto, quando separamos os genótipos e avaliamos os escores de gravidade, a média dos escores foi maior no grupo Hb SS do que no grupo Hb SC ($p < 0,001$) (Figura 17-B).

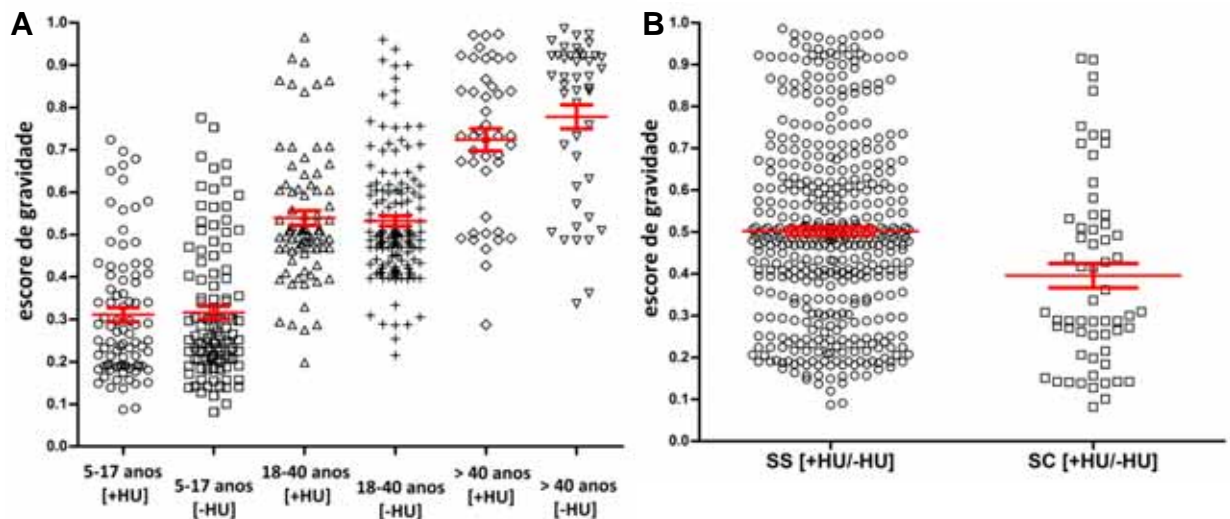


Figura 17. Distribuição dos escores de gravidade em diferentes grupos (idade, hidroxiureia e genótipos da DF). A) Distribuição dos escores de gravidade em pacientes com DF separados por grupos de idade com e sem o uso de hidroxiureia. B) A média dos escores no grupo Hb SS (n=440) de $0,501 \pm 0,218$ foi aproximadamente 1,3 vezes maior do que no grupo Hb SC (n=60) $0,395 \pm 0,223$ ($p < 0,001$). -HU (Pacientes sem o uso de HU); +HU (Pacientes em uso de HU).

De acordo com as observações da distribuição dos escores nos histogramas da Figura 16 e com as faixas de escores propostos pelo estudo de Sebastiani e colaboradores (2010), definiu-se as faixas para a caracterização dos fenótipos em leve, intermediário e grave que podem ser visualizados na Figura 18. Após essa determinação de faixas de escore, classificamos os pacientes e verificamos que 180 (36,0%) pacientes apresentavam fenótipo intermediário, 170 (34,0%) o fenótipo leve e 150 (30,0%) o fenótipo grave.

Pacientes > 40 anos de idade												
0.1	0.2	0.3	0.4	0.401	0.5	0.6	0.7	0.8	0.801	0.9	1.0	
escores de gravidade												
Pacientes ≤ 40 anos de idade												
0.1	0.2	0.3	0.4	0.401	0.5	0.599	0,6	0.7	0.8	0.801	0.9	1.0
escores de gravidade												
LEVE				INTERMEDIÁRIO				GRAVE				

Figura 18. Critérios de classificação fenotípica da doença falciforme. Para o fenótipo “grave” foram considerados os escores > 0,8 para pacientes com idades acima de 40 anos e escores \geq 0,6 para pacientes com idades \leq 40 anos. Para o fenótipo “leve” foram considerados os escores \leq 0,4 para todos os pacientes, independente da idade. Os escores que não corresponderam aos fenótipos “grave” e “leve” foram classificados como fenótipo “intermediário”.

Em cada grupo de idade, verificamos as frequências de fenótipos e, nos pacientes entre 5 a 17 anos, o fenótipo leve (75,3%) foi o mais frequente, seguido pelo fenótipo intermediário (18,9%) e menos frequente o fenótipo grave (5,8%). Nos pacientes entre 18 a 40 anos, o fenótipo intermediário foi o mais frequente (48,6%), seguido pelo fenótipo grave (40,1%) e menos frequente o fenótipo leve (11,3%). Em pacientes maiores que 40 anos, o fenótipo grave foi o mais frequente (56,8%), seguido pelo fenótipo intermediário (41,0%) e o menos frequente o fenótipo leve (2,0%). Essas observações de gravidade foram consistentes com os dados apresentados na Tabela 3 em que há uma tendência no aumento de algumas complicações da doença (úlceras de perna, necrose avascular e complicações cardíacas) com o aumento da idade. Além disso, a ocorrência de priapismo em homens e o número de crise de dor foram menores em indivíduos entre 5 a 17 anos, em comparação com os outros grupos de idade.

Outra forma de validar a calculadora de gravidade foi avaliar a associação das complicações da DF com as classes de fenótipos. Na Tabela 4 verificamos a associação do fenótipo grave com AVE, úlceras de perna, complicações cardíacas e transfusão de sangue. Crises de dor de 3 a 5 por ano e osteonecrose foram mais frequentes em fenótipos intermediários e graves quando comparadas com o fenótipo leve.

Tabela 3. Complicações da DF separadas de acordo com os grupos de idade.

Complicações da DF	Grupos de idade			p
	5 – 17 anos (n=190)	18 - 40 anos (n=222)	> 40 anos (n=88)	
AVE	38 (20,0%)	34 (15,3%)	11 (13,2%)	0,23
Úlceras de perna	5 (2,6%) ^a	52 (23,4%) ^b	44 (50,0%) ^c	<0,001
Osteonecrose	3 (1,6%) ^a	19 (8,6%) ^b	23 (26,5%) ^c	<0,001
STA	106 (55,8%)	142 (63,9%)	39 (44,3%)	0,107
Complicações cardíacas	5 (2,6%) ^a	25 (11,3%) ^b	24 (27,3%) ^c	<0,001
Priapismo [n/total homem]	14/108 (12,9%) ^a	26/93 (27,9%) ^b	5/26 (19,2%) ^b	0,025
Regime transfusional	84 (44,2%)	100 (45,1%)	35 (39,8%)	0,065
*Crises de dor [0 – 2]	82 (43,2%) ^a	134 (60,4%) ^b	54 (61,4%) ^b	<0,001
*Crises de dor [3 – 5]	24 (12,6%) ^a	59 (26,6%) ^b	24 (27,3%) ^b	<0,001
*Crises de dor [≥ 6]	7 (3,7%) ^a	29 (13,1%) ^b	10 (11,4%) ^b	0,003

*Número de crises de dor por pessoa no ano que antecedeu a coleta das amostras.

AVE: acidente vascular encefálico, STA: síndrome torácica aguda.

Letras diferentes indicam diferença estatística

Tabela 4. Complicações da DF separadas de acordo com os fenótipos caracterizados pelas faixas de escores de gravidade

Complicações da DF	Fenótipos			p
	Leve (n=170)	Intermediário (n=180)	Grave (n=150)	
AVE	21 (12,4%) ^a	25 (13,9%) ^a	37 (24,7%) ^b	<0,01
Úlceras de perna	9 (5,3%) ^a	43 (23,9%) ^b	49 (32,7%) ^c	<0,001
Osteonecrose	4 (2,3%) ^a	23 (12,8%) ^b	18 (12,0%) ^b	0,002
STA	97 (57,1%)	94 (52,2%)	95 (63,3%)	0,067
Complicações cardíacas	6 (3,5%) ^a	21 (11,7%) ^b	27 (18,0%) ^c	0,006
Priapismo [n/total homem]	11/88 (12,5%)	23/83 (27,7%)	11/54 (20,4%)	0,081
Regime transfusional	59 (34,7%) ^a	60 (33,3%) ^a	100 (66,7%) ^b	<0,001
*Crises de dor [0 – 2]	117 (68,8%)	119 (66,1%)	83 (55,3%)	0,241
*Crises de dor [3 – 5]	40 (23,5%) ^a	48 (26,7%) ^b	41 (27,3%) ^b	0,001
*Crises de dor [≥ 6]	13 (7,7%) ^a	13 (7,2%) ^a	26 (17,3%) ^b	0,122

*Número de crises de dor por pessoa no último ano que antecedeu a coleta das amostras.

AVE: acidente vascular encefálico, STA: síndrome torácica aguda.

Letras diferentes indicam diferença estatística

Avaliamos a relação dos escores de gravidade com os marcadores bioquímicos, utilizados pela calculadora, e também a concentração de Hb S e de Hb F para verificar se havia correlação entre essas variáveis. Assim, o grau de relação entre escores e hemoglobina ($p = 0,004$, $r = -0,20$), escores e hematócrito ($p = 0,001$, $r = -0,21$), escores e leucócitos ($p = 0,02$, $r = 0,10$), escores e reticulócitos ($p = 0,009$, $r = 0,11$) foram estatisticamente significativas. Como não existe validação da calculadora de gravidade para pacientes menores de 18 anos, fizemos outras análises de correlação e removemos o grupo entre 5 a 17 anos. Os resultados de correlações significativas foram: escores de gravidade e hemoglobina ($p < 0,001$, $r = -0,32$), escores e hematócrito ($p < 0,001$, $r = -0,33$), escores e leucócitos ($p = 0,03$, $r = 0,26$), escores e reticulócitos ($p < 0,001$, $r = 0,27$), escores e LDH ($p < 0,001$, $r = 0,28$). Estes resultados mostram que quando os valores de LDH, leucócitos e reticulócitos aumentam os valores de escores de gravidade tendem a aumentar, e quando os valores de hemoglobina e hematócrito diminuem os valores de escores de gravidade tendem a aumentar. Além disso, analisamos o grau de correlação nas classes de fenótipo sem o grupo entre 5 a 17 anos e verificamos que quando os valores de hemoglobina e hematócrito diminuem os valores de escores de gravidade tendem a aumentar, e quando os valores de leucócitos, reticulócitos, LDH, bilirrubina total e Hb S aumentam os valores de escore de gravidade tendem a aumentar. Os resultados estão ilustrados na Figura 19.

Os resultados desse item originaram o artigo “Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and validation of Bayesian Network Model” que foi submetido à British Journal of Haematology conforme consta no Apêndice C.

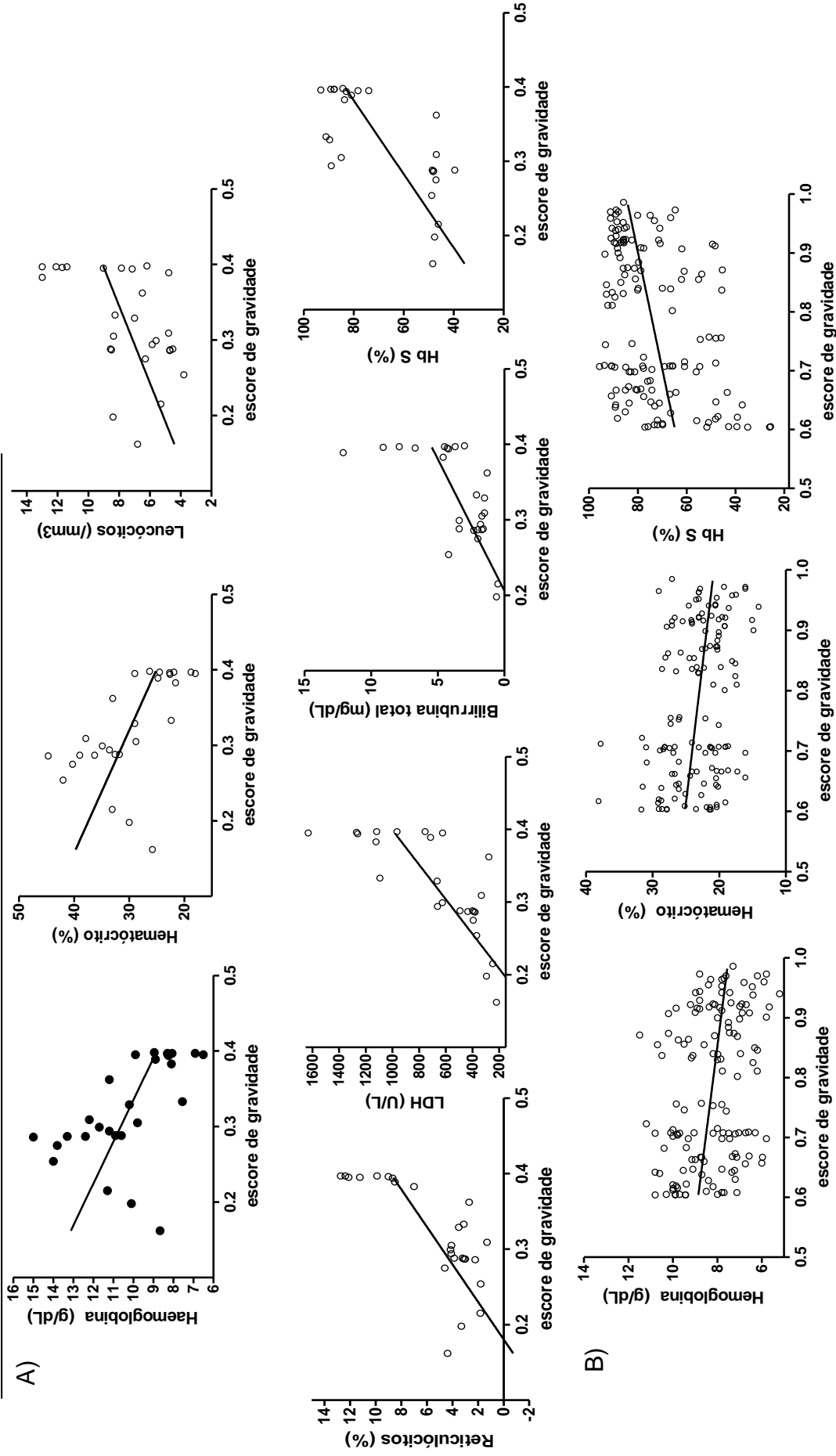


Figura 19. Análises de correlação entre escores de gravidade e variáveis laboratoriais sem o grupo de 5 a 17 anos. A) Correlações significativas no fenótipo leve. Correlações negativas entre o escore de gravidade e hemoglobina ($p < 0,001$, $r = -0,65$), escore de gravidade e hematócrito ($p < 0,001$, $r = -0,68$). Correlações positivas entre escore de gravidade e leucócitos ($p < 0,01$, $r = 0,64$), escore de gravidade e reticulócitos ($p < 0,01$, $r = 0,64$), escore de gravidade e bilirrubina total ($p < 0,01$, $r = 0,59$), escore de gravidade e Hb S ($p < 0,001$, $r = 0,69$). B) Correlações no fenótipo grave. Correlações negativas entre escore de gravidade e hemoglobina ($p < 0,01$, $r = -0,31$) e escore de gravidade e hematócrito ($p < 0,01$, $r = -0,32$); e positiva entre o escore de gravidade e Hb S ($p < 0,001$, $r = 0,34$).

4.3 POLIMORFISMOS ENVOLVIDOS NOS PROCESSOS INFLAMATÓRIOS, NA SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO E ESTRESSE OXIDATIVO DA DOENÇA FALCIFORME

Os polimorfismos nos genes *TNFA*, *TGFB1*, *NOS3*, *GSTP1*, *GSTM1* e *GSTT1* foram avaliados em 520 pacientes do grupo de estudo. Para o polimorfismo -308G/A no gene *TNFA*, seis (1,1%) indivíduos apresentaram o alelo mutante em homozigose (AA), 95 (18,3%) foram heterozigotos para a mutação investigada (GA) e 419 (80,6%) apresentaram genótipo normal (GG). O polimorfismo -509C/T no gene *TGFB1* esteve presente em 50 (9,6%) indivíduos, em homozigose (TT), 199 (38,3%), em heterozigose (CT) e 271 (52,1%) pacientes apresentaram o genótipo normal (CC). Para o polimorfismo 313A/G no gene *GSTP1*, 82 (15,8%) pacientes apresentaram o genótipo mutante em homozigose (GG), 185 (35,6%) indivíduos foram heterozigotos para a mutação (AG) e 253 (48,6%) apresentaram o genótipo normal (AA). O polimorfismo -786T/C no gene *NOS3* esteve em homozigose mutante (CC) para 21 (4,0%) dos pacientes, 188 (36,2%) pacientes em heterozigose (CT) e 311 (59,8%) indivíduos foram homozigotos normais (TT). A Tabela 5 detalha essas frequências genotípicas.

Para os polimorfismos nos genes *GSTT1* e *GSTM1*, encontramos 239 (46,0%) pacientes com o genótipo *GSTM1/GSTT1* (presença dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*), 121 (23,3%) indivíduos com o genótipo *GSTT1/GSTT1* (presença do alelo para *GSTT1* e ausência do alelo para *GSTM1*), 102 (19,6%) pacientes com o genótipo *GSTM1/GSTM1* (presença do alelo para *GSTM1* e ausência do alelo para *GSTT1*) e 58 (11,1%) indivíduos *NULO/NULO* (ausência dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*). Os portadores nulos para *GSTM1* foram representados pela soma dos genótipos *GSTT1/GSTT1* mais os indivíduos *NULO/NULO*, então para esse grupo foram encontrados 179 (34,4%) indivíduos; para os indivíduos nulos para *GSTT1* somamos o genótipo *GSM1/GSM1* mais o genótipo *NULO/NULO*, dessa forma foram encontrados 160 (30,8%) indivíduos (Tabela 6).

Tabela 5. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos -308G/A (*TNFA*), -509C/T (*TGFB1*), 313A/G (*GSTP1*) e -786T/C (*NOS3*) nos pacientes com doença falciforme

Polimorfismo	Genótipo	Frequência genotípica	Frequência alélica
<i>TNFA</i> (-308G/A) n=520	GG (n=419)	80,6%	G = 0,89 A = 0,11
	GA (n=95)	18,3%	
	AA (n=06)	1,1%	
<i>TGFB1</i> (-509C/T) n=520	CC (n=271)	52,1%	C = 0,71 T = 0,29
	CT (n=199)	38,3%	
	TT (n=50)	9,6%	
<i>GSTP1</i> (313A/G) n=520	AA (n=253)	48,6%	A = 0,66 G = 0,34
	AG (n=185)	35,6%	
	GG (n=82)	15,8%	
<i>NOS3</i> (-786T/C) n=520	TT (n=311)	59,8%	A = 0,78 G = 0,22
	CT (n=188)	36,2%	
	CC (n=21)	4,0%	

TNFA-GG, *TGFB1*-CC, *GSTP1*-AA e *NOS3*-TT: homocigoto normal. *TNFA*-AA, *TGFB1*-TT, *GSTP1*-GG e *NOS3*-CC: homocigotos mutantes. Alelos selvagens: *TNFA*-G, *TGFB1*-C, *GSTP1*-A e *NOS3*-A. Alelos mutantes: *TNFA*-A, *TGFB1*-T, *GSTP1*-G e *NOS3*-G

Tabela 6. Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* nos pacientes com doença falciforme

Genótipos	n (%)	Polimorfismo	n (%)	
<i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i>	239 (46,0%)	<i>GSTM1</i>	nulo para <i>GSTM1</i>	179 (34,4%)
<i>GSTT1</i> / <i>GSTT1</i>	121 (23,3%)		selvagem para <i>GSTM1</i>	341 (65,6%)
<i>GSTM1</i> / <i>GSTM1</i>	102 (19,2%)	<i>GSTT1</i>	nulo para <i>GSTT1</i>	160 (30,8%)
<i>NULO</i> / <i>NULO</i>	58 (11,1%)		selvagem para <i>GSTT1</i>	360 (69,2%)

Genótipo *GSTM1*/*GSTM1*: presença do alelo para *GSTM1* e ausência do alelo para *GSTT1*; genótipo *GSTT1*/*GSTT1*: presença do alelo para *GSTT1* e ausência do alelo para *GSTM1*; genótipo *GSTM1*/*GSTT1*: presença dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1* e genótipo *NULO*/*NULO* ausência dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*)

Como o objetivo de verificar a associação entre os polimorfismos investigados e as manifestações clínicas nos pacientes com DF, os parâmetros foram comparados por *odds ratio*. As ocorrências de úlceras de perna, osteonecrose e retinopatia, foram avaliadas em pacientes acima de 15 anos de idade para evitarmos vieses de associação uma vez que, por serem complicações crônicas, se evidenciam em idades mais tardias (Tabelas 8 e 9).

Para os polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1*, a única associação foi para a nulidade para o polimorfismo *GSTM1* em que os pacientes portadores desse polimorfismo apresentaram chance aumentada de 2,03 vezes para a ocorrência de priapismo ($p=0,04$).

O polimorfismo -509C/T no gene *TGFB1* apresentou-se como fator de proteção para a ocorrência de retinopatia e priapismo ($OR < 1$). A probabilidade de ocorrência de retinopatia é 33% menor nos portadores do polimorfismo comparada com pacientes sem a mutação ($OR: 0,33$ $IC: 0,15 - 0,72$). A ocorrência de priapismo em homens é 49% menor naqueles portadores do polimorfismo em questão ($OR: 0,49$ $IC: 0,25 - 0,97$).

Para o polimorfismo -786T/C no gene *NOS3*, verificamos que a presença desse polimorfismo diminui 69% a probabilidade de ocorrência de STA ($OR: 0,69$ $IC: 0,48 - 0,98$) e 60% a probabilidade de desenvolvimento de úlceras de perna ($OR: 0,60$ $IC: 0,37 - 0,98$).

Tabela 8. Chance de desenvolvimento das manifestações clínicas para os pacientes com DF portadores dos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1*.

Complicações clínicas	<i>GSTM1</i> (nulo x selvagem)			<i>GSTT1</i> (nulo x selvagem)		
	OR	p	IC 95%	OR	p	IC 95%
AVE	0,78	0,40	0,46 – 1,29	0,89	0,75	0,53 – 1,49
Retinopatia	1,13	0,86	0,56 – 2,24	1,28	0,62	0,62 – 2,66
STA	1,17	0,45	0,80 – 1,69	1,01	0,97	0,69 – 1,47
Priapismo	2,03	0,04	1,05 – 3,92	1,08	0,95	0,54 – 2,16
Úlceras de perna	1,07	0,87	0,66 – 1,73	0,93	0,88	0,56 – 1,54
Osteonecrose	1,23	0,65	0,63 – 2,37	1,56	0,26	0,79 – 3,10
Complicações cardíacas	1,38	0,32	0,78 – 2,44	0,73	0,41	0,38 – 1,38
Complicações renais	0,79	0,36	0,51 – 1,24	1,09	0,76	0,70 – 1,70
Transfusões	1,23	0,29	0,85 – 1,78	0,79	0,26	0,53 – 1,15
Crises de dor	1,27	0,23	0,87 – 1,85	0,94	0,83	0,63 – 1,38

AVE: Acidente Vascular Encefálico; STA: Síndrome Torácica Aguda. Complicações cardíacas: cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e insuficiência cardíaca aguda (ICA). Complicações renais: albuminúria, hematuria e proteinúria. Crises de dor: ≥ 3 crises de dor por paciente por ano no ano antecedente a coleta. OR: *Odds Ratio*. IC: Intervalo de Confiança.

Tabela 9. Chance de desenvolvimento das manifestações clínicas para os pacientes com DF portadores dos polimorfismos -308G/A no gene *TNFA*, -509C/T no gene *TGFB1*, 313A/G no gene *GSTP1* e -786T/C no gene *NOS3*.

Complicações clínicas	<i>TNFA</i> (GG x GA+AA)			<i>TGFB1</i> (CC x CT+TT)			<i>GSTP1</i> (AA x AG+GG)			<i>NOS3</i> (TT x CT+CC)		
	OR	p	IC 95%	OR	p	IC 95%	OR	p	IC 95%	OR	p	IC 95%
AVE	0,89	0,82	0,48 – 1,63	1,00	0,91	0,62 – 1,60	0,75	0,29	0,47 – 1,20	0,65	0,11	0,39 – 1,07
Retinopatia	2,15	0,10	0,94 – 4,91	0,33	0,00	0,15 – 0,72	0,87	0,81	0,45 – 1,68	0,78	0,59	0,39 – 1,55
STA	1,25	0,37	0,80 – 1,97	1,27	0,20	0,89 – 1,81	1,11	0,61	0,78 – 1,57	0,69	0,05	0,48 – 0,98
Priapismo	1,06	0,94	0,47 – 2,40	0,49	0,04	0,25 – 0,97	0,98	0,90	0,51 – 1,88	0,95	0,98	0,49 – 1,82
Úlceras de perna	1,41	0,33	0,76 – 2,61	0,68	0,14	0,42 – 1,09	0,82	0,47	0,52 – 1,30	0,60	0,05	0,37 – 0,98
Osteonecrose	0,93	0,92	0,36 – 2,40	0,56	0,15	0,28 – 1,14	1,16	0,75	0,62 – 2,18	1,07	0,95	0,56 – 2,03
Complicações cardíacas	1,45	0,33	0,76 – 2,79	0,95	0,96	0,54 – 1,65	0,63	0,14	0,36 – 1,11	0,87	0,75	0,49 – 1,54
Complicações renais	1,16	0,65	0,69 – 1,93	0,94	0,87	0,62 – 1,42	1,03	0,94	0,68 – 1,56	0,77	0,28	0,50 – 1,18
Transfusões	0,94	0,87	0,60 – 1,46	1,35	0,10	0,95 – 1,92	0,94	0,80	0,66 – 1,33	1,17	0,43	0,82 – 1,67
Crises de dor	0,88	0,69	0,56 – 1,40	0,89	0,60	0,62 – 1,28	1,00	0,94	0,70 – 1,43	1,05	0,86	0,72 – 1,51

AVE: Acidente Vascular Encefálico; STA: Síndrome Torácica Aguda. Complicações cardíacas: cardiomegalia, insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e insuficiência cardíaca aguda (ICA). Complicações renais: albuminúria, hematuria e proteinúria. OR: *Odds Ratio* (equivalente ao risco relativo de desenvolver a manifestação clínica associada ao 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.

Uma vez que caracterizamos os pacientes de acordo com o fenótipo de gravidade da DF, verificamos a influência dos polimorfismos nas classes de fenótipos com todos os DF sem separarmos os pacientes em grupos de idade e uso de HU. A diferença estatística encontrada foi nos genótipos do polimorfismo -509C/T do gene *TGFB1*, em que o genótipo heterozigoto (CT) e os heterozigotos mais homozigotos mutantes (CT+TT) foram menos frequentes no fenótipo intermediário; e o homozigoto normal (CC) foi mais frequente na classe de fenótipo intermediário quando comparado com os outros fenótipos (Tabela 10).

Tabela 10. Frequência genotípica dos polimorfismos nas diferentes classes de fenótipos da DF.

Polimorfismos	Classes de fenótipos			Valor de p
	Leve (n=179)	Intermediário (n=184)	Grave (n=157)	
-308G/A no gene TNFA				
GG	146 (81,6%)	144 (78,3%)	129 (82,2%)	0,607
GA	30 (16,7%)	40 (21,7%)	25 (15,9%)	0,311
AA	03 (1,7%)	0 (0%)	3 (1,9%)	0,186
GA+AA	33 (18,4%)	40 (21,7%)	28 (17,8%)	0,607
-509C/T no gene TGFB1				
CC	83 (46,4%) ^a	110 (59,8%) ^b	78 (49,7%) ^a	0,029
CT	80 (44,7%) ^a	54 (29,3%) ^b	65 (41,4%) ^a	0,006
TT	16 (8,9%)	20 (10,9%)	14 (8,9%)	0,772
CT+AA	96 (53,6%) ^a	74 (40,2%) ^b	79 (50,3%) ^a	0,029
313A/G no gene GSTP1				
AA	87 (48,6%)	86 (46,7%)	80 (51,0%)	0,739
AG	59 (33,0%)	70 (38,0%)	56 (35,7%)	0,599
GG	33 (18,4%)	28 (15,2%)	21 (13,4%)	0,432
AG+GG	92 (51,4%)	98 (53,3%)	77 (49,0%)	0,739
-786T/C no gene NOS3				
TT	109 (60,9%)	102 (55,4%)	100 (63,7%)	0,281
CT	65 (36,3%)	74 (40,2%)	50 (31,8%)	0,277
CC	05 (2,8%)	08 (4,3%)	7 (4,5%)	0,663
CT+CC	70 (39,1%)	82 (44,6%)	57 (36,3%)	0,281
Polimorfismo no gene GSTT1				
Nulo para GSTT1	59 (33,0%)	57 (31,0%)	44 (28,0%)	0,618
Selvagem GSTT1	120 (67,0%)	127 (69,0%)	113 (72,0%)	
Polimorfismo no gene GSTM1				
Nulo para GSTM1	57 (31,8%)	73 (39,7%)	49 (31,2%)	0,171
Selvagem GSTM1	122 (68,2%)	111 (60,3%)	108 (68,8%)	

Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE (ATIVIDADE DAS ENZIMAS CATALASE, GPX, GST, GR) E O DANO OXIDATIVO (TBARS)

Inicialmente, verificamos se as faixas de idade (5-17 anos, 18-40 anos e > 40 anos) e o gênero influenciariam nos valores obtidos para os marcadores da capacidade antioxidante e de dano oxidativo. Para isso, utilizamos o teste ANOVA fatorial confrontando os valores de cada marcador bioquímico com as variáveis: idade e gênero. Nem a idade ($p=0,51$) e nem o gênero ($p=0,29$) influenciaram nos valores de TBARS. Para a atividade da catalase o grupo de 5 a 17 anos apresentou maior atividade do que o grupo de 18 a 40 anos e > 40 anos de idade ($p=0,008$), porém o gênero não interferiu na atividade da catalase ($p=0,82$). A menor atividade da GST foi encontrada no grupo de 5 a 17 anos comparado com os outros grupos de idade ($p<0,001$) e o gênero não teve influência nos valores de GST ($p=0,49$). A atividade da Gpx foi maior no gênero feminino comparado com o gênero masculino ($p=0,02$) e não houve diferenças estatísticas entre os grupos de idade ($p=0,07$). No grupo de 5 a 17 anos, a atividade da GR foi maior quando comparado com os outros grupos ($p=0,02$) e entre os gêneros não foi encontrado diferença estatística ($p=0,21$).

Após a análise da idade e do gênero, separamos o grupo de DF de acordo com o genótipo da doença e a estatística descritiva das atividades enzimáticas e dos valores de TBARS, estão demonstradas na Tabela 11 pela média e erro padrão. Além da análise descritiva, avaliamos se os genótipos da DF tiveram influência nos valores encontrados, assim como, se os marcadores da capacidade antioxidante e de dano de membrana lipídica diferiram do grupo sem hemoglobinopatias.

No grupo Hb SS, a atividade da catalase, da GR e da GPx, apresentaram menor atividade de 1,8 vezes, 3,5 vezes e 1,9 vezes, respectivamente, do que o grupo de referência ($p<0,01$). No grupo Hb SC, a redução da atividade da catalase, GR e GPx foi de 1,5 vezes, 3,6 vezes e 1,8 vezes, respectivamente, quando comparado ao grupo de referência ($p<0,01$). Para os Hb SD, a redução da atividade foi de 1,9 vezes, 2,3 vezes e 2,1 vezes para a catalase, GR e GPx, respectivamente ($p<0,01$). No grupo Hb S/Beta, a atividade das enzimas, na mesma ordem, foi de 1,7 vezes, 2,7 vezes e 1,9 vezes menores do que o grupo de referência ($p<0,01$).

A atividade da GST no grupo Hb SS, Hb SC, Hb SD e HB S/Beta, foram, respectivamente, 1,4 vezes, 1,3 vezes, 1,31 vezes, 1,33 vezes, maiores do que no grupo de referência ($p < 0,01$).

Entre os genótipos da DF a atividade média da catalase nos pacientes Hb SS foi menor do que no grupo Hb SC ($p < 0,001$) e a atividade da GR no grupo Hb SD foi 1,7 vezes maior do que no grupo Hb SS ($p < 0,05$).

O marcador de peroxidação lipídica apresentou maiores concentrações nos pacientes com DF quando comparados com o grupo de referência ($p < 0,0001$). Em geral, os valores de TBARS no grupo de DF foram aproximadamente quatro vezes maior do que no grupo sem alterações de hemoglobina. A única diferença observada entre os genótipos da DF foi entre os Hb SS e Hb SC em que o valor de TBARS no Hb SS foi de aproximadamente 1,2 vezes maior do que no grupo Hb SC ($p < 0,005$).

Tabela 11 – Atividade das enzimas antioxidantes e valores de TBARS separadas de acordo com o genótipo DF.

Grupos	marcadores de estresse oxidativo				
	Catalase (U/L) ($\bar{x} \pm EP$)	GR (U/L) ($\bar{x} \pm EP$)	GPx (U/L) ($\bar{x} \pm EP$)	GST (U/L) ($\bar{x} \pm EP$)	TBARS (ng/mL) ($\bar{x} \pm EP$)
SS (n=405)	3926,1 \pm 75,7 ^{a,*}	0,77 \pm 0,02 ^{a,**}	1,02 \pm 0,03 ^a	0,94 \pm 0,02 ^a	2708 \pm 110 ^{a,***}
SC (n=57)	4632,5 \pm 293,9 ^{a,*}	0,81 \pm 0,06 ^a	1,11 \pm 0,07 ^a	0,89 \pm 0,06 ^a	2291 \pm 425 ^{a,***}
SD (n=10)	4222,7 \pm 525,9 ^a	1,31 \pm 0,31 ^{a,**}	0,97 \pm 0,12 ^a	0,87 \pm 0,14 ^a	2446 \pm 371 ^a
S/Beta tal (n=18)	4305,2 \pm 475,5 ^a	1,02 \pm 0,15 ^a	1,0 \pm 0,12 ^a	0,88 \pm 0,12 ^a	2577 \pm 536 ^a
Referência (n=100)	6882,3 \pm 148,3 ^b	1,64 \pm 0,03 ^b	1,22 \pm 0,05 ^b	0,66 \pm 0,11 ^b	549 \pm 50 ^b
valor p	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p = 0,0009$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$

EP: erro padrão. GR: glutathiona redutase, GPx: glutathiona peroxidase, GST: glutathiona S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

*Diferença da atividade da catalase entre os grupos Hb SS e Hb SC.

**Diferença da atividade da glutathiona redutase entre os grupos Hb SS e Hb SD.

*** Diferença na concentração de TBARS entre os grupos Hb SS e Hb SC.

Após a observação dos marcadores bioquímicos entre os genótipos da DF, avaliamos o comportamento enzimático e os valores de TBARS sob a influência dos polimorfismos rastreados nesse estudo. As comparações foram realizadas

separando os homozigotos normais contra os heterozigotos e homozigotos mutantes, os dados estão demonstrados nas Tabelas 12 e 13.

A atividade da catalase no genótipo nulo para o gene *GSTM1* foi de, aproximadamente, 11,4% menor do que o genótipo selvagem ($p=0,02$). Ainda no genótipo nulo, a atividade da GR foi de, aproximadamente, 11,6% maior do que o genótipo normal ($p=0,03$).

Para o genótipo nulo do gene *GSTT1*, a atividade da GR foi de, aproximadamente, 12,5% maior do que o genótipo selvagem ($p=0,01$).

Tabela 12 – Atividade das enzimas antioxidantes e valores de TBARS separadas de acordo com os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1*.

marcadores bioquímicos	Polimorfismos					
	<i>GSTM1</i>		Valor <i>p</i>	<i>GSTT1</i>		Valor <i>p</i>
	<i>GSTM1</i> Selvagem ($\bar{x} \pm DP$)	<i>GSTM1</i> Nulo ($\bar{x} \pm DP$)		<i>GSTT1</i> Selvagem ($\bar{x} \pm DP$)	<i>GSTT1</i> Nulo ($\bar{x} \pm DP$)	
Catalase (U/L)	4000,8 ± 1577,3	4079,1 ± 1772,4	0,19	3955,7 ± 1649,8	4189,5 ± 1631,2	0,32
GR (U/L)	0,76 ± 0,49	0,86 ± 0,49	0,03	0,77 ± 0,50	0,88 ± 0,47	0,01
GPx (U/L)	0,99 ± 0,58	1,09 ± 0,81	0,29	1,03 ± 0,69	1,02 ± 0,61	0,96
GST (U/L)	0,96 ± 0,50	0,85 ± 0,51	0,02	0,94 ± 0,50	0,90 ± 0,52	0,39
TBARS (ng/mL)	2732 ± 2498	2497 ± 1996	0,17	2573 ± 2304	2825 ± 2410	0,32

DP: desvio padrão. GR: glutationa redutase, GPx: glutationa peroxidase, GST: glutationa S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

As comparações enzimáticas, envolvendo o polimorfismo no gene *TNFA*, demonstraram que a atividade da catalase foi 15% maior no grupo heterozigoto e homozigotos mutantes quando comparados com o grupo homozigoto normal ($p<0,01$).

A presença do polimorfismo no gene da *GSTP1* influenciou na atividade da GPx e GST, em que a atividade dessas enzimas foram, aproximadamente, 11% e 19%, respectivamente, menores do que nos pacientes sem a mutação ($p<0,01$). Além disso, a atividade da GR foi 11% maior nos pacientes com a mutação do que aqueles que apresentaram o genótipo normal ($p<0,01$).

Tabela 13 – Atividade das enzimas antioxidantes e dos valores de TBARS separados de acordo com os polimorfismos nos genes *TNFA*, *TGFB1*, *GSTP1* e *NOS3*.

marcadores bioquímicos	Polimorfismos												Valor p													
	-308G/A <i>TNFA</i>		GA+AA		Valor p		-509C/T <i>TGFB1</i>		CT+TT		Valor p			313A/G <i>GSTP1</i>		AG+GG		Valor p		-786T/C <i>NOS3</i>		TT		CT+CC		Valor p
	GG	GA+AA	Valor	p	CC	CT+TT	Valor	p	AA	AG+GG	Valor	p		TT	CT+CC	Valor	p	TT	CT+CC	Valor	p					
Catalase (U/L)	3920,6 ± 1582,5	4484,9 ± 1832,5	<0,01	4062,9 ± 1491,1	3989,1 ± 1804,6	0,62	3948,1 ± 1702,3	4106,1 ± 1588,1	0,29	3924,4 ± 1546,5	4096,6 ± 1707,9	0,25														
GR (U/L)	0,77 ± 0,49	0,86 ± 0,50	0,13	0,78 ± 0,47	0,80 ± 0,51	0,72	0,75 ± 0,44	0,83 ± 0,53	<0,01	0,79 ± 0,50	0,79 ± 0,49	0,97														
GPx (U/L)	1,01 ± 0,69	1,08 ± 0,55	0,08	1,00 ± 0,70	1,06 ± 0,63	0,30	1,10 ± 0,60	0,96 ± 0,73	<0,01	0,98 ± 0,55	1,09 ± 0,81	0,31														
GST (U/L)	0,95 ± 0,51	0,84 ± 0,47	0,06	0,92 ± 0,49	0,93 ± 0,52	0,72	1,02 ± 0,53	0,83 ± 0,46	<0,01	0,90 ± 0,48	0,96 ± 0,53	0,26														
TBARS (ng/mL)	2674 ± 2462	2550 ± 1713	0,56	2611 ± 2333	2695 ± 2347	0,69	2703 ± 2531	2599 ± 2196	0,49	2627 ± 2566	2666 ± 2172	0,94														

Valores expressos em média ± desvio padrão. GR: glutationa redutase, GPx: glutationa peroxidase, GST: glutationa S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Também avaliamos o perfil de marcadores antioxidantes e a peroxidação lipídica entre os fenótipos de gravidade da DF. Verificamos que no fenótipo leve, a atividade da catalase foi maior do que nos fenótipos intermediário e grave ($p=0,01$). Ainda no fenótipo leve foi possível observar o aumento da atividade da GR, comparada ao fenótipo grave ($p=0,04$), e menor atividade da GST comparada com os outros fenótipos ($p<0,01$) (Tabela 14).

Tabela 14 – Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes e dos valores de TBARS nos diferentes fenótipos de gravidade da DF.

Marcadores	Fenótipos			valor p
	Leve (n=167)	Intermediário (n=173)	Grave (n=149)	
Catalase (U/L)	4327,8 ± 122,3 ^a	3865,5 ± 121,7 ^b	3883,8 ± 141,9 ^b	0,01
GR (U/L)	0,86 ± 0,1 ^a	0,78 ± 0,1 ^b	0,73 ± 0,1 ^c	0,04
GPx (U/L)	1,05 ± 0,1	0,98 ± 0,1	1,05 ± 0,01	0,58
GST (U/L)	0,79 ± 0,1 ^a	1,01 ± 0,1 ^b	0,98 ± 0,1 ^b	<0,01
TBARS (ng/mL)	2447,1 ± 175,6	2681,8 ± 170,8	2844,4 ± 205,5	0,31

Valores expressos em média ± erro padrão. GR: glutathiona redutase, GPx: glutathiona peroxidase, GST: glutathiona S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).

O grau de relação, entre os escores de gravidade com cada marcador de estresse oxidativo, foi avaliado para verificar se o aumento/diminuição dos níveis de marcadores bioquímicos estavam relacionados com a piora/melhora no fenótipo da doença. Após as análises, as correlações significativas foram observadas entre os escores de gravidade e catalase ($p=0,001$, $r= -0,15$), escores de gravidade e GST ($p<0,001$, $r= 0,21$) e escores de gravidade e GR ($p=0,005$, $r= -0,14$). Apesar dos valores de “r” serem baixos, a diminuição da atividade da catalase e da GR, foram relacionadas com o aumento da gravidade da doença, e o aumento da atividade da GST foi relacionada com o aumento da gravidade da doença.

4.5 RESPOSTA AO USO DE HIDROXIUREIA PERANTE OS MARCADORES BIOQUÍMICOS E LABORATORIAIS, FENÓTIPO DA DOENÇA E OS POLIMORFISMOS GENÉTICOS AVALIADOS

Neste tópico, todas as análises estatísticas a seguir foram utilizadas para verificar o comportamento dos marcadores bioquímicos e laboratoriais perante o uso de hidroxiureia associado a várias variáveis independentes.

Inicialmente, realizamos análises com o teste de Anova fatorial envolvendo as variáveis dependentes (Catalase, GR, Gpx, GST e TBARS) e as variáveis independentes (idade, genótipo da DF, gênero e classes de fenótipos). Cada variável dependente foi confrontada com o uso de HU e com mais outra variável independente, por exemplo, quando avaliamos se as variáveis HU e idade causariam efeito nos valores de TBARS, foram gerados seis subgrupos (uso de HU + 5-17 anos, uso de HU + 18-40 anos, uso de HU + > 40 anos, sem HU + 5-17 anos, sem HU + 18-40 anos, sem HU + >40 anos) e cada um deles foram comparado um com o outro. Então, para cada variável dependente, quando avaliada com a idade, genótipo da DF, gênero e classes de fenótipos, foram gerados, respectivamente, seis, oito, quatro, seis, subcategorias.

Os resultados das interações entre as subcategorias e variáveis dependentes, não mostraram comparação estatisticamente significativa. Diante disso, avaliamos a influência da HU nos marcadores de estresse oxidativo e os bioquímicos, utilizados pela calculadora de gravidade, obedecendo a herança dos polimorfismos genéticos. Separamos, para cada polimorfismo, um grupo de pacientes homocigoto normal e outro grupo heterocigoto somando aos homocigotos mutantes, e dentro desses grupos avaliamos os marcadores nos pacientes que faziam ou não o uso de HU.

As análises dos marcadores bioquímicos dentro de cada genótipo do polimorfismo no gene *TNFA*, com a influência da HU, estão representadas na Tabela 15. Os valores de Hb F e do VCM, em ambos os genótipos (GG e AG/AA), mostraram maiores valores nos pacientes que faziam o uso de HU comparadas com os pacientes que não usavam a HU ($p < 0,05$). Entretanto, os pacientes, homocigotos normais (GG) e que faziam o uso de HU, tiveram menores valores médios de lactato desidrogenase, bilirrubina total e no número total de leucócitos de,

aproximadamente, 15%, 26% e 10%, respectivamente ($p < 0,05$), quando comparados com os pacientes que não faziam o uso de HU.

Tabela 15 – Influência da hidroxureia nos marcadores bioquímicos e hematológicos associada ao polimorfismo -308G/A do gene *TNFA*.

Marcadores	<i>TNFA</i>					
	<i>GG</i>		<i>valor p</i>	<i>AG/AA</i>		<i>valor p</i>
	C/HU (n=160)	S/HU (n=236)		C/HU (n=38)	S/HU (n=56)	
Catalase (U/mL)	3814,7 ± 118,7	3992,4 ± 106,3	0,27	4637,6 ± 277,8	4331,7 ± 258,3	0,43
GR (U/mL)	0,76 ± 0,1	0,78 ± 0,1	0,64	0,91 ± 0,1	0,83 ± 0,1	0,45
GPx (U/mL)	1,06 ± 0,1	0,98 ± 0,1	0,72	1,10 ± 0,1	1,07 ± 0,1	0,80
GST (U/mL)	0,92 ± 0,1	0,97 ± 0,1	0,33	0,79 ± 0,1	0,89 ± 0,1	0,33
TBARS (ng/mL)	2420 ± 143	2617 ± 129	0,31	2147 ± 210	2794 ± 255	0,13
Leucócitos (k/uL)	9,5 ± 0,31	10,5 ± 0,21	<0,001	9,1 ± 0,81	10,3 ± 0,60	0,24
Hb F (%)	9,36 ± 0,57	5,11 ± 0,30	<0,001	10,1 ± 0,79	4,8 ± 0,61	<0,001
LDH (U/L)	881 ± 34,3	1035 ± 58,3	0,01	890 ± 69,5	1031 ± 101,1	0,56
BT (mg/dL)	2,65 ± 0,15	3,57 ± 0,17	<0,001	2,79 ± 0,32	3,22 ± 0,27	0,31
Reticulócitos (%)	8,84 ± 0,31	8,85 ± 0,31	0,98	8,83 ± 0,59	8,86 ± 0,65	0,96
VCM (fL)	96,2 ± 1,05	86,1 ± 0,59	<0,001	96,8 ± 2,27	85,6 ± 1,10	<0,001

Valores expressos em média ± erro padrão. GR: glutationa redutase, GPx: glutationa peroxidase, GST: glutationa S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. LDH: lactato desidrogenase. BT: bilirrubina total. VCM: volume corpuscular médio

Para o polimorfismo no gene *TGFB1*, em ambos os conjuntos de genótipos, os valores de Hb F e VCM foram maiores nos pacientes que faziam o uso de HU comparados aos pacientes que não usavam a HU ($p < 0,001$); e os valores de bilirrubina total foram menores nesse mesmo grupo que faziam o uso de HU ($p < 0,05$). Ainda sobre esse polimorfismo, os pacientes com o genótipo homozigoto normal para a mutação (CC) e que faziam o uso de HU, apresentaram menores valores de, aproximadamente, 18% nos valores de TBARS e de 12,5% na contagem de leucócitos, quando comparados com os pacientes com o mesmo genótipo, porém sem o uso de HU (Tabela 16).

Tabela 16 – Influência da hidroxiureia nos marcadores bioquímicos e hematológicos associada ao polimorfismo -509C/T do gene *TGFB1*.

Marcadores	<i>TGFB1</i>					
	CC		valor p	CT/TT		valor p
	C/HU (n=97)	S/HU (n=160)		C/HU (n=101)	S/HU (n=132)	
Catalase (U/mL)	4114,9 ± 161,6	4031,4 ± 113,2	0,66	3836,1 ± 154,5	4088,7 ± 172,3	0,37
GR (U/mL)	0,79 ± 0,1	0,78 ± 0,1	0,75	0,79 ± 0,1	0,81 ± 0,1	0,87
GPx (U/mL)	0,95 ± 0,1	1,08 ± 0,1	0,20	1,05 ± 0,1	1,06 ± 0,1	0,49
GST (U/mL)	0,94 ± 0,1	0,88 ± 0,1	0,29	0,91 ± 0,1	0,81 ± 0,1	0,42
TBARS (ng/mL)	2228 ± 183	2713 ± 159	0,04	2501 ± 162	2575 ± 176	0,75
Leucócitos (k/uL)	9,1 ± 0,41	10,4 ± 0,25	<0,001	9,2 ± 0,70	10,4 ± 0,33	0,16
Hb F (%)	9,91 ± 0,75	4,97 ± 0,37	<0,001	10,1 ± 0,79	5,1 ± 0,41	<0,001
LDH (U/L)	849 ± 36,9	1033 ± 83,0	0,09	914 ± 48,5	1037 ± 52,1	0,09
BT (mg/dL)	2,65 ± 0,48	3,35 ± 0,17	0,01	2,70 ± 0,18	3,70 ± 0,23	<0,001
Reticulócitos (%)	8,70 ± 0,39	8,72 ± 0,37	0,96	8,90 ± 0,40	9,01 ± 0,43	0,94
VCM (fL)	98,3 ± 1,35	85,3 ± 0,74	<0,001	94,3 ± 1,31	86,7 ± 0,73	<0,001

Valores expressos em média ± erro padrão. GR: glutationa redutase, GPx: glutationa peroxidase, GST: glutationa S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. LDH: lactato desidrogenase. BT: bilirrubina total. VCM: volume corpuscular médio

Os pacientes que faziam uso de HU, em ambos os genótipos para o polimorfismo no gene *GSTP1*, apresentaram valores médios de Hb F e do VCM maiores do que os pacientes que não usavam a HU ($p < 0,05$). Também foi observado, em ambos os genótipos, menores valores de leucócitos e de bilirrubina total nos pacientes que usavam a HU ($p < 0,05$). Os pacientes homozigotos normais para essa mutação e que faziam o uso de HU, tiveram valores de LDH menores do que os pacientes com o mesmo genótipo, porém sem o uso de HU ($p < 0,05$).

Tabela 17 – Influência da hidroxiureia nos marcadores bioquímicos e hematológicos associada ao polimorfismo 303A/G do gene *GSTP1*.

Marcadores	<i>GSTP1</i>					
	AA		valor p	AG/GG		valor p
	C/HU (n=98)	S/HU (n=145)		C/HU (n=101)	S/HU (n=132)	
Catalase (U/mL)	3878,3 ± 160,8	3996,7 ± 147,5	0,59	4065,1 ± 155,9	4117,7 ± 133,6	0,80
GR (U/mL)	0,75 ± 0,1	0,75 ± 0,1	0,87	0,83 ± 0,1	0,84 ± 0,1	0,89
GPx (U/mL)	1,14 ± 0,1	1,05 ± 0,1	0,27	0,99 ± 0,1	0,95 ± 0,1	0,68
GST (U/mL)	0,99 ± 0,1	1,03 ± 0,1	0,56	0,79 ± 0,1	0,87 ± 0,1	0,19
TBARS (ng/mL)	2393 ± 184	2643 ± 155	0,30	2343 ± 163	2659 ± 173	0,49
Leucócitos (k/uL)	8,9 ± 0,31	10,3 ± 0,28	0,002	9,9 ± 0,49	10,7 ± 0,30	0,002
Hb F (%)	10,34 ± 0,74	4,92 ± 0,39	<0,001	8,8 ± 0,67	5,2 ± 0,38	<0,001
LDH (U/L)	886 ± 41,5	1103 ± 93,9	0,04	879 ± 45,2	968 ± 41,8	0,15
BT (mg/dL)	2,65 ± 0,18	3,62 ± 0,21	<0,001	2,69 ± 0,21	3,38 ± 0,19	0,02
Reticulócitos (%)	8,49 ± 0,39	8,82 ± 0,41	0,53	9,18 ± 0,41	8,89 ± 0,39	0,61
VCM (fL)	96,1 ± 1,44	86,5 ± 0,72	<0,001	96,5 ± 1,31	85,4 ± 0,76	<0,001

Valores expressos em média ± erro padrão. GR: glutationa redutase, GPx: glutationa peroxidase, GST: glutationa S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. LDH: lactato desidrogenase. BT: bilirrubina total. VCM: volume corpuscular médio

Para o polimorfismo no gene da *NOS3*, tanto os pacientes homozigotos normais quanto os pacientes heterozigotos/homozigotos mutantes, apresentaram o mesmo comportamento dos marcadores avaliados. Os valores de Hb F e do VCM foram maiores nos pacientes que faziam o uso de HU comparados com aqueles que não faziam o uso ($p < 0,05$); e os valores médios de bilirrubina total e do número total de leucócitos foram menores nos pacientes que faziam o uso de HU ($p < 0,05$). (Tabela 18).

Tabela 18 – Influência da hidroxiureia nos marcadores bioquímicos e hematológicos associada ao polimorfismo -786T/C do gene *NOS3*.

Marcadores	<i>NOS3</i>					
	<i>TT</i>		valor <i>p</i>	<i>CT/CC</i>		valor <i>p</i>
	C/HU (n=116)	S/HU (n=178)		C/HU (n=82)	S/HU (n=114)	
Catalase (U/mL)	4102,3 ± 150,8	4092,0 ± 132,6	0,96	3789,3 ± 165,9	4001,0 ± 148,5	0,34
GR (U/mL)	0,82 ± 0,1	0,77 ± 0,1	0,44	0,76 ± 0,1	0,82 ± 0,1	0,55
GPx (U/mL)	1,00 ± 0,1	0,98 ± 0,1	0,72	1,16 ± 0,1	1,04 ± 0,1	0,85
GST (U/mL)	0,85 ± 0,1	0,94 ± 0,1	0,07	0,96 ± 0,1	0,97 ± 0,1	0,98
TBARS (ng/mL)	2467 ± 167	2711 ± 160	0,72	2227 ± 178	2556 ± 158	0,17
Leucócitos (k/uL)	9,5 ± 0,40	10,5 ± 0,30	0,03	9,2 ± 0,40	10,5 ± 0,30	0,01
Hb F (%)	8,96 ± 0,61	4,84 ± 0,35	<0,001	10,38 ± 0,85	5,37 ± 0,43	<0,001
LDH (U/L)	902 ± 41,7	1035 ± 77,4	0,23	954 ± 44,9	1027 ± 56,4	0,76
BT (mg/dL)	2,85 ± 0,19	3,50 ± 0,18	0,02	2,42 ± 0,19	3,50 ± 0,21	<0,001
Reticulócitos (%)	8,76 ± 0,37	8,34 ± 0,43	0,44	8,95 ± 0,43	9,56 ± 0,43	0,33
VCM (fL)	95,5 ± 1,28	85,3 ± 0,72	<0,001	97,4 ± 1,41	86,9 ± 0,72	<0,001

Valores expressos em média ± erro padrão. GR: glutationa redutase, GPx: glutationa peroxidase, GST: glutationa S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. LDH: lactato desidrogenase. BT: bilirrubina total. VCM: volume corpuscular médio

O polimorfismo envolvido no gene *GSTT1*, quando presente em pacientes que faziam o uso de HU, ou seja, quando o alelo era nulo para o gene, apresentaram a porcentagem de reticulócitos e atividade da GST, maiores do que os pacientes do mesmo genótipo e sem o uso de HU ($p < 0,05$). Além disso, a presença ou ausência da nulidade para o *GSTT1* repercutiu nos pacientes em uso de HU valores maiores de Hb F e do VCM ($p < 0,05$), porém, nos homocigotos normais em uso de HU observamos valores de BT menores do que aqueles pacientes que não usavam a HU, Tabela 19.

Tabela 19 – Influência da hidroxiureia nos marcadores bioquímicos e hematológicos associada ao polimorfismo no gene *GSTT1*.

Marcadores	<i>GSTT1</i>					
	<i>Selvagem GSTT1</i>		valor <i>p</i>	<i>Nulo GSTT1</i>		valor <i>p</i>
	C/HU (n=85)	S/HU (n=116)		C/HU (n=31)	S/HU (n=62)	
Catalase (U/mL)	4002,3 ± 170,8	4012,0 ± 169,6	0,96	4377,3 ± 310,5	4243,9 ± 211,5	0,72
GR (U/mL)	0,74 ± 0,1	0,75 ± 0,1	0,84	1,05 ± 0,1	0,82 ± 0,1	0,03
GPx (U/mL)	0,99 ± 0,1	0,95 ± 0,1	0,66	1,03 ± 0,1	1,01 ± 0,1	0,91
GST (U/mL)	0,89 ± 0,1	0,94 ± 0,1	0,41	0,72 ± 0,1	0,95 ± 0,1	0,04
TBARS (ng/mL)	2301 ± 164	2668 ± 190	0,48	2922 ± 428	2791 ± 294	0,79
Leucócitos (k/uL)	9,7 ± 0,50	10,5 ± 0,36	0,21	9,1 ± 0,60	10,4 ± 0,42	0,07
Hb F (%)	9,03 ± 0,72	4,83 ± 0,42	<0,001	8,78 ± 1,16	4,85 ± 0,63	0,001
LDH (U/L)	860 ± 44,5	1083 ± 115,4	0,14	1019 ± 95,3	947 ± 54,1	0,47
BT (mg/dL)	2,71 ± 0,19	3,38 ± 0,21	0,01	3,25 ± 0,51	3,73 ± 0,37	0,45
Reticulócitos (%)	8,32 ± 0,45	8,77 ± 0,47	0,49	9,98 ± 0,57	7,55 ± 0,61	0,002
VCM (fL)	95,9 ± 1,61	85,9 ± 0,91	<0,001	94,3 ± 1,87	84,3 ± 1,18	0,001

Valores expressos em média ± erro padrão. GR: glutationa redutase, GPx: glutationa peroxidase, GST: glutationa S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. LDH: lactato desidrogenase. BT: bilirrubina total. VCM: volume corpuscular médio

Por fim, a atividade da enzima GST, a concentração de Hb F e os valores do VCM, nos pacientes que apresentaram o genótipo selvagem para o gene *GSTM1* e faziam o uso de HU, foram maiores do que nos pacientes com o mesmo genótipo, porém sem o uso de HU ($p < 0,05$). Ainda nesse grupo, os valores de leucócitos e de bilirrubina total foram menores do que nos pacientes sem o uso de HU ($p < 0,05$). Nos indivíduos nulos para esse gene e que faziam o uso de HU, tiveram valores médios de Hb F e VCM maiores do que os pacientes sem o uso de HU.

Tabela 20 – Influência da hidroxureia nos marcadores bioquímicos e hematológicos associada ao polimorfismo no gene *GSTM1*.

Marcadores	<i>GSTM1</i>					
	<i>Selvagem GSTM1</i>		valor <i>p</i>	<i>Nulo GSTM1</i>		valor <i>p</i>
	C/HU (n=68)	S/HU (n=121)		C/HU (n=48)	S/HU (n=57)	
Catalase (U/mL)	4036,7 ± 193,7	4021,1 ± 143,3	0,94	4195,3 ± 239,5	4245,9 ± 281,5	0,89
GR (U/mL)	0,78 ± 0,1	0,74 ± 0,1	0,57	0,87 ± 0,1	0,85 ± 0,1	0,46
GPx (U/mL)	0,99 ± 0,1	0,93 ± 0,1	0,49	1,01 ± 0,1	1,07 ± 0,1	0,65
GST (U/mL)	0,85 ± 0,1	0,99 ± 0,1	0,04	0,84 ± 0,1	0,85 ± 0,1	0,84
TBARS (ng/mL)	2540 ± 200	2597 ± 180	0,84	2364 ± 289	2954 ± 321	0,18
Leucócitos (k/uL)	10,1 ± 0,58	10,6 ± 0,31	0,01	8,9 ± 0,48	10,1 ± 0,57	0,11
Hb F (%)	9,05 ± 0,87	4,61 ± 0,40	<0,001	8,84 ± 0,82	5,33 ± 0,69	0,001
LDH (U/L)	914 ± 61,7	1051 ± 109,4	0,31	886 ± 50,6	1004 ± 81,6	0,61
BT (mg/dL)	2,66 ± 0,22	3,49 ± 0,23	0,004	3,12 ± 0,35	3,52 ± 0,33	0,41
Reticulócitos (%)	9,20 ± 0,45	8,37 ± 0,45	0,25	8,15 ± 0,46	8,28 ± 0,67	0,75
VCM (fL)	96,1 ± 1,72	85,2 ± 0,86	<0,001	94,6 ± 1,91	85,7 ± 1,34	0,001

Valores expressos em média ± erro padrão. GR: glutatona redutase, GPx: glutatona peroxidase, GST: glutatona S-transferase. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. LDH: lactato desidrogenase. BT: bilirrubina total. VCM: volume corpuscular médio

Discussão

6. DISCUSSÃO

As evidências clínicas e epidemiológicas da doença falciforme, não nos deixam dúvidas de que essa afecção genética tem um grande impacto na morbimortalidade da população acometida pela doença, sendo reconhecidamente um grave problema de saúde pública mundial (POWARS, 1975; LOBO, 2010; AYGUN; ODAME, 2012).

No Brasil esse cenário não é diferente, as complicações clínicas são heterogêneas e a doença atinge cerca de 25.000 a 30.000 pessoas, estimando 7.200.000 indivíduos heterozigotos para a mutação da Hb S (CANÇADO; JESUS, 2007; SIMOES et al., 2010). Diante disso, vários estudos têm sido elaborados envolvendo desde a identificação desses portadores, pelo programa brasileiro de triagem neonatal, até recursos terapêuticos dirigidos à prevenção e tratamento das complicações da doença.

O nosso estudo vem ao encontro desses paradigmas da DF, tendo como foco principal, a associação de polimorfismos genéticos, envolvidos na fisiopatologia da DF, com a resposta da hidroxúria perante os diferentes marcadores bioquímicos.

Inicialmente, pensamos em uma forma de reunir todas as variáveis clínicas e laboratoriais dos indivíduos e estabelecer potenciais preditores da gravidade da DF, dessa forma, grupos com características clínicas em comum seriam formados e, assim, poderíamos identificar variações genéticas que possivelmente afetariam a gravidade da doença, bem como, a resposta ao uso de HU nesses grupos homogêneos.

Um impedimento para atingir esse objetivo seria integrar as várias dimensões clínicas e laboratoriais da doença em uma única medida sintética da gravidade por meio de métodos estatísticos tradicionais. Para solucionar esse impasse, Sebastiani e colaboradores (2007) desenvolveram um modelo de previsão da gravidade da doença usando uma abordagem de modelagem de rede Bayesiana, em que o risco de mortalidade em cinco anos foi projetado como um escore de gravidade, porém os dados sobre os pacientes foram derivados de residentes dos Estados Unidos e a aplicação desta ferramenta em indivíduos de outras populações, como a do Brasil, não foram testados (SEBASTIANI et al., 2007). Neste sentido,

realizamos o primeiro estudo brasileiro que avaliou a viabilidade de uso da “calculadora de gravidade da doença falciforme” para estimar os escores de gravidade e classificar os pacientes em categorias fenotípicas.

Para a validação, realizamos várias comparações que envolveram grupos de idade, genótipo da DF, uso de HU e variáveis clínicas para a classificação dos fenótipos.

O primeiro ponto positivo da validação pela calculadora envolveu os grupos de idade associados ao uso de HU. Os grupos em uso de HU mostraram variação em alguns marcadores laboratoriais como o aumento do VCM e da concentração de Hb F, bem como, a diminuição da quantidade de leucócitos e dos níveis de bilirrubina total. Além disso, avaliamos o escore de gravidade, em um grupo de 72 pacientes, antes e após o uso de HU e verificamos que o escore de gravidade diminuiu significativamente na avaliação pós uso de HU. Os efeitos benéficos da HU observados em nossas avaliações e, também, observações de outros estudos como o aumento da hemoglobina, diminuição de marcadores de hemólise, menor incidência de algumas complicações clínicas e maior sobrevida dos pacientes, já foram bem caracterizadas em estudos de seguimento de pacientes em uso de HU por muitos anos (HALSEY; ROBERTS, 2003; STEINBERG et al., 2010; NOURAIE et al., 2013; LOBO et al., 2013).

Outra consideração importante foi extraída da avaliação dos escores de gravidade em função dos grupos de idade. Conseguimos demonstrar, por diferentes análises, que a calculadora foi sensível para o quesito idade. A relação entre o aumento do risco de morte com o aumento da idade, está de acordo com o que tem sido documentado, pois com mais idade acumulam-se efeitos deletérios da doença e suas sequelas, permitindo traçar a história natural da DF (SERJEANT, 1995; FRENETTE; ATWEH, 2007a; SERJEANT, 2013). Observamos que 90% dos pacientes acima de 40 anos, apresentaram escores de gravidade acima de 0,5, ou seja, dentro dos próximos cinco anos, 90% dos pacientes tem 50% de chance de morte. Acreditamos que essa gravidade pode ser consequência de dois fatores, um seria a conduta e diagnóstico da doença que ainda estava em processo de aperfeiçoamento no Brasil em décadas passadas, e o outro fator seria o pouco conhecimento da própria fisiopatologia e tratamento da doença em tempos passados (SERJEANT, 2000).

Quando separamos os pacientes de acordo com o genótipo da DF, a média dos escores de gravidade nos indivíduos com Hb SS foi 1,3 vezes maior do que no grupo Hb SC. Pacientes duplo heterozigotos para a Hb SC são geralmente menos graves do que os indivíduos com Hb SS e Hb S/Beta⁰-talassemia (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Em média, os indivíduos com a doença Hb SC têm metade do número de episódios dolorosos do que os pacientes com Hb SS, ocorrência de AVC é menos frequente e as úlceras de perna são raras (CAMERON et al., 1983; KOSHY et al., 1989; STEINBERG, 2008). Deste modo, a calculadora de gravidade demonstrou sensibilidade para os escores nos genótipos da DF avaliados.

Após a elaboração das faixas de escores, que caracterizaram as classes de fenótipos, verificamos que existe uma associação entre o fenótipo grave e AVC, úlceras de perna, complicações cardíacas e pacientes em regime de transfusão de sangue. Além disso, as crises de dor de 3-5 por pessoa/ano e necrose avascular foram as ocorrências mais frequentes em indivíduos com os fenótipos intermediários e graves, quando comparado com o fenótipo leve. Isto demonstra que os critérios estabelecidos para as classes de fenótipos, por meio dos escores da calculadora, foram satisfatórios, pois a gravidade da DF é baseada no número de episódios de dor, frequência de internações hospitalares, priapismo, história de AVC, síndrome torácica aguda ou sepse, úlceras crônicas de perna, hipertensão pulmonar, insuficiência renal e necrose avascular dos ossos (PLATT et al., 1991; WALTERS et al., 1996).

Os poucos estudos envolvendo a DF e escores da calculadora de gravidade, mostraram valores médios de escores mais baixos do que os encontrados em nosso estudo. Anoop e colaboradores (2009) demonstraram, em pacientes acima de 18 anos classificados quanto à gravidade por hematologistas, escores de 0,182, 0,19 e 0,866 para os fenótipos leve, intermediário e grave, respectivamente. Os pacientes nessa faixa de idade apresentaram menores frequências de osteonecrose, STA e AVC em comparação com pacientes brasileiros da mesma idade por nós avaliados (ANOOP; BEVAN; CHAKRABARTI, 2009). Pacientes maiores que 21 anos do Centro Médico de Boston tiveram os seguintes escores de gravidade: fenótipo leve (0,16), fenótipo intermediário (0,28) e grave (0,95) (SEBASTIANI et al., 2007). Estes resultados mostram que, independentemente da forma de categorizar os fenótipos, os pacientes brasileiros têm maiores escores médios, ou seja, apresentam uma clínica mais grave, que pode ser decorrente de outros fatores, principalmente os

genéticos, como por exemplo, haplótipos do gene β^S (OKUMURA; LOBO; BONINI-DOMINGOS, 2013).

Os resultados obtidos por meio das análises de correlação permitiu-nos verificar que a gravidade da doença está associada com a diminuição da hemoglobina e do hematócrito. Baixos valores de hemoglobina, geralmente, estão ligados com pior prognóstico da DF e com aumento do risco de complicações específicas da doença (CAMERON et al., 1983; BALLAS, 1998; KATO et al., 2006; BALLAS et al., 2010a). Nas análises com todos os pacientes, os coeficientes de correlação não foram altos. Quando removemos o grupo entre 5 a 17 anos, os coeficientes de correlação aumentaram e outras variáveis tornaram-se estatisticamente significantes. Além disso, encontramos evidências de que a gravidade da DF está associada com o aumento de leucócitos, reticulócitos, bilirrubina total, LDH e Hb S. Todos estes marcadores estão associados com a gravidade da doença. Por exemplo, o aumento de leucócitos tem sido correlacionado com o aumento da frequência de crises de dor (PLATT et al., 1991), aumento do risco do AVE hemorrágico (OHENE-FREMPONG et al., 1998) e morte precoce (PLATT et al., 1994); aumento de LDH, bilirrubina e reticulócitos são indicadores laboratoriais de anemia hemolítica crônica (WEST et al., 1992; STEINBERG, 2008; BALLAS, 2013), e o aumento da concentração de Hb S propicia o processo de polimerização, sob condições específicas (VEKILOV, 2007; KATO et al., 2009).

As análises de correlação e comparações de manifestações clínicas em diferentes grupos ajudaram a validar a ferramenta. Para complementar este estudo seria importante a classificação dos fenótipos dos pacientes por hematologistas, para, em seguida, realizar comparações entre o escore de gravidade e as variáveis estudadas. Além disso, o grupo de pacientes entre 5 a 17 anos merecem mais atenção, pois a calculadora de gravidade não contém variáveis clínicas e laboratoriais específicas para esta faixa de idade, o que pode comprometer o cálculo do escore de gravidade. Nos pacientes classificados como fenótipo intermediário não encontramos correlações significativas como nas outras duas classes de fenótipos (leve e grave). Uma subdivisão do fenótipo intermediário poderia ser realizada, atribuindo outros critérios de classificação, pois neste grupo encontramos pacientes com características hematológicas e bioquímicas muito heterogêneas, o que pode ter influenciado nas correlações não significativas.

Considerando a avaliação dos polimorfismos, observamos que a frequência da mutação -308G/A no gene *TNFA*, encontrada nesse estudo, está de acordo com o trabalho que publicamos recentemente, demonstrando que as frequências obtidas foram semelhantes aos resultados de outros estudos no Brasil envolvendo pacientes com DF (TORRES et al., 2013), bem como, outros estudos para a população brasileira sem hemoglobinopatias (CAJADO et al., 2010).

Sabemos que o TNF alfa é uma citocina que desempenha papel importante na via de sinalização da inflamação e resposta imune, e que a variação nessa via pode modificar a gravidade da DF por meio de alterações no endotélio vascular, porém, os resultados de estudos envolvendo esse polimorfismo são controversos (DWORKIS et al., 2011). O polimorfismo no gene *TNFA* não apresentou associação com as manifestações clínicas estudadas nesse trabalho. Vicari e colaboradores (2011), avaliando pacientes brasileiros adultos com anormalidades cérebro vasculares, também, não encontraram associação do polimorfismo com esse fenótipo (VICARI et al., 2011). Ainda no Brasil, Cajado e colaboradores (2011) encontraram risco aumentado de 4,6 vezes na ocorrência de sequestro esplênico em pacientes com AF que herdavam o polimorfismo mutante (CAJADO et al., 2011). Em 2004 e, posteriormente, em 2007, outro grupo, porém dos Estados Unidos, demonstrou que o alelo mutante seria o responsável pela proteção contra o AVC em crianças com AF (HOPPE et al., 2004; HOPPE et al., 2007).

Com relação ao polimorfismo -509C/T no gene *TGFB1*, não temos estudos brasileiros que fizeram a associação desse SNP com a manifestação clínica em pacientes com a DF, portanto, buscamos resultados em outros estudos e verificamos que as frequências não diferiram das encontradas para os indivíduos com hipodontia (PERES et al., 2004), com asma (DE, I et al., 2008) e para a população geral do Brasil (DE SOUZA et al., 2003). Em nosso trabalho, os achados com significância estatística para esse polimorfismo referem-se ao efeito protetor que o alelo mutante apresentou em relação à ocorrência de retinopatia e de priapismo. Dentre as inúmeras funções desempenhadas pelo TGF-beta, destacam-se duas que poderiam justificar essa resposta: a estimulação da angiogênese e o controle da expressão de proteínas de matriz extracelular. A formação de novos vasos é um efeito já bem conhecido do TGF-beta e bastante estudado em pacientes com câncer, no que diz respeito à progressão tumoral (MASSAGUE, 1990; GUAN et al., 2009). Outro estudo também encontrou a ação protetora do alelo mutante em doentes falciformes

demonstrando efeito protetor para o desenvolvimento de necrose de fêmur e úmero (TORRES, 2012).

O polimorfismo -786T/C no gene *NOS3* mostrou efeito protetor para a ocorrência de STA e de úlceras de perna nos pacientes do nosso estudo. Os poucos trabalhos envolvendo a associação desse polimorfismo com a DF são controversos. Vargas e colaboradores (2005) não encontraram nenhuma associação do SNP com as complicações de pacientes do Brasil, porém, as frequências alélicas são semelhantes as que encontramos em nosso estudo (VARGAS et al., 2005).

Um estudo norte americano demonstrou que pacientes do gênero feminino com a mutação -786T/C foram mais suscetíveis à ocorrência de STA, mas a frequência do alelo mutante foi de 0,09 em uma amostra de 87 pacientes, ou seja, uma frequência bem menor do que a que encontramos nos nossos pacientes, sendo de 0,22 (SHARAN et al., 2004). Outro estudo mostrou que o alelo mutante, em pacientes provenientes da Índia, foi associado com o fenótipo mais grave da doença, no entanto, a frequência do alelo mutante para essa população foi de 0,4, sendo mais frequente do que no nosso trabalho (NISHANK et al., 2013). Por fim, Char e colaboradores (2006) encontraram diminuição do risco de STA em crianças com a presença do polimorfismo, e assim corroboramos com os resultados (CHAAR et al., 2006). Faltam estudos sobre a relação do polimorfismo -786T/C com os níveis de metabólitos de ON (nitrito/nitrato) na DF. A relação funcional do polimorfismo com os metabólitos foi estudada em pacientes sem a DF, porém com osteonecrose, hipertensão e doença coronária, e os resultados foram contraditórios, não conclusivos sobre a influência do polimorfismo no aumento ou diminuição da síntese de ON (YOON et al., 2000; AFRASYAP; OZTURK, 2004).

Para o polimorfismo 303A/G do gene da *GSTP1* não encontramos associações significativas da mutação com os eventos clínicos da DF. As frequências encontradas para esse polimorfismo se assemelham aos de outro trabalho realizado com voluntários sem hemoglobinopatias, residentes no Rio de Janeiro (ROSSINI et al., 2002). Na literatura, os principais trabalhos com esse polimorfismo estão associados a estudos com câncer, sendo que, muitos deles, relacionam a presença do polimorfismo à resistência a drogas e ao risco associado de desenvolvimento de alguns tipos de tumores (MO et al., 2009; PARKER et al., 2011), enquanto que, para a DF, existe somente um trabalho, inclusive do nosso grupo, demonstrando maior frequência do homocigoto mutante em pacientes com

DF quando comparados com o grupo controle e associação do polimorfismo com o aumento da glutatona reduzida (SILVA et al., 2011)

As frequências dos genótipos nulos para o gene *GSTM1* e *GSTT1*, em nosso estudo, foram semelhantes aos valores encontrados em um estudo com quatro populações afrodescendentes do Distrito Federal (HIRAGI et al., 2007). Outro estudo realizado na população brasileira mostrou que as frequências desses polimorfismos variam entre os grupos étnicos, sendo que a nulidade do *GSTM1* na população de etnia africana foi semelhante com os nossos dados (ARRUDA et al., 1998).

Estudos envolvendo pacientes com DF e os polimorfismos da *GSTM1* e *GSTT1* são escassos. Os existentes demonstraram, em uma população do Egito, maior frequência dos genótipos nulos comparados com aos de nosso estudo, porém sem associação da presença da mutação com características laboratoriais e manifestações clínicas da DF (RARAB; BOTHINA, 2013); em uma população indiana, na presença do genótipo nulo da *GSTM1* não foi observado diferenças dos valores de ferritina entre pacientes e grupo controle (SANJAY et al., 2012).

No Brasil, De Oliveira-Filho e colaboradores (2013) demonstraram, em pacientes com DF do Pernambuco, frequência dos polimorfismos semelhante ao de nosso estudo, além disso, encontraram associações do genótipo nulo da *GSTT1* com maior ocorrência de STA e osteonecrose, e do genótipo nulo da *GSTM1* com maior chance de desenvolver AVC, STA, úlceras maleolares e osteonecrose (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2013). Outro estudo, também do Brasil e do nosso grupo de pesquisa, envolvendo pacientes de São José do Rio Preto-SP e do Rio de Janeiro-RJ, mostrou que a frequência do genótipo nulo para *GSTT1* foi quase o dobro quando comparada com o estudo atual, e a frequência do genótipo nulo para *GSTM1* foi menor do que a por nós encontrada (SILVA et al., 2011). No nosso estudo, somente os pacientes com o genótipo nulo para a *GSTM1* apresentaram maior chance de ocorrência de priapismo. Em modelos animais submetidos ao priapismo, existe aumento do estresse oxidativo em que a atividade da GST é aumentada como resposta a neutralização de xenobióticos, por exemplo, a morfina (KANIKI; MELMAN; DAVIES, 2010). Na presença do genótipo nulo, a atividade da GST é prejudicada, podendo assim, aumentar o quadro de estresse oxidativo que, de certa forma, desencadeia a degradação de proteínas aumentando a fibrose do tecido peniano (FRIGUET, 2006).

A discrepância de resultados de associação pode ser decorrente a diversos fatores, tais como o tamanho das amostras, heterogeneidade étnica e fatores ambientais específicos para a população de estudo. Além disso, algumas considerações para associações fidedignas de fenótipo/genótipo devem ser seguidas, tais como: definições corretas das complicações clínicas, estimativa de herdabilidade, conhecimento de poder estatístico, controle da sobrecarga de hipóteses múltiplas e de outras variáveis de confusão, por exemplo, a estratificação da população, miscigenação e acesso a amostras independentes para a replicação de associações (LETTRE, 2012)

A avaliação dos marcadores de estresse oxidativo mostrou que a idade teve influência em alguns parâmetros como a catalase, GR e GST. De acordo com a teoria do envelhecimento, causada por radicais livres, espera-se um declínio geral da capacidade de defesa antioxidante celular em pessoas mais velhas, porém existem na literatura resultados divergentes sobre esse assunto (ALLESSIO; HAGERMAN, 2006). Faizal e colaboradores (2012) encontraram em indivíduos em bom estado de saúde, de 18 a 30 anos, maior atividade da catalase e maiores valores de antioxidantes não enzimáticos comparados com indivíduos acima de 50 anos (FAIZAL et al., 2013). Outro estudo demonstrou que pacientes com a DF entre 20 e 40 anos apresentaram valores de metabólitos de NO maiores do que os indivíduos entre 60 a 70 anos de idade (SARKAR et al., 2011). Em pacientes com DF menores do que seis anos, as atividades da GR e da SOD foram maiores do que em pacientes acima de seis anos de idade (RUSANOVA et al., 2010).

A maior atividade da catalase e GR, e menor atividade da GST no grupo entre 5 a 17 anos pode estar relacionada com a gravidade da doença, pois encontramos o mesmo comportamento em indivíduos com o fenótipo leve e, quando comparamos com o grupo de referência, as atividades da catalase e GR são mais altas e a atividade da GST é mais baixa.

A maior atividade da catalase foi encontrada nas seguintes observações: grupo de referência quando comparados com os pacientes com a DF, no fenótipo leve quando comparado com os outros fenótipos, e nos indivíduos com Hb SC quando comparados com os Hb SS. Esses resultados nos permitem inferir que o aumento na atividade da catalase diminui a gravidade da doença, além disso, houve uma relação entre o aumento da catalase e a diminuição dos escores de gravidade. Entretanto, existe na literatura discrepância entre os níveis da catalase na DF.

Alguns estudos têm mostrado resultados semelhantes aos nossos em ratos transgênicos com a DF (DASGUPTA; HEBBEL; KAUL, 2006) e também em pacientes com DF (ALSULTAN et al., 2010; SILVA et al., 2011). Por outro lado, outros estudos observaram aumento dos níveis de catalase em pacientes com a DF (DAS; NAIR, 1980; MANFREDINI et al., 2008). O aumento da catalase pode ser um efeito protetor para eliminar H_2O_2 , enquanto que os níveis diminuídos podem ser devido ao estresse oxidativo esmagador e crônico que consome a catalase produzida (CHIRICO; PIALOUX, 2012). Outra hipótese fundamenta-se no fato de que os níveis elevados de enzimas antioxidantes em eritrócitos falciformes também pode ser uma consequência do maior teor de reticulócitos no sangue dos pacientes com DF (SILVA et al., 2013).

A GPx é uma importante enzima intracelular, que possui selênio em seu sítio ativo, utilizando GSH como cosubstrato para a redução de H_2O_2 e peróxidos lipídicos, diminuindo a disponibilidade desses compostos no organismo (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011). A atividade da GPx nos pacientes com DF do nosso estudo foi menor do que no grupo de referência. Outros estudos também demonstraram valores reduzidos da atividade de GPx em pacientes quando comparados com indivíduos sem a doença (NATTA; CHEN; CHOW, 1990; REID et al., 2006; ALSULTAN et al., 2010), e ainda, com relação direta com a gravidade da doença (DASGUPTA; HEBBEL; KAUL, 2006). Por outro lado, Gizi e colaboradores (2011) relataram maior atividade da GPx nos pacientes em relação ao grupo controle (GIZI et al., 2011). Partindo do mesmo raciocínio utilizado para a catalase, o aumento da atividade da GPx, em pacientes com DF, pode ser decorrente do aumento de H_2O_2 produzido pela SOD, na neutralização dos superóxidos, e pelo o aumento de peróxidos lipídicos provenientes do dano da camada lipídica celular.

A atividade da GR nos pacientes do nosso grupo foi menor do que os valores de referência. Essa observação é condizente com a associação do fenótipo da doença, em que o fenótipo mais grave tem menor atividade da GR. Além disso, foi demonstrado que quando a atividade da GR diminui os escores de gravidade tendem a aumentar. A GR é uma enzima chave para a reciclagem da glutathiona, da forma oxidada para a forma reduzida, utilizando elétrons do NADPH. Dessa forma, libera quantidades de GSH para outras enzimas atuarem na capacidade antioxidante, por exemplo, as GST, GPx e glutaredoxinas. Os trabalhos existentes na literatura, envolvendo a GR e a DF, demonstraram resultados semelhantes aos

nossos, até mesmo em relação à gravidade e a atividade da GR (EL-HAZMI; WARZY, 1985; ADELEKAN; THURNHAM; ADEKILE, 1989; RUSANOVA et al., 2010).

A atividade da GST nos pacientes com DF foi mais alta do que no grupo de referência. Nos estudos de Ezeiruaku e colaboradores (2011) e Anosike e colaboradores (1991), foram encontrados resultados diferentes do nosso demonstrando que os indivíduos com Hb AA apresentam cerca de, aproximadamente, 3,2 e 5,4 vezes mais atividade da GST quando comparados com os indivíduos Hb SS (ANOSIKE et al., 1991; EZEIRUAKU; EZE; UKAJI, 2011). Sugere-se que esse aumento da GST na DF pode ser decorrente da atividade de metabolização de xenobióticos provenientes de medicamentos que contém em sua composição morfina e acetaminofeno (ISHIDA et al., 1989; TODAKA et al., 2005; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Mesmo excluindo os pacientes que fizeram o uso de analgésicos nas últimas 24 horas antes da coleta, resquícios desses compostos poderiam estar presentes, aumentando, assim, a atividade da GST. Outra explicação sobre o aumento da GST consiste no excesso de produção de ERO, que existe na DF, uma vez que as GSTs também removem as ERO e regeneram grupos tiois em proteínas oxidadas (DUSINSKA et al., 2012). Essas observações reforçam o que encontramos para o fenótipo leve, em que a atividade da enzima foi menor do que nos outros fenótipos, demonstrando assim, que existe menor estresse oxidativo nesses pacientes e os valores da GST estão mais próximos aos encontrados para o grupo de referência. Para complementar, demonstramos que existe uma relação entre a atividade da GST e a gravidade da doença, ou seja, quanto maior atividade da GST maior a gravidade da doença.

Altos níveis de peroxidação lipídica têm sido amplamente descritos na DF (KLINGS; FARBER, 2001; WALTER et al., 2006; SHIMAUTI et al., 2010; RUSANOVA et al., 2010; SILVA et al., 2011; TORRES et al., 2012), pois os eritrócitos falciformes apresentam aumento endógeno de lipídio oxidado e também o aumento da susceptibilidade a peroxidação lipídica quando comparados com eritrócitos normais (RICE-EVANS; OMORPHOS; BAYSAL, 1986; JAIN et al., 1990; ESSIEN, 1994). Os marcadores de peroxidação lipídica avaliados nos pacientes do nosso grupo de estudo foram maiores do que os valores de referência, e nos pacientes com Hb SS os valores de TBARS foram maiores do que no grupo com Hb SC. Sabe-se que quanto maior a concentração de Hb S intra-eritrocitário maior a

geração de ERO e, conseqüentemente, maior peroxidação lipídica, explicando assim, o fato de os pacientes com Hb SS terem maior peroxidação lipídica. Além de peroxidação lipídica, o aumento do estresse oxidativo intra e extra eritrocitário induz à instabilidade da membrana com porcentagem elevada de exposição da fosfatidilserina (PS), contribuindo para a acelerada hemólise intravascular que impulsiona o aumento da geração de ERO (REPKA; HEBBEL, 1991; WOOD; GRANGER, 2007). Além disso, a externalização de PS na membrana dos eritrócitos pode atuar como superfície catalítica em que vários fatores de coagulação podem interagir resultando em um estado de hipercoagulabilidade (JAIN, 1985).

O processo repetido de polimerização/despolimerização da Hb S pode conduzir a um ciclo vicioso incitando adesão de células sanguíneas, hemólise, vaso-oclusão e a lesão por isquemia – reperfusão. Em outras palavras, as fontes múltiplas de processos pró-oxidantes tem como conseqüências estresse oxidativo crônico e sistêmico. Por este motivo, os agentes terapêuticos mais recentes que podem direcionar o estresse oxidativo, constituem valioso meio de prevenir ou retardar o desenvolvimento de complicações em órgãos. Os principais agentes oxidantes descritos na literatura podem ser observados em recentes revisões (NUR et al., 2011; CHIRICO; PIALOUX, 2012; SILVA et al., 2013).

A influência da mutação nos genes *GSTM1* e *GSTP1* sobre os marcadores de estresse oxidativo mostrou que a atividade da GST foi menor nos pacientes com a presença do polimorfismo. É descrito na literatura, que a presença dessas mutações nos genes da GSTs podem diminuir ou inibir totalmente a expressão de isoformas dessa enzima levando à inabilidade de determinadas células em metabolizar compostos tóxicos ao organismo (MO et al., 2009; GAO et al., 2010). Dessa forma, na DF, a diminuição da atividade dessas enzimas pode afetar alguns eventos fisiopatológicos agravando a clínica, como já discutimos anteriormente. Ainda foi possível observar que os pacientes com a mutação para o gene *GSTP1* apresentaram baixa atividade de GPx o que pode ser um fator desfavorável para a neutralização de peróxidos. A diminuição da GST provavelmente fez com que ocorresse sobrecarga de ERO, diminuindo assim, a atividade da Gpx.

A presença dos três polimorfismos das GSTs resultou em maior atividade da GR quando comparados com os indivíduos com genótipos normais para a *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTM1*. Uma vez que a atividade da GST foi prejudicada, devido à presença das mutações, a reciclagem da glutathiona torna-se mais ativa para que

outras enzimas, como a glutaredoxina e GPx, pudessem atuar de forma eficiente para recompor a capacidade antioxidante intraeritrocitária (VAN; VERHOEVEN; ROOS, 2013).

Atualmente, a HU, é a terapia modificadora da doença aprovada para DF, em que o aumento da síntese de Hb F é um dos múltiplos efeitos benéficos do uso da medicação. A expressão aumentada Hb F reduz vários biomarcadores de estresse oxidativo e diminui o sequestro do NO em camundongos com AF e pacientes com DF (ZIMMERMAN et al., 2004; KAUL et al., 2004; DASGUPTA; FABRY; KAUL, 2010; TORRES et al., 2012). Outros resultados também mostraram que o aumento da concentração de Hb F é diretamente proporcional ao aumento da atividade de CAT, dos níveis de GSH e diminuição da peroxidação lipídica. Assim, a Hb F reduz o número de crises vaso-oclusivas e parece reduzir a hemólise (RODGERS et al., 1990; CHARACHE et al., 1995; DASGUPTA; FABRY; KAUL, 2010; SILVA et al., 2011)

Diante disso, avaliamos a influência da HU nos marcadores de estresse oxidativo obedecendo as variáveis: idade, genótipo da DF, gênero e classes de fenótipos, e não encontramos nenhuma associação significativa entre essas variáveis e o uso de HU. Acreditamos que por ser um estudo com muitas variáveis independentes e que elas podem se relacionar e influenciar na resposta ao uso de HU, teríamos que utilizar outros testes estatísticos mais elaborados para auxiliar nessas respostas, como por exemplo, análises multivariadas, ou até mesmo estatística Bayesiana.

Quando avaliamos a influência da HU, diante da herança dos polimorfismos nos genes envolvidos na fisiopatologia da DF, verificamos que em todos os genótipos, independente da presença do polimorfismo, a concentração de Hb F e os valores de VCM aumentaram na presença da HU. Estudos têm demonstrado que os efeitos celulares e hematológicos da HU, são expressos dentro das primeiras semanas de uso, aumentando a quantidade de Hb, concentração de Hb F e VCM, porém em adultos esse aumento nem sempre é constante durante todo o tratamento, devido ao esgotamento da eritropoiese (BALLAS et al., 2010b; NEVES et al., 2012). O VCM e a Hb F tem sido utilizados, por alguns autores, para avaliar a ação biológica da HU e adesão do paciente ao tratamento, mas os mesmos alertam que a resposta não é universal e métodos alternativos para avaliar a adesão devem ser empregados (BRANDOW; PANEPINTO, 2011; CREARY et al., 2014). Sheehan

e colaboradores (2013) avaliaram a influência de alguns polimorfismos genéticos envolvidos na expressão de Hb F, na UDP- glicosiltransferase e deficiência de G6PD, na resposta ao uso de HU, e verificaram que os efeitos da HU são mais potentes do que a herança dos polimorfismos estudados (SHEEHAN et al., 2013)

Os pacientes com a mutação -308G/A no gene *TNFA* não responderam ao uso de HU para os marcadores avaliados, exceto para o VCM e Hb F já discutidos. Entretanto, diferente dos pacientes sem a mutação, a HU influenciou na diminuição dos valores de LDH, bilirrubina total e contagem de leucócitos. Relatos tem demonstrado que o polimorfismo na região promotora do gene aumenta a produção do TNF alfa (GONZALEZ et al., 2003; SALLAKCI et al., 2005; ALTARESCU et al., 2005). Associado a esse aumento, na DF estudos tem demonstrado que os níveis plasmáticos de TNF alfa são elevados (BANDEIRA et al., 2014; HYACINTH et al., 2014), portanto esses dois fatores culminam em uma produção exacerbada de TNF alfa gerando um pior prognóstico da doença e, possivelmente, influenciado na resposta ao uso de HU.

A resposta do uso de HU em relação ao gene *TGFB1*, mostrou que, independente da mutação, os valores de bilirrubina total diminuíram estatisticamente, porém, somente os valores de TBARS e a contagem de leucócitos diminuíram nos pacientes com o genótipo normal na presença da HU. Ao contrário do que encontramos para o alelo mutante, anteriormente discutido, o genótipo normal associado à HU apresentou melhor resposta do que o alelo mutante. Sabe-se que a presença da mutação -509C/T aumenta a produção de TGF-beta, e por ser uma citocina capaz de aumentar a adesão celular e recrutar moduladores inflamatórios para a circulação sanguínea, é esperado que os eventos vaso-oclusivos sejam acentuados, prejudicando assim, a resposta ao uso de HU para esse genótipo mutante (GRAINGER et al., 1999).

A resposta ao uso de HU, nos pacientes com o genótipo normal para a *GSTM1*, resultou na diminuição da atividade da GST, nos valores de bilirrubina e da contagem de leucócitos, sendo diferente do comportamento para o genótipo nulo em que não responderam ao uso de HU, exceto para os valores de Hb F e VCM. Como discutido anteriormente, a atividade elevada de GST estava relacionada com o aumento da gravidade da doença, entretanto, com a ausência da mutação e o uso de HU, a atividade da GST reduziu quase 1,2 vezes, demonstrando assim, que a HU também atua com propriedades antioxidantes. Essa observação já foi realizada em

outros estudos, em que a HU aumenta a capacidade antioxidante dos eritrócitos falciformes por induzir a expressão da GPx1, cuja atividade desempenha papel na redução da peroxidação lipídica da membrana, promovendo a estabilidade, e assim, provavelmente, reduzindo a hemólise (CHO et al., 2010). Em adição a esta observação, a HU pode proteger diretamente a membrana de eritrócitos quando expostos a agentes oxidantes reduzindo a peroxidação lipídica (AGIL; SADRZADEH, 2000). Ghatpande e colaboradores (2008) demonstraram, por meio de análise da membrana de eritrócitos falcêmicos, que o tratamento *in vitro* com HU aumentou a atividade das enzimas antioxidantes, como a catalase, tioredoxina peroxidase e flavina redutase, sugerindo uma resposta adaptativa do eritrócito ao dano oxidativo (GHATPANDE et al., 2008).

Além disso, a HU mostrou a capacidade de ser doadora de NO, baseada em relatos do aumento dos níveis de metabólitos do NO, bem como, no de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) em pacientes com DF dentro de 1 a 2 horas após a administração (GLADWIN et al., 2002; KING, 2004; HUANG; KIM-SHAPIRO; KING, 2004). Por reduzir sozinha a hemólise e a vaso-oclusão, a administração da HU poderia ter um grande impacto sobre o estresse oxidativo total na DF.

Por outro lado, a presença dos polimorfismos nos genes *NOS3*, *GSTT1* *GSTP1*, não influenciaram na resposta ao uso de HU, pois independente dos genótipos, os valores de LDH, leucócitos e bilirrubina total diminuíram estatisticamente. Além disso, os pacientes com o genótipo nulo para *GSTT1* em uso de HU a porcentagem de reticulócitos aumentou ao invés de diminuir. É importante notar que, em adição ao efeito de aumentar os níveis de HbF, a HU também pode reduzir marcadores de hemólise, aumentar a quantidade total de Hb, diminuir o número de reticulócitos e expressão de moléculas de adesão, entre outros (HILLERY et al., 2000; SCHNOG et al., 2004; COVAS et al., 2004).

Um total de 226 SNPs em 46 genes candidatos, com possíveis papéis na regulação da Hb F e no metabolismo da HU, foi estudado em 214 pacientes afro-americanos com AF em que os níveis de Hb F foram avaliados antes e após o tratamento com a HU. SNPs no citocromo P450, na família 2, subfamília C, polipeptídeo 9 (CYP2C9), um membro da família do citocromo P450 de enzimas que catalisam reações de metabolismo da droga, podem ter um papel importante no metabolismo de derivados da HU, e, aquaporina 9 (AQP9), um canal de membrana seletiva de água que estimula o transporte de ureia e permite a passagem de solutos

não carregadas, foram associados com a resposta da HbF com a HU. Vários genes podem provavelmente efetuar respostas de modo que suas interações e o valor preditivo de seus polimorfismos deverão ser modelados (STEINBERG, 2005b).

De forma geral, o estudo da resposta ao uso de HU envolvendo o perfil genético e marcadores de estresse oxidativo, na pessoa com DF, contribuiu para a avaliação da conduta terapêutica tendo como alvo minimizar o excesso de ERO e melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

Os pacientes com a doença falciforme e não portadores dos polimorfismos - 509C/T no gene *TGFB1*, -308G/A no gene *TNFA* e nulo para *GSTM1* respondem melhor ao uso de hidroxiureia quando comparados aos pacientes com os alelos mutantes dos mesmos genes. Os efeitos da hidroxiureia sobre a concentração de Hb F, VCM e bilirrubina total são mais potentes do que a herança dos polimorfismos estudados.

A calculadora de gravidade da doença falciforme é válida para os pacientes brasileiros, pois é eficaz frente à idade, genótipos da DF e manifestações clínicas.

A presença do alelo nulo do gene *GSTM1* aumenta a chance de ocorrência de priapismo em pacientes com a DF. O efeito protetor de ocorrência de STA e úlceras de perna está associado à presença do alelo mutante para o gene *TGFB1*. A presença do alelo mutante do gene *NOS3* diminui a chance de ocorrência de retinopatia e priapismo.

A diminuição da atividade das enzimas antioxidantes (catalase, Gpx, GR) está associada com maior gravidade da DF devido à existência do estresse oxidativo crônico. O aumento da atividade da GST está associado com maior gravidade da DF devido a intensa metabolização de xenobióticos gerados na doença.

Os níveis de peroxidação lipídica são maiores nos pacientes do que os valores de referência, sendo que, o aumento dos valores de TBARS é influenciado pelo aumento da Hb S responsável pela geração de muitas ERO, principalmente, em decorrência do processo de polimerização.

As mutações nos genes *GSTM1* e *GSTP1* diminuem a atividade da GST total e as mutações nos genes das GSTs resultam na elevada atividade da GR devido à reciclagem aumentada da glutatona reduzida.

Este estudo demonstra que a resposta diferenciada ao uso de HU tem a influência dos polimorfismos avaliados. Estes resultados garantem importante informação e direcionamento promissor para o tratamento da DF.

Referências

8. REFERÊNCIAS

Segundo Normas da ABNT 6023:2002

- Allessio, H. M. and Hagerman, A. E. Oxidative Stress and antioxidant defense, effects of aging and exercise. In: *Oxidative Stress, Exercise and Aging*. 1 ed. London: Imperial College Press, 2006. p. 85-108.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. Cytokines. In: **Cellular and molecular immunology**. 6 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 267-301.
- ADEKILE, A. D.; TULI, M.; HAIDER, M.Z. et al. Influence of alpha-thalassemia trait on spleen function in sickle cell anemia patients with high HbF. **Am J Hematol**, v. 53, p. 1-5, Sep 1996.
- ADELEKAN, D. A.; THURNHAM, D.I.; ADEKILE, A.D. Reduced antioxidant capacity in paediatric patients with homozygous sickle cell disease. **Eur J Clin Nutr**, v. 43, p. 609-614, Sep 1989.
- AFRASYAP, L.; OZTURK, G. NO level and endothelial NO synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in the patients with coronary artery disease from the Turkish population. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 36, p. 661-666, Oct 2004.
- AGIL, A.; SADRZADEH, S.M. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. **Redox Rep**, v. 5, p. 29-34, 2000.
- AKINSHEYE, I.; KLINGS, E.S. Sickle Cell Anemia and Vascular Dysfunction: The Nitric Oxide Connection. **J Cell Physiol**, v. 224, p. 620-625, Sep 2010.
- ALMEIDA, C. B.; SCHEIERMANN, C.; JANG, J.E. et al. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. **Blood**, v. 120, p. 2879-2888, 4 Oct 2012.
- ALSULTAN, A. I.; SEIF, M.A.; AMIN, T.T. et al. Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 14, p. 527-538, Jun 2010.
- ALTARESCU, G.; ZIMRAN, A.; MICHELAKAKIS, H. et al. TNF-alpha levels and TNF-alpha gene polymorphism in type I Gaucher disease. **Cytokine**, v. 31, p. 149-152, 21 Jul 2005.
- AMER, J.; GHOTI, H.; RACHMILEWITZ, E. et al. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **Br J Haematol**, v. 132, p. 108-113, Jan 2006.
- ANOOP, P.; BEVAN, D.H.; CHAKRABARTI, S. Usefulness and limitations of Bayesian network model as a mortality risk assessment tool in sickle cell anemia. **Am J Hematol**, v. 84, p. 312-313, May 2009.

- ANOSIKE, E. O.; UWAKWE, A.A.; MONANU, M.O. et al. Studies on human erythrocyte glutathione-S-transferase from HbAA, HbAS and HbSS subjects. **Biomed Biochim Acta**, v. 50, p. 1051-1056, 1991.
- ARAND, M.; MUHLBAUER, R.; HENGSTLER, J. et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. **Anal Biochem**, v. 236, p. 184-186, 5 Apr 1996.
- ARRUDA, V. R.; GRIGNOLLI, C.E.; GONCALVES, M.S. et al. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? **Clin Genet**, v. 54, p. 210-214, Sep 1998.
- ASLAN, M.; RYAN, T.; ADLER, B. et al. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, p. 15215-15220, 2001.
- AYGUN, B.; ODAME, I. A global perspective on sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer**, v. 59, p. 386-390, Aug 2012.
- BAILEY, K.; MORRIS, J.S.; THOMAS, P. et al. Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. **Arch Dis Child**, v. 67, p. 517-520, Apr 1992.
- BAKANAY, S. M.; DAINER, E.; CLAIR, B. et al. Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. **Blood**, v. 105, p. 545-547, 15 Jan 2005.
- BALLAS, S. K. Sickle cell disease: clinical management. **Baillieres Clin Haematol**, v. 11, p. 185-214, Mar 1998.
- BALLAS, S. K. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. **Blood**, v. 121, p. 243-244, 3 Jan 2013.
- BALLAS, S. K.; LIEFF, S.; BENJAMIN, L.J. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **Am J Hematol**, v. 85, p. 6-13, Jan 2010a.
- BALLAS, S. K.; MCCARTHY, W.F.; GUO, N. et al. Early detection of response to hydroxyurea therapy in patients with sickle cell anemia. **Hemoglobin**, v. 34, p. 424-429, 2010b.
- BANDEIRA, I. C.; ROCHA, L.B.; BARBOSA, M.C. et al. Chronic inflammatory state in sickle cell anemia patients is associated with HBB(*)S haplotype. **Cytokine**, v. 65, p. 217-221, Feb 2014.
- BELINI JUNIOR, E.; DA SILVA, D.G.; DE SOUZA, T.L. et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in sickle cell anaemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. **Ann Hematol**, 27 Sep 2011.

- BELINI, J. E.; CANCADO, R.D.; DOMINGOS, C.R. The XmnI polymorphic site 5' to the gene G(gamma) in a Brazilian patient with sickle cell anaemia - fetal haemoglobin concentration, haematology and clinical features. **Arch Med Sci**, v. 6, p. 822-825, Oct 2010.
- BERNARDINI, S.; BELLINCAMPI, L.; BALLERINI, S. et al. Glutathione S-transferase P1 *C allelic variant increases susceptibility for late-onset Alzheimer disease: association study and relationship with apolipoprotein E epsilon4 allele. **Clin Chem**, v. 51, p. 944-951, Jun 2005.
- BEUTLER, E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. **Ann Intern Med**, v. 83, p. 919-919, 1 Dec 1975.
- BEUTLER, E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. **J Clin Invest**, v. 48, p. 1957-1966, Oct 1969.
- BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinopatias no Brasil: variabilidade genética e metodologia laboratorial**. 1993. 232 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São José do Rio Preto. 1993.
- BONINI-DOMINGOS, C.R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias.**, São José do Rio Preto-SP: HN Editora, 2006.
- BRADEN, D. S.; COVITZ, W.; MILNER, P.F. Cardiovascular function during rest and exercise in patients with sickle-cell anemia and coexisting alpha thalassemia-2. **Am J Hematol**, v. 52, p. 96-102, Jun 1996.
- BRANDOW, A. M.; PANEPINTO, J.A. Monitoring toxicity, impact, and adherence of hydroxyurea in children with sickle cell disease. **Am J Hematol**, v. 86, p. 804-806, Sep 2011.
- BRAZIL Ministry of Health, Department of Health Care. v. Clinical Protocols and Therapeutic Guidelines, Ordinance 55., 29 Jan 2010.
- BRAZIL Ministry of Health, Department of Health Care. v. Clinical Protocols and Therapeutic Guidelines, Ordinance 853, 5 Dec 2011.
- CAJADO, C.; CERQUEIRA, B.A.; COUTO, F.D. et al. TNF-alpha and IL-8: serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**, v. 56, p. 312-317, Nov 2011.
- CAJADO, C. S.; CERQUEIRA, B.A.V.; BARBOSA, C.G. et al. IL-8 e TNF-alfa: marcadores imunológicos no prognóstico da anemia falciforme. **Gazeta Médica Da Bahia**, v. 80, p. 56-61, 2010.
- CAMERON, B. F.; CHRISTIAN, E.; LOBEL, J.S. et al. Evaluation of clinical severity in sickle cell disease. **J Natl Med Assoc**, v. 75, p. 483-487, May 1983.

- CANÇADO, R. D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 204-206, 2007.
- CHAAR, V.; TARER, V.; ETIENNE-JULAN, M. et al. ET-1 and ecNOS gene polymorphisms and susceptibility to acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 91, p. 1277-1278, Sep 2006.
- CHARACHE, S.; TERRIN, M.L.; MOORE, R.D. et al. Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle-Cell-Anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 1317-1322, 18 May 1995.
- CHIRICO, E.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v. 64, p. 72-80, 2012.
- CHO, C. S.; KATO, G.J.; YANG, S.H. et al. Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. **Antioxid Redox Signal**, v. 13, p. 1-11, 1 Jul 2010.
- COKIC, V. P.; SMITH, R.D.; BELESLIN-COKIC, B.B. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 231-239, Jan 2003.
- CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C.F.; COSTA, F.F. Newer Aspects of the Pathophysiology of Sickle Cell Disease Vaso-Occlusion. **Hemoglobin**, v. 33, p. 1-16, 2009.
- COVAS, D. T.; DE, L.A., I; VIANNA BONINI, P.P. et al. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 89, p. 273-280, Mar 2004.
- CREARY, S. E.; GLADWIN, M.T.; BYRNE, M. et al. A pilot study of electronic directly observed therapy to improve hydroxyurea adherence in pediatric patients with sickle-cell disease. **Pediatr Blood Cancer**, 16 Jan 2014.
- CRIVELLATO, E. The role of angiogenic growth factors in organogenesis. **Int J Dev Biol**, v. 55, p. 365-375, 2011.
- DAS, S. K.; NAIR, R.C. Superoxide-Dismutase, Glutathione-Peroxidase, Catalase and Lipid-Peroxidation of Normal and Sickled Erythrocytes. **Br J Haematol**, v. 44, p. 87-94, 1980.
- DASGUPTA, T.; HEBBEL, R.P.; KAUL, D.K. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. **Free Radic Biol Med**, v. 41, p. 1771-1780, 15 Dec 2006.
- DASGUPTA, T.; FABRY, M.; KAUL, D. Antisickling property of fetal hemoglobin enhances nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout sickle mice. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, -402, 2010.

- DE OLIVEIRA FILHO, R. A.; SILVA, G.J.; DE, F.D., I et al. Association between the genetic polymorphisms of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) and the clinical manifestations in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 51, p. 76-79, Aug 2013.
- DE SOUZA, A. P.; TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M. et al. Analysis of the TGF-beta1 promoter polymorphism (C-509T) in patients with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 30, p. 519-523, Jun 2003.
- DE, F., I; DE FARIA, E.J.; TORO, A.A. et al. Association of TGF-beta1, CD14, IL-4, IL-4R and ADAM33 gene polymorphisms with asthma severity in children and adolescents. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, p. 203-210, May 2008.
- DRISS, A.; ASARE, K.O.; HIBBERT, J.M. et al. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights**, v. 2, p. 2330 Jul 2009.
- DUSINSKA, M.; STARUCHOVA, M.; HORSKA, A. et al. Are glutathione S transferases involved in DNA damage signalling? Interactions with DNA damage and repair revealed from molecular epidemiology studies. **Mutat Res**, v. 736, p. 130-137, 1 Aug 2012.
- DWORKIS, D. A.; KLINGS, E.S.; SOLOVIEFF, N. et al. Severe sickle cell anemia is associated with increased plasma levels of TNF-R1 and VCAM-1. **Am J Hematol**, v. 86, p. 220-223, Feb 2011.
- EL-HAZMI, M. A.; WARSY, A.S. Glutathione reductase deficiency in association with sickle cell and thalassaemia genes in Saudi populations. **Hum Hered**, v. 35, p. 326-332, 1985.
- EMBURY, S. H.; MATSUI, N.M.; RAMANUJAM, S. et al. The contribution of endothelial cell P-selectin to the microvascular flow of mouse sickle erythrocytes in vivo. **Blood**, v. 104, p. 3378-3385, 15 Nov 2004.
- ENDRES, M.; LAUFS, U.; LIAO, J.K. et al. Targeting eNOS for stroke protection. **Trends Neurosci**, v. 27, p. 283-289, May 2004.
- ERGUL, S.; BRUNSON, C.Y.; HUTCHINSON, J. et al. Vasoactive factors in sickle cell disease: In vitro evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction. **Am J Hematol**, v. 76, p. 245-251, Jul 2004.
- ESSIEN, E. U. Increased susceptibility of erythrocyte membrane lipids to peroxidation in sickle cell disease. **Cent Afr J Med**, v. 40, p. 217-220, Aug 1994.
- EZEIRUAKU, F. C.; EZE, E.M.; UKAJI, D.C. Activity Levels of Some Erythrocyte Enzymes (Glutathione S- Transferase, Nadh Ferricyanide Reductase) and Serum Lactate Dehydrogenase in the Three Human Genotype (Hb SS, Hb AA And HbAS) in Southern Nigeria. **Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences**, v. 2, p. 314-317, 2011.

- FAIZAL, P.; SATHEESHAN, B.; MILINDKUMAR et al. Antioxidant Status and Oxidative Stress in the Circulation of Younger and Elderly Human Subjects. **Ind J Clin Biochem**, v. 28, p. 426-428, 2013.
- FERTRIN, K. Y.; COSTA, F.F. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. **Expert Review of Hematology**, v. 3, p. 443-458, Aug 2010.
- FISCHEL-GHODSIAN, N.; HIRSCH, P.C.; BOHLMAN, M.C. Rapid detection of the hemoglobin C mutation by allele-specific polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet**, v. 47, p. 1023-1024, Dec 1990.
- FOX, P. D.; DUNN, D.T.; MORRIS, J.S. et al. Risk factors for proliferative sickle retinopathy. **Br J Ophthalmol**, v. 74, p. 172-176, Mar 1990.
- FRENETTE, P. S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v. 117, p. 850-858, Apr 2007b.
- FRENETTE, P. S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v. 117, p. 850-858, Apr 2007a.
- FRIGUET, B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. **FEBS Lett**, v. 580, p. 2910-2916, 22 May 2006.
- GALARNEAU, G.; PALMER, C.D.; SANKARAN, V.G. et al. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. **Nat Genet**, v. 42, p. 1049-1051, Dec 2010.
- GAO, Y.; CAO, Y.; TAN, A. et al. 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, Feb 2010.
- GARNER, C.; SILVER, N.; BEST, S. et al. Quantitative trait locus on chromosome 8q influences the switch from fetal to adult hemoglobin. **Blood**, v. 104, p. 2184-2186, 1 Oct 2004.
- GHATPANDE, S. S.; CHOUDHARY, P.K.; QUINN, C.T. et al. Pharmaco-proteomic study of hydroxyurea-induced modifications in the sickle red blood cell membrane proteome. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 233, p. 1510-1517, Dec 2008.
- 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, 15 Mar 2011.
- GLADWIN, M. T. Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. **J Clin Invest**, v. 116, p. 2330-2332, Sep 2006.

- GLADWIN, M.; SHELHAMER, J.; OGNIBENE, F. et al. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 116, p. 436-444, 2002.
- GONZALEZ, S.; RODRIGO, L.; MARTINEZ-BORRA, J. et al. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. **Am J Gastroenterol**, v. 98, p. 1101-1106, May 2003.
- GRAIDO-GONZALEZ, E.; DOHERTY, J.C.; BERGREEN, E.W. et al. Plasma endothelin-1, cytokine, and prostaglandin E2 levels in sickle cell disease and acute vaso-occlusive sickle crisis. **Blood**, v. 92, p. 2551-2555, 1 Oct 1998.
- GRAINGER, D. J.; HEATHCOTE, K.; CHIANO, M. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Hum Mol Genet**, v. 8, p. 93-97, Jan 1999.
- GUAN, X.; ZHAO, H.; NIU, J. et al. Polymorphisms of TGFB1 and VEGF genes and survival of patients with gastric cancer. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 28, p. 1-8, 2009.
- GUASCH, A.; ZAYAS, C.F.; ECKMAN, J.R. et al. Evidence that microdeletions in the alpha globin gene protect against the development of sickle cell glomerulopathy in humans. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, p. 1014-1019, May 1999.
- HAIDER, M. Z.; ASHEBU, S.; ADUH, P. et al. Influence of alpha-thalassemia on cholelithiasis in SS patients with elevated Hb F. **Acta Haematol**, v. 100, p. 147-150, Dec 1998.
- HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I.V. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. **Hum Immunol**, v. 62, p. 1191-1199, Nov 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3, New York: Oxford University Press, USA, 2007.
- HALSEY, C.; ROBERTS, I.A.G. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 120, p. 177-186, Jan 2003.
- HAYES, J. D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 51-88, 2005.
- HAYES, J. D.; STRANGE, R.C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, v. 61, p. 154-166, Sep 2000.
- HEBBEL, R. P.; EATON, J.W.; BALASINGAM, M. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **J Clin Invest**, v. 70, p. 1253-1259, Dec 1982.

- HEBBEL, R. P.; MILLER, W.J. Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and oxidative determinants of hemolytic anemia. **Blood**, v. 64, p. 733-741, Sep 1984.
- HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**, v. 11, p. 129-151, Mar 2004.
- HIGGS, D. R. The molecular basis of alpha-thalassemia. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, p. a011718 Jan 2013.
- HIGGS, D. R.; ALDRIDGE, B.E.; LAMB, J. et al. The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **N Engl J Med**, v. 306, p. 1441-1446, 17 Jun 1982.
- HILLERY, C. A.; DU, M.C.; WANG, W.C. et al. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. **Br J Haematol**, v. 109, p. 322-327, May 2000.
- HIRAGI, C. O.; DE OLIVEIRA, S.F.; HATAGIMA, A. et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms in Brazilian African descendants. **Hum Biol**, v. 79, p. 131-140, Feb 2007.
- HOPPE, C.; KLITZ, W.; CHENG, S. et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 103, p. 2391-2396, 15 Mar 2004.
- HOPPE, C.; KLITZ, W.; D'HARLINGUE, K. et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke**, v. 38, p. 2241-2246, Aug 2007.
- HUANG, J.; KIM-SHAPIRO, D.; KING, S. Catalase-mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. **J Med Chem**, v. 47, p. 3495-3501, 2004.
- HUANG, W.; WANG, W.; ZHOU, M. et al. Association of glutathione S-transferase polymorphisms (GSTM1 and GSTT1) with primary open-angle glaucoma: an evidence-based meta-analysis. **Gene**, v. 526, p. 80-86, 10 Sep 2013.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A.d. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1170-1179, 2008.
- HYACINTH, H. I.; CAPERS, P.L.; ARCHER, D.R. et al. TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, and IL-4 levels were elevated in a murine model of human sickle cell anemia maintained on a high protein/calorie diet. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 239, p. 65-70, 1 Jan 2014.
- INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD. **Variante Beta-Thalassemia Short Program Instruction Manual**, Bio-Rad Laboratories, 2006.
- ISHIDA, T.; KUMAGAI, Y.; IKEDA, Y. et al. (8S)-(glutathion-S-yl)dihydromorphinone, a novel metabolite of morphine from guinea pig bile. **Drug Metab Dispos**, v. 17, p. 77-81, Jan 1989.

- ISHII, T.; MATSUSE, T.; TERAMOTO, S. et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 54, p. 693-696, Aug 1999.
- JAIN, S.; ROSS, J.; LEVY, G. et al. The effect of malonyldialdehyde on viscosity of normal and sickle red blood cells. **Biochem Med Metab Biol**, v. 44, p. 37-41, 1990.
- JAIN, S. K. In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. **J Clin Invest**, v. 76, p. 281-286, Jul 1985.
- JOHNSON, R. M.; HO, Y.S.; YU, D.Y. et al. The effects of disruption of genes for peroxiredoxin-2, glutathione peroxidase-1, and catalase on erythrocyte oxidative metabolism. **Free Radic Biol Med**, v. 48, p. 519-525, 15 Feb 2010.
- KANIKA, N. D.; MELMAN, A.; DAVIES, K.P. Experimental priapism is associated with increased oxidative stress and activation of protein degradation pathways in corporal tissue. **Int J Impot Res**, v. 22, p. 363-373, Nov 2010.
- KATO, G. J.; HEBBEL, R.P.; STEINBERG, M.H. et al. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **Am J Hematol**, v. 84, p. 618-625, Sep 2009.
- KATO, G. J.; MCGCWAN, V.; MACHADO, R.F. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, p. 2279-2285, 15 Mar 2006.
- KAUL, D.; LIU, X.d.; CHANG, H.Y. et al. Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1136-1145, 2004.
- KEEN, J. H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **J Biol Chem**, v. 251, p. 6183-6188, 25 Oct 1976.
- KING, S. Nitric oxide production from hydroxyurea. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, p. 737-744, 2004.
- KLINGS, E.; FARBER, H. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. **Respiratory Research**, v. 2, p. 280-285, 2001.
- KOSHY, M.; ENTSUAH, R.; KORANDA, A. et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 74, p. 1403-1408, Sep 1989.
- KOVACIC, P. Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): Metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. **Med Hypotheses**, v. 76, p. 24-31, Jan 2011.

- LANDBURG, P.; TEERLINK, T.; BIEMOND, B. et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 44, p. 229-232, 2010.
- LANZKRON, S.; STROUSE, J.J.; WILSON, R. et al. Systematic review: Hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Ann Intern Med**, v. 148, p. 939-+, 17 Jun 2008.
- LETTRE, G. The search for genetic modifiers of disease severity in the beta-hemoglobinopathies. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, Oct 2012.
- LIU, Y. H.; WU, W.C.; LU, Y.L. et al. Antioxidant and Amine Oxidase Inhibitory Activities of Hydroxyurea. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, p. 1256-1260, Jun 2010.
- LOBO, C. L. D.; PINTO, J.F.C.; NASCIMENTO, E.M. et al. The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 161, p. 852-860, Jun 2013.
- LOBO, C. Doença falciforme - um grave problema de saúde pública mundial. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 280-281, 2010.
- LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D.E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 1957-1997, Oct 2011.
- MA, Q.; WYSZYNSKI, D.F.; FARRELL, J.J. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic determinants of response to hydroxyurea. **Pharmacogenomics Journal**, v. 7, p. 386-394, Dec 2007.
- MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L.s.; GRIEBELER, I. et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **J Natl Med Assoc**, v. 100, p. 897-902, 2008.
- MANWANI, D.; FRENETTE, P.S. Vaso-occlusion in sickle cell disease: pathophysiology and novel targeted therapies. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2013, p. 362-369, 2013.
- MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J Clin Pathol**, v. 18, p. 790-792, Nov 1965.
- MASSAGUE, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol**, v. 6, p. 597-641, 1990.
- MAY, J. M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. **Front Biosci**, v. 3, p. d1-10, 1998.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. **J Biol Chem**, v. 244, p. 6056-6063, 25 Nov 1969.

- MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal Biochem**, v. 86, p. 271-278, May 1978.
- 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, 1 May 2009.
- MORRIS, C. R.; KATO, G.J.; POLJAKOVIC, M. DYsregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. **JAMA**, v. 294, p. 81-90, 6 Jul 2005.
- MORRIS, C. R.; SUH, J.H.; HAGAR, W. et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v. 111, p. 402-410, 1 Jan 2008.
- NAOUM, P.C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**, São Paulo: Editora Santos, 1990.
- NATTA, C.; CHEN, L.; CHOW, C. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. **Acta Haematol**, v. 83, p. 130-132, 1990.
- NEONATO, M. G.; GUILLOUD-BATAILLE, M.; BEAUVAIS, P. et al. Acute clinical events in 299 homozygous sickle cell patients living in France. French Study Group on Sickle Cell Disease. **Eur J Haematol**, v. 65, p. 155-164, Sep 2000.
- NEVES, F.; MENEZES NETO, O.A.; POLIS, L.B. et al. Hematological differences between patients with different subtypes of sickle cell disease on hydroxyurea treatment. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 34, p. 426-429, 2012.
- NISHANK, S. S.; SINGH, M.P.; YADAV, R. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. **J Hum Genet**, v. 58, p. 775-779, Dec 2013.
- NOLAN, V. G.; ADEWOYE, A.; BALDWIN, C. et al. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. **Br J Haematol**, v. 133, p. 570-578, Jun 2006.
- NOURAIE, M.; LEE, J.S.; ZHANG, Y. et al. The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. **Haematologica**, v. 98, p. 464-472, Mar 2013.
- NUR, E.; BIEMOND, B.; OTTEN, H.M. et al. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **Am J Hematol**, v. 86, p. 484-489, 2011.
- OHENE-FREMPONG, K.; WEINER, S.J.; SLEEPER, L.A. et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. **Blood**, v. 91, p. 288-294, 1 Jan 1998.
- OKUMURA, J. V.; LOBO, C.L.d.C.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Beta-S globin haplotypes in patients with sickle cell anemia: one approach to understand the

- diversity in Brazil. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, p. 71-72, 2013.
- PANDEY, K. B.; RIZVI, S.I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 155, p. 131-136, Jun 2011.
- PARKER, L. J.; ITALIANO, L.C.; MORTON, C.J. et al. Studies of glutathione transferase P1-1 bound to a platinum(IV)-based anticancer compound reveal the molecular basis of its activation. **Chemistry**, v. 17, p. 7806-7816, 4 Jul 2011.
- PERES, R. C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; SILVA, E.R. et al. Absence of association between transforming growth factor-beta1 promoter polymorphisms and hypodontia. **Angle Orthod**, v. 74, p. 665-671, Oct 2004.
- PINHEL, M. A. S.; NAKAZONE, M.A.; CACAO, J.C. et al. Glutathione S-transferase variants increase susceptibility for late-onset Alzheimer's disease: association study and relationship with apolipoprotein E epsilon 4 allele. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, p. 439-445, 2008.
- PLATT, O. S.; BRAMBILLA, D.J.; ROSSE, W.F. et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med**, v. 330, p. 1639-1644, 9 Jun 1994.
- PLATT, O. S.; THORINGTON, B.D.; BRAMBILLA, D.J. et al. Pain in Sickle-Cell Disease - Rates and Risk-Factors. **N Engl J Med**, v. 325, p. 11-16, 4 Jul 1991.
- POWARS, D. R. Natural history of sickle cell disease--the first ten years. **Semin Hematol**, v. 12, p. 267-285, Jul 1975.
- QIAN, J.; FULTON, D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. **Front Physiol**, v. 4, p. 3472013.
- RARAB, A.; BOTHINA, M.H. GSTM1 and GSTT1 Polymorphism in Egyptian Sickle Cell Anemia Patients. **International Journal of Hematology and Oncology**, v. 23, p. 269-275, 2013.
- REES, D. C.; WILLIAMS, T.N.; GLADWIN, M.T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, p. 2018-2031, 11 Dec 2010.
- REID, M.; BADALOO, A.; FORRESTER, T. et al. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, p. E73-E79, Jul 2006.
- REITER, C. D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat Med**, v. 8, p. 1383-1389, Dec 2002.
- REPKA, T.; HEBBEL, R.P. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. **Blood**, v. 78, p. 2753-2758, 15 Nov 1991.

- RICE-EVANS, C.; OMORPHOS, S.C.; BAYSAL, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. **Biochem J**, v. 237, p. 265-269, 1 Jul 1986.
- RODGERS, G.; DOVER, G.; NOGUCHI, C. et al. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. **The New England Journal of Medicine**, v. 322, p. 1037-1045, 1990.
- RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, L.; GONZALEZ-JUANATEY, C.; PALOMINO-MORALES, R. et al. TNFA -308 (rs1800629) polymorphism is associated with a higher risk of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, v. 216, p. 125-130, May 2011.
- 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.
- RUSANOVA, I.; ESCAMES, G.; COSSIO, G. et al. Oxidative stress status, clinical outcome, and beta-globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **Eur J Haematol**, v. 85, p. 529-537, Dec 2010.
- SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. et al. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.
- SALLAKCI, N.; AKCURIN, G.; KOKSOY, S. et al. TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF-alpha production. **J Autoimmun**, v. 25, p. 150-154, Sep 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITCSH, E. F.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2 ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANJAY, P.; MANI, M.R.; SWETA, P. et al. Prevalence of glutathione S-transferase gene deletions and their effect on sickle cell patients. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, p. 100-102, 2012.
- SANKARAN, V. G.; ORKIN, S.H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, p. a011643Jan 2013.
- SARKAR, R.; BHOWMICK, R.; DEY, A. et al. Oxidative Stress Markers and Antioxidant Status in Human Hypertension. **Al Ameen Journal of Medical Sciences**, v. 4, p. 339-343, 2011.
- SCHACTER, L.; WARTH, J.A.; GORDON, E.M. et al. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. **FASEB J**, v. 2, p. 237-243, 1 Mar 1988.
- SCHNOG, J. B.; DUITTS, A.J.; MUSKIET, F.A. et al. Sickle cell disease; a general overview. **Neth J Med**, v. 62, p. 364-374, Nov 2004.
- SCHRODER, E.; PONTING, C.P. Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily. **Protein Sci**, v. 7, p. 2465-2468, Nov 1998.

- SEBASTIANI, P.; NOLAN, V.G.; BALDWIN, C.T. et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood**, v. 110, p. 2727-2735, 1 Oct 2007.
- SERJEANT, G. R. Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease. **Curr Opin Hematol**, v. 2, p. 103-108, Mar 1995.
- SERJEANT, G. R. Screening for sickle-cell disease in Brazil. **Lancet**, v. 356, p. 168-169, 8 Jul 2000.
- SERJEANT, G. R. The Natural History of Sickle Cell Disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 28 Jun 2013.
- SHARAN, K.; SURREY, S.; BALLAS, S. et al. Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 124, p. 240-243, Jan 2004.
- SHEEHAN, V. A.; LUO, Z.; FLANAGAN, J.M. et al. Genetic modifiers of sickle cell anemia in the BABY HUG cohort: influence on laboratory and clinical phenotypes. **Am J Hematol**, v. 88, p. 571-576, Jul 2013.
- SHETH, S.; LICURSI, M.; BHATIA, M. Sickle cell disease: time for a closer look at treatment options? **Br J Haematol**, v. 162, p. 455-464, Aug 2013.
- SHIMAUTI, E. L.; SILVA, D.G.; DE ALMEIDA, E.A. et al. Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 45, p. 297-301, 15 Dec 2010.
- SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E. et al. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett**, v. 103, p. 287-290, 15 Jul 1979.
- SILVA, D. G.; BELINI JUNIOR, E.; TORRES, L.D. et al. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, 12 Apr 2011.
- SILVA, D. G. H.; BELINI JUNIOR, E.; DE ALMEIDA, E.A. et al. Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 1101-1109, Dec 2013.
- SILVERMAN, E. S.; PALMER, L.J.; SUBRAMANIAM, V. et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, p. 214-219, 15 Jan 2004.
- SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for Microcytemia in Italy - Analysis of Data Collected in Past 30 Years. **Am J Hum Genet**, v. 27, p. 198-212, 1975.
- SIMOES, B. P.; PIERONI, F.; BARROS, G.M.N. et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comite de hemoglobinopatias. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 46-53, 2010.

- STEINBERG, M. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v. 129, p. 465-481, 2005a.
- STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Baillieres Clin Haematol**, v. 11, p. 163-184, Mar 1998.
- STEINBERG, M. H. Management of sickle cell disease. **N Engl J Med**, v. 340, p. 1021-1030, 1 Apr 1999.
- STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v. 129, p. 465-481, May 2005b.
- STEINBERG, M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **ScientificWorldJournal**, v. 8, p. 1295-1324, 2008.
- STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **ScientificWorldJournal**, v. 9, p. 46-67, 2009.
- STEINBERG, M. H.; LU, Z.H.; BARTON, F.B. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: Determinants of response to hydroxyurea. **Blood**, v. 89, p. 1078-1088, 1 Feb 1997.
- STEINBERG, M. H.; MCCARTHY, W.F.; CASTRO, O. et al. The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. **Am J Hematol**, v. 85, p. 403-408, Jun 2010.
- STEINBERG, M. H.; ROSENSTOCK, W.; COLEMAN, M.B. et al. Effects of thalassemia and microcytosis on the hematologic and vasoocclusive severity of sickle cell anemia. **Blood**, v. 63, p. 1353-1360, Jun 1984.
- STEVEN, T.; LOWE, J.E.; KNOWLES, R.G. et al. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, p. 77-84, 18 Jun 1998.
- STUART, M. J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, p. 1343-1360, 9 Oct 2004.
- SWITZER, J. A.; HESS, D.C.; NICHOLS, F.T. et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. **Lancet Neurol**, v. 5, p. 501-512, Jun 2006.
- TEW, K. D.; TOWNSEND, D.M. Glutathione-s-transferases as determinants of cell survival and death. **Antioxid Redox Signal**, v. 17, p. 1728-1737, 15 Dec 2012.
- THE INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT The International HapMap Project. **Nature**, v. 426, p. 789-796, 18 Dec 2003.
- THORNBURG, C. D.; FILES, B.A.; LUO, Z. et al. Impact of hydroxyurea on clinical events in the BABY HUG trial. **Blood**, v. 120, p. 4304-4310, 22 Nov 2012.

- TODAKA, T.; ISHIDA, T.; KITA, H. et al. Bioactivation of Morphine in Human Liver: Isolation and Identification of Morphinone, a Toxic Metabolite. **Biol Pharm Bull**, v. 28, p. 1275-1280, 2005.
- TORRES, L. D. **Polimorfismos nos genes TGFB e TNFA e sua relação com crises vaso-oclusivas e disfunção endotelial em pacientes com anemia falciforme**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestre em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São José do Rio Preto. 2012.
- TORRES, L. S.; BELINI, J.E.; SILVA, D.G. et al. Frequencies of -308G/A (TNFA) and -509C/T (TGFB1) polymorphisms in sickle cell anemia patients from Brazil. **Genet Mol Res**, v. 12, p. 6762-6766, 2013.
- TORRES, L.; DA SILVA, D.; BELINI JUNIOR, E. et al. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. **Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia**, v. 34, p. 421-425, 2012.
- VAN, Z. R.; VERHOEVEN, A.J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. **Free Radic Biol Med**, v. 67C, p. 377-386, 6 Dec 2013.
- VARGAS, A. E.; DA SILVA, M.A.L.; SILLA, L. et al. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. **Tissue Antigens**, v. 66, p. 683-690, Dec 2005.
- VEKILOV, P. G. Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? **Br J Haematol**, v. 139, p. 173-184, Oct 2007.
- VELLA, F. Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **Am J Clin Pathol**, v. 49, p. 440-442, Mar 1968.
- VICARI, P.; SILVA, G.S.; NOGUTTI, M.A. et al. Absence of association between TNF-alpha polymorphism and cerebral large-vessel abnormalities in adults with sickle cell anemia. **Acta Haematol**, v. 125, p. 141-144, 2011.
- WALI, Y. A.; AL-LAMKI, Z.; HUSSEIN, S.S. et al. Splenic function in Omani children with sickle cell disease: correlation with severity index, hemoglobin phenotype, iron status, and alpha-thalassemia trait. **Pediatr Hematol Oncol**, v. 19, p. 491-500, Oct 2002.
- WALTER, P. B.; MACKLIN, E.A.; PORTER, J. et al. Inflammation and oxidant-stress in beta-thalassemia patients treated with iron chelators deferasirox (ICL670) or deferoxamine: an ancillary study of the Novartis C1CL670A0107 trial. **Haematologica**, v. 93, p. 817-825, Jun 2008.
- WALTER, P.; FUNG, E.; KILLILEA, D. et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 135, p. 254-263, 2006.

- WALTERS, M. C.; PATIENCE, M.; LEISENRING, W. et al. Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. **N Engl J Med**, v. 335, p. 369-376, 8 Aug 1996.
- WANG, W. C.; WARE, R.E.; MILLER, S.T. et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **Lancet**, v. 377, p. 1663-1672, 14 May 2011.
- WANG, X. L.; WANG, J. Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. **Mol Genet Metab**, v. 70, p. 241-251, Aug 2000.
- WARE, R. E. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 115, p. 5300-5311, 1 Jul 2010.
- WARE, R. E.; AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 62-69, 2009.
- WATANABE, Y.; KINOSHITA, A.; YAMADA, T. et al. A catalog of 106 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and its signaling pathway. **J Hum Genet**, v. 47, p. 478-483, 2002.
- WEATHERALL, D.; HOFMAN, K.; RODGERS, G. et al. A case for developing North-South partnerships for research in sickle cell disease. **Blood**, v. 105, p. 921-923, 1 Feb 2005.
- WEST, M. S.; WETHERS, D.; SMITH, J. et al. Laboratory Profile of Sickle-Cell Disease - A Cross-Sectional Analysis. **J Clin Epidemiol**, v. 45, p. 893-909, Aug 1992.
- WILSON, A. G.; DI GIOVINE, F.S.; BLAKEMORE, A.I. et al. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. **Hum Mol Genet**, v. 1, p. 353Aug 1992.
- WOOD, K. C.; GRANGER, D.N. Sickle cell disease: Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, p. 926-932, Sep 2007.
- WOOD, K.; HEBBEL, R.; GRANGER, D. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. **FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 19, p. 989-991, 2005.
- XIA, Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. et al. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 6770-6774, 25 Jun 1996.
- YOON, Y.; SONG, J.; HONG, S.H. et al. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. **Clin Chem**, v. 46, p. 1626-1630, Oct 2000.

- 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, p. 207-214, 2007.
- ZIMMERMAN, S. A.; SCHULTZ, W.H.; DAVIS, J.S. et al. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. **Blood**, v. 103, p. 2039-2045, 15 Mar 2004.

Apêndice

APÊNDICE A - PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA OS TESTES BIOQUÍMICOS

A padronização de coleta e preparo das amostras dos pacientes foi necessária a ser reavaliada no 1º ano de doutorado, pois havia alguns fatores, como processamento, armazenamento e tempo de análise, que poderiam estar afetando/prejudicando a atividade das enzimas.

Quando iniciamos as análises bioquímicas verificamos que a atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e catalase, contida nas amostras, estava muito baixa ou sem nenhuma atividade, portanto, repetimos a técnica por várias vezes, usamos controles e percebemos que em alguma etapa do fluxo de amostras estava errada. Para melhor entendimento, na Figura 1 demonstra como era realizada a coleta, envio e preparo das amostras coletadas pela equipe do Hemorio. Observando a figura destaca-se que o envio imediato das amostras é o ponto chave nas análises bioquímicas, pois a demora de envio e também o acondicionamento inadequado das amostras poderiam afetar nos testes, uma vez que o preparo das amostras deve ser rápido e a temperatura de armazenamento controlada.

Após a identificação deste problema concluímos que todo o preparo das amostras deveria ser realizado no Hemorio para que houvesse o armazenamento correto e o envio apropriado de todo o material coletado para que fossem analisados em São José do Rio Preto.

Assim, fizemos vários testes simulando as futuras coletas no Hemorio, neste sentido, consideramos variáveis importantes tais como: diferentes temperaturas de armazenamento, diferentes tipos de processamento de amostra e conservação da amostra após período de armazenamento.

Então, montamos um fluxograma testando três variáveis: tipos de processamento de amostras, temperatura de armazenamento (-20°C e -80°C) e tempo de armazenamento (Figura 2).

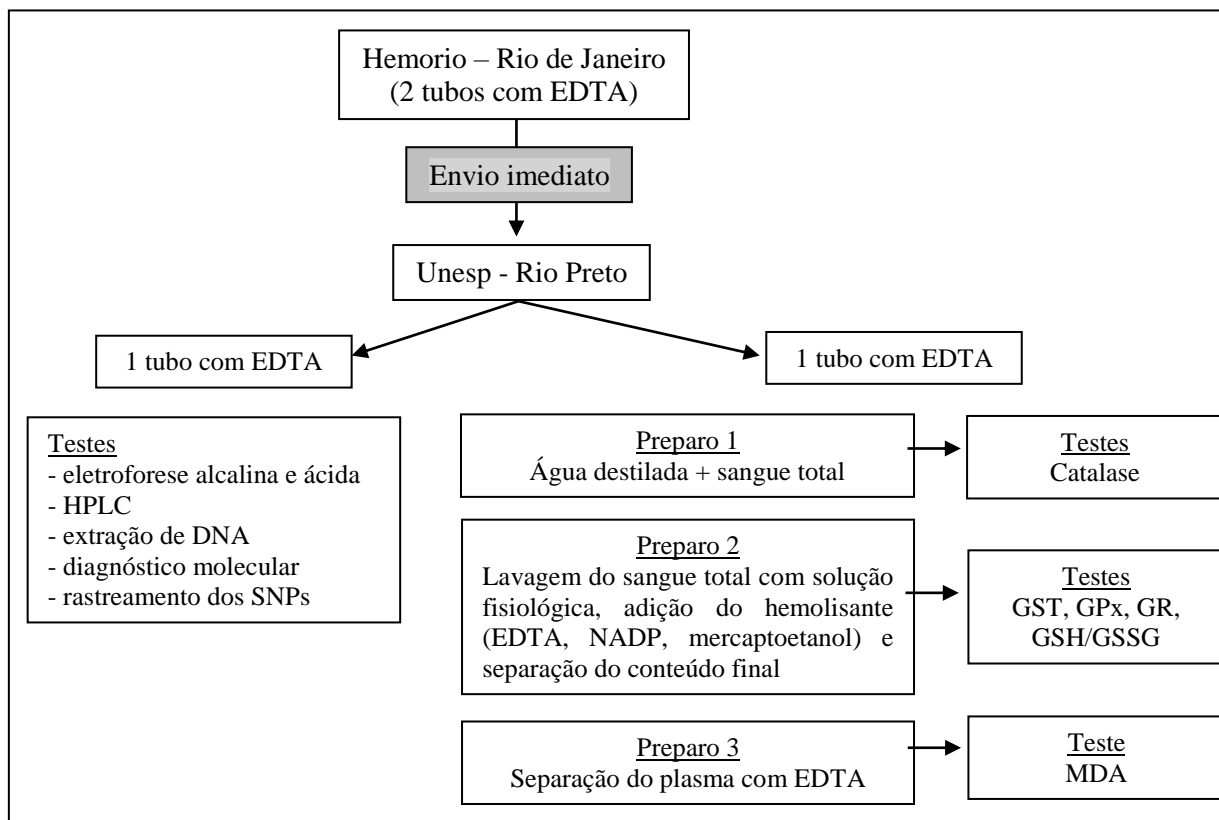


Figura 1. Fluxograma das coletas de amostras realizadas no Hemorio demonstrando todas as etapas para a realização dos testes envolvidos neste projeto. SOD: superóxido dismutase, GST: glutaciona S-transferase, GPx: glutaciona peroxidase, GR: glutaciona redutase, GSH: glutaciona reduzida, GSSG: glutaciona dissulfeto, MDA: malondialdeído, NADP: nicotinamida adenina dinucleotido fosfato

Nessa primeira análise concluímos que o Tipo 1 de processamento é utilizado somente para a análise da atividade da catalase, como fazíamos anteriormente; o Tipo 2 demonstrou resultados insatisfatórios nas atividades enzimáticas e também na concentração de GSH e GSSG observados no HPLC, independente do período de análise; já o do Tipo 3 a atividade enzimática e concentrações de CSH/GSSG encontrados nesse hemolisado foi ideal e também apresentou uma solução homogênea diferente do que foi encontrado na do Tipo 2.

Sabendo que as amostras do Tipo 3 e do Tipo 1 foram as ideais para as análises bioquímicas, descartamos a do Tipo 2 e após 20 dias avaliamos novamente as mesmas amostras para verificar qual a temperatura ideal de armazenamento das amostras e também se existe diferença de atividade após o período de armazenamento.

Entre as duas temperaturas estudadas não houve diferença de atividade enzimática da catalase, glutaciona S-transferase e da concentração de GSH, portanto, as temperaturas de -20°C e -80°C são ideais para a conservação enzimática.

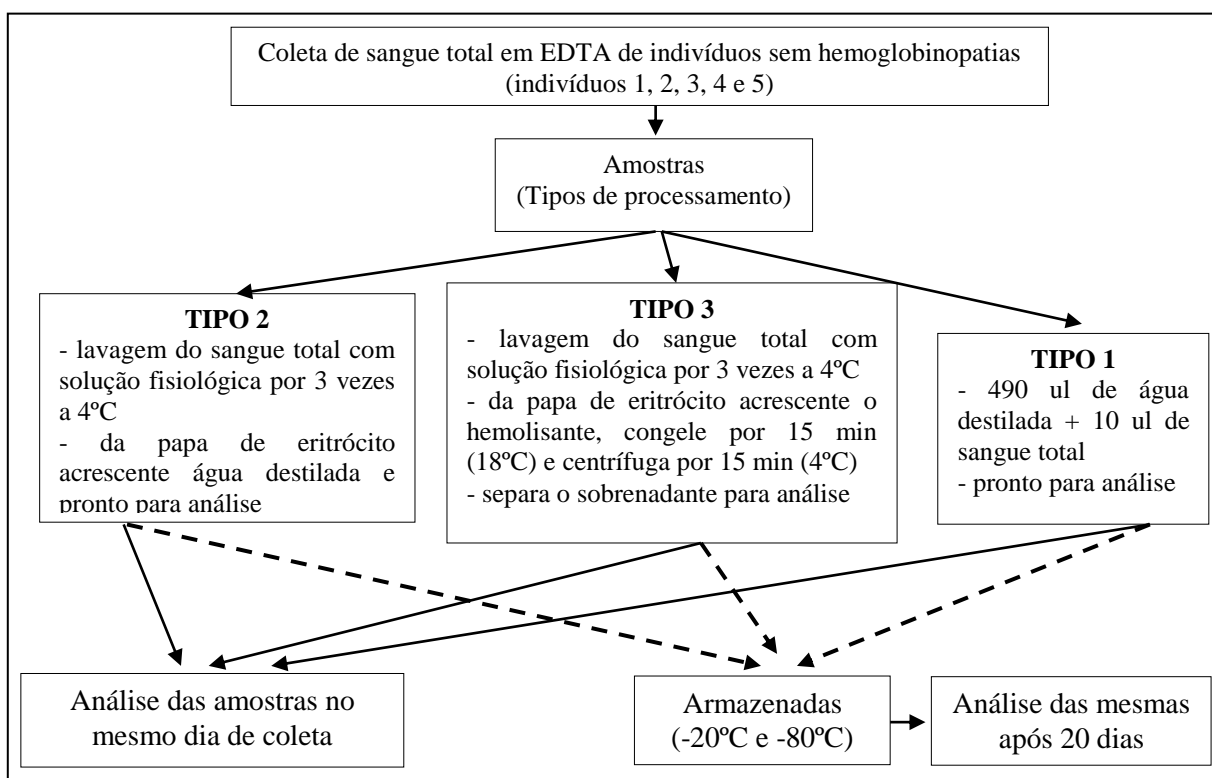


Figura 2. Desenho esquemático desenvolvido para testar as variáveis que poderiam influenciar na atividade das enzimas antioxidantes (tipos de processamento, temperatura de armazenamento e conservação da amostra).

Em relação à preservação da amostra, analisamos a atividade enzimática das amostras em períodos diferentes de análise, uma análise no dia da coleta das amostras, após processamento, e após 20 dias de armazenamento. Com essa observação verificamos que a atividade da GST e catalase não diferiu após o período de armazenamento ($p > 0,05$). No Gráfico 1 a concentração de GSH demonstra que os valores não mudaram conforme o tempo de armazenamento ($p = 0,49$). É interessante ressaltar que o mesmo tipo de processamento de amostra para a avaliação da atividade da GST é também utilizado para a GR, GPX e SOD, no entanto, não incluímos a atividade destas enzimas porque apresentariam o mesmo comportamento da GST.

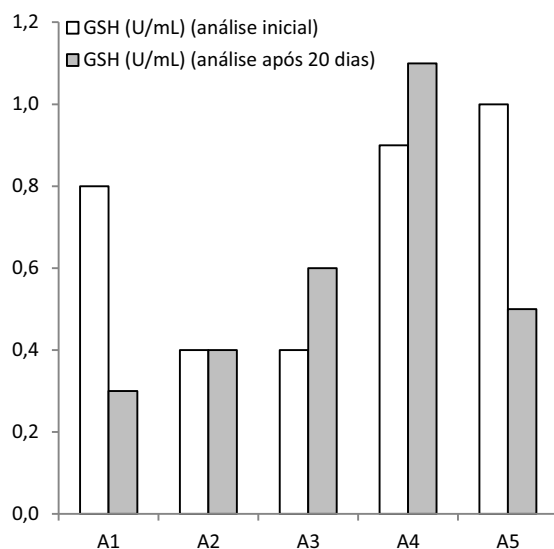


Gráfico 1. Valores de glutatona reduzida (GH) sob a influência do armazenamento das amostras após 20 dias sob-refrigeração a -80°C.

* teste *t* pareado não mostrou diferença estatística ($p=0,49$) A1: amostra 1, A2: amostra, A3: amostra 3, A4: amostra 4 e A5: amostra 5

Após estas primeiras observações, questionamos se o preparo das amostras, utilizando a centrífuga refrigerada, influenciaria nos resultados, pois as centrífugas que estavam disponíveis no Hemorio, num primeiro momento, não eram refrigeradas. Assim, montamos outro fluxograma de testes para avaliar a influência da centrífuga no processamento, análise e armazenamento das amostras (Figura 3).

Tentando minimizar impasses no processamento de amostras, separamos o sangue total em alíquotas e congelamos em -20°C e -80°C para verificar se, quando transportadas em gelo seco até S.J do Rio Preto, conseguiríamos realizar o processamento das amostras aqui na nossa instituição. Porém, como o esperado, a amostras ficou totalmente degradada impossibilitando o processamento das mesmas, assim, excluimos essa possibilidade de logística.

Para a avaliação da atividade da catalase, novamente o Tipo 1 de processamento, foi a melhor forma de efetuar o teste. Comparando a atividade da enzima no mesmo dia da coleta e após sete dias de armazenamento em duas temperaturas diferentes, -20°C e -80°C, verificamos que não houve diferença estatística entre estas observações ($p=0,32$), ou seja, mesmo que no Gráfico 2 observa-se uma redução de atividade a diferença não é estatisticamente significativa.

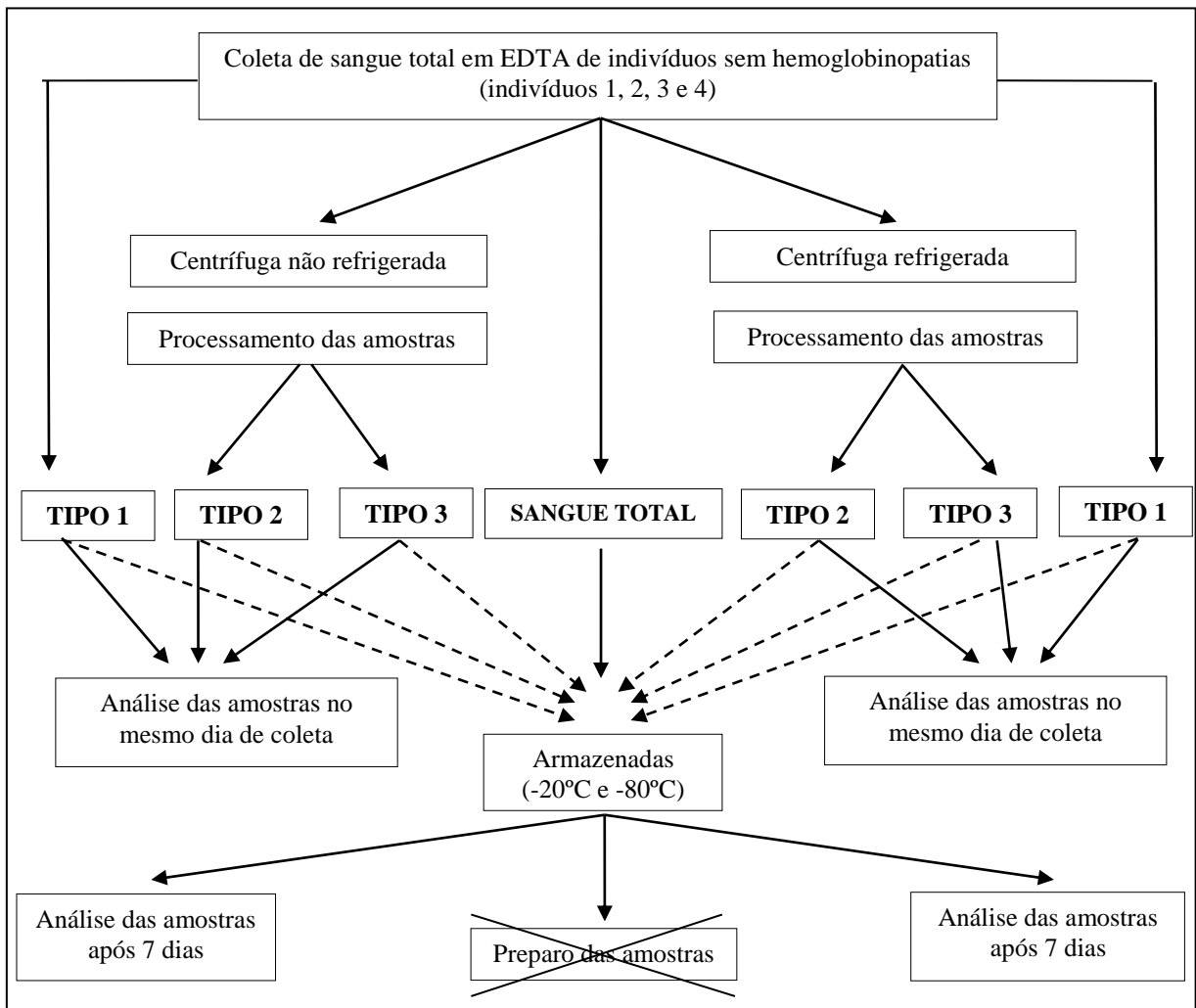


Figura 3. Fluxograma de testes envolvendo a influência da centrífuga refrigerada, processamento de amostras, armazenamento e conservação das amostras.

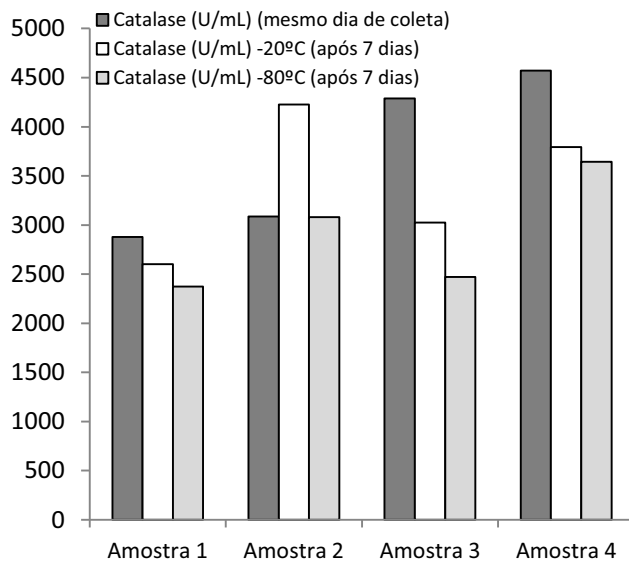


Gráfico 2. Valores da atividade enzimática da catalase avaliadas no mesmo dia de coleta e após 7 dias de armazenamento em -20°C e -80°C.
* teste ANOVA não mostrou diferença estatística ($p=0,32$)

Os outros dois tipos de processamento de amostra (Tipo 2 e Tipo 3) também foram avaliados e de acordo com a atividade enzimática e homogeneidade da solução final, a do Tipo 2 foi excluída e a do Tipo 3 seguimos os testes. A nossa primeira observação utilizando o Tipo 3, foi em relação a influência da temperatura no processamento das amostras, ou seja, o uso de centrífuga refrigerada e não refrigerada. No Gráfico 3-A fica evidente a importância da centrífuga refrigerada no processamento das amostras, uma vez que, a atividade enzimática da GST apresentou valores superestimados em relação aos valores obtidos com o uso de centrífuga refrigerada. Devido a esse resultado descartamos as amostras processadas sem o uso de centrífuga refrigerada e avaliamos a atividade enzimática dessas mesmas amostras após sete dias de armazenamento em duas diferentes temperaturas (-20°C e -80°C). Os resultados podem ser observados do Gráfico 3-B, em que a melhor temperatura que condiz com a atividade enzimática no mesmo dia de coleta foi o armazenamento das amostras na temperatura de -80°C.

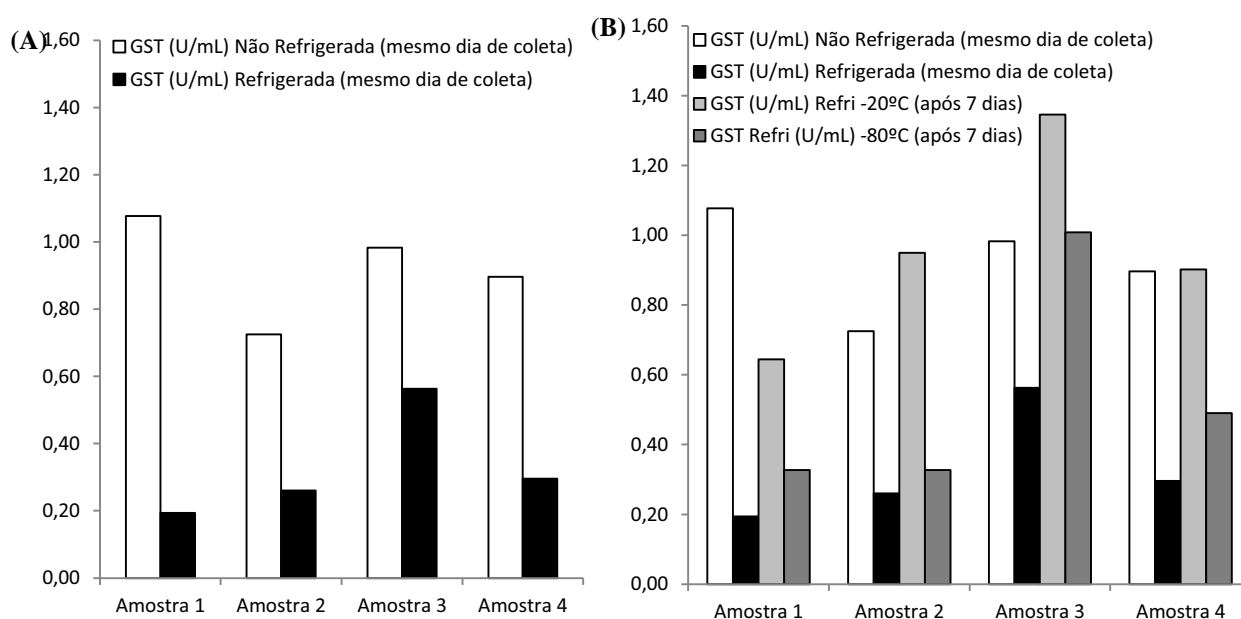


Gráfico 3. Valores da atividade enzimática da glutatona S-transferase com a influência da centrífuga não refrigerada e da temperatura de armazenamento das amostras. A) O processamento das amostras sem o uso de centrífuga refrigerada superestima a atividade da GST em ~2.8 vezes do valor ideal ($p=0,01$ pelo teste *T* pareado). B) Influência da temperatura na viabilidade da atividade enzimática, pelo teste de ANOVA a atividade enzimática da GST no mesmo dia de coleta não apresentou diferença estatística com o -80°C, ao contrário da -20°C que aumentou a atividade em ~2.9 vezes do valor ideal.

Os valores obtidos na concentração de GSH, que também utiliza o Tipo 3 de processamento, foram parecidos com os demonstrados na atividade da GST.

Resumindo essa etapa de repadronização, a forma ideal de processamento, envio das amostras, armazenamento e análise do material coletado devem seguir as seguintes etapas:

1) Após a coleta dos dois tubos de sangue total com EDTA executada pela equipe do Hemorio, as amostras deverão ser processadas no mesmo dia de coleta;

2) Os tipos de processamento serão a do Tipo 1, para análise da atividade da catalase e quantificação de proteínas, a do Tipo 3 com o uso de centrífuga refrigerada para a análise das enzimas GST, GPx, GR e SOD, bem como da concentração de GSH e GSSG;

3) As amostras após o processamento deverão ser armazenadas em freezer a -80°C até o momento de envio das amostras;

4) As amostras processadas do Tipo 1, Tipo 3 e plasma com EDTA deverão ser embaladas em caixas de isopor com gelo seco para manter a temperatura em torno de -80°C , e as amostras de sangue total embaladas em caixas de isopor contendo gelo reutilizável mantendo a temperatura entre $2 - 8^{\circ}\text{C}$. Após o embalamento das amostras, as mesmas serão enviadas para o Ibilce/São José do Rio Preto;

5) Quando as amostras chegarem no Ibilce, as que forem para a avaliação bioquímica deverão ser armazenadas no freezer a -80°C até serem analisadas e as de sangue total serão submetidas a testes de diagnóstico para a doença falciforme e extração de DNA

APÊNDICE B - PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA FALCIFORME, IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS E ANÁLISES BIOQUÍMICAS.

Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias

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

Preparação de hemolisados:

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

- Hemolisado Rápido - com saponina
- Solução de Hb - com clorofórmio

Hemolisado Rápido: com saponina

Reativo hemolisante:

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

Procedimento:

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

Solução de Hb: com Clorofórmio

Procedimento:

- Para lavar os eritrócitos, centrifugou-se 1 mL de sangue colhido com anticoagulante com solução salina a 0,85%, a 1.500 rpm, durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante. O processo foi realizado três vezes, no mínimo.
- Ao volume de eritrócitos lavados, adicionou-se outro de água destilada, homogeneizando a solução. A seguir, adicionou-se um volume de clorofórmio

idêntico ao do hemolisado formado. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000 rpm, por 20 minutos.

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

Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%

Princípio:

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

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

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

Solução trabalho

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

Procedimento:

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

Interpretação:

O tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% foi colocado a 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras. O teste foi interpretado como positivo quando não se visualiza as linhas negras, pois a resistência aumentada à

hemólise do eritrócito, tornava a amostra opaca. Em amostras com resistência normal à hemólise visualizam-se facilmente as linhas através da solução.

Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária

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

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

Eletroforese em pH alcalino

Princípio:

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

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

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

Corante Ponceau

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

Solução descorante:

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

Procedimento:

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

- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas,

conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multi-uso).

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

- Passaram-se 300 volts por 30 minutos.

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

Eletroforese em pH ácido

Princípio:

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

Reagentes:

Tampão Fosfato pH 6,2 - Para eletroforese e confecção do gel:

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

Conservar em geladeira

Gel de Ágar-Fosfato

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

Procedimento:

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

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

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

- Passaram-se 100 volts por 30 minutos.

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

Cromatografia líquida de alta performance

Princípio:

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD) com Kit de análise Beta Talassemia Heterozigota. O equipamento consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passam pela coluna detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância versus tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb. Cada Hb tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Para o Kit Beta Talassemia Heterozigota:

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

Interpretação:

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

considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

Metodologias moleculares para análise dos polimorfismos

Extração do DNA

Princípio:

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

Reagentes:

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

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

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

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

3. Proteinase K (20 mg/mL)

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

Conservar em freezer.

4. Fenol

5. Clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)

6. Etanol 70%

7. KCl 2M

Procedimento:

Amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA, foram colocadas em microtubos e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após 10 minutos de agitação, foi centrifugado por cinco minutos a 6500 rpm. O sobrenadante

foi desprezado e ao precipitado foram acrescentados 1,0 mL de solução de lise 1, esse passo foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 450µL de solução de lise 2; 25µL de SDS à 10% e 5 µL de proteinase K 20 mg/mL. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por três horas a 42°C.

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

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

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

Análise molecular para Hb S por PCR-RFLP

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

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

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

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

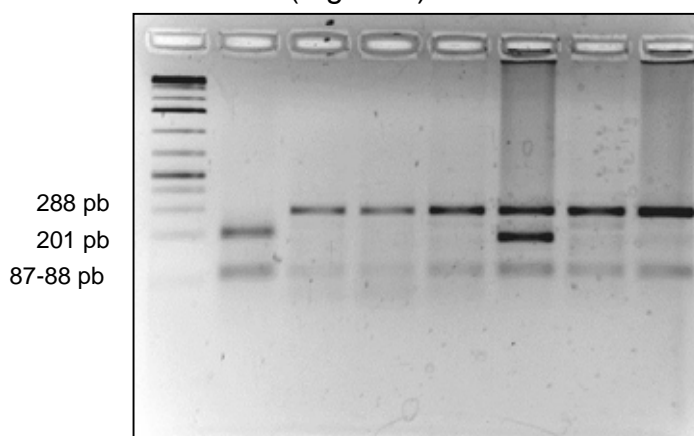


Figura 1. Foto de um gel de agarose a 1,5%, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-RFLP para Hb S. Amostras 2, 3, 4, 6 e 7 – homozigotos para a mutação Hb S. Amostra 1- ausência da mutação Hb S. Amostra 5: heterozigoto para a Hb S. M = marcador molecular de 100 pb

PCR-AE para Hb S e Hb C

As amostras que apresentaram perfil eletroforético e cromatográfico compatível com Hb SC foram submetidas à amplificação gênica alelo-específica (PCR-AE). Nesta técnica foram utilizados 3 tubos para cada amostra de DNA, sendo no tubo 1 adicionados os *primers* controles (B5a e B5b) e o *primer* específico do alelo normal (BA); no tubo 2 os *primers* controles (B5a e B5b) e o *primer* específico do alelo mutante (BS) e no tubo 3 os *primers* controles (B5a e B5b) mais o *primer* específico (BC). As sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR-AE e o tamanho dos fragmentos amplificados estão listados na Tabela 1 e na Figura 7.

Para cada “mix” foi preparado um volume final de 25,0µL, destes 10,0µL foram de H₂O, 2,5µL dos *primers* controles a 3,0µM, 0,32µL do *primer* específico a 3,0 µM, 3,2µL de dNTP a 1,25mM cada, 0,5µL de *Taq* Polimerase de 1U, 2,5µL de tampão sem MgCl₂, 1,5µL de MgCl₂ a 50mM, 1,0 µL de DMSO a 30% e 1,0 µL de DNA a 100ng/µL. A reação de amplificação obedeceu as seguintes condições: um

ciclo com uma repetição de 3 minutos a 94°C para desnaturação inicial; um ciclo com 35 repetições, desnaturação a 45 segundos a 94°C, anelamento durante 60 segundos a 60°C, extensão de 30 segundos a 72°C e 1 ciclo com uma repetição de 10 minutos a 72°C.

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

O indivíduo com o genótipo normal apresentou o fragmento de 216 pb na posição correspondente a posição A, indivíduo Hb SS na posição S, Hb CC na posição C, Hb AS nas posições A e S , Hb AC nas posições A e C, Hb SC nas posições S e C (Figura 2).

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

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

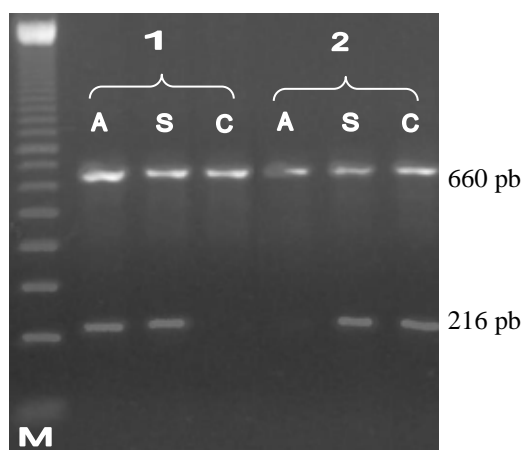


Figura 2. Foto de um gel de agarose a 2,0%, com iluminação UV. PCR-AE para Hb S e Hb C. M= marcador molecular de 100pb; A - “mix” para o alelo da Hb A; S - “mix” para o alelo da Hb S e C - “mix” para o alelo da Hb C. O Paciente 1 é heterozigoto para a Hb S e o Paciente 2 é duplo heterozigoto para a Hb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

Identificação dos genótipos de beta talassemia

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

Mutação no Códon 39 (C → T)

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

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

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

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sobre luz ultravioleta (Figura 3).

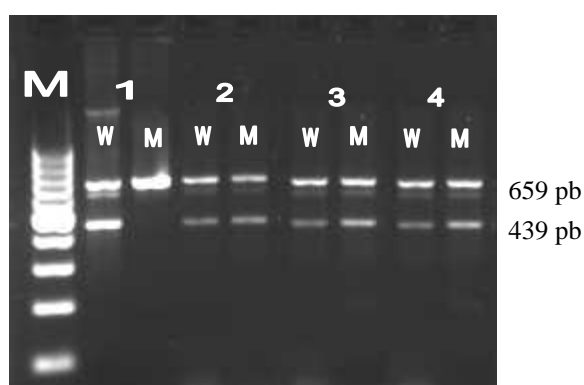
As bandas de tamanho 659 pb representam os fragmentos resultantes do controle interno da reação, já as de 439 pb referem-se a produtos de amplificação específica. Se o produto do “mix” do alelo normal apresentar fragmentos de 659 e 439 pb indica que o individuo possui o alelo normal; se o produto do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

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

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

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

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

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

Mutação IVS-I-110 (G → A)

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

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

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

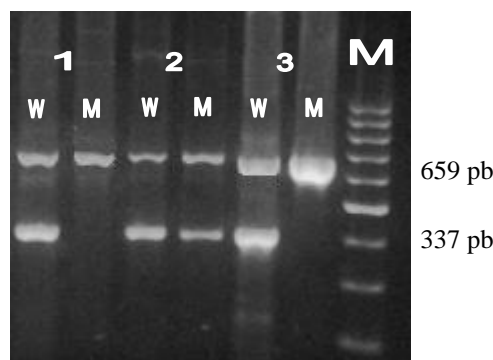
Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2%, sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sobre luz ultravioleta, Figura 4

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

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

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

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

**Figura 4.** Foto de um gel de agarose a 2,0 %, com iluminação UV. Resultado da técnica PCR-AE para detecção da mutação IVS-I-110. Amostra 1 e 3 – ausência da mutação, Amostra 2 - heterozigotos para mutação. M = marcador molecular de 100pb. W – alelo normal, M – alelo mutante.

Mutação IVS-I-6 (T → C)

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

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

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

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

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

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

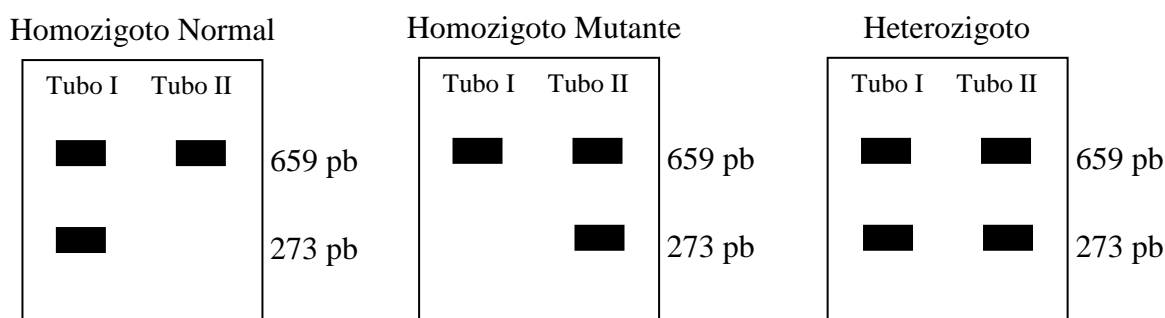


Figura 5. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR –AE para a mutação IVS-I-6.

Mutação IVS-I-1 (G → A)

Para a mutação IVS-I-1, o DNA foi amplificado a partir de dois “mix”, utilizou-se três iniciadores para cada “mix”. No primeiro foi inserido o par de *primers* controles internos da reação (B5a e B5b), para o segmento de interesse, mostrados

anteriormente, e o *primer* específico para o alelo normal (IVSI1W - 5' GTG ACC TTG ATA CCA AC 3'). No segundo "mix" foram inseridos os mesmos *primers* controles e o *primer* específico (IVSI1M - 5' GTG ACC TTG ATA CCA AA 3') para o alelo mutante.

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

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

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

"mix" I – Alelo Normal		"mix" – Alelo Mutante	
Componentes	µL	Componentes	µL
Tampão (10 X)	2,5	Tampão (10 X)	2,5
MgCl ₂ (2 mM)	0,75	MgCl ₂ (2 mM)	0,75
dNTP's (1,25 mM)	4,0	dNTP's (1,25 mM)	4,0
DMSO puro	1,0	DMSO puro	1,0
Primer B5a (2 µM)	2,5	Primer B5a (2 µM)	2,5
Primer B5b (2 µM)	2,5	Primer B5b (2 µM)	2,5
Primer IVSI1W (10 µM)	2,5	Primer IVSI1W (10 µM)	2,5
Taq Polimerase (5U/µl)	0,25	Taq Polimerase (5U/µl)	0,25
DNA (100 ng)	1,0	DNA (100 ng)	1,0
H ₂ O	8,0	H ₂ O	8,0
Volume Final (µL)	25,0	Volume Final (µL)	25,0

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

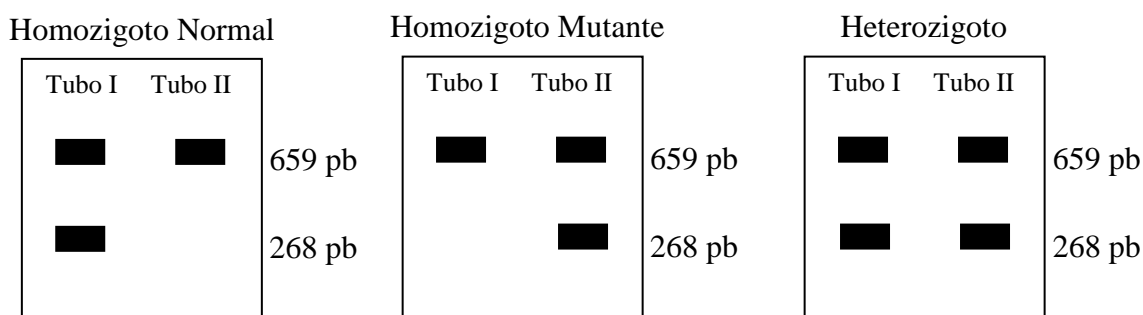


Figura 6. Representação esquemática do produto esperado após amplificação por PCR –AE para a mutação IVS-I-1.

Detecção dos Polimorfismos

Identificação do polimorfismo C-509T no gene *TGFB1*

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguida de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação foram: *primer* sense TGFB1: 5' CCG CTT CTG TCC TTT CTA GG 3', *primer* antisense TGFB2: 5' AAA GCG GGT GAT CCAGATG - 3'.

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

H2O Mili Q	13,55 µL.
<i>Primer</i> TGFB1 10 µM	2,0 µL.
<i>Primer</i> TGFB2 10 µM	2,0 µL.
dNTP 1,25 mM	2,0 µL.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 µL.
MgCl ₂ 50 mM	0,75 µL.
Taq Polimerase 5U	0,2 µL.
DNA 150 ng/µL	2,0 µL.

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: Ativação a 95°C por 5 minutos, ciclo de 35 repetições, desnaturação inicial durante 30 segundos a 95°C, anelamento durante 30 segundos a 60°C, extensão de 30 segundos a 72°C, extensão final durante 7 minutos a 72°C, após a amplificação, o fragmento de 406 pb foi digerido a 37°C por 5 minutos. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi: 8,5 µL de H2O Mili Q, 1,0uL de Tampão 0,5 uL de Enzima Bsu36 I (CC↓TNAGG) e 5,0 µL do produto da PCR.

Os fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizado sob luz UV, após coloração com brometo de etídio (Figura 3).

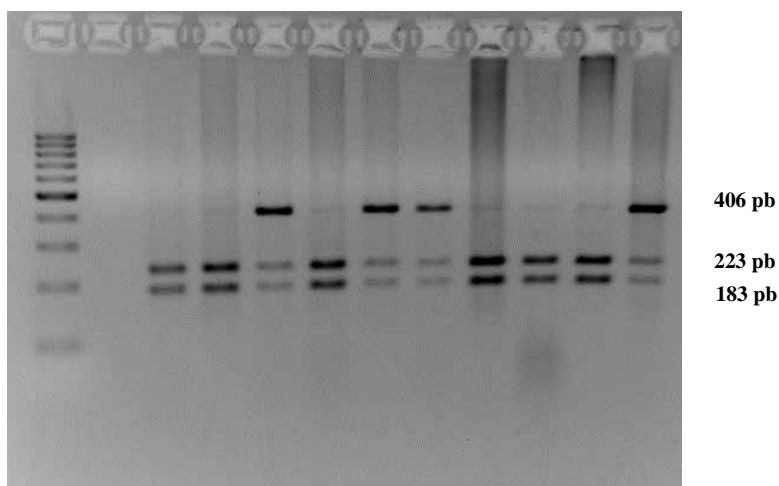


Figura 7. Gel de agarose para análise do polimorfismo -509C/T (*TGFB1*). O fragmento gerado na amplificação tem 406pb. Na ausência do polimorfismo, a enzima de restrição gera 2 fragmentos (183pb e 223pb). Os resultados para as amostras da figura são: 1-Branco, 2-CC, 3-CC, 4-CT, 5-CC, 6-CT, 7-CT, 8-CC, 9-CC, 10-CC, 11-CT.

Identificação do polimorfismo G-308A no gene TNFA

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguida de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação foram: *primer* sense TNFA1: 5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT - 3' e *primer* antisense TNFA2: 5' - ACA CTC CCC ATC CTC CCG GCT - 3'

Para cada tubo de reação foi preparada a seguinte mistura, com volume final de 25 μ L

H2O Mili Q	5,0 μ L.
<i>Primer</i> TNFA1 10 μ M	3,75 μ L.
<i>Primer</i> TNFA2 10 μ M	3,75 μ L.
dNTP 1,25 mM	5,0 μ L.
Tampão sem MgCl ₂	2,5 μ L.
MgCl ₂ 50 mM	2,5 μ L.
Taq Polimerase 5U	0,5 μ L.
DNA 150 ng/ μ L	2,0 μ L

A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições de ciclagem: Ativação a 95°C por 5 minutos, ciclo de 35 repetições, desnaturação inicial durante 1 minuto e 30 segundos a 95°C., anelamento durante 1 minuto a 62°C, extensão de 1 minuto e 30 segundos a 72°C e extensão final durante 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, o fragmento gerado, de 117 pb, foi digerido a 37°C por 5 minutos. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi: 8,5 μ L de H₂O Mili Q, 1,0 μ L de Tampão, 0,5 μ L da enzima Nco I (C↓CATGG) e 5,0 μ L do produto da PCR. Na presença do alelo G, foram originados dois fragmentos (97 pb e 20 pb), enquanto

o alelo A não possui o sítio reconhecido pela enzima de restrição, gerando, então, apenas um fragmento (117 pb). Indivíduos heterozigotos apresentaram os três fragmentos (117 pb, 97 pb e 20 pb)

A visualização dos fragmentos digeridos foi realizada em gel de agarose a 3% submetido à eletroforese sob corrente constante de 120 V por 70 minutos, Figura 8.

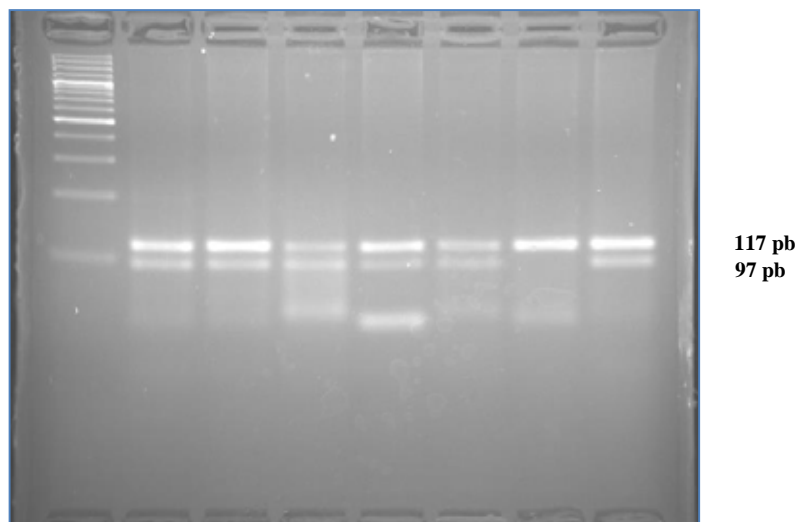


Figura 8. Gel de agarose a 3% para análise do polimorfismo -308G/A (TNFA). O fragmento gerado na amplificação tem 117 pb. Na ausência do polimorfismo, a enzima de restrição gera dois fragmentos menores, 97pb e 20pb, este último não é visualizado no gel. Os resultados para as amostras da figura são: 1-GA, 2-GA, 3-GA, 4-GA, 5-GA, 6-AA, 7-GG.

Identificação do polimorfismo T-786C no NOS3

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. Os *primers* utilizados para a amplificação foram o *primer* sense ENOS1 5' GCA TGC ACT CTG GCC TGA AGT G3' e *primer* antisense ENOS2 5' CAG GAA GCT GCC TTC CAG TGC 3'.

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

Após a amplificação, o fragmento gerado, de 180 pb, foi digerido a 37°C por 5 minutos. O conteúdo do mix para a reação de digestão foi: 8,5 µL de H₂O Mili Q,

1,0 µL de Tampão, 0,5 uL da enzima *Msp* I (C↓CGG) e 5,0 µL do produto da PCR. Na presença do alelo normal, foram originados dois fragmentos (138 pb e 42 pb), enquanto o alelo mutante gera três fragmentos de 92 pb, 46 pb e 42 pb, Figura 9.

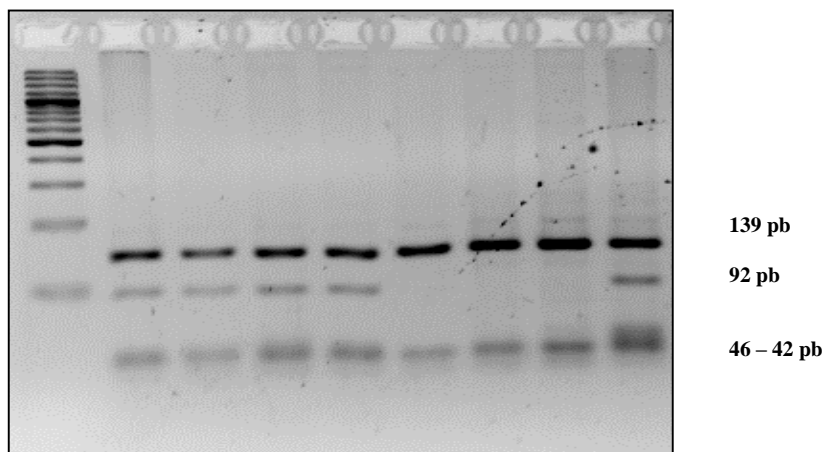


Figura 9. Foto de um gel de agarose a 2,5% e após a digestão da PCR pela enzima *MspI*. Amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 8 – heterozigotos para a mutação -786T/C. Amostras 5, 6 e 7 – ausência da mutação -786T/C. M= marcador molecular de 100 pb.

Identificação do polimorfismo 313A/G do gene GSTP1

A pesquisa do polimorfismo GSTP1 envolve a amplificação do segmento delimitado pelos *primers* 105F – 5' – ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA – 3' e 105R – 5' – TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT – 3, seguido das seguintes condições:

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

- H ₂ 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 ₂	2,5 µL;
- MgCl ₂ 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 1 minuto e meio, seguida de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

O produto de amplificação da PCR foi submetido à enzima de restrição *Bsm*I, isômero da enzima *A**l**w* 26*I* (5U) (New England BioLabs). O produto da amplificação após o adição da enzima foi colocado em banho maria à 37°C, por 4 horas, para clivagem das sequências em regiões específicas. Após digestão, o alelo normal gerou um fragmento de 176 pb e o alelo mutante 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 10)

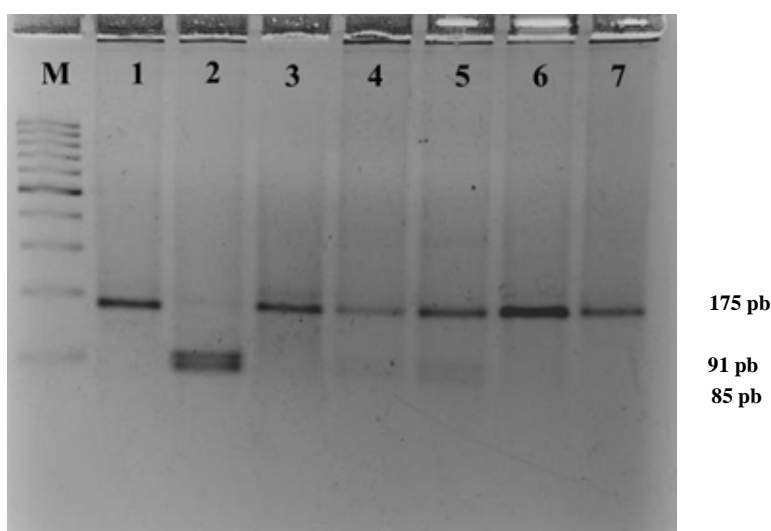


Figura 10. Interpretação da análise molecular para a mutação 313A/G por PCR-RFLP. Gel de agarose a 3,5% com os padrão de bandas após a digestão da PCR pela enzima *Bsm**I*. Amostras 1, 3, 4, 5, 6 e 7 – ausência da mutação 313A/G. Amostra 2 – homocigoto para a mutação 313A/G. M= marcador molecular de 100 pb.

Identificação dos polimorfismos da *GSTM1* e *GSTT1*

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 *primers* específicos *GSTM1* 5'GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C3', *GSTM2* 5'GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G3', *GSTT1* 5'TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC3', *GSTT2* 5'TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA3' e *primers* controles (CYP1 5' GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT3', CYP2 5'CAG CTG CATT TGG AAG TGC TC3') gerada pela amplificação do gene *housekeeping* *CYP1*.

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

- H ₂ O Mili Q	7,0 μ L;
- <i>Primer</i> M1	1,25 μ L;
- <i>Primer</i> M2	1,25 μ L;
- <i>Primer</i> T1	1,25 μ L;
- <i>Primer</i> T2	1,25 μ L;
- <i>CYP</i> 1	1,25 μ L;
- <i>CYP</i> 2	1,25 μ L;
- dNTP 1,25 mM	5,0 μ L;
- Tampão sem MgCl ₂	2,5 μ L;
- MgCl ₂ 50 mM	0,75 μ L;
- Taq Polimerase 5U	0,20 μ L;
- DNA 100 ng/ μ L	2,0 μ 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 1 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 11).

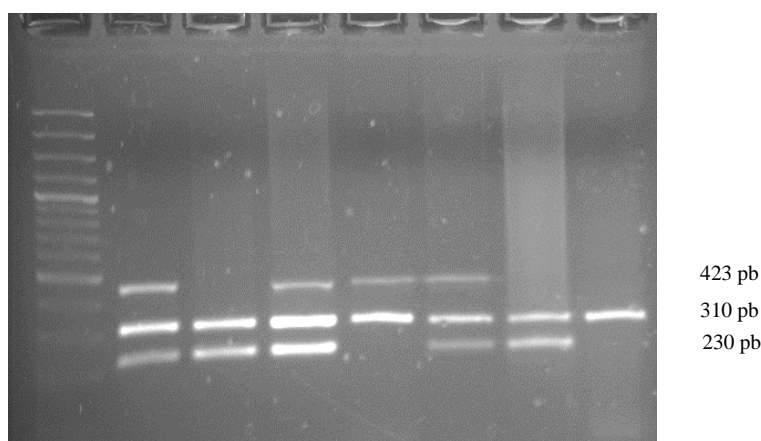


Figura 11. Interpretação da análise molecular para as deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* por PCR-MULTIPLEX Foto de um gel de agarose a 2,0%. Amostras 1, 3 e 5 – genótipo M/T. Amostra 2 e 6 – genótipo M/M. Amostra 4 – genótipo T/T e Amostra 4 – genótipo nulo. M= marcador molecular de 100 pb.

Avaliação da Capacidade antioxidante e de marcadores de dano oxidativo

Determinação da atividade enzimática da Catalase

As amostras de sangue foram diluídas a 50 vezes em água destilada e sua atividade medida pelo método de Beutler (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima, através do decréscimo de absorvância em 240 nm, a 30° C ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Preparo das amostras: 1) Centrifugar amostra de sangue total por 3 min a 1500 rpm a 4 °C, coletar 10 μL do precipitado (papa de eritrócitos) e misturá-los a 490 μL de H₂O ultra pura, obtendo o hemolisado utilizado nas análises.

Preparo do tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0 contendo EDTA 0,5 mM	
Tris(hidroximetil)aminometano	30,27g
EDTA	0,365g
H ₂ O destilada	250 mL
Ajustar o pH para 8,0 com HCl.	

Análise da leitura: Referência: 1 mL de H₂O Ultra Pura

Meio de Reação (10 mM H₂O₂): 1) Adicionar 250 μL de H₂O₂ 3% em 25mL de H₂O Ultra Pura; 2) Descartar uma alíquota de 2,5 mL; 3) Adicionar 1,25mL do Tampão Tris-HCl.EDTA e 1,25mL de H₂O Ultra Pura

Ensaio Enzimático

Meio de reação	990 μL
Amostra (hemolisado)	10 μL

A atividade da catalase foi calculada e expressa em U/mL de hemolisado

Determinação da atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase

As amostras de sangue foram diluídas a 100 vezes em solução hemolisante e a atividade da GST foi feita pelo método de Keen et al., (1976). A amostra diluída foi adicionada em um meio de reação contendo 100 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 100 mM de GSH, e o aumento de absorvância será acompanhado a 340 nm.

Preparo das amostras e soluções

Solução Salina 0,9%		
NaCl (Cloreto de Sódio)	9,0 g	
H ₂ O destilada q.s.p		1 litro

Solução hemolisante		
2-mercaptoetanol 7 mM	500 µL	
NADP 2 mM	5 mL	
EDTA 0,27 M	10 mL	
H ₂ O ultra pura		1 litro

Procedimento da técnica: 1) Adicionar 1 mL solução fisiológica gelada (NaCl 0,9%) a 100 µL do precipitado de glóbulos vermelhos de sangue total colhido em tubo contendo EDTA, homogeneizar e centrifugar por 3 min a 1500rpm/4°C e, finalmente, descartar o sobrenadante. 2) Repetir o processo anterior três vezes; 3) Coletar 50 µL do precipitado (papa de eritrócitos lavados final), e acrescentar 950 µL de solução hemolisante; 4) Manter por 15min a -18°C; 5) Centrifugar por 15 min a 3500rpm; 6) Separar o sobrenadante (hemolisado) para as análises.

Preparo do tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5)		
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio Monobásico)	13,605 g	
K ₂ H ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio Dibásico)		17,42 g
H ₂ O destilada q.s.p.		1 litro
Ajustar o pH para 6,5.		

Análise da leitura: Referência

Referência: 1mL de Solução tampão Fosfato de Potássio

Hidrólise espontânea:

Solução tampão Fosfato de Potássio	980µL
GSH 100mM	10µL
CDNB 100mM	10µL

Ensaio Enzimático

Solução tampão Fosfato de Potássio	930µL
GSH 100mM	10µL
CDNB 100mM	10µL
Amostra (hemolisado)	50µL

A atividade da GST total foi calculada e expressa em U/mL de hemolisado:

Determinação da atividade enzimática da Glutaciona Peroxidase

As amostras de sangue foram diluídas a 100 vezes em solução hemolisante e a atividade da GPx foi medida pelo método de Sies et al. (1979), por meio do decréscimo da absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da glutaciona oxidada (GSSG). A redução é catalisada por glutaciona redutase (GR) em presença de NADPH a 30°C.

Preparo do meio de reação:

Tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,0	25 mL
EDTA 0,005 M; pH 7,0	10 mL
NADPH	1,72 mg/10 mL meio
Glutaciona redutase	11 uL
GSH	16 mg
H ₂ O	15 mL

Preparação do tBOOH

tBOOH	128 uL
Tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,0	10 mL

Ensaio Enzimático

Meio de reação	(990-X) ul
tBOOH	10 uL
Amostra	x uL

Análise da leitura: Referência

Referência: 1 mL do Tampão fosfato de potássio 0,1M; pH 7,0

Hidrólise espontânea:

Meio de reação	990 ul
tBOOH	10 uL

Leitura: 1 minuto a 340nm.

Determinação da atividade enzimática da Glutaciona Redutase (GR)

As amostras de sangue foram lisadas e a atividade da GR foi medida pelo método de Beutler (1969). A amostra lisada foi adicionada em um meio de reação contendo 125 mM de GSSG e 6 mM de NADPH, e o aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm.

Preparo dos reagentes:

GSSG 125mM

Tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5; EDTA 1mM	1 mL
GSSG (612,6)	76,58 mg
GSSG (656,6)	82,08 mg

NADPH 6mM

NADPH (833,4)	5 mg
NaHCO ₃ a 0,1%	1 mL

Análise da leitura: Referência

Referência: 1 mL do tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5; EDTA 1mM

Hidrólise espontânea:

tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5; EDTA 1mM	960µL
GSSG 12 5mM	20 µL
NADPH 6 mM	20 µL

Ensaio Enzimático

Solução tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,5; EDTA 1mM	(960-X) µL
Amostra	X µl
GSSG 12 5mM	20 µL
NADPH 6 mM	20 µL

Leitura: 2 minutos a 340nm; a 30°C.

Dosagem de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

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

Reagentes:

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

Preparo do Plasma: 1) As amostras de sangue foram coletadas em tubo com EDTA e permaneceram por um período de 20 minutos em descanso, sob Banho Maria a 38°C. 2) Foram centrifugadas a 1500rpm, durante 20 min e separadas

Preparo final dos controles e amostras 1) O TBA foi preparado no mesmo dia da leitura; 2) Foi separado 2 tubos de ensaio para cada amostras (ensaio em duplicata); 3) Pipetou-se 1 mL do reagente TBA para cada tubo; 4) 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; 5) A partir dos tubos de número 3 foram adicionadas 500 ul das amostras a serem analisadas; 6) Os tubos forma colocados em banho Maria a 94°C durante 1h; 7) Após 1h resfriamos os tubos a temperatura ambiente por 15 minutos; 8) Pipetou-se 4 mL de álcool n Butílico em cada tubo; 9) Tampamos os tubos com rolhas apropriadas e homogeneizamos as amostras com um vórtex; 10) Centrifugou-se os tubos 2500 rpm durante 10 minutos

Leitura em Espectrofotômetro: 1) Ajustamos o espectrofotometro em 535 nm; 2) Zeramos o aparelho com o CONTROLE BRANCO (tubo 1); 3) Dosamos as amostras contidas nos tubos

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:

$$\text{TBARS} = \text{A média} \times \text{F, no qual: A média} = (\text{A1} + \text{A2}) / 2$$

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

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

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

APÊNDICE C- ARTIGOS

Artigo publicado na revista: Free Radical Biology and Medicine

Fator de impacto: 5.271

Qualis: A1 para Ciências Biológicas I



Review Article

Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies



Danilo Grunig Humberto Silva^{a,b,1}, Edis Belini Junior^{a,1}, Eduardo Alves de Almeida^b,
Claudia Regina Bonini-Domingos^{a,*}

^a Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases Laboratory, Department of Biology, Sao Paulo State University "Julio de Mesquita Filho," 15054-000 Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil

^b Laboratory of Aquatic Contamination Biomarkers, Department of Chemistry and Environmental Sciences, Sao Paulo State University "Julio de Mesquita Filho," 15054-000 Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2013

Received in revised form

22 August 2013

Accepted 22 August 2013

Available online 31 August 2013

Keywords:

Erythrocytes

Redox process

Hemoglobin S

Free radicals

ABSTRACT

Erythrocytes have an environment of continuous pro-oxidant generation due to the presence of hemoglobin (Hb), which represents an additional and quantitatively significant source of superoxide ($O_2^{\cdot -}$) generation in biological systems. To counteract oxidative stress, erythrocytes have a self-sustaining antioxidant defense system. Thus, red blood cells uniquely function to protect Hb via a selective barrier allowing gaseous and other ligand transport as well as providing antioxidant protection not only to themselves but also to other tissues and organs in the body. Sickle hemoglobin molecules suffer repeated polymerization/depolymerization generating greater amounts of reactive oxygen species, which can lead to a cyclic cascade characterized by blood cell adhesion, hemolysis, vaso-occlusion, and ischemia-reperfusion injury. In other words, sickle cell disease is intimately linked to a pathophysiologic condition of multiple sources of pro-oxidant processes with consequent chronic and systemic oxidative stress. For this reason, newer therapeutic agents that can target oxidative stress may constitute a valuable means for preventing or delaying the development of organ complications.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

Introduction.....	1101
Erythrocyte role in the maintenance of body antioxidant systems	1102
Sickle erythrocytes: a pro-oxidant machine	1102
Antioxidant therapeutic strategies in SCD	1103
Hydroxycarbamide	1103
Iron chelators	1104
Glutamine	1104
α -Lipoic acid and acetyl-L-carnitine	1104
Statins	1104
Zinc supplementation	1105
L-Arginine, tetrahydrobiopterin (R-BH ₄), and inhaled NO	1105
N-acetylcysteine	1105
Vitamin E and vitamin C	1105
Conclusions	1105
Acknowledgments	1106
References	1106

Introduction

Sickle cell disease (SCD) encompasses inherited hemolytic anemia due to a single point mutation in the β -globin gene (HBB^{S/normal})

* Corresponding author.

E-mail address: claudiabonini@jrp.unesp.br (C.R. Bonini-Domingos).

¹ These authors contributed equally to this work.

that results in the formation of sickle hemoglobin (HbS) [1]. The phenotypic expression of SCD patients is complex and characterized by intermittent vaso-occlusion events, increased susceptibility to infections, chronic inflammatory disease, and microvascular damage in all organs [2–5].

The molecular basis for HbS formation is known, but the mutation by itself is not sufficient to explain the heterogeneous phenotype found in SCD patients, such as pain episodes, acute chest syndrome, neurological complications, leg ulcers, and other symptoms. However, since the first description of sickle-shaped erythrocytes in 1910 by Herrick [6], the understanding of SCD pathophysiology has gradually increased.

Among the new evidence, oxidative stress processes have been increasingly related to SCD pathophysiology [7]. The increased production of pro-oxidant elements is caused by intrinsic disease mechanisms, such as increased activity of several oxidases (NADPH oxidase and endothelial xanthine oxidase) [8,9], HbS autoxidation [10], heme iron release, increased asymmetric dimethylarginine [11,12], uncoupling of nitric oxide synthase (NOS) activity, and decreased nitric oxide (NO) levels [13]. As the antioxidant defense systems in SCD are affected and/or are not efficient enough to neutralize excessive production of oxidant species [14,15], chronic oxidative stress is established, being a critical factor in endothelial dysfunction, inflammation, and damage to multiple organs [16].

Even with better understanding of several mechanisms involved in SCD, e.g., the consequences of HbS polymerization, clinical management of the disease is still basic and, although much evidence gives support to the use of blood transfusion and hydroxycarbamide in some circumstances, no drugs have been specifically developed to target the pathophysiology of this disease [17]. Many studies have been carried out to elucidate oxidative stress in SCD or even in red blood cells (RBCs), and some antioxidant therapeutic possibilities, but to our knowledge this is the first work focusing specifically on normal and sickle erythrocyte redox metabolism, and its implications for body antioxidant systems and SCD pathophysiology, and on current antioxidant strategies to attenuate oxidative stress, thus improving SCD patients' condition. In this review, we briefly overview the implications of the HbS presence in erythrocyte redox metabolism and the use of antioxidant therapeutic strategies in SCD.

Erythrocyte role in the maintenance of body antioxidant systems

Reactive oxygen species (ROS) production is a steady-state event in respiring cells. In erythrocytes, Hb can represent an additional and quantitatively significant source of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) generation in biological systems. There is an electron transfer in the bonding interaction between the heme and the O_2 in oxygenated Hb [18]. When Hb deoxygenates, the heme iron normally remains in the Fe(II) ferrous state. In this exchange, alterations wherein Hb autoxidizes result in methemoglobin and $O_2^{\cdot-}$ formation [19]. There is a normal "physiologic" rate of red cell methemoglobin formation that provides a continual source of $O_2^{\cdot-}$ production, which in turn generates hydrogen peroxide (H_2O_2) and O_2 as enzymatic dismutation by-products [20]. Thus, perturbations in erythrocyte function and structure can lead to an enhanced flow of pro-oxidant generation that can lead to oxidative stress.

To counteract oxidative stress, erythrocytes have a self-sustaining activity of antioxidant defense enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR), in addition to low-molecular-weight antioxidants, such as glutathione (GSH) and

vitamins E and C [21]. Furthermore, RBCs have a plasma membrane redox system that transfers electrons from intracellular substrates to extracellular electron acceptors, which may be NAD^+ or vitamin C [22]. Therefore, RBCs uniquely function to protect Hb via a selective barrier allowing gaseous and other ligand transport as well as providing enzymatic mechanisms to maintain Hb in a functional nontoxic state [23], providing antioxidant protection not only to themselves but also to other tissues and organs in the body [24].

In healthy individuals, the erythrocyte number exceeds $4 \times 10^{12}/L$ in circulating blood, which comprises approximately one-quarter of the total body cell number [25–27]. Thus, erythrocytes are among the most abundant cell types in a human body [28–30]. The usual erythrocyte life span approaches 100–120 days [25–27]. Thus, in an individual with 5 L of blood, more than 10^{11} erythrocytes are newly formed and removed each day [25–27], meaning the erythrocyte generation rate is closely coordinated with their removal by the reticuloendothelial system [31]. Erythrocytes lack nuclei and mitochondria, critical elements in the apoptosis machinery. Thus, dying erythrocytes were considered to be eliminated by mechanisms other than apoptosis [32–34]. However, aged erythrocyte clearance shares apoptosis hallmarks, such as cell shrinkage, cell membrane blebbing, and cell membrane scrambling leading to phosphatidylserine exposure at the cell surface [35]. Owing to similarities to apoptosis, the term eryptosis has been coined to describe the suicidal erythrocyte death [36].

Eryptosis may be elicited by several cell stressors, including osmotic shock [37], energy depletion [38], and oxidative stress [38–40]. Before senescence, erythrocytes may experience injury, which may compromise their integrity and survival [35]. On average RBCs pass once a minute through the lungs, where they are exposed to oxidative stress. More than once an hour they travel through the kidney medulla, where they face osmotic shock. Erythrocytes have to squeeze through capillaries that are smaller than the cells [36]. Thus, the erythrocyte's integrity is constantly challenged [41]. Human erythrocytes are also exposed to pro-oxidative actions of ROS produced in the circulation [21] as well as to a wide range of environments for each vascular circuit and are exposed to a variety of xenobiotics along their lifetime [41]. Under these conditions affected erythrocytes may undergo eryptosis, leading to removal of injured erythrocytes before hemolysis. Enhanced eryptosis may also result from genetic defects of erythrocyte enzymes, such as glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, or of Hb synthesis, such as thalassemia or SCD [26].

Sickle erythrocytes: a pro-oxidant machine

Sickle erythrocytes are characterized by the presence of HbS, instead of the normal HbA. Upon deoxygenation within the microcirculation, HbS molecules alter their configuration, exposing some hydrophobic residues that rapidly associate with hydrophobic regions of adjacent molecules in the aqueous cell compartment [42]. This process of self-assembly or polymerization/sickling generates rigid HbS fibers that distort and damage the RBC membrane and cytoskeleton and alter RBC biochemical properties. HbS polymerization is reversible; fibers "melt" as oxygen is taken up by the HbS and the normal discoid shape returns [42].

One of the important pro-oxidant sources in SCD are sickle erythrocytes, in which the unstable autoxidative HbS and increased metabolic turnover due to recurrent HbS polymerizations and depolymerizations cause increased ROS generation [43,44]. The higher energy expenditure due to the increased metabolic turnover upon polymerization and depolymerization

results in higher ROS production in sickle erythrocytes [43,45]. Hence, sickle erythrocytes have been reported to generate twofold greater amounts of $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , hydroxyl radical (HO^*), and lipid oxidation products compared with HbA-containing erythrocytes [18,44,46–49]. The increased and unremitting pro-oxidant generation in SCD results in excessive antioxidant consumption and thus antioxidant deficiency [43,50,51]. RBC SOD activity has been shown to increase in some SCD studies [52–54], which concluded that this may be a defense mechanism in response to increased oxidative stress and could possibly cause a H_2O_2 buildup, whereas other works showed decreased SOD activity [15,55,56]. According to Schacter et al. [15], decreased RBC SOD is related to disease severity in SCD patients compared with healthy volunteers.

H_2O_2 is produced either via a two-electron transfer or as a result of sickling and it is removed by two main antioxidant enzymes: GPx and CAT [18,52,57]. CAT is usually more important than GPx because of its ability to degrade H_2O_2 without consuming cellular reducing equivalents (GSH or NADPH), which is an energy-efficient way of removing H_2O_2 [41]. There is a discrepancy between studies on SCD CAT levels; some studies have shown decreased CAT activity in transgenic sickle mouse models [56] and likewise in SCD patients [55,58]. In contrast, Manfredini et al. [54] observed increased CAT levels in SCD patients, in agreement with another study done by Das and Nair [52]. The increase in CAT might be a protective effect to scavenge H_2O_2 , whereas the decreased levels might be due to the overwhelming and chronic oxidative stress [59]. An additional hypothesis is that elevated antioxidant enzyme levels in sickle erythrocytes might also be a consequence of higher reticulocyte content in SCD patients' blood.

Another important enzyme related to the antioxidant defense in erythrocytes is G6PD, the regulatory enzyme of the pentose-phosphate (PP) pathway. Because RBCs do not contain mitochondria, the PP pathway is the only source of NADPH in erythrocytes [60], playing an important role in the NADPH-dependent antioxidant defense [61,62]. G6PD deficiency is the most common human enzyme defect, affecting over 400 million people worldwide [60], and it has been associated with increased oxidative stress [63]. The interaction of G6PD deficiency and SCD has been of interest; various studies have suggested that G6PD deficiency has a beneficial [64,65], deleterious [66,67], or no influence upon the course of SCD [68,69]. However, the influence of the interaction of these disorders on oxidative stress markers is still unclear.

Glutathione, a cofactor for GPx to reduce H_2O_2 , is easily oxidized to glutathione disulfide (GSSG) by oxidant compounds. GSH concentration is significantly reduced in SCD patients [51,57], with some studies noting a 50% decrease in sickle erythrocytes compared with normal erythrocytes [70]. GPx concentrations are also reduced [55,71], with a direct relationship to the disease severity [56]. A contrasting study by Gizi et al. [53] reported higher GPx activity compared to controls, whereas no significant difference was found regarding the activity of GR, a key enzyme in the regeneration of GSH from GSSG by using electrons from NADPH. As commented, sickle erythrocytes are characterized by decreased GSH concentrations [43,72], even though its *de novo* synthesis and recycling rate have been shown to be higher compared to healthy erythrocytes [51]. These studies suggest that the pro-oxidant overabundance may lead to the consumption or inactivation of these protective elements.

Under normal conditions 95% of the intracellular glutathione is present in its reduced form (GSH) [73]. The disulfide form (GSSG) can be either recycled to GSH or removed from the intracellular environment through specialized transporters, such as multidrug resistance-associated protein-1 (encoded by the *ABCC1* gene), located in the erythrocyte cell membrane [74,75]. The mechanism for sickle erythrocyte GSH deficiency has not been determined yet. Nur et al. [76] demonstrated an increased GSSG efflux in sickle erythrocytes that can be a protective action, because GSSG is an

oxidant itself and its enhanced excretion under oxidative conditions prevents the potentially toxic effects of its intracellular accumulation [77]. But increased GSSG efflux could play an important role in GSH depletion in these cells. Erythrocytes are not only a main ROS source in SCD but also endure the brunt of the intracellular oxidative stress [44,78].

Other low-molecular-weight antioxidants suffer alterations due to excessive ROS generation. SCD patients have approximately a 40% reduction in plasma carotene level and a 30% reduction in vitamin E levels [70,79] and reduced ascorbic acid levels [80]. More recently, Gizi et al. [53] also showed lower levels of vitamins A, C, and E and antioxidant compounds (an overall antioxidant capacity measure) in SCD patients compared with normal counterparts. In contrast, Shimaui et al. [81] reported higher antioxidant compounds, but ones that correlated positively with lipid peroxidation in SCD patients, suggesting that even higher antioxidant levels were not enough to counteract oxidative stress in SCD patients.

High lipid peroxidation levels have been extensively described in SCD [47,54–56,58,81–87], because sickle erythrocytes showed both an increased endogenous extent of oxidized lipid and an increased susceptibility to further lipid peroxidation, compared with HbA-containing erythrocytes [48,52,88,89], and also a rise in intracellular Ca^{2+} [90]. In addition to lipid peroxidation, increased intra- and extraerythrocytic oxidative stress induces membrane instability with high phosphatidylserine (PS) exposure percentage, contributing to accelerated intravascular hemolysis [5,91–93] that drives increased endothelial ROS generation. Furthermore, externalization of PS at the outer side of erythrocytes may act as a catalytic surface on which various coagulation factors can interact, resulting in a condition of hypercoagulability [94].

The repeated polymerization/depolymerization process can lead to a vicious cycle inciting blood cell adhesion, hemolysis, vaso-occlusion, and ischemia-reperfusion injury [59]. In other words, multiple sources of pro-oxidant processes with consequent chronic and systemic oxidative stress. For this reason, newer therapeutic agents that can target oxidative stress may constitute a valuable means of preventing or delaying the development of organ complications [5,95].

Antioxidant therapeutic strategies in SCD

Several studies have demonstrated a significant increase in stress markers in SCD, and protective mechanisms such as antioxidants are often decreased [7,54,92,96,97]. In SCD the benefit of life-long treatment with antioxidants may be more promising, because the onslaught of oxidizing agents is widespread in the body and probably commences in the first year of life and continues from then on at a high intensity [95]. Thus, the demonstration of a reduction in oxidative stress parameters and of the prevention of pathophysiologic events due to the use of drugs with antioxidant properties in SCD patients indicates that the use of therapeutic antioxidants may represent a fundamental issue in the attenuation of several oxidative stress consequences of the disease. However, owing to the complexity of the SCD pathophysiology, there are few available clinical trials, mainly phase III ones, which limits the evaluation of the impact of antioxidant therapies on disease symptoms. However, *in vitro* studies, observations in animal models, and studies involving SCD patients have shown interesting and optimistic results (Table 1).

Hydroxycarbamide

Currently, hydroxycarbamide, or hydroxyurea (HU), is the only disease-modifying therapy approved for SCD; the increased synthesis of fetal Hb (HbF) is the main effect of this drug [98].

Table 1
Summary of main antioxidant effects of various therapeutic strategies on the oxidative stress attenuation in SCD.

Drug/treatment	Main antioxidant effect on oxidative stress in SCD
Hydroxyurea	Decreases lipid peroxidation and enhances NO metabolites
Iron chelators	Decreases iron toxicity and lipid peroxidation
Glutamine	Increases the NAD redox potential and NO generation
α -Lipoic acid	Decreases plasma protein carbonyls, increases NF- κ B and glutathione synthesis
Acetyl-L-carnitine	Decreases lipid peroxidation
Statins	Increases NO metabolites
Zinc	Increases antioxidant power and plasma nitrite and nitrate
L-Arginine	Increases plasma NO
Inhaled NO	Increases NO bioavailability
Tetrahydrobiopterin	Increases eNOS activity and NO production
N-acetylcysteine	Increases glutathione synthesis
Vitamin E	Decreases lipid peroxidation and ROS production
Vitamin C	Decreases ROS production and increases glutathione concentration

NO, nitric oxide; eNOS, endothelial nitric oxide synthase, NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; ROS, reactive oxygen species.

The augmented HbF expression reduces several oxidative stress biomarkers and NO scavenging in both sickle cell mice and SCD patients [58,86,99,100]. Other results also showed that increasing concentrations of HbF, a protective effect of HU, is directly proportional to the increase in CAT activity and GSH levels and decreased lipid peroxidation [58,99]. Thus, HbF reduces the number of painful vaso-occlusive crises and seems to reduce hemolysis [101,102].

Another pathway through which HU enhances antioxidant capacity of sickle erythrocytes is by inducing GPx1 expression, whose activity plays a role in reducing membrane lipid peroxidation, promoting membrane stability, and thereby probably reducing hemolysis [103]. In addition to this observation, HU can directly protect the RBC membrane when exposed to oxidizing agents, reducing lipid peroxidation [104]. Ghatpande et al. [105] demonstrated, through analysis of the sickle RBC membrane, that in vitro HU treatment increased antioxidant enzymes, such as catalase, thioredoxin peroxidase, and flavin reductase, suggesting an RBC-adaptive response to oxidative damage.

Furthermore, HU showed a capacity as a NO donor, based on reports of enhanced NO metabolite levels as well as cGMP in SCD patients within 1–2 h after its administration [106–108]. By reducing vaso-occlusion and hemolysis alone, HU administration could have a major impact on total oxidative stress in SCD. It is important to note that in addition to the effect of increasing HbF levels, HU also can reduce hemolysis markers, increase total Hb amount, and decrease reticulocyte number and adhesion molecule expression, among others [109–111].

Iron chelators

Iron overload in SCD is usually associated with recurrent hemolysis, frequent blood transfusions, and an iron-rich diet. SCD patients require regular blood transfusions to manage acute and chronic complications [112–114]. As humans have no physiological mechanism to actively eliminate iron overload, the excessive labile iron in the circulation promotes ROS generation through Fenton and Haber–Weiss reactions [115]. Thus, to avoid excessive oxidation of biomolecules by ROS due to iron overload, SCD patients are often treated with iron chelators.

Among the available iron chelators, deferiprone has been shown in vitro and in vivo to decrease iron associated with sickle erythrocyte membranes and H₂O₂-mediated lipid peroxidation

end-products, suggesting that enhanced sickle erythrocyte oxidant production and cell damage are partially dependent on catalytically active iron [116]. Desferoxamine, a cell-impermeative chelator, has been shown to attenuate blood cell adhesion in cerebral venules of SCD mice [9]. Deferasirox has shown efficacy in iron chelating, reducing oxidative stress parameters in β -thalassemia and myelodysplastic syndrome patients that were transfusion-dependent [117–120]. In SCD patients, Belini Junior et al. [121] demonstrated, in a longitudinal study, the antioxidant and iron-chelating effects of deferasirox. SCD patients showed decreased lipid peroxidation levels and iron parameters, in addition to increased overall antioxidant capacity levels.

Glutamine

Glutamine plays an additional antioxidant role through preservation of intracellular NADPH levels, required for GSH recycling. In vitro studies with glutamine have shown an antisickling property in RBCs [122,123]. Glutamine oral supplementation in SCD increases the NAD redox potential and may decrease sickle erythrocyte adhesiveness [124]. RBC glutamine depletion has been associated with elevated tricuspid regurgitant jet velocity, hemolysis, and oxidative stress markers in SCD patients [13]. These observations have led to a phase II trial of oral glutamine therapy for hemolysis-associated pulmonary hypertension in SCD and thalassemia (NCT01048905). Another phase III clinical trial is currently under way to determine whether a 48-week course of glutamine supplementation reduces vaso-occlusive events in adults with SCD (NCT01179217).

α -Lipoic acid and acetyl-L-carnitine

In vitro supplementation of α -lipoic acid is known to have potent antioxidant properties. It can inhibit sickling by 50% [125]; decrease plasma protein carbonyls, urinary isoprostanes, and low-density lipoprotein oxidation [126]; protect peroxyl radical-induced hemolysis; and increase GSH synthesis [127]. The cellular stress response is related to increasing antioxidant gene expression, NF- κ B, and GSH synthesis [128].

Acetyl-L-carnitine is an essential nutrient that facilitates the entry of long-chain fatty acids into the mitochondria and decreases lipid peroxidation in tissue. Based on in vitro observations, Ronca et al. [129] suggest that this nutrient may be beneficial in maintaining the normal shape of sickle erythrocytes at low oxygen tension and in decreasing the peroxidative damages that accumulate during RBC life. A recent study in SCD also suggests a benefit in cardiac function [130].

The association of α -lipoic acid and acetyl-L-carnitine has a synergistic antioxidant effect in reversing oxidative stress arising from iron overload [131], and a phase II trial is now evaluating their efficacy in decreasing vaso-occlusive events (NCT01054768).

Statins

Statins are believed to mediate their effects through prevention of endothelial injury via direct action on NO production [132,133]. The clinical benefit derived from statins is mediated via improved endothelial function, as shown in diseases such as diabetes, stroke, metabolic syndrome, and cardiovascular disease, but their effects in SCD are not known [134]. In SCD, results from transgenic sickle cell mice showed that lovastatin (a type of fermentation-derived statin) inhibits endothelial expression of tissue factors induced by hypoxia and reperfusion injury [135]. Hoppe et al. [136], in a pilot study, observed increased plasma NO metabolites and decreased C-reactive protein in SCD patients using simvastatin (a type of

fermentation-derived statin), suggesting a potential therapeutic role for SCD vasculopathies.

Other clinical trials involving SCD are in progress using simvastatin (NCT00508027) and atorvastatin (NCT00072826); thus statins may prove to be a viable option for stopping the vasculopathy progression.

Zinc supplementation

Zinc deficiency is common in adult SCD patients [137–139]. Zinc supplementation of SCD patients has been shown to decrease oxidative stress, incidence of infection, and inflammatory cytokine generation [140]. The mechanism of zinc functioning as a site-specific antioxidant has been widely investigated. At least two mechanisms have been proposed: (i) the competition of zinc with iron and copper for binding to cell membranes and some proteins, which displaces these redox-active metals, and (ii) zinc can bind the SH groups in proteins, which protects them from oxidation [141]. Furthermore, zinc has been recognized as an inhibitor of NADPH oxidases to reduce generation of ROS and it is also a cofactor of SOD. Another study found that zinc reduces the irreversibility of sickled cells, but this antioxidant did not accomplish a clinically measurable ameliorating effect, such as reducing the degree of hemolysis [142].

L-Arginine, tetrahydrobiopterin (R-BH₄), and inhaled NO

In SCD patients, NO bioavailability can be reduced in several ways, e.g., via an increase in free O₂^{•-}, through the products of hemolysis (free heme and arginase), and through the “uncoupling” of endothelial NOS (eNOS) [59]. In addition to its role in vascular tone, blood flow, and adhesion, NO is also known to possess antioxidant properties, two of the most noteworthy being O₂^{•-} scavenging and heme oxygenase induction [143]. Because of the importance in maintaining proper NO levels, exogenous NO treatment is often beneficial.

In addition to the evidence for HU increasing NO metabolite levels, arginine therapy in transgenic knockout sickle mice has been demonstrated to improve NO bioavailability and microvascular function and reduce hemolysis and oxidative stress [56,144]. In SCD patients with pulmonary hypertension, arginine supplementation increases plasma NO and rapidly decreases pulmonary artery pressure [145]. When given in combination with HU, arginine therapy of SCD patients seems to increase NO bioavailability [146,147]. Otherwise, a phase II clinical trial found that NO amounts did not increase in patients using arginine compared to a placebo group (NCT00513617).

Normally, through the catalytic action of eNOS, R-BH₄ transfers an electron in the oxygenase domain, converting L-arginine into NO and L-citrulline. A deficiency of R-BH₄ can lead to the production of O₂^{•-} via the uncoupling of eNOS [148]. In cultured endothelial cells, a deficiency of R-BH₄ was shown to uncouple eNOS, whereas its supplementation completely restored eNOS activity and increased NO production [149]. The combined effects of these studies demonstrate the vital role of R-BH₄ in assisting in eNOS function and thus its potential as a treatment for SCD [150].

Measurements of decreased exhaled NO in SCD patients with acute chest syndrome (ACS) suggest that these patients may benefit from NO therapy [143,151]. A case report showed a variety of beneficial effects, including increased plasma NOx, in inhaled NO treatment used to treat SCD patients with ACS and nonhemorrhagic stroke [152]. Indeed, it has been reported that inhaled NO improves tissue oxygenation and reduces pain in SCD patients [153,154], although it remains unclear whether this effect reflects an improved oxygen affinity of HbS [155].

Other approaches to increasing NO bioavailability include phase I and II clinical trials evaluating sodium nitrite, niacin, and R-BH₄ (NCT01033227, NCT00508989).

N-acetylcysteine

N-acetylcysteine (NAC) is an important antioxidant with pleiotropic effects on inflammation and vasomotor function. NAC readily enters cells and within the cytoplasm it is converted to L-cysteine, which is a precursor of GSH [156,157]. Gibson et al. [158] demonstrated, in vitro, that NAC could effectively block the formation of dense cells and irreversible sickle cells. SCD patients treated with NAC at a dose of 2400 mg increased intracellular GSH levels and reduced dense cell formation [159]. In another study it was observed that NAC at both 1200- and 2400-mg doses seemed to decrease hemolysis (detected by reductions in cell-free hemoglobin concentrations) and oxidative stress (evidenced by reductions in sickle erythrocyte phosphatidylserine expression and plasma levels of advanced glycation end-products) [160].

Vitamin E and vitamin C

Supplementation of vitamins C and E in SCD patients has conflicting reports in the literature. In vitro, preincubation of sickle erythrocytes with vitamin E decreased the susceptibility to peroxidation. This finding was also observed in vivo, whereby those individuals with vitamin E deficiency showed increased levels of lipid peroxidation compared to control subjects [161,162]. Ohnishi et al. [125], both in an ex vivo study and in a pilot clinical trial, demonstrated that a cocktail consisting of daily doses of vitamin E, vitamin C, and garlic extract may be beneficial to SCD patients. Another study found that after only 10 weeks of vitamin E supplementation, the irreversibly sickled red cells decreased from 25 to 11% [163]. Amer et al. [14] also observed a decrease in sickled RBC and ROS markers and an increase in GSH concentration. In a study with SCD children supplemented with α-tocopherol, the percentage of irreversibly sickled cells was significantly reduced and the resistance of the cells to lysis was increased [164]. On the other hand, in other studies the vitamin E supplementation did not improve anemia or markers of hemolysis, oxidative stress, and inflammation in SCD patients [142,165].

Vitamin C supplementation efficiently decreased ROS production while it increased GSH concentration. It may be through these effects that ascorbic acid supplements were shown to also prevent H₂O₂-induced hemolysis [14]. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid supplements have also shown to inhibit dense RBC formation and to decrease lipid peroxidation levels in SCD patients [126], despite Arruda et al. [165] and Muskiet et al. [142] having found no significant differences in SCD patients.

Conclusions

The presence of HbS in erythrocytes not only causes erythrocyte deformation and biochemical alterations that enhance hemolysis and eryptosis, but is also responsible for increases in ROS production and oxidative stress. Nevertheless the classical therapeutic strategies for SCD treatment (i.e., blood transfusion and hydroxycarbamide) have mainly focused on increasing the non-sickled cell amounts or HbF levels. Several studies have pointed toward the great efficacy of therapeutic drugs that decrease ROS consequences in SCD, i.e., decrease lipid peroxidation levels in plasma, including hydroxycarbamide. These studies often indicate that oxidative stress mitigation by various antioxidant therapeutic approaches generally results in the amelioration of the health conditions of SCD patients, but for the most part they refer only to

blood oxidative stress parameters. There are few studies regarding oxidative stress in SCD that have focused on the role of the erythrocytes in ROS generation and the molecular strategies triggered by these cells that could be important for the attenuation of general blood oxidative stress. Therefore more studies on oxidative stress biomarkers and antioxidant therapeutic strategies that reduce oxidative stress generation in erythrocytes, as discussed in this review, remain a worthy and promising goal, which might lead to more specific and effective prognostic information for SCD patients and to the development of more efficacious therapeutic drugs for mitigating oxidative stress in sickle erythrocytes, thus alleviating the disease outcome.

Acknowledgments

We thank the following Brazilian foundations for supporting our research: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

References

- Scinberg, M.; Sebastiani, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *Am. J. Hematol.* **87**:795–803; 2012.
- Barabino, G.; Platt, M.; Kaul, D. Sickle cell biomechanics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **12**:345–367; 2010.
- Steinberg, M. Predicting clinical severity in sickle cell anemia. *Br. J. Haematol.* **129**:465–481; 2005.
- van Beers, E.; van Tuijn, C.; Mac Gillavry, M.; van der Giessen, A.; Schnog, J.; Biemond, B.; CURAMA Study Group. Sickle cell disease-related organ damage occurs irrespective of pain rate: implications for clinical practice. *Haematologica* **93**:757–760; 2008.
- Wood, K. C.; Granger, D. N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**:926–932; 2007.
- Herrick, J. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *Yale J. Biol. Med.* **74**:179–184; 2001.
- Rees, D.; Gibson, J. Biomarkers in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **156**:433–445; 2012.
- Aslan, M.; Ryan, T.; Adler, B.; Townes, T.; Parks, D.; Thompson, J.; Tousson, A.; Gladwin, M.; Patel, R.; Tarpey, M.; Batinic-Haberle, I.; White, C.; Freeman, B. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:15215–15220; 2001.
- Wood, K.; Heibel, R.; Granger, D. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *FASEB J* **19**:989–991; 2005.
- Heibel, R. P.; Eaton, J. W.; Balasingam, M.; Steinberg, M. H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **70**:1253–1259; 1982.
- Landburg, P. P.; Teerlink, T.; Biemond, B. J.; Brandjes, D. P.; Muskiet, F. A.; Duits, A. J.; Schnog, J. B. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cells Mol. Dis.* **44**:229–232; 2010.
- Xia, Y.; Dawson, V.; Dawson, T.; Snyder, S.; Zweier, J. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:6770–6774; 1996.
- Morris, C. R.; Kato, G. J.; Poljakovic, M.; Wang, X.; Blackwelder, W. C.; Sachdev, V.; Hazen, S. L.; Vichinsky, E. P.; Morris Jr S. M.; Gladwin, M. T. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* **294**:81–90; 2005.
- Amer, J.; Choti, H.; Rachmilewitz, E.; Koren, A.; Levin, C.; Fibach, E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br. J. Haematol.* **132**:108–113; 2006.
- Schacter, L.; Warth, J. A.; Gordon, E. M.; Prasad, A.; Klein, B. L. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. *J. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2**:237–243; 1988.
- Heibel, R. P.; Osaroglagbon, R.; Kaul, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* **11**:129–151; 2004.
- Rees, D. C.; Williams, T. N.; Gladwin, M. T. Sickle-cell disease. *Lancet* **376**:2018–2031; 2010.
- Aslan, M.; Thornley-Brown, D.; Freeman, B. A. Reactive species in sickle cell disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**:375–391; 2000.
- Carroll, R. W.; Winterbourn, C. C.; Rachmilewitz, E. A. Activated oxygen and haemolysis. *Br. J. Haematol.* **30**:259–264; 1975.
- Freeman, B. A.; Crapo, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**:412–426; 1982.
- Perrone, S.; Tataranno, M. L.; Stazzoni, G.; Del, V. A.; Buonocore, G. Oxidative injury in neonatal erythrocytes. *J. Matern.-Fetal Neonat. Med.* **25**:104–108; 2012.
- Rizvi, S. I.; Jha, R.; Maurya, P. K. Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging. *Rejuvenation Res* **9**:470–474; 2006.
- Cappadoro, M.; Giribaldi, G.; O'Brien, E.; Turrini, F.; Mammi, F.; Ulliers, D.; Simola, G.; Luzzatto, L.; Anese, P. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood* **92**:2527–2534; 1998.
- Siems, W. G.; Sommerburg, G.; Grune, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. *Clin. Nephrol.* **53**:59–17; 2000.
- Foller, M.; Huber, S. M.; Lang, F. Erythrocyte programmed cell death. *JBMB Life* **60**:661–668; 2008.
- Lang, E.; Qadri, S. M.; Lang, F. Killing me softly—suicidal erythrocyte death. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**:1236–1243; 2012.
- Lang, F.; Gulbins, E.; Lerche, H.; Huber, S. M.; Kempe, D. S.; Foller, M. Eryptosis, a window to systemic disease. *Cell. Physiol. Biochem.* **22**:373–380; 2008.
- Anese, P.; Turrini, F.; Schwarzer, E. Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* **16**:133–146; 2005.
- Bosman, G. J.; Willekens, F. L.; Werre, J. M. Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis? *Cell. Physiol. Biochem.* **16**:1–8; 2005.
- Kiefer, C. R.; Snyder, L. M. Oxidation and erythrocyte senescence. *Curr. Opin. Hematol.* **7**:113–116; 2000.
- (de) Oliveira, S.; Saldanha, C. An overview about erythrocyte membrane. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **44**:63–74; 2010.
- Berg, C. P.; Engels, I. H.; Rothbart, A.; Lauber, K.; Renz, A.; Schloesser, S. F.; Schulze-Osthoff, K.; Wesselborg, S. Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell Death Differ.* **8**:1197–1206; 2001.
- Bratosin, D.; Estaquier, J.; Petit, F.; Arnault, D.; Quatannens, B.; Tissier, J. P.; Stomiatny, C.; Sartiaux, C.; Alonso, C.; Huard, J. J.; Montreuil, J.; Ameisen, J. C. Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell Death Differ.* **8**:1143–1156; 2001.
- Dauqas, E.; Candé, C.; Kroemer, G. Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ.* **8**:1131–1133; 2001.
- Lang, E.; Qadri, S. M.; Zelenak, C.; Gu, S.; Rotte, A.; Draeger, A.; Lang, F. Inhibition of suicidal erythrocyte death by blebbistatin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**:C490–C498; 2011.
- Lang, K. S.; Lang, P. A.; Bauer, C.; Duranton, C.; Wieder, T.; Huber, S. M.; Lang, F. Mechanism of suicidal erythrocyte death. *Cell. Physiol. Biochem.* **15**:195–202; 2005.
- Lang, K. S.; Duranton, C.; Poehlmann, H.; Myssina, S.; Bauer, C.; Lang, F.; Wieder, T.; Huber, S. M. Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. *Cell Death Differ.* **10**:249–256; 2003.
- Lang, K. S.; Roll, B.; Myssina, S.; Schittenhelm, M.; Scheel-Walter, H. G.; Kanz, L.; Fritz, J.; Lang, F.; Huber, S. M.; Wieder, T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cell. Physiol. Biochem.* **12**:365–372; 2002.
- Barvitenko, N. N.; Adragna, N. C.; Weber, R. E. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cell. Physiol. Biochem.* **15**:1–18; 2005.
- Bracci, R.; Perrone, S.; Buonocore, G. Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period. *Acta Paediatr.* **91**:130–134; 2002.
- Pandey, K. B.; Rizvi, S. I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **155**:131–136; 2011.
- Stuart, M. J.; Nagel, R. L. Sickle-cell disease. *Lancet* **364**:1343–1360; 2004.
- Banerjee, T.; Kuypers, F. A. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *Br. J. Haematol.* **124**:391–402; 2004.
- Heibel, R. P.; Morgan, W. T.; Eaton, J. W.; Hedlund, B. E. Accelerated autooxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:237–241; 1988.
- Akbohse, S. A.; Shankar, S.; Milne, G. L.; Morrow, J.; Chen, K. Y.; Ajayi, W. U.; Buchowski, M. S. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr. Res.* **61**:233–238; 2007.
- Heibel, R. P. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood* **77**:214–237; 1991.
- Klings, E. S.; Farber, H. W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respir. Res.* **2**:280–285; 2001.
- Rice-Evans, C.; Omorphos, S. C.; Baysal, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem. J.* **237**:265–269; 1986.
- Sheng, K.; Shariff, M.; Heibel, R. P. Comparative oxidation of hemoglobins A and S. *Blood* **91**:3467–3470; 1998.
- Chaves, M. A.; Lennart, M. S.; do Nascimento, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology* **13**:187–192; 2008.
- Reid, M.; Badaloo, A.; Forrester, T.; Jaboor, F. In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **291**:E73–E79; 2006.
- Dax, S. K.; Nair, R. C. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br. J. Haematol.* **44**:87–92; 1980.

- [53] Gizi, A.; Papassotiropou, I.; Apostolaki, F.; Lazaropoulou, C.; Papantamataki, M.; Kanavaki, I.; Kalotychnou, V.; Goussetis, E.; Kattamis, A.; Rombos, I.; Kanavakis, E. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: the glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood Cells Mol. Dis.* **46**:220–225; 2011.
- [54] Manfredini, V.; Lazzaretti, L. L.; Griebeler, L. H.; Santin, A. P.; Brandao, V. D.; Wagner, S.; Castro, S. M.; Peralha, M. C.; Benfato, M. S. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *JAMA* **100**:897–902; 2008.
- [55] Absultan, A. I.; Seif, M. A.; Amin, T. T.; Naboh, M.; Alsuliman, A. M. Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **14**:527–538; 2010.
- [56] Dasgupta, T.; Hebbel, R. P.; Kaul, D. K. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic. Biol. Med.* **41**:1771–1780; 2006.
- [57] Morris, C. R.; Suh, J. H.; Hagar, W.; Larkin, S.; Bland, D. A.; Steinberg, M. H.; Vichinsky, E. P.; Shigenaga, M.; Ames, B.; Kuypers, F. A.; Klings, E. S. Erythrocyte glutathione depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* **111**:402–410; 2008.
- [58] Silva, D. G.; Bellini, J. E.; Torres, L. S.; Ricci, J. O.; Lobo, C. C.; Bonini-Domingos, C. R. de Almeida, E. A. Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood Cells Mol. Dis.* **47**:23–28; 2011.
- [59] Chirico, E. N.; Ptaloux, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *JMMB Life* **6**:472–80; 2012.
- [60] Cappellini, M. D.; Fiorelli, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* **371**:64–74; 2008.
- [61] Faut, M.; Paiz, A.; San Martin de Viale, L. C.; Mazzetti, M. B. Alterations of the redox state, pentose pathway and glutathione metabolism in an acute porphyria model: their impact on heme pathway. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **238**:133–143; 2013.
- [62] Pandolfi, P. P.; Sonati, F.; Rivi, R.; Mason, P.; Grosveld, F.; Luzzatto, L. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J* **14**:5209–5215; 1995.
- [63] Hecker, P. A.; Lionetti, V.; Ribeiro Jr, R. F.; Rastogi, S.; Brown, B. H.; O'Connell, K. A.; Cox, J. W.; Shekar, K. C.; Gamble, D. M.; Sabbah, H. N.; Leopold, J. A.; Gupta, S. A.; Recchia, F. A.; Stanley, W. C. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency increases redox stress and moderately accelerates the development of heart failure. *Circ. Heart Fail* **6**:118–126; 2013.
- [64] Lewis, R. A.; Kay, R. W.; Hathorn, M. Sickle cell disease and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Haematol.* **36**:399–411; 1966.
- [65] Piomelli, S.; Reindorf, C. A.; Arzanan, M. T.; Corash, L. M. Clinical and biochemical interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle-cell anemia. *N. Engl. J. Med.* **287**:213–217; 1972.
- [66] Konotey-Ahulu, E. I. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle-cell anemia. *N. Engl. J. Med.* **287**:887–888; 1972.
- [67] Smits, H. L.; Oski, F. A.; Brody, J. I. The hemolytic crisis of sickle cell disease: the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J. Pediatr.* **74**:544–551; 1969.
- [68] Bwenzle, U.; Sodeinde, O.; Effiong, C. E.; Luzzatto, L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and sickle cell anemia: frequency and features of the association in an African community. *Blood* **46**:591–597; 1975.
- [69] Gibbs, W. N.; Wardle, J.; Serjeant, G. R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and homozygous sickle cell disease in Jamaica. *Br. J. Haematol.* **45**:73–80; 1980.
- [70] Tatum, V. L.; Chow, C. K. Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. *Free Radic. Biol. Med.* **25**:133–139; 1998.
- [71] Natta, C. L.; Chen, L. C.; Chow, C. K. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematol.* **83**:130–132; 1990.
- [72] Sontjoe, S. S.; Warrior, R. P.; Thomson, J. L.; Ory-Ascani, J.; Hempte, J. M. Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* **128**:112–118; 2005.
- [73] Reid, M.; Jabor, F. Glutathione in disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **4**:65–71; 2001.
- [74] Cole, S. P.; Deeley, R. G. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**:438–446; 2006.
- [75] Pulaski, L.; Jedlitschky, G.; Leier, I.; Buchholz, U.; Keppler, D. Identification of the multidrug-resistance protein (MRP) as the glutathione-S-conjugate export pump of erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **241**:644–648; 1996.
- [76] Nur, E.; Verwijns, M.; de Waart, D. R.; Sching, J. J.; Otten, H. M.; Brandjes, D. P.; Blemond, B. J.; Elferink, R. P. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**:1412–1417; 2011.
- [77] Prechal, J.; Srivastava, S. K.; Beutler, E. Active transport of GSSG from reconstituted erythrocyte ghosts. *Blood* **46**:111–117; 1975.
- [78] Wood, B. L.; Gibson, D. F.; Takk, J. F. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. *Blood* **88**:1873–1880; 1996.
- [79] Chiu, D.; Lubin, B. Abnormal vitamin E and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia: evidence for increased susceptibility to lipid peroxidation in vivo. *J. Lab. Clin. Med.* **94**:542–548; 1979.
- [80] Jain, S. K.; Williams, D. M. Reduced levels of plasma ascorbic acid (vitamin C) in sickle cell disease patients; its possible role in the oxidant damage to sickle cells in vivo. *Clin. Chim. Acta* **149**:257–261; 1985.
- [81] Shimsauti, E. L.; Silva, D. G.; de Almeida, E. A.; Zamaro, P. J.; Bellini, J. E.; Bonini-Domingos, C. R. Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia. *Blood Cells Mol. Dis.* **45**:297–301; 2010.
- [82] Öztas, Y. E.; Sabuncuoglu, S.; Unal, S.; Özgünes, H.; Özgünes, N. Hypochloremia is associated negatively with hemolysate lipid peroxidation in sickle cell anemia patients. *Clin. Exp. Med.* **11**:195–198; 2011.
- [83] Rusanova, I.; Escames, G.; Costio, G.; de Borace, R. G.; Moreno, B.; Chahboune, M.; Lopez, L. C.; Diez, T.; Cuna-Castroviejo, D. Oxidative stress status, clinical outcome, and beta-globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. *Eur. J. Haematol.* **85**:529–537; 2010.
- [84] Sess, E. D.; Carboneau, M. A.; Meite, M.; Peuchant, E.; Dumont, M. F.; Receveur, M. C.; Thomas, M. J.; Perromat, A.; Sangare, A.; Le, B. M.; Clerc, M. [Markers of lipid peroxidation, inflammatory proteins and plasma tocopherols in homozygotic and heterozygotic sickle cell anemia]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **91**:238–241; 1998.
- [85] Titus, J.; Chari, S.; Gupta, M.; Parekh, N. Pro-oxidant and anti-oxidant status in patients of sickle cell anaemia. *Indian J. Clin. Biochem.* **19**:168–172; 2004.
- [86] Torres, L. S.; da Silva, D. G.; Bellini, J. E.; de Almeida, E. A.; Lobo, C. C.; Cancado, R. D.; Ruiz, M. A.; Bonini-Domingos, C. R. The influence of hydroxyurea on oxidative stress in sickle cell anemia. *Rev. Bras. Hematol. Hemater* **34**:421–425; 2012.
- [87] Viana-Baracoli, L. M.; Takamoto Junior, N. C.; Ricci Junior, O.; Mattos, L. C.; Angulo, E. L.; Bonini-Domingos, C. R. Comparison of oxidative stress and the frequency of polymorphisms in the HFE gene between hemoglobin S trait blood donors and sickle cell disease patients. *Genet. Mol. Res.* **10**:3446–3454; 2011.
- [88] Essien, E. U. Increased susceptibility of erythrocyte membrane lipids to peroxidation in sickle cell disease. *Crit. Afr. J. Med.* **40**:217–220; 1994.
- [89] Jain, S. K.; Shohet, S. B. A novel phospholipid in irreversibly sickled cells: evidence for in vivo peroxidative membrane damage in sickle cell disease. *Blood* **63**:362–367; 1984.
- [90] Jain, S. K.; Shohet, S. B. Calcium potentiates the peroxidation of erythrocyte membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **642**:46–54; 1981.
- [91] Repka, T.; Hebbel, R. P. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood* **78**:2753–2758; 1991.
- [92] Walter, P. B.; Fung, E. B.; Killilea, D. W.; Jiang, Q.; Hudes, M.; Madden, J.; Porter, J.; Evans, P.; Vichinsky, E.; Harmatz, P. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **135**:254–263; 2006.
- [93] Jain, S. K. The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **259**:1391–1394; 1984.
- [94] Jain, S. K. In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. *J. Clin. Invest.* **76**:281–286; 1985.
- [95] Nur, E.; Blemond, B. J.; Otten, H. M.; Brandjes, D. P.; Schong, J. J. Oxidative stress in sickle cell disease: pathophysiology and potential implications for disease management. *Am. J. Hematol.* **86**:484–489; 2011.
- [96] Jain, S.; Ross, J.; Levy, G.; Duert, J. The effect of malonyldialdehyde on viscosity of normal and sickle red blood cells. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **44**:37–41; 1990.
- [97] Sertac, A.; Bingöl, F.; Aydin, S.; Uslu, A. Peroxidative damage in sickle-cell erythrocyte ghosts: protective effect of allopurinol. *Gen. Pharmacol.* **28**:427–428; 1997.
- [98] Zimmerman, S. A.; Schultz, W. H.; Davis, J. S.; Pickens, C. V.; Mortier, N. A.; Howard, T. A.; Ware, R. E. Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. *Blood* **103**:2039–2045; 2004.
- [99] Dasgupta, T.; Fabry, M.; Kaul, D. Antisickling property of fetal hemoglobin enhances nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout sickle mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**:402; 2010.
- [100] Kaul, D. K.; Liu, X. D.; Chang, H. Y.; Nagel, R. L.; Fabry, M. E. Effect of fetal hemoglobin on microvascular regulation in sickle transgenic-knockout mice. *J. Clin. Invest.* **114**:1136–1145; 2004.
- [101] Charache, S.; Terrin, M.; Moore, R.; Dover, G.; Barton, E.; Eckert, S.; McMahon, R.; Bonds, D. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *N. Engl. J. Med.* **332**:1317–1322; 1995.
- [102] Rodgers, G.; Dover, G.; Noguichi, C.; Schechter, A.; Nienhuis, A. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. *N. Engl. J. Med.* **322**:1037–1045; 1990.
- [103] Cho, C. S.; Kato, G.; Yang, S.; Bae, S.; Lee, J.; Gladwin, M.; Bhee, S. Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. *Antioxid. Redox Signaling* **13**:1–11; 2010.
- [104] Agil, A.; Sadzadeh, S. M. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Rep.* **5**:29–34; 2000.
- [105] Gharipande, S. S.; Chouhary, P. K.; Quinn, C. T.; Goodman, S. R. Pharmacoproteomic study of hydroxyurea-induced modifications in the sickle red blood cell membrane proteome. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **233**:1510–1517; 2008.
- [106] Gladwin, M.; Shelhamer, J.; Ognibene, F.; Pease-Fye, M.; Nichols, J.; Link, B.; Patel, D.; Jankowski, M.; Pannell, L.; Schechter, A.; Rodgers, G. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **116**:436–444; 2002.

- [107] Huang, J.; Kim-Shapiro, D.; King, S. Catalase-mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. *J. Med. Chem.* **47**:3495–3501; 2004.
- [108] King, S. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radic. Biol. Med.* **37**:737–744; 2004.
- [109] Covas, D. T.; de Lucena Angulo, I.; Vianna Bonini Palma, P.; Zago, M. A. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica* **89**:273–280; 2004.
- [110] Hillery, C. A.; Du, M. C.; Wang, W. C.; Scott, J. P. Hydroxyurea therapy decreases the in vitro adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. *Br. J. Haematol.* **109**:322–327; 2000.
- [111] Schnog, J. B.; Duits, A. J.; Muskiet, F. A.; ten Cate, H.; Rojer, R. A.; Brandjes, D. P. Sickle cell disease: a general overview. *Neth. J. Med.* **62**:364–374; 2004.
- [112] Adams, R.; McKie, V.; Hsu, L.; Files, B.; Vichinsky, E.; Pegelow, C.; Abboud, M.; Gallagher, D.; Kurlar, A.; Nichols, E.; Bonds, D.; Brambilla, D. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N. Engl. J. Med.* **339**:5–11; 1998.
- [113] Steinberg, M. H. Management of sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.* **340**:1021–1030; 1999.
- [114] Vichinsky, E.; Ohene-Frempong, K.; Transfusion Committee. Approaches to transfusion therapy and iron overload in patients with sickle cell disease: results of an international survey. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **28**:37–42; 2011.
- [115] Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**:47–95; 2002.
- [116] Shalev, D.; Repka, T.; Goldfarb, A.; Grinberg, L.; Abrahamov, A.; Olivieri, N.; Rachmilewitz, E.; Heibel, R. Deferiprone (L1) chelates pathologic iron deposits from membranes of intact thalassemic and sickle red blood cells both in vitro and in vivo. *Blood* **116**:2008–2013; 2010.
- [117] Breccia, M.; Alimena, G. Efficacy and safety of deferrioxol in myelodysplastic syndromes. *Ann. Hematol.* **2013**.
- [118] Ghori, H.; Fibach, E.; Merkel, D.; Perez-Avraham, G.; Grisaru, S.; Rachmilewitz, E. A. Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferrioxol in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes. *Haematologica* **95**:1433–1434; 2010.
- [119] Saigo, K.; Kono, M.; Takagi, Y.; Takenokuchi, M.; Hiramatsu, Y.; Tada, H.; Hishita, T.; Misawa, M.; Imoto, S.; Imashuku, S. Deferrioxol reduces oxidative stress in patients with transfusion dependency. *J. Clin. Med. Res.* **5**:57–60; 2013.
- [120] Walter, P. B.; Macklin, E. A.; Porter, J.; Evans, P.; Kwiatkowski, J. L.; Neufeld, E. J.; Coates, T.; Gardina, P. J.; Vichinsky, E.; Olivieri, N.; Alberti, D.; Holland, J.; Harmatz, P. Inflammation and oxidant-stress in beta-thalassemia patients treated with iron chelators deferrioxol (ICL670) or deferrioxamine: an ancillary study of the Novartis CICL670A0107 trial. *Haematologica* **93**:817–825; 2008.
- [121] Belini Junior, E.; da Silva, D. G.; de Souza, T. L.; de Almeida, E. A.; Cancado, R. D.; Chantone, C.; Bonini-Domingos, C. R. Oxidative stress and antioxidant capacity in sickle cell anemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. *Ann. Hematol.* **91**:479–489; 2012.
- [122] MacKenzie, R.; Gleason, E.; Schatzman, G.; Cawein, M. An in vitro method for screening compounds for the effect on the rate of sickling of erythrocytes. *J. Int. Med. Res.* **4**:375–381; 1976.
- [123] Rumen, N. Inhibition of sickling in erythrocytes by amino acids. *Blood* **45**:45–48; 1975.
- [124] Nishida, Y.; Matsui, N. M.; Shen, Y. M.; Akiyama, D. A.; Johnson, C. S.; Sunga, M. A.; Magpayo, J.; Embury, S. H.; Kalra, V. K.; Cho, S. H.; Tanaka, K. R. L-1-Glutamine therapy reduces endothelial adhesion of sickle red blood cells to human umbilical vein endothelial cells. *BMC Blood Disord.* **5**:4; 2005.
- [125] Ohnishi, S.; Ohnishi, T.; Ogumura, G. Sickle cell anemia: a potential nutritional approach for a molecular disease. *Nutrition (Burbank, CA)* **16**:330–338; 2000.
- [126] Marangon, K.; Devara, S.; Tirosh, O.; Packer, L.; Jalal, I. Comparison of the effect of α -lipoic acid and α -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:1114–1121; 1999.
- [127] Lexts, L.; Fassett, R.; Coombes, J. Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A-treated rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98**:68–73; 2006.
- [128] Vichinsky, E. Emerging 'W' therapies in hemoglobinopathies: agonists, antagonists, antioxidants, and arginine. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2012**:271–275; 2012.
- [129] Ronca, F.; Palmieri, L.; Malengo, S.; Bertelli, A. Effect of L-propionyl carnitine on in-vitro membrane alteration of sickle-cell anemia erythrocytes. *Int. J. Tissue React.* **16**:187–194; 1994.
- [130] El-Beshlawy, A.; bd El Raouf, E.; Mostafa, F.; Talaat, M.; Isma'eel, H.; Aoun, E.; Hoffbrand, A.; Taher, A. Diastolic dysfunction and pulmonary hypertension in sickle cell anemia: is there a role for L-carnitine treatment? *Acta Haematol.* **115**:91–98; 2006.
- [131] Lal, A.; Aramna, W.; Killilea, D.; Suh, J.; Ames, B. Lipoic acid and acetyl-carnitine reverse iron-induced oxidative stress in human fibroblasts. *Redox Rep.* **13**:2–10; 2008.
- [132] Amin-Hanjani, S.; Stagliano, N. E.; Yamada, M.; Huang, P. L.; Liao, J. K.; Moskowitz, M. A. Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke* **32**:980–986; 2001.
- [133] Asahi, M.; Huang, Z.; Thomas, S.; Yoshimura, S.; Sumii, T.; Mori, T.; Qiu, J.; min-Hanjani, S.; Huang, P. L.; Liao, J. K.; Lö, E. H.; Moskowitz, M. A. Protective effects of statins involving both eNOS and iPA in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **25**:722–729; 2005.
- [134] Adam, S. S.; Hoppe, C. Potential role for statins in sickle cell disease. *Phdiatr. Blood Cancer* **60**:550–557; 2013.
- [135] Solovay, A.; Kollander, R.; Sht, A.; Milbauer, L. C.; Choong, S.; Panoskaltis-Mortari, A.; Bazar, B. R.; Kelm Jr R. J.; Heibel, R. P. Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin. *Blood* **104**:840–846; 2004.
- [136] Hoppe, C.; Kuypers, F.; Larkin, S.; Hagar, W.; Vichinsky, E.; Styles, L. A pilot study of the short-term use of simvastatin in sickle cell disease: effects on markers of vascular dysfunction. *Br. J. Haematol.* **153**:655–663; 2011.
- [137] Niell, H. B.; Leach, B. E.; Kraus, A. P. Zinc metabolism in sickle cell anemia. *JAMA* **242**:2686–2687; 1979.
- [138] Prasad, A. S.; Schonmaker, E. B.; Ortega, J.; Brewer, G. J.; Oberleis, D.; Oelshlegel Jr. F. J. Zinc deficiency in sickle cell disease. *Clin. Chem.* **21**:582–587; 1975.
- [139] Prasad, A. S.; Abbasi, A. A.; Kabbani, P.; DuMouchelle, E. Effect of zinc supplementation on serum testosterone level in adult male sickle cell anemia subjects. *Am. J. Hematol.* **10**:119–127; 1981.
- [140] Bao, B.; Prasad, A. S.; Beck, F. W.; Sneli, D.; Suneja, A.; Sarkar, F. H.; Doshi, N.; Fitzgerald, J. T.; Swerdlow, P. Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl. Res.* **152**:67–80; 2008.
- [141] Bettger, W. J. Zinc and selenium, site-specific versus general antioxidant. *Crit. J. Physiol. Pharmacol.* **71**:721–724; 1993.
- [142] Muskiet, F. A.; Muskiet, F. D.; Meiborg, G.; Schermer, J. G. Supplementation of patients with homozygous sickle cell disease with zinc, alpha-tocopherol, vitamin C, soybean oil, and fish oil. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**:736–744; 1991.
- [143] Wood, K. C.; Hsu, L. L.; Gladwin, M. T. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic. Biol. Med.* **44**:1506–1528; 2008.
- [144] Kaul, D. K.; Zhang, X.; Dasgupta, T.; Fabry, M. E. Arginine therapy of transgenic-knockout sickle mice improves microvascular function by reducing non-nitric oxide vasodilators, hemolysis, and oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**:H439–H447; 2008.
- [145] Morris, C. R.; Morris Jr S. M.; Hagar, W.; van, W. J.; Cluster, S.; Kepka-Lenhart, D.; Machado, L.; Kuypers, F. A.; Vichinsky, E. P. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**:63–69; 2003.
- [146] Elias, D. B.; Barbosa, M. C.; Rocha, L. B.; Dutra, L. L.; Silva, H. F.; Martins, A. M.; Gonçalves, R. P. L-Arginine as an adjunct drug in the treatment of sickle cell anemia. *Br. J. Haematol.* **160**:410–412; 2013.
- [147] Morris, C. R.; Vichinsky, E. P.; van, W. J.; Machado, L.; Kepka-Lenhart, D.; Morris Jr S. M.; Kuypers, F. A. Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **25**:629–634; 2003.
- [148] Wood, K. C.; Heibel, R. P.; Lefer, D. J.; Granger, D. N. Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **40**:1443–1453; 2006.
- [149] Vasquez-Visar, J. Tetrahydrobiopterin, superoxide, and vascular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **47**:1108–1119; 2009.
- [150] Hsu, L.; Ataga, K. I.; Gordeuk, V. R. Tetrahydrobiopterin (6R-BH4): novel therapy for endothelial dysfunction in sickle cell disease. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* **122**(11); 2008. [Abstract].
- [151] Giris, B. E.; Qureshi, M. A.; Abrams, J.; Swerdlow, P. Decreased exhaled nitric oxide in sickle cell disease: relationship with chronic lung involvement. *Am. J. Hematol.* **72**:177–184; 2003.
- [152] Montero-Huerta, P.; Hess, D. R.; Head, C. A. Inhaled nitric oxide for treatment of sickle cell stroke. *Anesthesiology* **105**:619–621; 2006.
- [153] Weiner, D. L.; Hibberd, P. L.; Beit, P.; Cooper, A. B.; Botelho, C. A.; Brugnara, C. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA* **289**:1136–1142; 2003.
- [154] Zuzak, K. J.; Gladwin, M. T.; Cannon, R. O.; Levin, I. I. I. W. Imaging hemoglobin oxygen saturation in sickle cell disease patients using noninvasive visible reflectance hyperspectral techniques: effects of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**:H1183–H1189; 2003.
- [155] Gladwin, M. T.; Schechter, A. N.; Stelhamer, J. H.; Pannell, L. K.; Conway, D. A.; Hrinzenko, B. W.; Nichols, J. S.; Pease-Pye, M. E.; Noguetti, C. T.; Rodgers, G. P.; Ogilvie, F. P. Inhaled nitric oxide augments nitric oxide transport on sickle cell hemoglobin without affecting oxygen affinity. *J. Clin. Invest.* **104**:937–945; 1999.
- [156] Faintuch, J.; Aguilar, P. B.; Nadalin, W. Relevance of N-acetylcysteine in clinical practice: fact, myth or consequence? *Nutrition* **15**:177–179; 1999.
- [157] Zafarullah, M.; Li, W. Q.; Sylvester, J.; Ahmad, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol. Life Sci.* **60**:6–20; 2003.
- [158] Gibson, K. A.; Shartava, A.; McIntyre, J.; Monteiro, C. A.; Zhang, Y.; Shah, A.; Campbell, N. F.; Goodman, S. R. The efficacy of reducing agents or antioxidants in blocking the formation of dense cells and irreversibly sickled cells in vitro. *Blood* **91**:4373–4378; 1998.
- [159] Pace, B. S.; Shartava, A.; Pack-Mabien, A.; Mulekar, M.; Ardia, A.; Goodman, S. R. Effects of N-acetylcysteine on dense cell formation in sickle cell disease. *Am. J. Hematol.* **73**:26–32; 2003.
- [160] Nur, E.; Brandjes, D.; Teerlink, T.; Otten, H. M.; Oude Efferink, R.; Muskiet, F.; Evers, L.; ten Cate, H.; Biemond, B.; Duits, A.; Schnog, J. J.; CURAMA Study Group. N-acetylcysteine reduces oxidative stress in sickle cell patients. *Ann. Hematol.* **91**:1097–1105; 2012.

- [161] Chiu, D.; Vichinsky, E.; Yee, M.; Klemm, K.; Lubin, B. Peroxidation, vitamin E, and sickle-cell anemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **393**:323–335; 1982.
- [162] Gbenebitse, S.; Jaja, S. I.; Kehinde, M. D. Effect of changes in plasma vitamin E level of vascular responses and lipid peroxidation in sickle cell anaemia subjects. *Niger. Postgrad. Med. J.* **12**:81–84; 2005.
- [163] Natta, C. L.; Machlin, L. J.; Britt, M. A decrease in irreversibly sickled erythrocytes in sickle cell anemia patients given vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**:968–971; 1980.
- [164] Jaja, S. I.; Aigbe, P. E.; Gbenebitse, S.; Temiye, E. O. Changes in erythrocytes following supplementation with alpha-tocopherol in children suffering from sickle cell anaemia. *Niger. Postgrad. Med. J.* **12**:110–114; 2005.
- [165] Arruda, M. M.; Merabo, G.; Rodrigues, C. A.; Matsuda, S. S.; Rabelo, I. B.; Figueiredo, M. S. Antioxidant vitamins C and E supplementation increases markers of hemolysis in sickle cell anaemia patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Br. J. Haematol.* **160**:688–700; 2013.

Artigo submetido na revista: British Journal of Haematology

Fator de impacto: 4.942

Qualis: A1 para Ciências Biológicas I

British Journal of Haematology



Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and validation of Bayesian Network Model

Journal:	<i>British Journal of Haematology</i>
Manuscript ID:	BJH-2014-00109
Manuscript Type:	Ordinary Papers
Date Submitted by the Author:	17-Jan-2014
Complete List of Authors:	Belini Junior, Edis; UNESP- São Paulo State University, Biologia Silva, Danilo Grunig; UNESP - Sao Paulo State University, Biology Torres, Lidiane; UNESP-Sao Paulo State University, Biology Okumura, Jessika; UNESP - Sao Paulo State University, Biology Lobo, Clarisse; HEMORIO-State Institute of Hematology Arthur de Siqueira Cavalcanti, Hematology
Key Words:	SICKLE CELL ANAEMIA, HYDROXYUREA, HAEMOGLOBIN DISORDERS

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1

Severity of Brazilian sickle cell disease patients: severity scores and validation of Bayesian Network Model

Edis Belini Junior¹
Danilo Grünig Humberto Silva¹
Lidiane de Souza Torres¹
Jéssika Viviane Okumura¹
Clarisse Lopes de Castro Lobo²
Claudia Regina Bonini-Domingos¹

¹ UNESP - Sao Paulo State University, Department of Biology, Haemoglobin and Haematologic Diseases Genetic Laboratory, Sao Paulo, Brazil

² HEMORIO - State Institute of Hematology "Arthur de Siqueira Cavalcanti", Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding Author:

Edis Belini Junior
UNESP- São Paulo State University "Julio de Mesquita Filho" - IBILCE
Department of Biology, Haemoglobin and Haematologic Diseases Genetic Laboratory
Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth
CEP: 15054-000 São José do Rio Preto – Sao Paulo - Brazil
Telephone number: +55-17-3221-2392 e-mail: belini.jnr@gmail.com

Type of article: Research Paper
Running Title: Severity of Brazilian SCD patients
Word count for abstract: 230
Figure count: 4
Table count: 3
Reference count: 61

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2

Abstract

The integration of the several clinical and laboratory dimensions and the influence of each parameter on the sickle cell disease (SCD)-related mortality is useful for predicting the phenotype of an individual. This study evaluated the feasibility of the SCD severity calculator use to measure disease severity in Brazilian patients. The study group was composed of 500 SCD patients (440 HbSS and 60 HbSC) diagnosed by molecular biology. We observed a decrease in severity scores in 72 SCD patients assessed before and after the hydroxyurea (HU) use. Furthermore, the HU influenced the increase of mean corpuscular volume (MCV) and HbF concentration, and the decrease of leukocytes and total bilirubin. We found 180 (36.0%) patients with intermediate phenotype, 170 (34.0%) mild phenotype and 150 (30.0%) with severe phenotype. Patients with ages > 40 years had higher mean score (0.778 ± 0.177) than patients between 18-40 years (0.562 ± 0.152) and patients between 5-17 years (0.322 ± 0.145). We observe that there is a tendency of individuals with leg ulcers, avascular necrosis and cardiac complications with increasing age. Correlation analysis showed relations between severity scores with leukocytes, reticulocytes, bilirubin, lactate dehydrogenase, HbS, haemoglobin and haematocrit ($p < 0.05$). Several comparisons involving age groups, SCD genotype and phenotypic classification had satisfactory results and this classification will be used for future studies involving genetic polymorphisms, response to treatment with hydroxyurea and oxidative stress markers in SCD.

Keywords: haemoglobin S, sickle cell anaemia, hydroxyurea

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3

Introduction

Sickle cell disease (SCD) is characterized by a very heterogeneous clinical course between patients with the same mutations for sickle haemoglobin (HbS), ranging from patients who have normal life expectancy with relatively few complications. Others can have severe complications such as pulmonary hypertension, priapism, stroke, leg ulceration, recurrent painful episodes, acute chest syndrome (ACS) and avascular necrosis of bone (AVN) (Stuart & Nagel, 2004).

The molecular basis for HbS formation is known, but only the mutation (HBB, glu6val, rs334) is not sufficient to explain the heterogeneous phenotype found in SCD patients, other factors such as HbF levels (Platt *et al*, 1994; Bailey *et al*, 1992; Fox *et al*, 1990; Charache *et al*, 1995; Ohene-Frempong *et al*, 1998; Serjeant *et al*, 2001), α -thalassaemia co-inheritance (Higgs *et al*, 1982; De & Serjeant, 1991; Mouele *et al*, 2000; Hsu *et al*, 2003; Mukherjee *et al*, 1998; Powars *et al*, 2002), genetic polymorphisms (De Castro *et al*, 1998; Hoppe *et al*, 2004; Hoppe *et al*, 2007; Nolan *et al*, 2006; Sullivan *et al*, 2001; Zimmerman *et al*, 1998; Zimmerman & Ware, 1998; Fertrin & Costa, 2010; Sharan *et al*, 2004; Taylor *et al*, 2002), hydroxyurea use (Zimmerman *et al*, 2004; Ware *et al*, 2002; Steinberg *et al*, 2003; Steinberg *et al*, 2010; Ballas *et al*, 2006) and environmental factors (Steinberg, 2009) have been identified as modulators of SCD.

Even with improved knowledge of the human genome, development of new genomic tools and identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with subphenotypes of SCD by genome-wide association studies (GWAS) (Lettre, 2012), there is still a major challenge to combine all these variables and establish potential predictors of the SCD severity. Thus, the knowledge of these determinants may help to unravel the pathophysiological mechanisms underlying the disease process, to identify novel targets for therapeutic interventions, and to enhance patient care (van den Tweel *et al*, 2010).

On the other hand, a number of SCD severity classification have been proposed, aiming at the integration of many clinical and laboratory dimensions and the influence of each parameter on disease-related mortality (Cameron *et al*, 1983; Joly *et al*, 2012; Pearson *et al*, 2005; Solomou *et al*, 2013; van den Tweel *et al*, 2010). Therefore, a meaningful single synthetic measure of morbidity and/or risk of death within a given period is clinically useful to understand the relationships among clinical and laboratory measures of disease expression and to identify genetic variants that impact the disease severity (Coelho *et al*, 2012).

An impediment to this objective has been the inability to integrate the many clinical and laboratory dimensions of the disease into a single measure of disease severity using traditional statistical methods. Furthermore, many results of haematological and biochemical tests are usually found outside of normal values hindering the prediction of disease severity.

Sebastiani *et al*. (2007) developed a predictive model of disease severity using a Bayesian network modeling approach in which the 5-year mortality risk was projected as a disease severity score and can be used in other studies involving clinical and laboratory variables. But, the data on the patients were derived from United States residents and the application of this tool in individuals from others populations like in Brazil should be tested.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4

In this study, we aimed to evaluate the feasibility of the calculator use for disease severity (<http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>) and to classify the Brazilian SCD patients according to the range of scores established.

Methods

Study design, Patients and Data collection

An observational study involving 500 SCD patients (237 males and 279 females with a mean age of 25.1 ranging between 5 and 65 years old) receiving medical care at State Institute of Hematology "Arthur de Siqueira Cavalcanti", Rio de Janeiro (HEMORIO) were included in this analysis. Eligible patients were 5 years old or older, and the patients were excluded if they were smokers, consumers alcoholic drinks, or pregnant. All patients were under follow-up according to Clinical Protocols and Therapeutic Guidelines for SCD patients from Brazil (BRAZIL, 2011; BRAZIL, 2010). Laboratory values, clinical events, hydroxyurea treatment, and regular blood transfusion were taken from the clinical records. We considered the patients who were using hydroxyurea over 90 days. All subjects gave their informed consent, and the study was approved by the Data Safety Monitoring Board (DSMB) according to Brazilian Regulations. To evaluate the severity scores in patients before and after HU use, we used 72 SCD randomized patients adherent to the HU use (mean age of 36.4 years old) from HEMORIO.

Haemoglobin phenotypes and genotypes

Haemoglobin was identified using electrophoresis on cellulose acetate at pH 8.6, and using agar electrophoresis at pH 6.2. Hb fraction quantification was obtained using high performance liquid chromatography (HPLC) with the automated VARIANT™ equipment (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). In all samples, the Hb genotype was developed through molecular analysis using PCR-RFLP and PCR-EA (Belini *et al*, 2010).

Sickle cell disease severity calculator

We used the tool "Sickle Cell Disease Severity Calculator", available from <http://www.bu.edu/sicklecell/downloads/Projects>, for calculation of severity scores and classification of patients into categories by phenotype (mild, intermediate, severe). This tool was developed through a Bayesian network modeling using 25 clinical and laboratory variables to estimate the severity of SCD in a study involving 3380 patients followed in the Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD). The network model calculates the death risk within 5 years and considers this risk as a disease severity score, which ranges from 0 (least severe) to 1 (most severe). The predictive value (ie, accuracy of forecasting death based on a clinical and laboratory profile) of the model was validated in two unrelated sets of patients and showed high specificity and sensitivity (Sebastiani *et al*, 2007).

Severity scores computed for this study included the variables recommended by the calculator: age, acute chest syndrome (ACS), serum total bilirubin, blood transfusion, lactate dehydrogenase (LDH), mean corpuscular volume (MCV), pain crises, priapism, absolute reticulocyte, gender, stroke, total leukocyte, genotype of sickle cell disease and avascular necrosis of bone (AVN). Two parameters required by the calculator "Sepsis" and

1
2
3 "systolic blood pressure" could not be used for this study because they were not available
4 in the routine medical records, in Brazil. 5

6 7 **Statistical Analysis**

8 Statistical analysis was performed using the Statistica 10.0 and Graphpad Prism 5.0
9 softwares. Data are expressed as mean \pm standard deviation and were tested for normal
10 distribution using the Lilliefors test. Data were also tested for homogeneity of variances
11 using Levene's test. Means between the groups were compared by applying the t test or
12 one-way ANOVA, followed by the post hoc Tukey's test for parametric data, and either the
13 Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test, followed by the post hoc Dunn's test for non-
14 parametric data. In order to assess the degree of association among the variables studied,
15 Pearson correlation for parametric data or Spearman correlation for non-parametric data
16 was used. Categorical data were compared by Binomial test and Pearson Chi-square test
17 supplemented by Fisher's exact test. A p value of <0.05 was considered statistically
18 significant. 19

20 21 22 **Results and Discussion**

23 This is the first Brazilian study involving SCD patients that assesses the feasibility of
24 "sickle cell disease severity calculator" to calculate the severity scores of disease and
25 classify patients into phenotypic categories. In this regard, we conducted several
26 comparisons involving age groups, SCD genotype, HU use and phenotype classification.

27 Initially, we evaluated the HU influences on the disease severity, then we compared
28 haematological, biochemical, clinical data and severity score between patients using and
29 not using HU (Table 1). As the age is a factor that influences the disease severity, we
30 separated the patients into three age groups according to calculator (age below 18 years,
31 age between 18 and 40 years, age above 40 years). The HU influenced in the increase in
32 mean corpuscular volume (MCV) and HbF concentration. Furthermore we observed a
33 decrease of leukocytes amount and of total bilirubin levels in the HU-sample groups. The
34 beneficial effects of HU as increased HbF synthesis, increased hemoglobin and VCM, and
35 decreased hemolysis markers and number of leukocytes have been characterized in the
36 literature (Steinberg *et al*, 2010; Halsey & Roberts, 2003; Lobo *et al*, 2013; Nouraie *et al*,
37 2013) (Table 1). However, severity scores in different age groups were not statistically
38 different between patients using and not using HU (Table 1). 39

40 We cannot affirm that the HU use did not influenced the severity scores because to
41 answer this question would be necessary to calculate the severity score of the same
42 patients before and after the HU use. So, we evaluated the severity score of 72
43 randomized SCD patients (patients adherent and responders to HU treatment) before the
44 HU use (0.641 ± 0.194) and after the HU use (0.601 ± 0.223) and by paired t -test we
45 verified decrease in the values of the score after the use of HU ($p=0.02$). 46

47 Since it was not found difference in severity scores seen in Table 1, we evaluated
48 the distribution of severity scores in the three age groups independent of HU use. In the
49 age group between 5 and 17 years, 13.2% of patients had scores greater than 0.5; the age
50 group between 18-40 years, 60.8% of patients were above 0.5 and in the age group > 40
51 years, 90,8% of the patients had risk of death above 0.5 (Figure 1). These observations
52 demonstrate that age is a factor that influences the disease severity, ie, the risk of death
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

6
increases with age and this observation has been well documented once age is related to the natural history of SCD (Frenette & Atweh, 2007; Serjeant, 2013; Serjeant, 1995).

Independent of HU use, patients age > 40 years had the highest mean score (0.778 ± 0.177) followed by patients of age between 18-40 years (0.562 ± 0.152) and finally patients age between 5-17 years (0.322 ± 0.145) ($p < 0.0001$) (Figure 2A). This is further evidence that age affects the disease severity, since 90% of patients > 40 years had severity scores above 0.5. We believe that this gravity might be a consequence of two factors, first one would be the management and diagnosis of the disease that were still in improvement process in Brazil in previous decades, and the other factor would be the less knowledge of the pathophysiology and treatment of the disease which had at that time (Serjeant, 2000).

When we separated the patients according to the genotype of the disease, the mean severity scores were higher in HbSS compared with HbSC ($p < 0.001$) (Figure 2B). Patients with HbSC disease are usually less severe than individuals with sickle cell anaemia and HbS- β^0 thalassaemia (Rees *et al*, 2010). On average, individuals with HbSC disease have half the number of painful episodes than sickle cell anaemia patients. Stroke is less frequent and leg ulcers are rare in HbSC patients (Koshy *et al*, 1989; Steinberg, 2008; Cameron *et al*, 1983). Thus, the calculator showed a sensitivity of severity in the aspect of the SCD genotypes.

According to the observations of the scores distribution in the histograms of our study group (Figure 1) and with the aid of severity ranges established in this study of (Sebastiani *et al*, 2010), we defined the scores ranges for severity and we classified the patients phenotypes in mild, intermediate and severe. The scores ≤ 0.4 were classified as "mild phenotype" independent of age. The score > 0.8 for patients ages > 40 years and scores ≥ 0.6 for patients ages ≤ 40 years were considered as "severe phenotype". The scores do not corresponding to "mild" and "severe" phenotype were classified as "intermediate" phenotype. After determining the score ranges, we classified the SCD phenotypes and we found that 180 (36.0%) patients had intermediate phenotype, 170 (34.0%) mild phenotype and 150 (30.0%) the severe phenotype.

In each age group, we found statistical difference in the frequency of phenotypes. In patients aged 5-17 years the mild phenotype (75.3%) was more frequent, followed by intermediate phenotype (18.9%) and less frequent the severe phenotype (5.8%). In the patients aged 18-40 years the intermediate phenotype was more frequent (48.6%), followed by severe phenotype (40.1%) and less frequent the mild phenotype (11.3%). In patients > 40 years the severe phenotype was more frequent (56.8%), followed by intermediate phenotype (41.0%) and less frequent the mild phenotype (2.0%). These observations are consistent with the data presented in Table 2.

Another way to validate the severity calculator was to verify whether the SCD complications were associated with age or phenotype class. In Table 2, we observed that there is tendency of higher number of individuals with leg ulcers, avascular necrosis and cardiac complications with increasing age. The occurrence of priapism in men and number of painful crisis were lower in subjects between 5-17 years compared with other age groups. In Table 3, it is possible to verify the association of severe phenotype with stroke, leg ulcers, cardiac complications and blood transfusion. Pain crises of 3-5 per person in the last year and avascular necrosis were more frequent in intermediate and severe

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

7

phenotypes when compared with the mild phenotype. The SCD severity is based on the number of painful episodes, frequency of hospital admissions, priapism, history of stroke, acute chest syndrome or sepsis, chronic leg ulcers, pulmonary hypertension, renal impairment, and avascular necrosis of bones (Walters *et al*, 1996; Platt *et al*, 1991). Therefore, the results of the disease manifestations demonstrated in the Table 1 and 2, both age and classes of phenotypes showed association with the severity calculator.

The severity score averages separated by age groups and phenotypes are shown in Figure 3. Patients with the same phenotype class showed differences in mean scores between the age groups. As expected, in mild phenotype, patients 5-17 years (0.254 ± 0.078) showed lower scores than patients of 18-40 years (0.327 ± 0.062) and > 40 years (0.296 ± 0.003) ($p < 0.001$). In the intermediate phenotype, patients > 40 years showed higher mean scores (0.627 ± 0.111) compared to the 18-40 years (0.492 ± 0.052) and 5-17 years (0.482 ± 0.060) ($p < 0.001$). The same occurred in the severe phenotype, patients > 40 years exhibited mean scores (0.906 ± 0.047) higher than 5-17 years (0.674 ± 0.055) and the 18-40 years group (0.711 ± 0.098), ($p < 0.001$).

The few studies associated with disease severity and severity scores have shown lower scores than found for Brazilian patients. (Anoop *et al*, 2009) found in patients > 18 years classified phenotypically by clinicians, mean score of 0.182 for the mild phenotype, score of 0.19 for the intermediate and mean score of 0.866 for the severe phenotype. However, these patients also had lower frequencies of individuals with avascular necrosis, acute chest syndrome and stroke compared with Brazilian patients > 18 years. Patients > 21 years from Boston Medical Center showed the following mean severity scores: mild phenotype (0.16), intermediate phenotype (0.28) and severe (0.95) (Sebastiani *et al*, 2007). These results show that regardless of the form of phenotypes categorization, Brazilian patients have higher mean scores.

The degree of relation between severity scores and haemoglobin ($p = 0.004$, $r = -0.20$), severity scores and haematocrit ($p = 0.001$, $r = -0.21$), severity scores and leukocyte ($p = 0.02$, $r = 0.10$), severity scores and reticulocyte ($p = 0.009$, $r = 0.11$) were statistically significant. Since there is no validation of severity calculator in patients < 18 years (Sebastiani *et al*, 2007), we have made other correlation analyses removing the group of 5-17 years and found the results: severity scores and haemoglobin ($p < 0.001$, $r = -0.32$), severity scores and haematocrit ($p < 0.001$, $r = -0.33$), severity scores and leukocyte ($p = 0.03$, $r = 0.26$), severity scores and reticulocyte ($p < 0.001$, $r = 0.27$), severity scores and LDH ($p < 0.001$, $r = 0.28$). These results show that when LDH, leukocyte and reticulocyte values increased the severity scores values tended to increase; and when haemoglobin and haematocrit values decreased the severity scores values tended to increase. In addition, we analyzed the degree correlation in the phenotype classes without the group 5-17 years and the results are shown in Figure 4.

The correlation analyzes allowed us to verify that the disease severity is associated with decreased haemoglobin and haematocrit. Anaemia is directly and easily assessed by measuring the total haemoglobin. Low haemoglobin is linked generally to poor prognosis in SCD with increased risk of many specific complications (Kato *et al*, 2006; Cameron *et al*, 1983; Ballas, 1998; Ballas *et al*, 2010). In the first analyses, the correlation coefficients were not high, but when we removed the group 5-17 years, the correlation coefficients increased and other variables became significant. Furthermore, we found that the SCD

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

8

severity is associated with increased of leukocytes, reticulocytes, bilirubin, LDH and HbS. All these markers are associated with the severity of the disease, e.g., increased leucocytes have been correlated with increased frequency of pain (Platt *et al*, 1991), increased haemorrhagic stroke risk (Ohene-Frempong *et al*, 1998) and earlier death (Platt *et al*, 1994); increased LDH, bilirubin and reticulocytes are laboratory indicators of chronic hemolytic anaemia. (West *et al*, 1992; Ballas, 2013; Steinberg, 2008), and the increase in HbS concentration provides the polymerization, under specific conditions (Vekilov, 2007; Kato *et al*, 2009).

Currently there are two models of disease severity that have been validated by other studies: one involving pediatric patients (van den Tweel *et al*, 2010) and another which we are validating (Sebastiani *et al*, 2007). Thus discussion among different studies involving severity tools is limited, (Coelho *et al*, 2012) mentioned that both tools are not yet the effective tools needed for patient stratification in genotype/phenotype relationship analyses as well as in the discovery and validation of prognosis markers of the largely unpredictable SCD clinical course. (Anoop *et al*, 2009) agree that scores have high specificity and positive predictive value, but for patients > 40 years start off with a high score and if data on one or more severity parameters for such patients are unavailable, the score is likely to be spuriously high.

Importantly, there are already results in the literature showing the relationship between genotype and severity score. Reported the association of several SNPs (for example, rs652785 in complement component 8 gene-C8A) and biomarkers (tumor necrosis factor- α receptor-1 and vascular cell adhesion molecule-1) with the severe phenotype. (Sebastiani *et al*, 2010; Dworkis *et al*, 2011)

The correlation analyzes and comparisons of clinical manifestations in different groups helped to validate the tool. To complement this study would be important the phenotype classification of patients by clinicians and then make comparisons between severity score and the variables studied here. Furthermore, the group of patients <18 years deserves more attention, because the calculator does not contain clinical and laboratory variables specific to this age which may compromise the generation severity score. Another observation was in patients classified as intermediate phenotype. In this group we have not found significant correlations as in the other two phenotypes classes (mild and severe). In this group we found patients with very heterogeneous haematological and biochemical characteristics, which prevented the significant correlations. Maybe a subdivision of the intermediate phenotype could be done in these patients, fulfilling other criteria for classification. Moreover, the incorporation of genetic polymorphisms that participate in relevant pathological events of SCD (eg, rapid destruction of sickle cells, dense cell formation, and adhesion to endothelium) might improve the utility of the scoring system.

For our study the severity calculator showed high sensitivity and positive predictive value. Several comparisons involving age groups, SCD genotype and phenotype classification had satisfactory results and this classification will be used in future studies involving genetic polymorphisms, response to treatment with hydroxyurea and oxidative stress markers in SCD.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

9

Acknowledgements

The authors would like to thank the following Brazilian foundations: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (grant 409691/2006-2), Ministério da Saúde (grant MS 3072/2007), and Fundação Pró HEMORIO – Fundarj (grant 188/13) for their financial support.

Authorship

E.B.J.: data design, data acquisition, data analysis, data interpretation, and manuscript preparation. D.G.H.S.: data interpretation and statistical analysis assistance. L.S.T.: technical and statistical analysis assistance. J.V.O.: technical and statistical analysis assistance. C.L.C.L.: study concept and design, and critical review of manuscript. C.R.B.D.: study concept and design, and critical review of manuscript.

References

- Anoop,P., Bevan,D.H., & Chakrabarti,S. (2009) Usefulness and limitations of Bayesian network model as a mortality risk assessment tool in sickle cell anemia. *Am.J.Hematol.*, **84**, 312-313.
- Bailey,K., Morris,J.S., Thomas,P., & Serjeant,G.R. (1992) Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. *Arch.Dis.Child.*, **67**, 517-520.
- Ballas,S.K. (1998) Sickle cell disease: clinical management. *Baillieres Clinical Haematology*, **11**, 185-214.
- Ballas,S.K. (2013) Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. *Blood*, **121**, 243-244.
- Ballas,S.K., Barton,F.B., Waclawiw,M.A., Swerdlow,P., Eckman,J.R., Pegelow,C.H., Koshy,M., Barton,B.A., & Bonds,D.R. (2006) Hydroxyurea and sickle cell anemia: effect on quality of life. *Health Qual.Life Outcomes.*, **4**, 59.
- Ballas,S.K., Lieff,S., Benjamin,L.J., Dampier,C.D., Heeney,M.M., Hoppe,C., Johnson,C.S., Rogers,Z.R., Smith-Whitley,K., Wang,W.C., & Telen,M.J. (2010) Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, **85**, 6-13.
- Belini,E., Cancado,R.D., & Domingos,C.R.B. (2010) The XmnI polymorphic site 5' to the gene G gamma in a Brazilian patient with sickle cell anaemia - fetal haemoglobin concentration, haematology and clinical features. *Archives of Medical Science*, **6**, 822-825.

- 1
2
3 BRAZIL. Ministry of Health, Department of Health Care. Clinical Protocols and Therapeutic
4 Guidelines, Ordinance 55. 29-1-2010.
5 Ref Type: Statute
6
7
8 BRAZIL. Ministry of Health, Department of Health Care. Clinical Protocols and Therapeutic
9 Guidelines, Ordinance 853. 5-12-2011.
10 Ref Type: Statute
11
12
13 Cameron,B.F., Christian,E., Lobel,J.S., & Gaston,M.H. (1983) Evaluation of clinical severity in
14 sickle cell disease. *Journal of the National Medical Association*, **75**, 483-487.
15
16 Charache,S., Terrin,M.L., Moore,R.D., Dover,G.J., Barton,F.B., Eckert,S.V., McMahan,R.P.,
17 Bonds,D.R., Orringer,E., Jones,S., Strayhorn,D., Rosse,W., Phillips,G., Peace,D.,
18 Johnson,telfair,A., Milner,P., Kutlar,A., Tracy,A., Ballas,S.K., Allen,G.E., Moshang,J.,
19 Scott,B., Steinberg,M., Anderson,A., Sabahi,V., Pegelow,C., Temple,D., Case,E.,
20 Harrell,R., Childerie,S., Embury,S., Schmidt,B., Davies,D., Koshy,M., Talischyazahed,N.,
21 Dorn,L., Pendarvis,G., Mcgee,M., Telfer,M., Davis,A., Castro,O., Finke,H., Perlin,E.,
22 Siteman,J., Gascon,P., Dipaolo,P., Gargiulo,S., Eckman,J., Bailey,J.H., Platt,A., Waller,L.,
23 Ramirez,G., Knors,V., Hernandez,S., Rodriguez,E.M., Wilkes,E., Vichinsky,E., Claster,S.,
24 Earles,A., Kleman,K., McLaughlin,K., Swerdlow,P., Smith,W., Maddox,B., Usry,L.,
25 Brenner,A., Williams,K., O'Brien,R., Genter,K., Shurin,S., Berman,B., Chiarucci,K.,
26 Keverline,L., Olivieri,N., Shaw,D., Lewis,N., Bridges,K., Tynan,B., Winograd,C.,
27 Bellevue,R., Dosik,H., Sheikhai,M., Ryans,P., Souffrant,H., Prchal,J., Braddock,J.,
28 Mcardle,T., Carlos,T., Schmotzer,A., Gardner,D., Moore,R., Dover,G., Bergner,M.,
29 Ewart,C., Eckert,S., Lent,C., Ulrich,J., Fishpaw,L., Tirado,G., Gibson,J., Moeller,T.,
30 Nagel,T., Terrin,M., Handy,C., Harris,D., Canner,M., Depkin,J., Meinert,N., Carroll,M.,
31 Giro,R., Karabelas,S., Kelly,C., Heyman,M., Beilinson,P., Druskin,M., Ellis,P., Flood,W.A.,
32 Kravitz,S., Lanzkron,S., Lorica,V., Moliterno,A., Nahum,A., Nesbitt,J.A., Rosenthal,L.,
33 Sharfman,W., Streiff,M., Wachsman,M., Bray,P., Vandang,C., Casella,J., McGuire,M.,
34 Patrick,L., Schaad,H., Steiner,C., Johnson,C., Bank,A., Cutter,G., Davis,C.E., Huntley,O.,
35 Lessin,L., Platt,O., Graysecundy,M., Bonds,D., Reid,C., Geller,H., & Waclawiw,M. (1995)
36 Effect of Hydroxyurea on the Frequency of Painful Crises in Sickle-Cell-Anemia. *New*
37 *England Journal of Medicine*, **332**, 1317-1322.
38
39
40 Coelho,A., Dias,A., Morais,A., Nunes,B., Faustino,P., & Lavinha,J. (2012) Sickle cell disease
41 severity scoring: a yet unsolved problem. *European Journal of Haematology*, **89**, 501-502.
42
43
44 De Castro,L., Rinder,H.M., Howe,J.G., & Smith,B.R. (1998) Thrombophilic genotypes do not
45 adversely affect the course of sickle cell disease (SCD). *Blood*, **92**, 161A.
46
47
48 De,C.K. & Serjeant,G.R. (1991) Acute splenic sequestration in Jamaican adults with homozygous
49 sickle cell disease: a role of alpha thalassaemia. *British Journal of Haematology*, **77**, 563-
50 564.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 Dworkis,D.A., Klings,E.S., Solovieff,N., Li,G., Milton,J.N., Hartley,S.W., Melista,E., Parente,J.,
Sebastiani,P., Steinberg,M.H., & Baldwin,C.T. (2011) Severe sickle cell anemia is

- 1
2
3 associated with increased plasma levels of TNF-R1 and VCAM-1. *Am.J.Hematol.*, **86**, 220-
4 223.
5
6 Fertrin,K.Y. & Costa,F.F. (2010) Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for
7 clinical diversity and treatment. *Expert.Rev.Hematol.*, **3**, 443-458.
8
9
10 Fox,P.D., Dunn,D.T., Morris,J.S., & Serjeant,G.R. (1990) Risk factors for proliferative sickle
11 retinopathy. *British Journal of Ophthalmology*, **74**, 172-176.
12
13
14 Frenette,P.S. & Atweh,G.F. (2007) Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future
15 promise. *J.Clin.Invest*, **117**, 850-858.
16
17
18 Halsey,C. & Roberts,I.A.G. (2003) The role of hydroxyurea in sickle cell disease. *British Journal of*
19 *Haematology*, **120**, 177-186.
20
21
22 Higgs,D.R., Aldridge,B.E., Lamb,J., Clegg,J.B., Weatherall,D.J., Hayes,R.J., Grandison,Y.,
23 Lowrie,Y., Mason,K.P., Serjeant,B.E., & Serjeant,G.R. (1982) The interaction of alpha-
24 thalassemia and homozygous sickle-cell disease. *New England Journal of Medicine*, **306**,
25 1441-1446.
26
27
28 Hoppe,C., Klitz,W., Cheng,S., Apple,R., Steiner,L., Robles,L., Girard,T., Vichinsky,E., & Styles,L.
29 (2004) Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Blood*, **103**,
30 2391-2396.
31
32
33 Hoppe,C., Klitz,W., D'Harlingue,K., Cheng,S., Grow,M., Steiner,L., Noble,J., Adams,R., &
34 Styles,L. (2007) Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter
35 polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke*, **38**, 2241-2246.
36
37
38 Hsu,L.L., Miller,S.T., Wright,E., Kutlar,A., McKie,V., Wang,W., Pegelow,C.H., Driscoll,C.,
39 Hurler,A., Woods,G., Elsas,L., Embury,S., & Adams,R.J. (2003) Alpha Thalassemia is
40 associated with decreased risk of abnormal transcranial Doppler ultrasonography in children
41 with sickle cell anemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, **25**, 622-628.
42
43
44 Joly,P., Pondarre,C., Bardel,C., Francina,A., & Martin,C. (2012) The alpha-globin genotype does
45 not influence sickle cell disease severity in a retrospective cross-validation study of the
46 pediatric severity score. *European Journal of Haematology*, **88**, 61-67.
47
48
49 Kato,G.J., Hebbel,R.P., Steinberg,M.H., & Gladwin,M.T. (2009) Vasculopathy in sickle cell
50 disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research
51 directions. *Am.J.Hematol.*, **84**, 618-625.
52
53
54 Kato,G.J., McGewan,V., Machado,R.F., Little,J.A., Taylor,J., Morris,C.R., Nichols,J.S.,
55 Wang,X.D., Poljakovic,M., Morris,S.M., & Gladwin,M.T. (2006) Lactate dehydrogenase as
56 a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration,
57 pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, **107**, 2279-
58 2285.
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

12

- Koshy,M., Entsuah,R., Koranda,A., Kraus,A.P., Johnson,R., Bellvue,R., Flourmoy-Gill,Z., & Levy,P. (1989) Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood*, **74**, 1403-1408.
- Lette,G. (2012) The Search for Genetic Modifiers of Disease Severity in the beta-Hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**.
- Lobo,C.L.D., Pinto,J.F.C., Nascimento,E.M., Moura,P.G., Cardoso,G.P., & Hankins,J.S. (2013) The effect of hydroxycarbamide therapy on survival of children with sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, **161**, 852-860.
- Mouele,R., Pambou,O., Feingold,J., & Galacteros,F. (2000) alpha-thalassemia in Bantu population from Congo-Brazzaville: its interaction with sickle cell anemia. *Human Heredity*, **50**, 118-125.
- Mukherjee,M.B., Surve,R., Tamankar,A., Gangakhedkar,R.R., Ghosh,K., Lu,C.Y., Krishnamoorthy,R., Colah,R., & Mohanty,D. (1998) The influence of alpha-thalassaemia on the haematological & clinical expression of sickle cell disease in western India. *Indian Journal of Medical Research*, **107**, 178-181.
- Nolan,V.G., Adewoye,A., Baldwin,C., Wang,L., Ma,Q., Wyszynski,D.F., Farrell,J.J., Sebastiani,P., Farrer,L.A., & Steinberg,M.H. (2006) Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF-beta/BMP pathway. *British Journal of Haematology*, **133**, 570-578.
- Nourai,M., Lee,J.S., Zhang,Y., Kaniyas,T., Zhao,X., Xiong,Z., Oriss,T.B., Zeng,Q., Kato,G.J., Gibbs,J.S., Hildesheim,M.E., Sachdev,V., Barst,R.J., Machado,R.F., Hassell,K.L., Little,J.A., Schraufnagel,D.E., Krishnamurti,L., Novelli,E., Girgis,R.E., Morris,C.R., Rosenzweig,E.B., Badesch,D.B., Lanzkron,S., Castro,O.L., Goldsmith,J.C., Gordeuk,V.R., & Gladwin,M.T. (2013) The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. *Haematologica*, **98**, 464-472.
- Ohene-Frempong,K., Weiner,S.J., Sleeper,L.A., Miller,S.T., Embury,S., Moohr,J.W., Wethers,D.L., Pegelow,C.H., & Gill,F.M. (1998) Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*, **91**, 288-294.
- Pearson,S.R., Alkon,A., Treadwell,M., Wolff,B., Quirolo,K., & Boyce,W.T. (2005) Autonomic reactivity and clinical severity in children with sickle cell disease. *Clinical Autonomic Research*, **15**, 400-407.
- Platt,O.S., Brambilla,D.J., Rosse,W.F., Milner,P.F., Castro,O., Steinberg,M.H., & Klug,P.P. (1994) Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *New England Journal of Medicine*, **330**, 1639-1644.
- Platt,O.S., Thorington,B.D., Brambilla,D.J., Milner,P.F., Rosse,W.F., Vichinsky,E., & Kinney,T.R. (1991) Pain in Sickle-Cell Disease - Rates and Risk-Factors. *New England Journal of Medicine*, **325**, 11-16.

- 1
2
3 Powars,D.R., Hiti,A., Ramicone,E., Johnson,C., & Chan,L. (2002) Outcome in hemoglobin SC
4 disease: a four-decade observational study of clinical, hematologic, and genetic factors.
5 *Am.J.Hematol.*, **70**, 206-215.
6
7
8 Rees,D.C., Williams,T.N., & Gladwin,M.T. (2010) Sickle-cell disease. *Lancet*, **376**, 2018-2031.
9
10 Sebastiani,P., Nolan,V.G., Baldwin,C.T., bad-Grau,M.M., Wang,L., Adewoye,A.H.,
11 McMahon,L.C., Farrer,L.A., Taylor,J.G., Kato,G.J., Gladwin,M.T., & Steinberg,M.H.
12 (2007) A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood*, **110**, 2727-
13 2735.
14
15 Sebastiani,P., Solovieff,N., Hartley,S.W., Milton,J.N., Riva,A., Dworkis,D.A., Melista,E.,
16 Klings,E.S., Garrett,M.E., Telen,M.J., shley-Koch,A., Baldwin,C.T., & Steinberg,M.H.
17 (2010) Genetic modifiers of the severity of sickle cell anemia identified through a genome-
18 wide association study. *American Journal of Hematology*, **85**, 29-35.
19
20
21
22 Serjeant,G.R. (1995) Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease.
23 *Current Opinion in Hematology*, **2**, 103-108.
24
25
26 Serjeant,G.R. (2000) Screening for sickle-cell disease in Brazil. *Lancet*, **356**, 168-169.
27
28 Serjeant,G.R. (2013) The Natural History of Sickle Cell Disease. *Cold Spring Harb.Perspect.Med.*
29
30 Serjeant,G.R., Singhal,A., & Hambleton,I.R. (2001) Sickle cell disease and age at menarche in
31 Jamaican girls: observations from a cohort study. *Arch.Dis.Child*, **85**, 375-378.
32
33 Sharan,K., Surrey,S., Ballas,S., Borowski,M., Devoto,M., Wang,K.F., Sandler,E., & Keller,M.
34 (2004) Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to
35 acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *British Journal of Haematology*,
36 **124**, 240-243.
37
38
39
40 Solomou,E., Kraniotis,P., Kourakli,A., & Petsas,T. (2013) Extent of silent cerebral infarcts in adult
41 sickle-cell disease patients on magnetic resonance imaging: is there a correlation with the
42 clinical severity of disease? *Hematol.Rep.*, **5**, 8-12.
43
44
45 Steinberg,M.H. (2008) Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular
46 etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal.*, **8**, 1295-
47 1324.
48
49
50 Steinberg,M.H. (2009) Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia.
51 *ScientificWorldJournal.*, **9**, 46-67.
52
53
54
55 Steinberg,M.H., Barton,F., Castro,O., Pegelow,C.H., Ballas,S.K., Kutlar,A., Orringer,E.,
56 Bellevue,R., Olivieri,N., Eckman,J., Varma,M., Ramirez,G., Adler,B., Smith,W., Carlos,T.,
57 Ataga,K., DeCastro,L., Bigelow,C., Sauntharajah,Y., Telfer,M., Vichinsky,E., Claster,S.,
58 Shurin,S., Bridges,K., Waclawiw,M., Bonds,D., & Terrin,M. (2003) Effect of hydroxyurea
59 on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of
60 treatment. *JAMA*, **289**, 1645-1651.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- 14
- Steinberg,M.H., McCarthy,W.F., Castro,O., Ballas,S.K., Armstrong,F.D., Smith,W., Ataga,K., Swerdlow,P., Kutlar,A., DeCastro,L., & Waclawiw,M.A. (2010) The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. *Am.J.Hematol.*, **85**, 403-408.
- Stuart,M.J. & Nagel,R.L. (2004) Sickle-cell disease. *Lancet*, **364**, 1343-1360.
- Sullivan,K.J., Kissoon,N., Duckworth,L.J., Sandler,E., Freeman,B., Bayne,E., Sylvester,J.E., & Lima,J.J. (2001) Low exhaled nitric oxide and a polymorphism in the NOS1 gene is associated with acute chest syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **164**, 2186-2190.
- Taylor,J.G., Tang,D.C., Savage,S.A., Leitman,S.F., Heller,S.I., Serjeant,G.R., Rodgers,G.P., & Chanock,S.J. (2002) Variants in the VCAM1 gene and risk for symptomatic stroke in sickle cell disease. *Blood*, **100**, 4303-4309.
- van den Tweel,X.W., van der Lee,J.H., Heijboer,H., Peters,M., & Fijnvandraat,K. (2010) Development and validation of a pediatric severity index for sickle cell patients. *American Journal of Hematology*, **85**, 746-751.
- Vekilov,P.G. (2007) Sickle-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle-cell anaemia? *British Journal of Haematology*, **139**, 173-184.
- Walters,M.C., Patience,M., Leisenring,W., Eckman,J.R., Scott,J.P., Mentzer,W.C., Davies,S.C., Ohene-Frempong,K., Bernaudin,F., Matthews,D.C., Storb,R., & Sullivan,K.M. (1996) Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, **335**, 369-376.
- Ware,R.E., Eggleston,B., Redding-Lallinger,R., Wang,W.C., Smith-Whitley,K., Daeschner,C., Gee,B., Styles,L.A., Helms,R.W., Kinney,T.R., & Ohene-Frempong,K. (2002) Predictors of fetal hemoglobin response in children with sickle cell anemia receiving hydroxyurea therapy. *Blood*, **99**, 10-14.
- West,M.S., Wethers,D., Smith,J., Steinberg,M., Johnson,R., McMahon,L., Platt,O., Gill,F., Ohenefrempong,K., Bray,G., Kelleher,J.F., Lelkin,S., Vichinsky,E., Lubin,B., Bank,A., Piomelli,S., Rosse,W., Falletta,J., Kinney,T.R., Lessin,L., Smith,J., Khakoo,Y., Scott,R.B., Castro,O., Reindorf,C., Diamond,S., Wang,W., Wilimas,J., Milner,P., Brown,A., Miller,S., Rieder,R., Gillette,P., Lande,W., Embury,S., Mentzer,W., Wethers,D., Grover,R., Koshy,M., Talishy,N., Pegelow,C., Klug,P., Steinberg,M., Kraus,A., Zarkowsky,H., Dampier,C., Pearson,H., & Ritchey,A.K. (1992) Laboratory Profile of Sickle-Cell Disease - A Cross-Sectional Analysis. *Journal of Clinical Epidemiology*, **45**, 893-909.
- Zimmerman,S.A., Howard,T.A., Whorton,M.R., Rosse,W.F., & Ware,R.E. (1998) The A312G polymorphism in alpha-fibrinogen is associated with stroke and avascular necrosis in patients with sickle cell anemia. *Blood*, **92**, 36B.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

15

- Zimmerman,S.A., Schultz,W.H., Davis,J.S., Pickens,C.V., Mortier,N.A., Howard,T.A., & Ware,R.E. (2004) Sustained long-term hematologic efficacy of hydroxyurea at maximum tolerated dose in children with sickle cell disease. *Blood*, **103**, 2039-2045.
- Zimmerman,S.A. & Ware,R.E. (1998) Inherited DNA mutations contributing to thrombotic complications in patients with sickle cell disease. *Am.J.Hematol.*, **59**, 267-272.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

17

Table 1. Demographics and clinical data and laboratory values in SCD patients separated into age groups with and without hydroxyurea use.

Characteristics	5 - 17 years		18 - 40 years		> 40 years		P value*
	- HU (n=108)	+ HU (n=82)	- HU (n=143)	+ HU (n=79)	- HU (n=43)	+ HU (n=45)	
Hb genotypes (HbSS/HbSC)	89 / 19	79 / 03	125 / 17	74 / 5	34 / 09	39 / 06	---
Gender (Female/Male)	48 / 60	34 / 48	87 / 56	42 / 37	33 / 10	29 / 16	---
Haemoglobin (g/dL)	9.5 ± 6.4	8.6 ± 1.4	8.8 ± 1.8	9.0 ± 1.7	8.5 ± 1.9	8.7 ± 1.9	0.7
Haematocrit (%)	25.9 ± 7.8	24.7 ± 4.4	25.1 ± 5.5	25.7 ± 5.1	24.5 ± 6.2	24.4 ± 5.8	0.95
MCV (fL)	84.1 ± 9.0	94.0 ± 9.9	87.8 ± 8.2	97.4 ± 12.2	87.6 ± 9.1	98.1 ± 22.9	<0.001
Leucocytes (/mm ³)	10.7 ± 3.3	9.9 ± 3.2	10.8 ± 3.4	9.9 ± 5.0	10.9 ± 4.4	8.2 ± 3.4	0.03
Reticulocyte (k/uL)	248.2 ± 112.5	240.2 ± 91.4	252.7 ± 99.9	229.0 ± 93.8	200.3 ± 102.9	177.2 ± 79.2	0.32
LDH (U/L)	1081.9 ± 567.3	953.0 ± 343.5	940.3 ± 482.6	873.3 ± 416.5	927.7 ± 519.1	750.1 ± 79.2	0.12
Total Bilirubin (mg/dL)	3.4 ± 2.2	2.7 ± 1.9	3.7 ± 2.6	2.8 ± 2.2	3.1 ± 2.2	2.2 ± 1.4	0.03
ALT (U/L)	23.1 ± 15.3	22.6 ± 13.5	30.4 ± 29.6	33.6 ± 25.8	25.2 ± 14.3	26.1 ± 16.3	0.98
AST (U/L)	54.1 ± 22.1	52.9 ± 22.1	54.7 ± 28.4	56.9 ± 46.0	50.6 ± 21.2	52.9 ± 30.1	0.65
Creatinine level (mg/dL)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.2 ± 1.1	1.1 ± 0.5	0.18
Hb F (%)	5.6 ± 4.8	9.9 ± 5.5	4.8 ± 4.6	8.8 ± 7.1	5.7 ± 4.8	11.7 ± 9.3	<0.001
Blood transfusion [n (%)]	39 (36.1%)	45 (54.9%)	53 (37.1%)	47 (59.5%)	14 (32.5%)	21 (47.0%)	0.17
Number of sickle cell crises per person per year in the last year [n (%)]							
0 - 2	81 (75.0%)	50 (61.0%)	101 (70.6%)	33 (41.8)	25 (58.1%)	29 (64.4%)	0.38
3 - 5	24 (22.2%)	22 (26.8%)	29 (20.3%)	30 (38.0%)	13 (30.2%)	11 (24.4%)	0.63
≥ 6	03 (2.8%)	10 (12.2%)	13 (9.1%)	16 (20.2%)	05 (11.6%)	05 (11.1%)	0.52
Complications of sickle cell disease [n (%)]							
Stroke	22 (20.4%)	16 (19.5%)	22 (15.4%)	12 (15.2%)	07 (16.3%)	04 (8.9%)	0.29
Leg ulcers	04 (3.7%)	01 (1.2%)	30 (21.0%)	22 (27.8%)	19 (44.2%)	25 (55.5%)	0.22
Avascular necrosis	02 (1.9%)	01 (1.2%)	11 (7.7%)	08 (10.1%)	12 (27.3%)	11 (24.4%)	0.83
Acute chest syndrome	47 (43.5%)	58 (70.3%)	81 (56.6%)	61 (77.2%)	18 (41.0%)	21 (46.7%)	0.51
Cardiac complications	02 (1.9%)	03 (3.6%)	15 (10.5%)	10 (12.6%)	12 (27.3%)	12 (27.1%)	0.99
Priapism	04 (7.0%)	10 (20.8%)	12 (21.4%)	14 (37.8%)	02 (20.0%)	03 (18.7%)	0.64
Mean severity score	0.320 ± 0.147	0.324 ± 0.144	0.549 ± 0.145	0.595 ± 0.164	0.795 ± 0.194	0.762 ± 0.161	0.38

MCV (mean corpuscular volume); LDH (lactate dehydrogenase); ALT (alanine aminotransferase); AST (aspartate aminotransferase); -HU (Patients without hydroxyurea use); +HU (Patients hydroxyurea use). We considered the patients who were using hydroxyurea over 90 days. Quantitative data comparisons were made by Mann-Whitney test (non-parametric data) and t test (parametric data). Categorical data comparisons were made by Binomial test

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

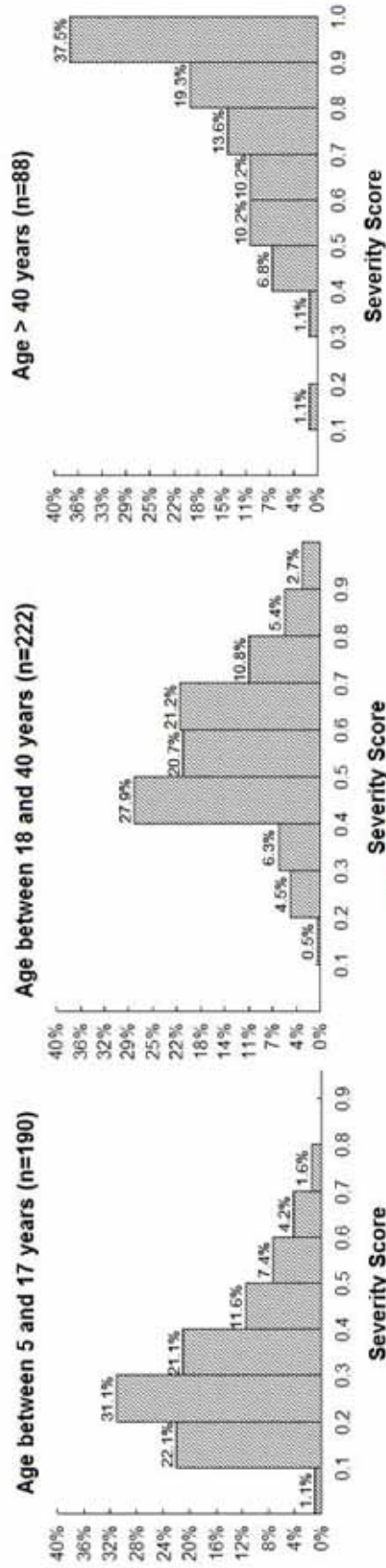


Figure 1 - Distribution of the severity score in sickle cell disease patients. The histograms show the different distribution of disease severity score in three age groups. In ascending order, the frequency of patients with more severe scores: [Age > 40 years] > [age between 18 and 40 years] > [age between 5 and 17 years].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

19

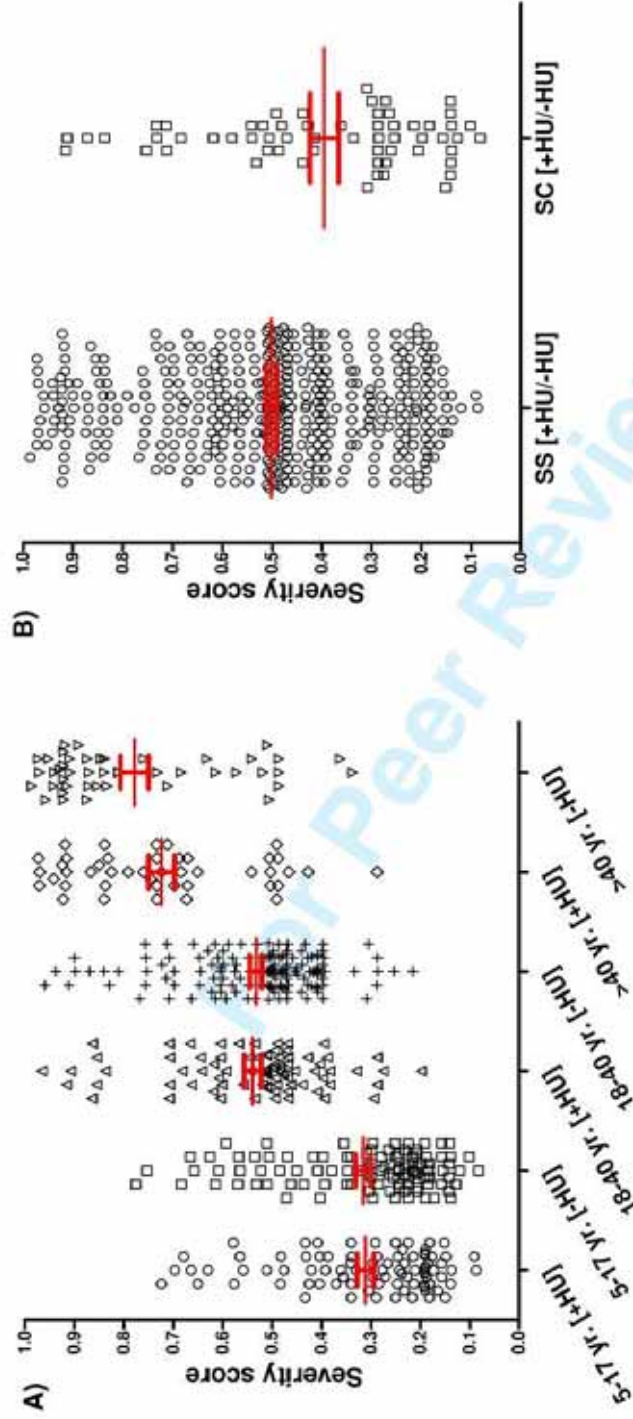


Figure 2 - Distribution of severity scores in different groups (age groups, hydroxyurea use and genotypes). A) Distribution of severity scores in SCD patients separated by age groups with and without the hydroxyurea use. Independent of HU use, patients >40 years had the highest average score (0.778 ± 0.177) followed by patients of 18-40 years (0.562 ± 0.152) and finally patients 5-17 years (0.322 ± 0.145), ($p < 0.0001$). B) Difference between HbSS and HbSC in which the mean severity scores were higher in HbSS ($n=440$) (0.501 ± 0.218) compared to HbSC ($n=60$) (0.395 ± 0.223), ($p < 0.001$).

Table 2. Complications of sickle cell disease separated according to age groups.

Complications of SCD	Age Groups			<i>p</i> value
	5 – 17 years (n=190)	18-40 years (n=222)	>40 years (n=88)	
Stroke	38 (20.0%)	34 (15.3%)	11 (13.2%)	0.23
Leg ulcers	5 (2.6%) ^a	52 (23.4%) ^b	44 (50.0%) ^c	<0.001
Avascular necrosis	3 (1.6%) ^a	19 (8.6%) ^b	23 (26.5%) ^c	<0.001
Acute chest syndrome	106 (55.8%)	142 (63.9%)	39 (44.3%)	0.107
Cardiac complications	5 (2.6%) ^a	25 (11.3%) ^b	24 (27.3%) ^c	<0.001
Priapism [n/total male]	14/108 (12.9%) ^a	26/93 (27.9%) ^b	5/26 (19.2%) ^b	0.025
Blood transfusion	84 (44.2%)	100 (45.1%)	35 (39.8%)	0.065
*Painful crises [0 – 2]	82 (43.2%) ^a	134 (60.4%) ^b	54 (61.4%) ^b	<0.001
*Painful crises [3 – 5]	24 (12.6%) ^a	59 (26.6%) ^b	24 (27.3%) ^b	<0.001
*Painful crises [≥ 6]	7 (3.7%) ^a	29 (13.1%) ^b	10 (11.4%) ^b	0.003

Data were expressed as number of patients with complication (percent of patients)

*Number of sickle cell crises per person per year in the last year.

Different letters indicate statistical difference (Pearson Chi square test supplemented by Fisher's exact test)

Table 3. Complications of sickle cell disease separated according to phenotypes characterized by ranges of severity scores in mild, intermediate and severe

Complications of SCD	Phenotypes			<i>p</i> value
	Mild (n=170)	Inter (n=180)	Severe (n=150)	
Stroke	21 (12.4%) ^a	25 (13.9%) ^a	37 (24.7%) ^b	<0.01
Leg ulcers	9 (5.3%) ^a	43 (23.9%) ^b	49 (32.7%) ^c	<0.001
Avascular necrosis	4 (2.3%) ^a	23 (12.8%) ^b	18 (12.0%) ^b	0.002
Acute chest syndrome	97 (57.1%)	94 (52.2%)	95 (63.3%)	0.067
Cardiac complications	6 (3.5%) ^a	21 (11.7%) ^b	27 (18.0%) ^c	0.006
Priapism [n/total male]	11/88 (12.5%)	23/83 (27.7%)	11/54 (20.4%)	0.081
Blood transfusion	59 (34.7%) ^a	60 (33.3%) ^a	100 (66.7%) ^b	<0.001
*Painful crises [0 – 2]	117 (68.8%)	119 (66.1%)	83 (55.3%)	0.241
*Painful crises [3 – 5]	40 (23.5%) ^a	48 (26.7%) ^b	41 (27.3%) ^b	0.001
*Painful crises [≥ 6]	13 (7.7%) ^a	13 (7.2%) ^a	26 (17.3%) ^b	0.122

Data were expressed as number of patients with complication (percent of patients)

*Number of sickle cell crises per person per year in the last year.

Different letters indicate statistical difference (Pearson Chi square test supplemented by Fisher's exact test)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

21

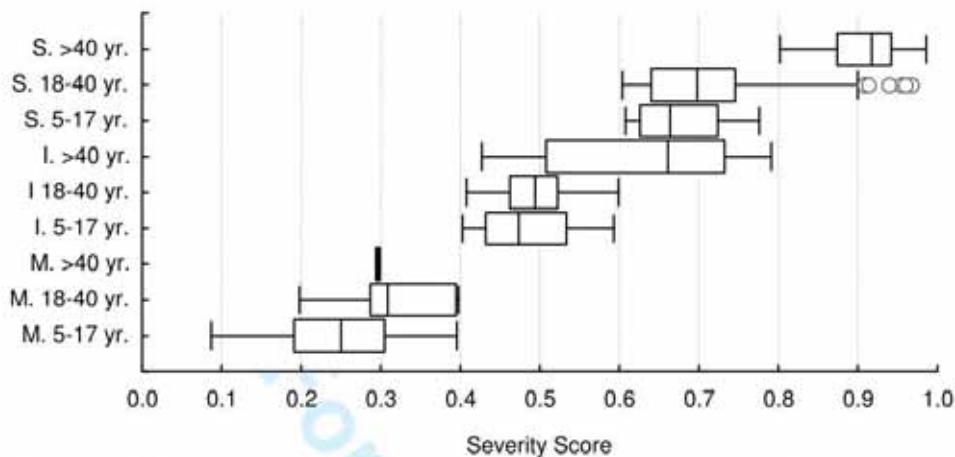


Figure 3. Distribution of severity scores according to the phenotype and age groups. Each box plot displays the observations between the first and the third quartile in the rectangle, with a line for the median. The whiskers extend to 1.5 times the interquartile range from each end of the rectangle. Circles represent outliers beyond the end of the whiskers. The outliers represent six severity scores above 0.9; these patients had the following clinical and laboratorial characteristics that justify these high scores: 50% were on chronic transfusion, 50% had renal complications, 80% had acute chest syndrome, 80% had over three pain crises in the last year and all patients were splenectomized.

Review

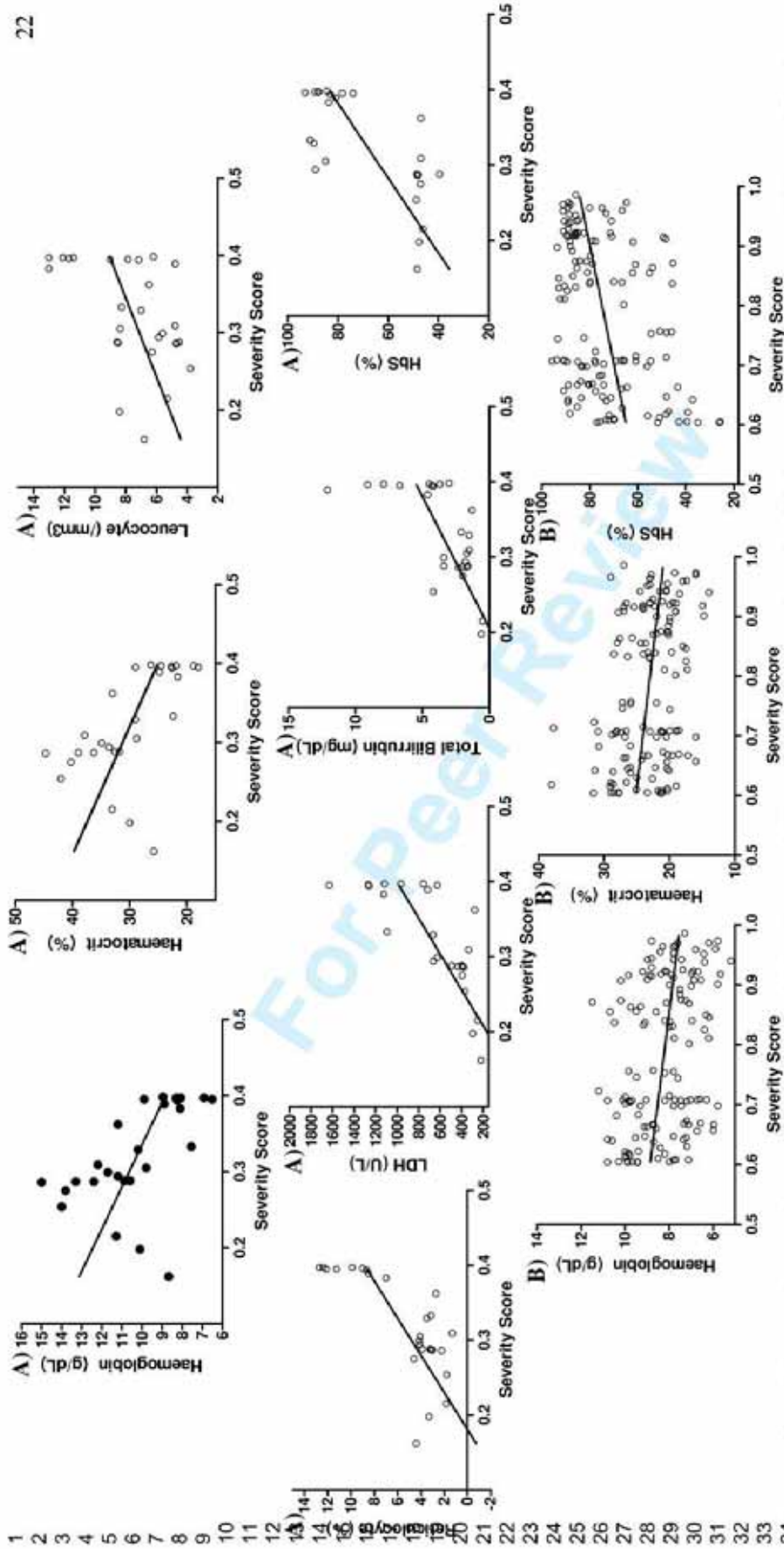



Figure 4. Correlation analyses using severity scores and laboratory variables. A) Correlation analyses in mild phenotype without the group 5-17 years. The degree of relation between severity score and haemoglobin ($p < 0.001$, $r = -0.65$) and severity score and haematocrit ($p < 0.001$, $r = -0.68$) were significantly negative. The degree of relation between severity score and Leucocyte ($p < 0.001$ and $r = 0.54$), severity score and reticulocyte ($p < 0.01$ and $r = 0.64$), severity score and LDH ($p < 0.001$ and $r = 0.76$), severity score and Haemoglobin S ($p < 0.001$ and $r = 0.69$) were significantly positive. B) Correlation analyses in Severe phenotype. The degree of relation between severity score and Haemoglobin ($p < 0.01$ and $r = -0.31$) and severity score and haematocrit ($p = < 0.01$ and $r = -0.32$) were significantly negative. The degree or relation between severity score and Haemoglobin S ($p < 0.001$ and $r = 0.34$) was significantly positive. When haemoglobin and haematocrit values decreased the severity scores tended to increase; and when leucocyte, reticulocyte, LDH, total bilirubin and Hbs values increased the severity score values tended to increase.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 17/03/2014



Edis Bahia Junior

Assinatura