



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

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**Danilo Grünig Humberto da Silva**

**Expressão fenotípica da homozigose para hemoglobina S em  
relação aos haplótipos da beta globina, polimorfismos da  
glutathione S-transferase e enzimas de detoxificação**

---

São José do Rio Preto - SP  
2011

**Danilo Grünig Humberto da Silva**

**Expressão fenotípica da homozigose para hemoglobina S em relação aos  
haplótipos da beta globina, polimorfismos da glutathione S-transferase e  
enzimas de detoxificação**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

**Co-orientadora:** Profa Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP

2011

Silva, Danilo Grünig Humberto.

Expressão fenotípica da homozigose para hemoglobina S em relação aos haplótipos da beta globina, polimorfismos da glutathione S-Transferase e enzimas de detoxificação / Danilo Grünig Humberto da Silva. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

143 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo Alves de Almeida

Co-orientador: Claudia Regina Bonini Domingos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobinopatia. 2. Hemoglobina S – Fenótipo. 3. Capacidade antioxidante. 4. Anemia falciforme. I. Almeida, Eduardo Alves de. II. Bonini Domingos, Claudia Regina. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616.155

**Danilo Grünig Humberto da Silva**

**Expressão fenotípica da homozigose para hemoglobina S em relação aos  
haplótipos da beta globina, polimorfismos da glutathione S-transferase e  
enzimas de detoxificação**

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

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues  
UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza  
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

São José do Rio Preto - SP  
16 de Fevereiro de 2011

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia e no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental, do 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 CNPq e CAPES.**

**Dedico este trabalho**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Veronika, por terem feito com que eu acreditasse e alcançasse meus objetivos, meus sonhos, pelo amor e confiança depositados a mim. Às minhas irmãs Carolina e Erica, pelo incentivo, apoio, admiração e carinho. À minha noiva, Joyce, pela paciência, cumplicidade, e por nunca ter desistido do nosso amor.*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, **Paulo Sérgio Humberto da Silva e Veronika Helena Grünig da Silva**, pela criação, ensinamentos, amor, carinho, amizade, participação, confiança e exemplos de vida.*

*Às minhas irmãs, **Carolina Grünig Humberto da Silva e Erica Grünig Humberto da Silva**, pelo carinho, respeito, apoio, incentivo e admiração.*

*À minha noiva, **Joyce Santos Barbeiro**, pela paciência, cumplicidade, amor, compreensão e por tudo que vivemos e viveremos juntos.*

*A toda a família **Grünig Silva**, mesmo distante sempre me incentivaram e acreditaram no caminho que trilho, e, também, pelos momentos de conversa e confraternização.*

*A toda a família **Santos Barbeiro** pelo apoio, carinho e pelos momentos de muita conversa e descontração durante todos esse anos.*

*Aos meus cunhados e amigos, **Du e Tiago**, pelo incentivo e momentos de confraternização.*

*Aos meu amigos das antigas, **Nathy, Denílson, Kinha, Gabi, Alan, Clarindo, Renan, Nelson** pela amizade de várias anos.*

*Aos meus amigos da graduação, **Kido, Caio, Erisson, Tamia, Day, Michel, Pauloso, Diego, Gustavo, Bruno, Carla, Bianca, Glaucia, Jéssika, Danilo (Bad), Gabiii, Fernanda, Naka, Marina, Fabão, Guedes**, pelo incentivo e pela amizade.*

*Às galeras do **Handball**, de Birigui e Rio Preto, pela amizade e momentos de descontração.*

*À **Profa. Glória M. G. de Oliveira** pelos ensinamentos, amizade e por ser responsável pelo meu envolvimento com a pesquisa científica.*

*Aos meus “tios postiços”, **José A. A. Queiroz e Maria de Fátima Belini**, por terem me acolhido inúmeras vezes durante o caminho até aqui, sempre com muito carinho e atenção.*

*Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), **Belini, Gisele, Paula, Larissa, Tiago, Isabel, Carol, Eliane, Isabeth, Vinicius, Ítalo, Júlia, Lidiane, Haruo, Wilian, Isabela, Rafael, Marina, Carlos, João Vitor** e do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental (LABCA), **Lilian, Aline, Daína, Letícia, Mariana, Lucilene, Dani, Tatiana, Déia, Camila, Lenard, Luiz, Ana Paula, Brunão, Alexandre e Gabriel** e àqueles que passaram pelo laboratório, pelos momentos de discussão, aprendizagem, amizade e diversão.*

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

*À **CAPES** pela minha bolsa de estudos.*

*Ao **Dr. Octávio Ricci Júnior e Dra. Clarisse Lobo** pela autorização das coletas de amostras dos doentes falciformes e toda equipe do Hemocentro de São José do Rio Preto e Hemorio.*

*Aos amigos **Belini, Gisele, Lidiane e Larissa** pela contribuição valiosas nas análises laboratoriais e estatísticas deste estudo.*

*Ao **Prof. Dr. Octávio Ricci Júnior e à Profa. Dra. Luciana de Souza Onde** pela valiosa contribuição durante o exame de qualificação.*

*Aos meus orientadores, **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida e Profa Dra Claudia Regina Bonini Domingos** pela confiança, paciência, ensinamentos, amizade, orientação e pela formação não só acadêmica e profissional, mas também pessoal.*

*À **Deus** pelo dom da vida.*



*A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.*

*(George Bernard Shaw)*

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) apresenta fisiopatologia que envolve múltiplas alterações nos eritrócitos falcêmicos, episódios vasoclusivos, hemólise, ativação de mediadores inflamatórios, disfunção das células endoteliais e estresse oxidativo. Estes eventos dificultam o tratamento e culminam no desenvolvimento de manifestações como anemia, crises de dor e insuficiência de múltiplos órgãos. Portanto, o presente estudo objetivou, em portadores da AF, avaliar marcadores do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante, correlacionando-os ao tratamento com hidroxíureia (HU), aos haplótipos da  $\beta$ -globina e aos polimorfismos da glutationa S-transferase (*GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1*), em comparação com os resultados do grupo controle (GC). Os grupos estudados se compuseram de 48 indivíduos sem hemoglobinopatias (GC), pacientes com AF tratados com HU [AF (+HU), n=13] e pacientes não tratados [AF (-HU); n=15], após consentimento informado. Para a composição dos grupos utilizamos métodos citológicos, eletroforéticos, cromatográficos, moleculares e informações de prontuários. A pesquisa dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada por meio de PCR-MULTIPLEX, enquanto o polimorfismo *GSTP1* por PCR-RFLP. Os parâmetros bioquímicos foram avaliados por meio de métodos espectrofotométricos [TBARS, TEAC, atividade das enzimas catalase (CAT) e GST] e cromatográficos [glutaciona (GSH)]. Os níveis de Hb Fetal (Hb F) verificados no grupo AF (+HU) (10,9%) confirmaram seu já bem descrito efeito farmacológico da HU, porém, o grupo AF (-HU) também apresentou níveis elevados de Hb F (6,1%) que podem ter sido influenciados por fatores genéticos não considerados neste estudo. Encontramos maior frequência do haplótipo Bantu (48,2%), seguido pelo Benin (32,1%) e, também, haplótipo Camarões (1,8%), raro na população brasileira, e 19,7% de haplótipos atípicos. A presença do haplótipo Bantu relacionou-se com os maiores níveis de peroxidação lipídica nos pacientes, porém, também, conferiu resposta diferencial ao tratamento com HU, elevando os níveis de Hb F em 52,6% ( $p=0,030$ ). O efeito protetor da Hb F foi comprovado, pois o aumento em seus níveis culminou na diminuição em 41,3% dos níveis de peroxidação lipídica ( $r = - 0,74$ ,  $p=0,015$ ). A frequência genotípica dos polimorfismos da GST obtida foi similar a de outros estudos em populações brasileiras e, sua associação com os marcadores bioquímicos revelou diferença significativa apenas para o polimorfismo *GSTP1* nos pacientes de genótipo V/V que apresentaram maiores níveis de TEAC e GSH ( $p=0,040$  e  $p=0,030$ , respectivamente) comparados aos pacientes com genótipo I/I. Os níveis de TBARS foram cerca de cinco a oito vezes maiores nos grupos AF (+HU) e AF (-HU), respectivamente, do que no GC e, o uso de HU proporcionou redução de 35,2% nos níveis de peroxidação lipídica ( $p<0,001$ ). O grupo AF (+HU) apresentou níveis mais elevados de TEAC quando comparado ao GC ( $p=0,002$ ). Não foi encontrada diferença significativa para a atividade de GST entre os grupos estudados ( $p=0,760$ ), porém a atividade da CAT foi cerca de 17% e 30% menor nos grupos AF (+HU) e AF (-HU) ( $p<0,001$ ), respectivamente, e, 31% da sua redução é explicada pelo aumento dos níveis de TBARS ( $R^2 = 0,31$ ,  $p<0,001$ ). E os níveis de GSH plasmáticos foram cerca de duas vezes maiores nos pacientes com AF em relação ao GC ( $p<0,001$ ) e, apresentaram correlação positiva com os níveis de TBARS ( $r=0,37$ ,  $p<0,001$ ), confirmando sua função antioxidante. O uso de HU contribuiu para maiores atividade da CAT e níveis de TEAC e menor peroxidação lipídica; e, o seu efeito farmacológico apresentou resposta “haplótipo-dependente”. Esses resultados contribuem para destacar a influência da HU na melhora do estresse oxidativo nos portadores da AF.

**Palavras-chave:** anemia falciforme, estresse oxidativo, capacidade antioxidante, hidroxíureia

## ABSTRACT

*Sickle cell anemia (SCA) shows a pathophysiology that involves multiple changes in the sickle cell erythrocytes, vaso-occlusive episodes, hemolysis, activation of inflammatory mediators, endothelial cell dysfunction and oxidative stress. These events complicate the treatment and culminate in the manifestations development such as anemia, pain crises and multiorgan dysfunction. Therefore, the aim of this study was to evaluate, in SCA patients, oxidative stress and antioxidant capacity markers, correlating them to treatment with hydroxyurea (HU), the  $\beta$ -globin haplotypes and glutathione S-transferase polymorphisms (GSTT1, GSTM1 and GSTP1) in comparison to a control group (CG). The groups were composed of 48 individuals without hemoglobinopathies (CG), SCA patients treated with HU [AF (+ HU), n = 13] and untreated patients [AF (-HU), n = 15], after informed consent. For the groups composition we used cytological, electrophoretic, chromatographic and molecular methods and information from medical records. The GSTM1 and GSTT1 polymorphisms study was performed by multiplex PCR, while the GSTP1 polymorphism by PCR-RFLP. Biochemical parameters were measured using spectrophotometric methods [TBARS, TEAC and catalase (CAT) and GST activities] and chromatographic method [glutathione (GSH)]. The Fetal Hb (Hb F) levels observed in the SCA (+HU) group (10.9%) confirmed their already well-described pharmacological effect of HU, however, the SCA (-HU) group also had high Hb F levels (6.1%) that may have been influenced by genetic factors not targeted in this study. We found a higher frequency of Bantu haplotype (48.2%), followed by Benin (32.1%) and also Cameroon haplotype, rare in our population and 19.7% of atypical haplotypes. The Bantu haplotype presence was related to higher lipid peroxidation levels in patients, but also, it conferred the differential response to HU treatment, raising Hb F levels in 52.6% ( $p = 0.03$ ). The protective effect of Hb F was confirmed, because the increase in their levels resulted in a decrease of 41.3% of the lipid peroxidation levels ( $r = - 0.74$ ,  $p = 0.0156$ ). The genotypic frequency of the GST polymorphisms obtained was similar to other studies in Brazilian populations and its association with biochemical markers revealed a significant difference only for the GSTP1 polymorphism in patients with genotype V/V showed higher GSH and TEAC levels ( $p = 0.04$  and  $p = 0.03$ , respectively) compared to patients with genotype I/I. The TBARS levels were about five to eight times higher in groups SCA (+HU) and SCA (-HU), respectively, than in the CG and, HU use provides a 35.2% decrease in the lipid peroxidation levels on the SCA (+HU) group ( $p < 0.0001$ ). Moreover, the SCA (+HU) group showed higher TEAC levels as compared to the CG ( $p = 0.002$ ). We did not find any significant difference in GST activity between the studied groups ( $p = 0.76$ ), but the CAT activity was about 17% and 30% decreased in the SCA (+HU) and SCA (-HU) groups, respectively ( $p < 0.00001$ ). Whereas the plasma GSH levels were ~2 times higher in the SCA patients than the control group ( $p = 0.0005$ ) and showed a positive correlation with TBARS levels, confirming its antioxidant function. The HU use has contributed to higher CAT activity and TEAC levels and lower lipid peroxidation, and its pharmacological effect presented a "haplotype-dependent" response. These findings may contribute to highlight the influence of HU in ameliorating oxidative stress on SCA subjects.*

**Key-Words:** sickle cell anemia, oxidative stress, antioxidant capacity, hydroxyurea

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização cromossômica dos <i>clusters</i> gênicos $\alpha$ e $\beta$ ..	19
Figura 2. Deformação da membrana eritrocitária pela polimerização da Hb S..	21
Figura 3. Processos fisiopatológicos na anemia falciforme..	22
Figura 4. Distribuição geográfica e representação esquemática de haplótipos $\beta^S$ .....	24
Figura 5. Esquema simplificado de sistemas oxidativos e antioxidantes.....	25
Figura 6. Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbS.....	43
Figura 7. Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos $\beta^S$ .....	43
Figura 8. Representação esquemática dos produtos da PCR MULTIPLEX para <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> .....	46
Figura 9. Representação esquemática dos produtos da PCR - RFLP para <i>GSTP1</i> .....	47
Figura 10. Níveis de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total. ....	66
Figura 11. Atividade enzimática da GST..	67
Figura 12. Atividade enzimática da CAT e sua relação com a peroxidação lipídica..	67
Figura 13. Níveis de GSH no plasma e sua relação com a peroxidação lipídica..	68
Figura 14. Níveis de Hb F e peroxidação lipídica em pacientes com mesmo haplótipo $\beta^S$ ....	71
Figura 15. Análise do efeito do haplótipo Bantu e do tratamento de HU sobre moduladores da expressão fenotípica na AF..	72
Figura 16. Associação entre os níveis de Hb F e atividade enzimática da CAT dos pacientes falciformes.....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões do <i>cluster</i> $\beta$ . .....	44
Tabela 2. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina $\beta$ . .....	44
Tabela 3. Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do <i>cluster</i> da globina $\beta$ . .....	45
Tabela 4. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição. ....	45
Tabela 5. Diluição da Solução Estoque para construção da curva padrão de GSH. ....	58
Tabela 6. Valores das frações hemoglobínicas nos grupos estudados. ....	61
Tabela 7. Caracterização dos alelos atípicos dos haplótipos $\beta^S$ . ....	61
Tabela 8. Distribuição genotípica dos haplótipos $\beta^S/\beta^S$ por localidade .....	62
Tabela 9. Distribuição alélica dos haplótipos encontrados.....	62
Tabela 10. Incidência de eventos clínicos da AF nos pacientes de São José do Rio Preto. ....	63
Tabela 11. Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> nos grupos controle e pacientes. ....	64
Tabela 12. Frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo <i>GSTP1</i> nos grupos controle e pacientes.....	64
Tabela 13. Análise da interferência do gênero e idade nos valores dos marcadores bioquímicos no grupo controle e pacientes. ....	65
Tabela 14. Análise descritiva da interferência dos haplótipos $\beta^S$ nos moduladores da expressão fenotípica na AF. ....	69
Tabela 15. Influência dos haplótipos $\beta^S$ sobre moduladores da expressão fenotípica na AF. ...	69
Tabela 16. Influência do uso de HU em pacientes com o mesmo haplótipo $\beta^S$ . ....	70
Tabela 17. Relação entre o haplótipo Bantu e tratamento de HU sobre moduladores da expressão fenotípica na AF. ....	71
Tabela 18. Relação entre os polimorfismos de GST e parâmetros bioquímicos avaliados.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	microlitro
$\bullet\text{OH}$	radical hidroxil
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio
AF (+)	grupo de portadores da anemia falciforme sob uso de ácido fólico e hidroxiureia
AF (-HU)	grupo de portadores da anemia falciforme sob uso somente de ácido fólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVE	Acidente Vascular Encefálico
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CAM	Camarões
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAR	República Centro Africana ou Bantu
CAT	catalase
CD36	proteína de membrana ( <i>Cluster of Differentiation 36</i> )
CD47	proteína de membrana ( <i>Cluster of Differentiation 47</i> )
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DF	doença falciforme
DFO	deferroxamina
DFP	deferiprona
DFX	deferasirox
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
DTC	doppler transcraniano
EDTA	Ácido etinodiaminotetracético
ERN	espécies reativas de nitrogênio

ERO	espécies reativas de oxigênio
et al.	e outros
GC	grupo controle
GPx	glutaciona peroxidase
GSH	glutaciona
GSSG	glutaciona dissulfeto
GST	glutaciona S transferase
<i>GSTM1</i> -	genótipo nulo para <i>GSTM1</i>
<i>GSTM1</i> +	genótipo selvagem para <i>GSTM1</i>
<i>GSTT1</i> -	genótipo nulo para <i>GSTT1</i>
<i>GSTT1</i> +	genótipo selvage para <i>GSTT1</i>
GS-X	glutaciona conjugada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
Hb A	hemoglobina A (normal)
Hb F	hemoglobina fetal
Hb S	hemoglobina S (falcêmica)
Hb S/beta	interação Hb S e beta talassemia
Hb SC	duplo heterozigoto para a Hb S e Hb C
Hb SS	homozigoto para a Hb S (anemia falciforme)
Hb	hemoglobina
HCl	ácido clorídrico
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HU	hidroxiureia
LCR	região controladora de locus
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
MDA	malondialdeído
mM	mili molar
mmol	mili mol

MS	Ministério da Saúde
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	fosfato de sódio dibásico anidro
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	fosfato de sódio monobásico monohidratado
ng/mL	nanograma por mililitro
NO	óxido nítrico
$\text{O}_2^{\cdot -}$	radical superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de base
PCR-RFLP	Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
q.s.p	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
SAUDI	Índia-Arábia Saudita
SDS	dodecil sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
STA	Síndrome Torácica Aguda
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEAC	capacidade antioxidante em equivalência ao trolox
TEB	Tris-EDTA-Borato
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethychroman-2-carboxylic acid
U/mL	unidade de enzima* por mili litro
UV	ultravioleta
$\mu\text{M}$	micro molar

\* 1 U de enzima é a quantidade de enzima necessária para consumir 1 mmol de substrato por minuto, ou formar 1 mmol de produto por minuto.



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	gene alfa
$\infty$	infinito
$\beta$	gene beta
$\beta^+$	beta mais talassemia
$\beta^0$	beta zero talassemia
$\beta^S$	gene beta S mutante
$\beta^{\text{Tal}}$	gene beta talassêmico
$\gamma^A$	gene gama alanina
$\gamma^G$	gene gama glicina
$\delta$	gene delta
$\epsilon$	gene epsilon
$\zeta$	gene zeta
$\psi\alpha$	pseudogene alfa
$\psi\beta$	pseudogene beta
$\psi\zeta$	pseudogene zeta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Hemoglobinas Humanas.....	18
1.2. Hemoglobinopatias Hereditárias .....	19
1.3. Hemoglobina S .....	20
1.4. Haplótipos $\beta^S$ .....	23
1.5. Estresse Oxidativo na Anemia Falciforme .....	25
1.6. Glutathione S-Transferase .....	26
1.7. Manifestações Fenotípicas na Anemia Falciforme.....	27
1.8. Terapia para Anemia Falciforme .....	29
1.8.1. <i>Terapia transfusional associada à quelação do ferro</i> .....	29
1.8.2. <i>Terapia Farmacológica com Hidroxiureia</i> .....	30
2. OBJETIVOS .....	32
2.1. Objetivo geral .....	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.1. Casuística.....	34
3.2. Considerações Éticas .....	35
3.3. Metodologia.....	35
3.3.1. <i>Genotipagem e fenotipagem hemoglobínica e caracterização dos haplótipos <math>\beta^S</math></i> ..35	
3.3.2. <i>Análise molecular para a investigação dos polimorfismos da glutathione S-transferase</i> .....	45
3.3.3. <i>Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante</i> .....	47
4. RESULTADOS .....	61
4.1. Perfil hemoglobínico, dos haplótipos $\beta^S$ e fenotípico dos pacientes. ....	61
4.2. Frequência dos polimorfismos da glutathione S-transferase - GSTM1, GSTT1 e GSTP1 .....	63
4.3. Relações entre marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante. ....	65
4.4. Associação dos marcadores genéticos e bioquímicos na expressão fenotípica dos pacientes. ....	68
5. DISCUSSÃO .....	76
6. CONCLUSÕES .....	84
REFERÊNCIAS .....	86
APÊNDICE I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	104
APÊNDICE II - Questionário.....	105
APÊNDICE III - Planilhas .....	108
APÊNDICE IV – Artigo de qualificação .....	113
ANEXO – Artigo publicado.....	138

## *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

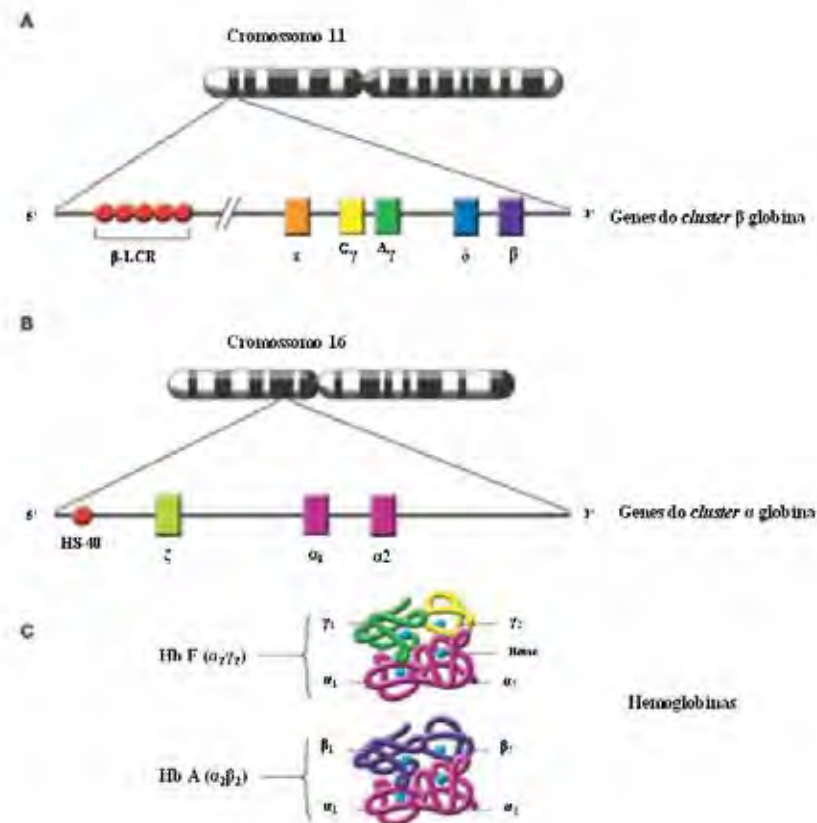
### 1.1. Hemoglobinas Humanas

A hemoglobina (Hb) humana é uma proteína globular e tetramérica, com peso molecular de 64.458 daltons, composta de quatro subunidades polipeptídicas codificadas por dois grupos de genes localizados nos cromossomos 11 e 16. Cada uma das quatro subunidades é composta por uma fração protéica, a globina, e um grupo prostético, o heme, que contém um átomo de ferro e é capaz de se ligar a ao oxigênio e gás carbônico, o que determina sua capacidade de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e parte do gás carbônico no sentido inverso. (HONIG; ADAMS, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

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

Durante as fases do desenvolvimento, diferentes hemoglobinas exercem a função de transporte de gases. São tetrâmeros formados pela interação de duas cadeias polipeptídicas do tipo alfa – alfa ou zeta – com duas cadeias do tipo beta – épsilon, gama, delta ou beta. No período embrionário, são formadas as Hb Gower I ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Gower II ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), Hb Portland I ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e Hb Portland II ( $\zeta_2\beta_2$ ); estas são substituídas pela Hb Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ), predominante durante todo o período fetal. Por ocasião do nascimento, a Hb F é, gradativamente, substituída pelas hemoglobinas do adulto, Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), majoritária, e Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), minoritária (Figura 1) O perfil de hemoglobinas no adulto sem alterações hemoglobínicas é de Hb A 96 – 98%, Hb A<sub>2</sub> 2,5 – 3,5% e, podendo apresentar de 0 – 1% de Hb F (WEATHERALL; CLEGG, 1981; BUNN; FORGET, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A Hb, além do transporte de gases, também atua no equilíbrio ácido-base, na detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), e no transporte de Oxido Nítrico (NO), para garantir a capacidade antioxidante do sangue e a oxigenação dos tecidos (CAVIL, 2002; REISCHL et al., 2007).



**Figura 1. Organização cromossômica dos clusters gênicos  $\alpha$  e  $\beta$ .** (A) Os genes do cluster  $\beta$  globina estão presentes no cromossomo 11 na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento. A região reguladora do locus ( $\beta$ -LCR) é um importante elemento regulador. (B) Os genes do cluster  $\alpha$  globina estão localizados no cromossomo 16 e, também, dispostos de acordo com a ontogenia hemoglobínica. O sítio HS-40 representa um importante elemento regulador desse cluster gênico. (C) Durante a vida fetal, a Hb F é o tipo predominante de Hb que sofre comutação durante o desenvolvimento humano, que leva ao silenciamento da expressão dos genes  $\gamma$  e à ativação recíproca dos genes  $\beta$ . Isso resulta na formação do tipo hemoglobínico predominante do período adulto, a Hb A (modificado de FRENETE; ATWEH, 2007).

## 1.2. Hemoglobinopatias Hereditárias

As mutações que afetam a expressão dos genes da Hb humana normal levam às hemoglobinopatias, as mais comuns das afecções genéticas e, ocorrem fundamentalmente por: mutações e/ou deleções em genes reguladores, que levam ao desequilíbrio do conteúdo quantitativo das cadeias globínicas, originando as talassemias, ou por alterações envolvendo genes estruturais, que promovem a formação de moléculas com características bioquímicas diferentes, denominadas variantes (WEATHERALL; CLEGG, 2001; BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

As hemoglobinopatias hereditárias representam um grupo de alterações, em sua maioria, autossômicas e monogênicas representadas, atualmente, por 1488 diferentes alelos

mutantes caracterizados em nível molecular, porém a maioria não apresenta fenótipos com manifestações clínicas. Para aqueles portadores que possuem fisiopatologia, os efeitos são diversos, dependentes do tipo de herança, homo ou heterozigota, e também das interações genéticas ou ambientais, com consequências que vão de imperceptíveis às letais (LEONELI et al., 2000; HUISMAN et al., 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 7% da população mundial apresentam algum tipo de gene mutante para a Hb que determina a presença de Hb anormais, nas mais diversas combinações e representam um problema de saúde pública. Baseado nesta estimativa, aproximadamente 0,5 milhões de crianças nascem por ano com algum tipo de alteração grave nas cadeias globínicas (WEATHERALL E CLEGG, 2001).

A frequência de portadores de hemoglobinopatias no Brasil é muito variável de uma região para a outra (1-12% aproximadamente) e depende da composição étnica da população local (BONINI-DOMINGOS, 1993; CANÇADO; JESUS, 2007).

### **1.3. Hemoglobina S**

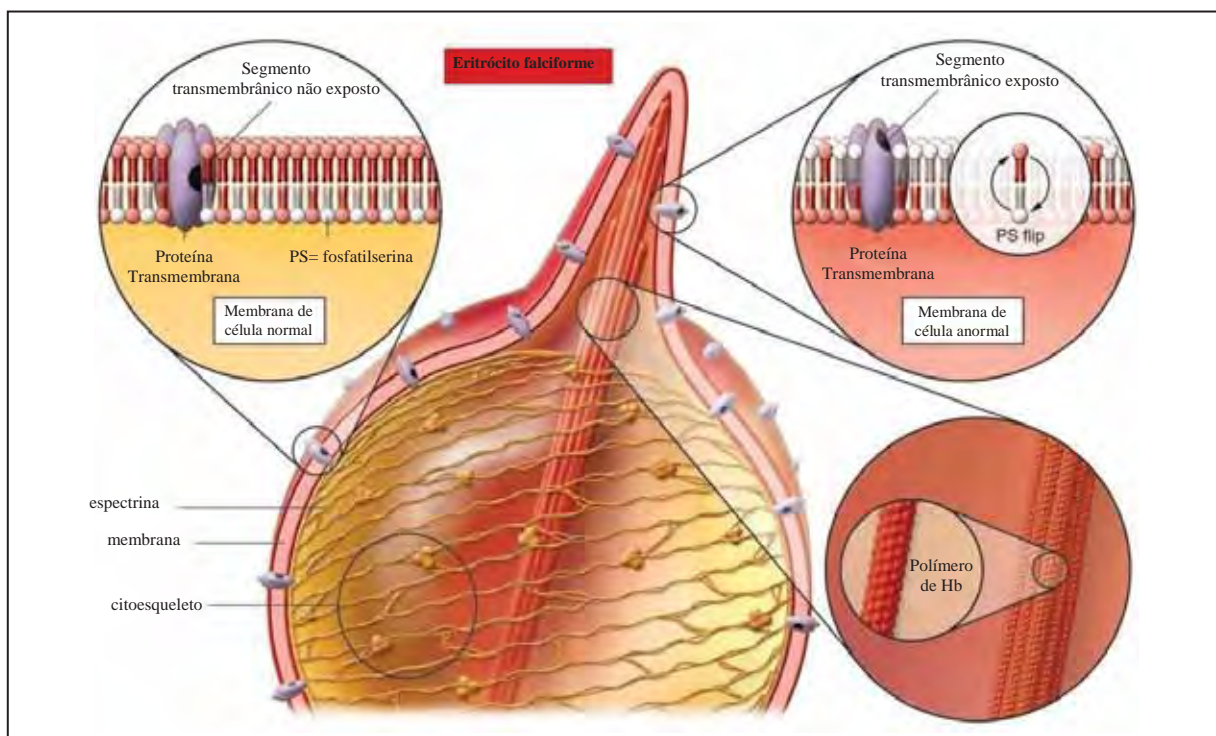
A Hb S é causada por uma mutação pontual do tipo transversão, no gene  $\beta$ -globina, em que o 17º nucleotídeo sofre alteração de timina para adenina, codificando valina, ao invés de um ácido glutâmico, que por sua vez origina uma Hb variante (BUNN, 1997; STEINBERG, 1998).

O termo “doença falciforme (DF)” se aplica a um grupo de anemias hemolíticas hereditárias que têm em comum a presença de Hb S, incluindo a anemia falciforme (Hb SS), as interações com talassemias (S/Beta talassemia), e associações com outras variantes de hemoglobina formando os duplos heterozigotos, como a Hb SC (LOBO et al., 2007).

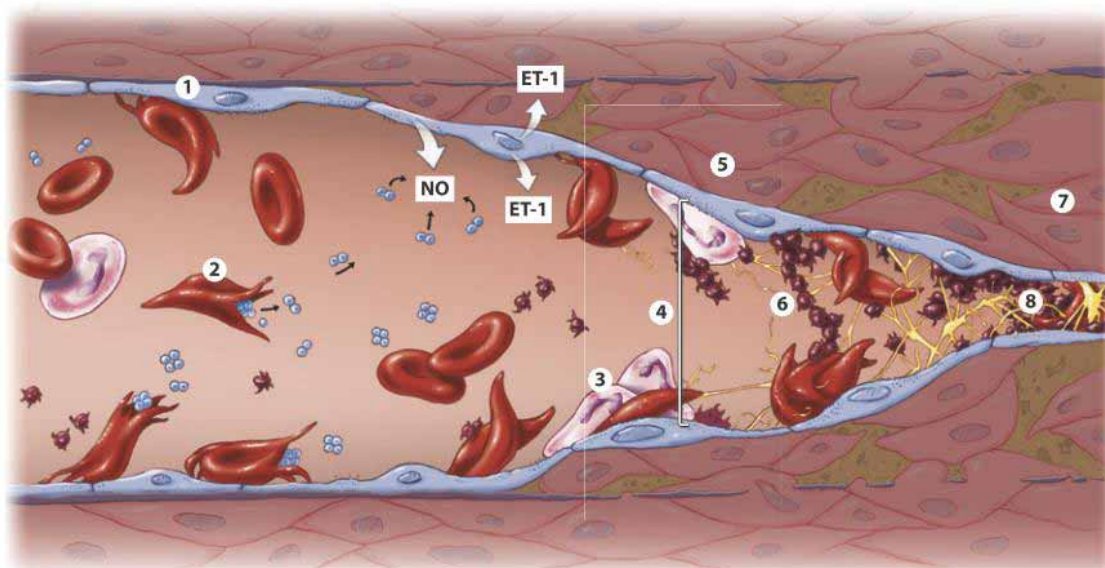
A anemia falciforme (AF) é uma doença multissistêmica, associada a episódios agudos de dor e lesões progressivas de órgãos. É uma das doenças monogênicas mais comuns e graves em todo o mundo (WEATHERALL et al., 2005). Estudos epidemiológicos mostram que 300 a 400 mil crianças nascidas vivas por ano no mundo apresentam AF. No Brasil, esta afecção tem significativa importância epidemiológica em virtude de sua prevalência, da morbidade e da mortalidade e, por isso, tem sido apontada como uma questão de saúde pública (BANDEIRA, 2007). Estima-se que mais de sete milhões de indivíduos possuam o traço falciforme (Hb AS) e 25.000 a 30.000 apresentam a AF (Hb SS) (ANVISA, 2002; CANÇADO; JESUS, 2007).

A mutação que resulta na Hb S produz regiões hidrofóbicas de contato, no tetrâmero desoxigenado, entre a valina de uma molécula de Hb S e uma alanina, fenilalanina e/ou leucina da molécula de Hb S adjacente que resulta na ligação entre esses aminoácidos, produzindo um polímero que se estende e preenche o eritrócito, rompendo a arquitetura e flexibilidade eritrocitária, e, alterando drasticamente suas propriedades mecânicas e reológicas (WISHNER et al., 1975; FRONTICELLI; GOLD, 1976; DYKES et al., 1979; BRIEHL, 1983; BRITTENHAM et al., 1985; CARRAGER et al., 1988; SAMUEL et al., 1990).

A polimerização da Hb S dentro das hemácias acarreta múltiplas alterações celulares: efluxo de íons monovalentes como o potássio, desidratação celular, aumento da densidade dos eritrócitos, oxidação da Hb (formação de metahemoglobina e radical superóxido), desnaturação da Hb (formação de hemicromos, heme livre e ferro livre), exposição de epítomos protéicos e lipídicos (banda 3, espectrina, fosfatilserina, CD36, CD47) e por fim a hemólise (Figura 2) (ZAGO; PINTO, 2007; FRENETE; ATWEH, 2007). Tais alterações culminam em dois importantes processos fisiopatológicos: a vasoculsão com lesão do tipo isquemia-reperfusão e anemia hemolítica (Figura 3) (REES et al., 2010).



**Figura 2. Deformação da membrana eritrocitária pela polimerização da Hb S.** A desoxigenação induz a mudança na conformação estrutural da proteína, em que as cadeias globínicas  $\beta$  mutante se ligam ao sítio hidrofóbico complementar, originado pela substituição do ácido glutâmico pela valina, levando à formação do polímero de Hb. Os feixes de polímeros de Hb S alongam-se e rompem a ligação da membrana do eritrócito com proteínas do citoesqueleto resultando em protrusões na membrana e exposição de proteínas e lipídios (modificado de FRENETE; ATWEH, 2007).



**Figura 3. Processos fisiopatológicos na anemia falciforme.** (1) Adesão de hemácias ao endotélio. (2) Hemólise. (3) Adesão leucocitária. (4) Aumento do tônus vascular. (5) Proliferação neointimal. (6) Agregação plaquetária. (7) Vasculopatia. (8) Vasoculsão. ET-1: endotelina 1; NO: óxido nítrico. (modificado de BARABINO et al., 2010).

A interação dinâmica entre eritrócitos e o endotélio vascular resulta em episódios de oclusão microvascular e isquemia, seguidos de restauração do fluxo sangüíneo, o que aumenta a lesão tecidual mediada por reperfusão (WOOD et al., 2005). Estes ciclos de isquemia e reperfusão causam estresse oxidativo, com a ativação de oxidases vasculares, e processos inflamatórios, aumentando a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais e a síntese de citocinas inflamatórias que podem causar leucitose (FRENETTE, 2002; BELCHER et al., 2003; BELCHER et al., 2005; WOOD et al., 2005).

O segundo processo fisiopatológico da AF é a hemólise, que também é desencadeada pela polimerização da Hb S. Sabe-se que a hemólise causa anemia, fadiga e colelitíase, mas há, atualmente, evidências de sua contribuição para o desenvolvimento de vasculopatia (PEGELow et al., 1997; OHENE-FREMPONG et al., 1998; GLADWIN et al., 2004; KATO et al., 2006). A Hb livre no plasma gera espécies reativas de oxigênio (ERO), como os radicais hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), sendo o último um potente depletor de óxido nítrico, o que acarreta disfunção do endotélio vascular (REPKA; HEBBEL, 1991; REITER et al., 2002; GLADWIN, 2006).

Vários moduladores genéticos têm sido estudados, baseados na fisiopatologia da AF, e, a capacidade inata de produção de Hb F e a coerança de alfa talassemia foram validadas por inúmeros estudos (CAPPELLINI et al., 1981; HIGGS et al., 1982; OLD et al., 1982; THEIN; WEATHERALL, 1989; CAMASCHELLA et al., 1995). O aumento nos níveis de Hb F



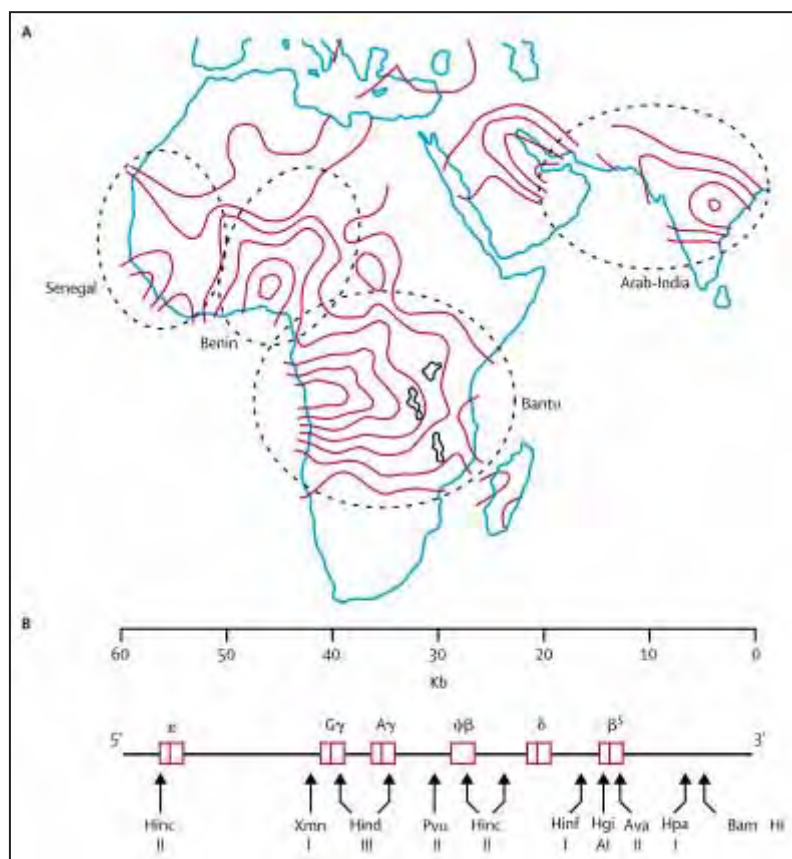
promove a diluição da concentração de Hb S com conseqüente diminuição de polimerização, evento primordial da fisiopatologia da AF (STEINBERG, 1999). Enquanto que a alfa talassemia tem efeito quantitativo da concentração intracelular de Hb S, reduzindo, assim a freqüência de Hb S e, conseqüentemente, a polimerização e falcização (HIGGS et al., 1982).

No entanto, estes dois moduladores não explicam toda a heterogeneidade clínica e muitas questões importantes permanecem em relação ao papel de outros modificadores genéticos e suas interações com o meio ambiente, dentre eles, a característica genética que determina a concentração intracelular de Hb S, os haplótipos da beta globina, a coerança de outros polimorfismos envolvidos em sua fisiopatologia, além dos estados inflamatório e oxidativo crônicos (ZAGO; PINTO, 2007; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008; THEIN, 2008; CONRAN et al., 2009).

#### 1.4. Haplótipos $\beta^S$

Os haplótipos são definidos como combinações específicas dos sítios polimórficos em uma única cromátide, para qualquer tipo de cromossomo (ANTONARAKIS et al., 1984). Dessa forma, os haplótipos  $\beta^S$  são definidos como padrões específicos de polimorfismos reconhecidos por enzimas de restrição no *cluster* do gene da  $\beta$ -globina no cromossomo 11 (STUART; NAGEL, 2004). Estas alterações ocorrem aproximadamente a cada cem bases ao longo do genoma e determinam o tipo de variabilidade mais comum no complexo gênico das globinas alfa ou beta (ANTONARAKIS et al., 1984).

A descoberta dos haplótipos do gene  $\beta^S$  apresentou-se como importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como elemento de estudo clínico, podendo fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e de seu nível de gravidade (POWARS, 1991). Cinco haplótipos têm sido associados a diferentes grupos étnicos, de acordo com a região de origem e onde predominam: o haplótipo Benin tem sido associado à África Ocidental; o Bantu ou República Centro Africana (CAR) à África Oriental Centro-Sul; o Senegal (SEN) à África Atlântico Ocidental, o Índia-Arábia Saudita (SAUDI) à Índia e Península Arábica Oriental e, o Camarões (CAM), que é restrito à África, mais especificamente, ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana (Figura 4) (PAGNIER et al., 1984; NAGEL, 1984; SUTTON et al., 1989, LAPOUMÉROULIE et al., 1992).



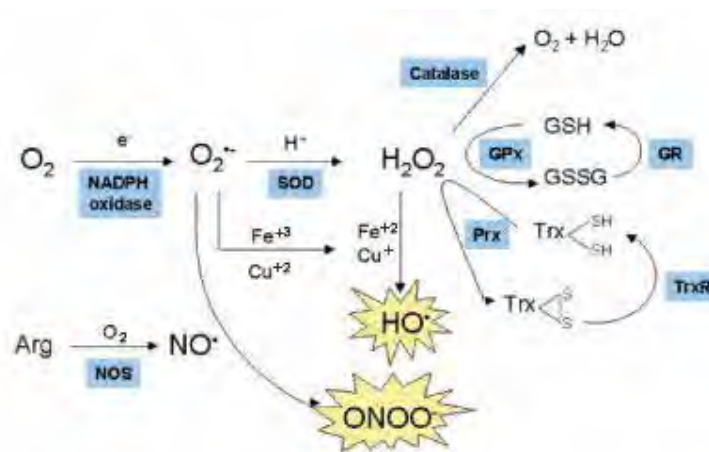
**Figura 4. Distribuição geográfica e representação esquemática de haplótipos  $\beta^S$ .** (A) O mapa identifica três áreas distintas na África e outra na região Árabe-Índiana, onde haplótipos  $\beta^S$  predominam (linhas pontilhadas). As linhas vermelhas representam a incidência da AF. (B) Os haplótipos do *cluster* gênico da  $\beta$ -globina são determinados por sítios polimórficos do DNA (caixas) que são identificados por diferentes enzimas de restrição. Com essas informações, os haplótipos são construídos (modificado de STUART; NAGEL, 2004)

Muitos estudos têm sido realizados para tentar estabelecer relações entre os haplótipos  $\beta^S$  e os diferentes fenótipos na AF. O haplótipo Bantu está associado com curso clínico mais grave e alta incidência de lesões a órgãos, ao contrário do haplótipo Senegal e Árabe-Indiano, vinculados a curso mais brando, enquanto o haplótipo Benin à gravidade clínica intermediária (POWARS, 1991; POWARS; HITI, 1993; PADMOS et al., 1991). A expressão fenotípica diferencial dos portadores de AF que apresentam os haplótipos Árabe-indiano e Senegal está ligada a presença do polimorfismo *XmnI* (-158 C→T) na região promotora do gene  $\gamma$ -globina, que confere maiores níveis de Hb F. No entanto, o mecanismo exato e a extensão dos efeitos dos haplótipos sobre os níveis de Hb F, as características hematológicas e curso clínico da AF, não foram completamente elucidados (NOGUCHI et al., 1993; RAHGOZAR et al., 2000; STEINBERG, 2009; AL-SACLADI et al., 2010).

### 1.5. Estresse Oxidativo na Anemia Falciforme

A produção de ERO, espécies reativas de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano, observada em diversas condições fisiológicas, como na fagocitose de patógenos, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio (FINKEL; HOLBROOK, 2000; SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Os principais meios de defesa antioxidante no organismo podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da GSH, a glutatona peroxidase (GPx), glutatona *S*-transferase, glutatona redutase (GR) e glicose-6-fosfato-dehidrogenase (G6PD). Além da superóxido dismutase (SOD), que promove a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  e oxigênio ( $O_2$ ), bem como a catalase (CAT), que converte o  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e  $O_2$ , impossibilitando a formação do radical  $\cdot OH$ . Há ainda a proteção não enzimática promovida, principalmente, pelas vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol), C (ácido L-ascórbico) e GSH (Figura 5) (NORDBERG; ARNER, 2001; ROVER-JÚNIOR, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



**Figura 5. Esquema simplificado de sistemas oxidativos e antioxidantes.** O metabolismo aeróbico apresenta uma série de reações que podem formar ERO e ERN, como pela ação da enzima NADPH oxidase, presente em diversas células. NOS: óxido nítrico sintase; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutatona peroxidase; Prx: peroxirredoxinas; GR: glutatona redutase; TrxR: tioredoxina redutase; Trx:tioredoxina; GSH: glutaiona reduzida; GSSG: glutatona dissulfeto (modificado de BARBOSA et al., 2006)

O tripeptídeo glutatona é um tiol livre intracelular muito abundante que desempenha papel crítico na regulação de uma variedade de funções celulares, incluindo a desintoxicação de xenobióticos, a síntese de DNA e outros compostos endógenos, modulação da expressão

gênica e regulação do ciclo celular. No entanto, a função mais importante e bem conhecida da GSH é como antioxidante não enzimático (LIU; PRAVIA, 2010).

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com danos consequentes (FINKEL; HOLBROOK, 2000; SCHAFFER; BUETTNER, 2001). Os danos celulares resultam basicamente de ataque de ERO e ERN sobre as macromoléculas, tais como carboidratos (CHOH)<sub>n</sub>, DNA, proteínas e lipídios (VASCONCELOS et al., 2007).

As hemácias estão sujeitas a elevado nível de estresse oxidativo, como resultado da contínua produção do radical  $O_2^{\cdot-}$  que acompanha a auto-oxidação da Hb, e mais ainda na AF que radicais são gerados provenientes da oxidação da Hb S, liberação do ferro heme e diminuição do NO (HEBBEL et al., 1988; WOOD et al., 2008). Dessa forma, a AF caracteriza-se por estresse oxidativo crônico, causando aumento nos níveis de peroxidação lipídica e alterações nos sistemas de defesa antioxidante como nos níveis de GSH e nas atividades das enzimas SOD, CAT e GPx (CHO et al., 2010). No entanto, os poucos estudos que examinaram enzimas antioxidantes em pacientes com AF encontraram resultados contraditórios. Manfredini ET al (2008) mostraram que pacientes com AF tinham atividades significativamente maiores de GPx e SOD do que controles saudáveis, e não houve diferença estatística na atividade da CAT. No entanto Alsultan et al (2010) constataram que os valores médios da atividade da SOD, CAT e GPx foram, significativamente, menores em pacientes com AF em relação ao seu controle.

## 1.6. Glutathione S-Transferase

Glutathione S-transferase (GSTs) constituem enzimas multifuncionais que são codificadas por pelo menos oito *loci* distintos:  $\alpha$  (GSTA),  $\mu$  (GSTM),  $\theta$  (GSTT),  $\pi$  (GSTP),  $\sigma$  (GSTS),  $\kappa$  (GSTK),  $\omega$  (GSTO) e  $\zeta$  (GSTZ), cada qual composta por uma ou mais isoformas homodimérica ou heterodimérica (HAYES; STRANGE, 2000; HAYES et al., 2005). Essas enzimas estão envolvidas nas reações de conjugação da glutathione (GSH) a uma variedade de compostos eletrofílicos, potencialmente, tóxicos e carcinogênicos (RUSHMORE; PICKETT, 1993; HAYES; PULFORD, 1995), além disso, as GSTs exibem atividade peroxidase e podem assim proteger as células danos oxidativos causados pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (RINALDI et al., 2002). Em geral, as reações catalisadas pelas GSTs são consideradas detoxificantes, e, protegem macromoléculas celulares dos danos causados por vários

carcinógenos ambientais encontradas nos alimentos, fumo, ar e medicamentos, compostos endógenos, tais como peroxilipídios, além de inativarem metabólitos secundários formados durante o estresse oxidativo (WIENCKE et al., 1990; GULICK; FAHL, 1995; HIRVONEN, 1995; STRANGE et al., 2001).

A deficiência na atividade dessa enzima pode ser derivada dos polimorfismos em genes que codificam as GSTs, e dentre os vários polimorfismos descritos, *GSTT1* (22q11.23), *GSTM1* (1q13.3) e *GSTP1* (11q13) são os mais estudados. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são altamente polimórficos. Três variantes importantes foram descritas para a classe *GSTM1*: genótipo nulo resultante da deleção completa do gene, e, dois polimorfismos (*GSTM1\*A* e *GSTM1\*B*) que ocorrem devido a mutações pontuais, porém não há diferenças fenotípicas relatadas entre os mesmos (MANNERVIK et al., 1985). A classe *GSTT1* também apresenta uma deleção, gerando genótipo nulo e perda da função enzimática (PEMBLE et al., 1994). Indivíduos com deleção homocigota de ambos os *loci* (*GSTM1* e *GSTT1*) não possuem atividade enzimática funcional das respectivas classes, resultando em deficiência na metabolização de agentes oxidantes (BRUHN et al., 1998; ZHONG et al., 1991; DUSINKÁ et al., 2001; BERNARDINI et al., 2005).

Para o gene *GSTP1*, o polimorfismo mais estudado é o resultante de uma mutação pontual do tipo transversão, no códon 105 (A→G), levando a substituição do aminoácido isoleucina por valina na estrutura protéica (MO et al., 2009). 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).

### **1.7. Manifestações Fenotípicas na Anemia Falciforme**

O curso e apresentação clínica da AF mostram grande variação e são dependentes, além da própria fisiopatologia da doença, da idade dos portadores, da condição sócio-econômica, nutrição, diagnóstico e acompanhamento terapêutico precoce, estresse psicossocial, entre outros fatores (PLATT, 1991; REES et al, 2010)

A manifestação mais comum na AF são as crises de dor, em que a oclusão microvascular episódica ocorre em um ou muitos locais e provoca a dor e a incapacidade. É acompanhada por inflamação local. Tais crises álgicas ocorrem inesperadamente, muitas vezes sem sintomas preliminares e impactam diretamente a qualidade de vida do paciente (SERJEANT et al., 1994; STUART; NAGEL, 2004).

As úlceras de perna podem ser geradas espontaneamente, ou subsequente a trauma, por vezes leve como picada de mosquito, pele ressecada ou pequenas fissuras, e afetam aproximadamente 22% dos pacientes com AF (KOSHY et al., 1989; ECKMAN, 1996; SERJEANT et al., 2005). Enquanto que as osteonecroses do quadril e das articulações do ombro afetam cerca da metade dos pacientes com AF e Hb SC. Seu início é insidioso, mas progressivo, e a maioria dos pacientes com doença na fase inicial irá avançar para o colapso da cabeça femoral dentro de dois anos. Normalmente, apresenta-se com dor ao redor da articulação afetada, às vezes com espasmos nos músculos que a rodeiam (OHENE-FREMPONG; STEINBERG, 2001).

A elevada excreção constante de bilirrubina nas anemias hemolíticas faz com que ocorra a formação frequente de cálculos biliares. A colecistite crônica calculosa é uma complicação frequente da doença falciforme e geralmente requer procedimento cirúrgico – a colecistectomia (HABERKEN et al., 1997; TRAINA; SAAD, 2007). A colelitíase é frequente em indivíduos homozigotos para Hb S (58%) e a prevalência aumenta com a idade (TRAINA; SAAD, 2007).

A síndrome torácica aguda é uma causa frequente de internação, e a principal causa de mortalidade em adultos jovens. É caracterizada pelo aparecimento de um infiltrado pulmonar, sem etiologia definida, febre, dor torácica pleurítica, dor abdominal, tosse e hipóxia. Episódios repetidos predisõem o aparecimento de doenças pulmonares crônicas, incluindo hipertensão pulmonar (PLATT et al., 1994; BALLAS, 1998; STUART; SETTY, 2001).

Hipoesplenismo e autoinfarto esplênico surgem durante os primeiros dois anos de vida e o sequestro esplênico ocorre em 10% a 30% das crianças com AF, geralmente entre as idades de seis meses e três anos, e pode desencadear doença febril (PEARSON et al, 1985; KINNEY et al., 1990).

O priapismo é resultado da vasoclusão dentro dos sinusóides e do corpo cavernoso peniano e, ocorrem em 40% dos homens com AF, podendo ter curta duração ou durar várias horas. Aqueles com duração maior que 24 horas estão associadas ao aparecimento de impotência sexual (HAMRE et al., 1991; NOLAN et al., 2005).

O acidente vascular encefálico é a mais dramática intercorrência na doença falciforme e a segunda maior causa de mortalidade no mundo (SWITZER et al, 2006). Com a utilização do Doppler Transcraniano (DTC) pode-se prever a possibilidade do paciente apresentar um AVE isquêmico e mudar a história natural da doença. O DTC mede a velocidade do fluxo nas artérias cerebrais e, crianças que apresentam medidas acima de 200 cm/s têm 40% de chances

de desenvolver AVE nos próximos três anos (ADAMS et al., 1992; KWIATKOWSKI et al., 2010).

## **1.8. Terapia para Anemia Falciforme**

A gestão clínica da AF necessita de assistência médica coordenada por equipe de hematologia, além de outros serviços médicos e não médicos, pois a fragmentação do atendimento pode ser desastrosa, uma vez que as complicações com risco de vida podem não ser reconhecidas a tempo por profissionais não familiarizados com as nuances da expressão fenotípica da AF (STUART; NAGEL, 2004).

Um protocolo paliativo bastante utilizado nesses pacientes é a suplementação com ácido fólico. O folato participa do metabolismo de purinas e pirimidinas para a síntese de DNA e RNA sendo, assim, importante na formação de hemácias (ANVISA, 2002). Exceto pelo transplante de células tronco hematopoiéticas, as terapias atualmente disponíveis para a AF não são curativas ao ponto de substituir uma eritropoiese falcêmica por uma normal. Por isso, o que tem sido buscado, são alvos terapêuticos que atuam na fisiopatologia da doença minimizando as complicações clínicas dos portadores (BELINI-JUNIOR, 2010).

### ***1.8.1. Terapia transfusional associada à quelação do ferro***

A transfusão de hemácias tem papel bem estabelecido no controle das complicações agudas e crônicas da AF. Esta terapia corrige a anemia, diminui a porcentagem de Hb S e reduz a hemólise, eventos que são de benefício potencial (ECKMAN, 2001). Os resultados obtidos em estudos clínicos mostraram redução do risco de evento isquêmico cerebral, redução do número e intensidade de crises vaso-oclusivas, síndrome torácica aguda e hospitalizações, com conseqüente melhora da qualidade de vida dos pacientes em regime de transfusões regulares de hemácias (MILLER et al., 2001; CANÇADO, 2007).

Pacientes dependentes de transfusão sanguínea estão sujeitos a sobrecarga de ferro e, por esse motivo, o uso de agentes quelantes torna-se indispensável para a sobrevivência. O ferro (Fe) é o metal pesado mais abundante no organismo e é altamente reativo, podendo catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (AUST; MILLER, 1991). Dessa forma, a quelação tem como objetivo prevenir o acúmulo de ferro nos tecidos e os danos resultantes desse acúmulo (CANÇADO, 2007). A desferroxamina pode ser administrada por via parentérica,

embora o quelante oral deferasirox esteja sendo usado cada vez mais e com benefícios evidentes (VICHINSKY et al., 2007).

### ***1.8.2. Terapia Farmacológica com Hidroxiureia***

Muitos medicamentos citotóxicos aumentam a concentração de Hb F, este efeito farmacológico é potencialmente benéfico para os pacientes com AF. A hidroxiureia (HU) foi escolhida dentre os estudos de alvos terapêuticos na AF e, desde 1960, é o fármaco utilizado como tratamento da AF, por causa de sua eficácia por via oral e baixa toxicidade. Outros efeitos benéficos observados incluem o aumento da concentração de Hb, diminuição dos níveis plaquetários, da contagem das células brancas e da expressão de moléculas de adesão, e aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (PLATT et al., 1984; SCHNOG et al., 2004; CARTRON; ELION, 2008; LOU et al., 2009).

Em um ensaio clínico randomizado, observou-se que a HU diminuiu a frequência de episódios dolorosos, STA, a necessidade de transfusão de sangue, e a admissão hospitalar de pacientes com AF, tanto para adultos quanto para crianças (STROUSE et al., 2008; LANZKRON et al., 2008). A HU é bem tolerada, pois seu principal efeito colateral a curto prazo é a mielossupressão dose-dependente; porém, existe a preocupação da possibilidade da HU predispor doença maligna, apesar de haver pouca evidência para apoiar esta hipótese (LANZKRON et al., 2008). Apesar de seus efeitos benéficos, a HU também é considerada um agente citotóxico e carcinogênico. Desta forma, investigações vêm sendo realizadas para avaliar as mutações e outros danos causados ao DNA somático (BUCHANAN et al., 2004).

A importância epidemiológica da AF, seus processos fisiopatológicos complexos e diversificados que dificultam seu tratamento e desencadeiam manifestações clínicas variadas fundamentam a importância de estudos que objetivem a caracterização molecular da homozigose para Hb S, bem como dos haplótipos  $\beta^S$  e sua associação com outros polimorfismos e marcadores bioquímicos vinculados a fisiopatologia da doença para o melhor entendimento da sua diversidade fenotípica, e avaliação da resposta individual aos tratamentos da AF.



*Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Analisar, em homocigotos para Hb S, marcadores da capacidade antioxidante e estresse oxidativo correlacionando-os com os polimorfismos da glutathione *S*-transferase, haplótipos do grupamento beta e uso de medicação específica, comparados a um grupo controle. Com essas análises pretendemos entender os aspectos genéticos, bioquímicos e ambientais que conduzem à resposta específica ao tratamento da anemia falciforme.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos haplótipos do grupamento beta no perfil molecular dos pacientes, e, correlacioná-los com as respostas terapêuticas;
- Avaliar a frequência dos polimorfismos da GST – *GSTP1*, *GSTM1* e *GSTT1*, no grupo controle e portadores da anemia falciforme, e, a influência da coerância com hemoglobina S;
- Avaliar o estresse oxidativo, em cada grupo, por meio da peroxidação lipídica (TBARS) e a capacidade antioxidante por meio da ação dos antioxidantes enzimáticos (Catalase e GST) e dos não enzimáticos (TEAC e GSH), e, sua relação com a fisiopatologia e resposta terapêutica;
- Verificar a influência da idade e do gênero sobre os parâmetros bioquímicos avaliados;
- Verificar a associação dos marcadores genéticos e bioquímicos na expressão fenotípica da anemia falciforme.

## *Material e Métodos*

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Casuística

O grupo amostral constituiu-se de 76 indivíduos (30 homens e 46 mulheres, com média de idade: 23,8 anos; variação: 9-65 anos), provenientes da região sudeste do Brasil. O grupo teste foi composto por 28 pacientes com anemia falciforme (11 homens e 17 mulheres, com média e desvio de idade:  $27,7 \pm 14,8$  anos) em acompanhamento clínico nos hemocentros de São José do Rio Preto (SP) ou do Rio de Janeiro (RJ). O grupo controle foi composto por 48 indivíduos sem hemoglobinopatias, destes 19 homens e 29 mulheres, com média e desvio de idade de  $21,9 \pm 4,2$  anos.

Todas as amostras de sangue (11 mL) foram coletadas por meio de punção venosa em tubos com heparina ou com EDTA a 5%, após consentimento informado, conforme normas da Resolução CNS 196/96. O sangue heparinizado (7 mL) foi incubado por 20 minutos a 37°C e então centrifugado a 1500 rpm por 20 minutos para separar o plasma, para as análises de peroxidação lipídica (TBARS) e capacidade antioxidante total (TEAC). Em seguida, alíquotas de plasma foram congeladas a -80°C até o momento das análises. A fração de amostra colhida em EDTA (4 mL) foi alíquotada, tendo sido 2 mL utilizados para os testes de hemoglobinopatias, determinação genotípica e análise das atividades enzimáticas da catalase e glutathione *S*-transferase. Os outros 2 mL foram submetidos à centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma e, em seguida, foram congeladas a -80°C para determinação da concentração de GSH.

Todos os pacientes foram selecionados por meio de entrevista e aplicação de questionário, obedecendo a critérios de inclusão e exclusão. Foram excluídos os fumantes, consumidores de álcool, ou que haviam sofrido AVE nos últimos dois meses. O questionário incluía informações sobre número de crises de dor, crises hemolíticas, e se receberam transfusão de sangue nos últimos dois meses. Os indivíduos sob uso de medicamentos conhecidos por afetar os parâmetros analisados como, por exemplo, uso de quelantes de ferro foram excluídos do estudo. As informações sobre medicação em uso, exposição a interferentes ambientais, eventos clínicos e transfusões sanguíneas, foram confirmadas por meio de consulta aos prontuários médicos, ao banco de dados dos hemocentros além da aplicação de questionários no momento da coleta.

Todos os pacientes estavam sob uso de ácido fólico, porém foram separados em dois grupos, de acordo com o tratamento específico: pacientes em uso de HU ( n=13) e não tratados com HU ( n=15).

### 3.2. Considerações Éticas

O presente projeto foi registrado sob o nº 0015.0.229.000-09 CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) e 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 072/09 e, obedecendo aos princípios estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

### 3.3. Metodologia

#### 3.3.1. Genotipagem e fenotipagem hemoglobínica e caracterização dos haplótipos $\beta^S$

A triagem clássica das hemoglobinopatias foi realizada para investigação das Hb normais e presença da Hb S, e, respectiva formação do grupo controle e confirmação molecular e identificação dos haplótipos do grupamento beta globina, pelos métodos a seguir:

#### **Preparação do hemolisado:**

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos as células foram rompidas para a obtenção da solução de Hb, utilizando:

- Hemolisado Rápido - com saponina (NAOUM, 1990).

Reativo hemolisante:

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| - Saponina P.A.         | 1 g    |
| - Água destilada q.s.p. | 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.

**Resistência globular osmótica eritrocitária em solução de NaCl a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)***Princípio:*

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

## Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

- NaCl	9,0 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,36 g
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,28 g
- Água destilada	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 (BONINI-DOMINGOS, 2006)**

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

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

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

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

*Reagentes:*

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

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

Conservado em geladeira

Corante Ponceau

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

*Solução descorante:*

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

*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 de hemoglobinas em pH ácido (VELLA, 1968)***Princípio:*

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

*Reagentes:*

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

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

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 polimerizaram a 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 ou coradas com Ponceau.

### **Cromatografia líquida de alta performance (BONINI-DOMINGOS, 2006)**

*Princípio:*

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

*Procedimento:*

Para o Kit Beta Talassemia Heterozigota:

Em um tubo de 1,5 mL, fornecido pelo fabricante, foram misturados 5 µL de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise. Após a hemólise total, as

amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento para realização dos procedimentos de leitura e análise das frações.

*Interpretação:*

A quantificação das diferentes frações de Hb em uma amostra foi realizada a partir dos valores percentuais e de tempo de retenção fornecidos pela calibração específica, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Aos valores de Hb A<sub>0</sub> 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 A<sub>2</sub> considerados normais foram de 2,5 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

**Extração do DNA (PENA et al., 1991 com modificações)**

*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 0,32 M	10,95 g
- Tris HCl 10 mM	1 mL
- MgCl <sub>2</sub> 5 mM	0,5 mL
- Triton 1% 100x	1 mL
- Água ultra-pura 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 ultra-pura q.s.p.	500 mL
  
3. Proteinase K (20 mg/mL)

- Proteinase K	20 mg
----------------	-------

- Água ultra-pura 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 450 µL de solução de lise 2; 25 µL 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 500 µL 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 500 µL 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 50 µL de solução de KCl 2M gelada e acrescentado 500 µL 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 200 µL etanol 70% (gelado), para iniciar a hidratação, o sobrenadante, após centrifugação, foi desprezado. Após a evaporação do etanol, o DNA foi solubilizado com 50 µL de água ultra pura e conservado em freezer – 20°C.

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

A detecção da mutação foi realizada por PCR seguido de análise de restrição. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação que envolve o códon 6 foram: o

oligonucleotídeo iniciador P 277 (*sense*): 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e o oligonucleotídeo iniciador P 278 (*antisense*): 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'.

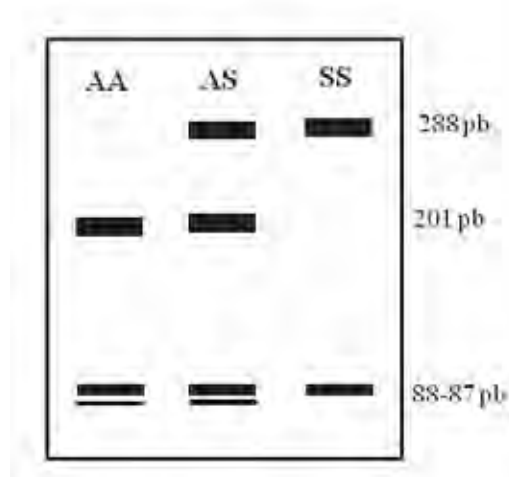
*Mistura de Reação*

H <sub>2</sub> O	13,0 µL
Tampão sem MgCl <sub>2</sub>	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3,0 µL
Oligonucleotídeo iniciador (10,0 µM)	1,0 µL
dNTP (1,25 mM cada)	1,0 µL
<i>Taq</i> Polimerase (1U)	1,5 µL
DNA (100 ng/µL)	2,0 µL
Volume Final da reação	25 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; na solução de reação continha 13,1 µL de H<sub>2</sub>O, 1,0 µL 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 (Figura 6).

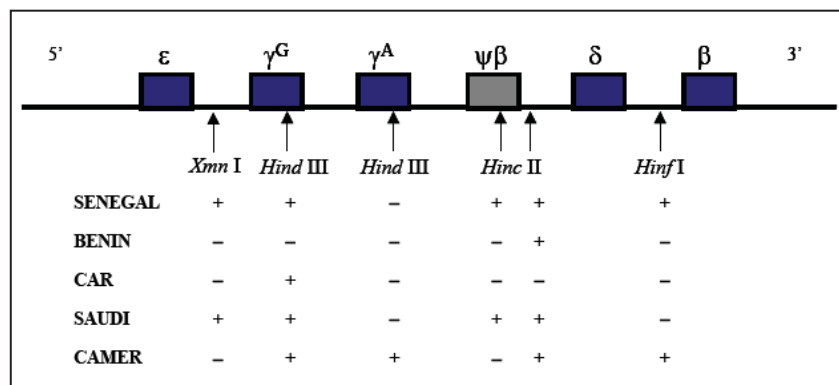
A digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.



**Figura 6.** Representação esquemática dos possíveis produtos de restrição da PCR-RFLP para HbS. AA: homozigoto selvagem; AS: heterozigoto para Hb S; SS: homozigoto para Hb S; pb = pares de bases.

### Análise dos Haplótipos $\beta^S$ (SUTTON et al., 1989)

A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR – RFLP, por meio da análise de seis sítios polimórficos, e a classificação segundo Sutton et al (1989) (Figura 7).



**Figura 7.** Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos  $\beta^S$  (Sutton et al., 1989).

As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores para análise dos polimorfismos do *cluster*  $\beta$  estão listadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões do *cluster*  $\beta$ .**

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5' – 3')	Direção	Região
H0	AACTGTTGCTTTATAGGATTTT	→	5' $\gamma^G$
H1	AGGAGCTTATTGATAACTCAGAC	←	
H2	AAGTGTGGAGTGTGCACATGA	←	$\gamma^G$
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	
H3	TGCTGCTAATGCTTCATTACAA	→	$\gamma^A$
H4	TAAATGAGGAGCATGCACACAC	←	
H5	GAACAGAAGTTGAGATAGAGA	→	$\psi\beta$
H6	ACTCAGTGGTCTTGTGGGCT	←	
H7	TCTGCATTTGACTCTGTTAGC	→	3' $\psi\beta$
H8	GGACCCTAACTGATATAACTA	←	
H9	CTACGCTGACCTCATAAATG	→	5' $\beta$
H10	CTAATCTGCAAGAGTGTCT	←	

→: sense ; ← anti-sense

Os reagentes, a concentração utilizada para a montagem da solução de reação e as condições de amplificação estão representadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

**Tabela 2. Composição das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina  $\beta$ .**

Componentes	Volumes ( $\mu$ L)			
	<i>Xmn</i> I 5' $\gamma^G$	<i>Hind</i> III $\gamma^G$ e $\gamma^A$	<i>Hinc</i> II $\Psi\beta$ e 3' $\psi\beta$	<i>Hinf</i> I 5' $\beta$
Tampão (10X)	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,25	1,0	1,0	1,25
dNTP's (2 mM)	2,5	-	-	2,5
dNTP's (10 mM)	-	0,75	0,75	-
Oligonucleotídeo iniciador 5' (10 $\mu$ M)	-	0,5	0,5	0,5
Oligonucleotídeo iniciador 3' (10 $\mu$ M)	-	0,5	0,5	0,5
Oligonucleotídeo iniciador 5' (25 $\mu$ M)	0,25	-	-	-
Oligonucleotídeo iniciador 3' (25 $\mu$ M)	0,25	-	-	-
<i>Taq</i> Polimerase (5U/ $\mu$ L)	0,125	0,25	0,25	0,125
DNA (200 ng)	1,0	1,0	1,0	1,0
H <sub>2</sub> O	17,125	18,5	18,5	16,625
<b>Volume Final (<math>\mu</math>l)</b>	<b>25,0</b>	<b>25,0</b>	<b>25,0</b>	<b>25,0</b>

**Tabela 3.** Condições das reações utilizadas para amplificação das regiões polimórficas do *cluster* da globina  $\beta$ .

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

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

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

**Tabela 4.** Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases de restrição.

Oligonucleotídeo iniciador	Enzima	Região	Tamanho do fragmento amplificado	Tamanho dos fragmentos após a clivagem
H0 e H1	<i>Xmn</i> I	5' $\gamma^G$	657 pb	450 pb + 200 pb
H2 e H3	<i>Hind</i> III	$\gamma^G$	780 pb	430 pb + 340 pb + 10 pb
H3 e H4	<i>Hind</i> III	$\gamma^A$	760 pb	400 pb + 360 pb
H5 e H6	<i>Hinc</i> II	$\Psi\beta$	701 pb	360 pb + 340 pb + 1 pb
H7 e H8	<i>Hinc</i> II	3' $\Psi\beta$	590 p b	470 pb + 120 pb
H9 e H10	<i>Hinf</i> I	5' $\beta$	380 pb	240 pb + 140 pb

De acordo com perfil de restrição para as regiões polimórficas do *cluster* da  $\beta$ -globina, é possível definir os haplótipos  $\beta^S$ .

### 3.3.2. Análise molecular para a investigação dos polimorfismos da glutathiona S-transferase

O DNA genômico, previamente obtido pela técnica do fenol/clorofórmio segundo Pena et al (1991), foi utilizado para a análise dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*.

### Avaliação dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* por PCR multiplex (ABDEL-RAHMAN et al., 1996).

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

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

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

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

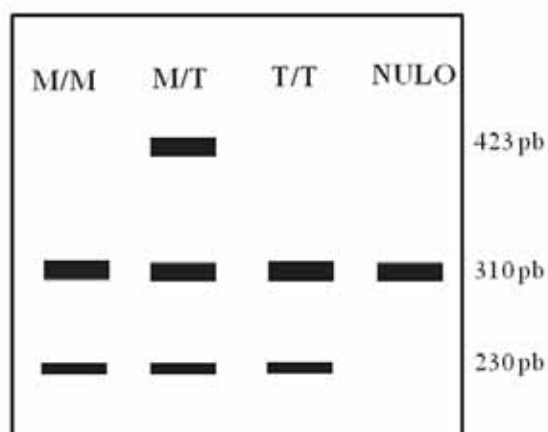
*GSTM1* – 5' – GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C – 3' (*sense*)

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

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

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

O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por quatro minutos, acrescida de 40 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 100V por 30 minutos e evidenciados com brometo de etídio sob luz UV (Figura 8).



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



### Avaliação do polimorfismo *GSTP1* por PCR-RFLP (NOCK et al, 2009).

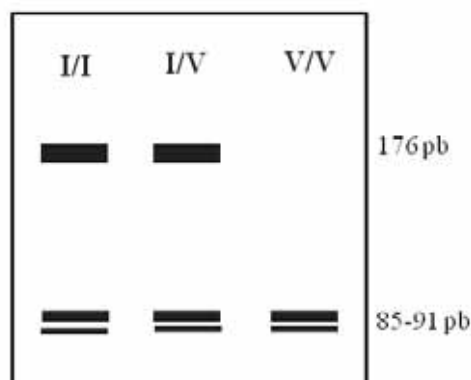
Para a amplificação do segmento que codifica o polimorfismo do gene *GSTP1* foram utilizados os seguintes iniciadores:

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

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

O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por quatro minutos, acrescida de 40 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 10 minutos.

O produto de amplificação da PCR foi submetido à enzima de restrição *BsmI*, isômero da enzima *Alw 26I* (5U) (New England BioLabs). O produto da amplificação após o adicionamento da enzima é colocado em banho maria à 37°C, por 4 horas, para clivagem das sequências em regiões específicas. Após digestão, o alelo normal gera um fragmento de 176 pb e o alelo mutante gera dois fragmentos, um de 91 pb e outro 85 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 3,5% sob corrente constante de 80 V por 45 minutos e evidenciados com brometo de etídio sob luz UV (Figura 9).



**Figura 9.** Representação esquemática dos produtos da PCR - RFLP para *GSTP1*. I/I= presença dos alelos isoleucina (homozigoto selvagem); I/V= presença do alelo isoleucina e alelo valina (heterozigoto); V/V= presença dos alelos valina (homozigoto mutante).

#### 3.3.3. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante

Para minimizar as variáveis que influenciam os marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante, as amostras de plasma foram obtidas imediatamente após a coleta do sangue total e, em seguida, congeladas à -80°C até o momento das análises. Enquanto, as

atividades enzimáticas da GST e catalase foram medidas no mesmo dia da coleta das amostras de sangue total.

**Dosagem de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) (UCHIYAMA; MIHARA, 1978).**

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

*Reagentes:*

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

*Preparo do Plasma*

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

*Procedimentos:*

*Preparo final dos controles e amostras*

- O TBA foi preparado no mesmo dia da leitura.
- Foi separado 2 tubos de ensaio para cada amostras (ensaio em duplicata)
- Pipetou-se 1 mL do reagente TBA para cada tubo
- Os tubos de número 1 receberam 500 µL de Água destilada – controle branco, e os tubos de número 2 receberam 500 µL de solução padrão TBARS – controle padrão TBA.
- A partir dos tubos de número 3 foram adicionadas 500 uL das amostras a serem

analisadas

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

vórtex

- Centrifugou-se os tubos 2500 rpm durante 10 minutos

#### *Leitura em Espectrofotômetro*

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

#### *Cálculo do valor de TBARS da amostra*

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

TBARS = A média x F, no qual:

$$A \text{ média} = (A1+A2)/2$$

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

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

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

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

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

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

O método tem como objetivo dosar substâncias antioxidantes hidro- e lipossolúveis em amostras biológicas. O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência ao potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-

carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. É uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), produzindo diretamente o radical cátion  $ABTS^{\bullet+}$ , cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815 nm.

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

Os resultados finais foram expressos em milimolar (mM) correspondente a concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente à da amostra que foi estudada, padrão de medida este denominado TEAC (*Trolox Equivalente Antioxidant Capacity*).

*Reagentes:*

PBS pH 7.2

Solução Salina Isotônica com pH 7,2 foi usada como solvente no preparo de reagentes e diluição de amostras.

$Na_2HPO_4$ (Fosfato de Sódio Dibásico)	1,48g
$NaH_2PO_4$ (Fosfato de Sódio Monobásico)	0,43g
NaCl	7,0g
$H_2O$ destilada q.s.p.	1 litro
Ajustar o pH para 7,2	

Solução de estoque  $ABTS^{\bullet+}$

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

A solução de estoque  $ABTS^{\bullet+}$  foi preparada de 12 a 16h antes das dosagens. Misturou-se uma solução do sal diamônio ABTS a 7 mM com uma solução de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$  – Sigma-Aldrich P5592) cuja concentração final foi de 2,45 mM.

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

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

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

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

(B)  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  140 mM: 0,7560g ----- 20 mL de PBS

▪ Retirar com pipeta automática 352 $\mu\text{L}$  da solução (A) e misturar a esta 352 $\mu\text{L}$  da solução (B):

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

\* pipetar 176  $\mu\text{L}$  + 176  $\mu\text{L}$

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

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

#### Solução de Trabalho de ABTS<sup>•+</sup>

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

A expectativa é diluir 2289  $\mu\text{L}$  da solução de estoque ABTS em 200 mL de PBS.

- Calibrar espectrofotômetro na leitura de 734 nm, zerando com PBS.
- Preparar Erlenmeyer com 200 mL de PBS.
- Começar com 1800  $\mu\text{L}$  da solução de estoque ABTS, misturar ao PBS, homogenizar e ler o espectro. Subir ou diluir até atingir valor de leitura de  $0.7 \pm 0.02$  a 30°C, ou seja, de 0,680 a 0,720.

Atingido esse valor está pronta a solução de trabalho ABTS<sup>•+</sup>

#### Solução de estoque de TROLOX (2.5 mM)

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

- Cálculo base: 0,647g de TROLOX (Aldrich 23,881-3) em 1L de PBS. S.

- Logo, para 200 mL – 0,1294g de Trolox  
para 100 mL – 0,0647g de Trolox
- Esta solução é estável por uma semana quando estocada a 4°C ou 6 meses se estocada a -20°C.

#### Preparo do plasma

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

#### Dosagem

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

#### Leitura

- Em uma cubeta colocar com pipeta automática 2970 µL da solução de trabalho ABTS<sup>+</sup> outrora preparada. Realizar leitura da absorbância a 734 nm e anotar o valor (correspondente a T0).
- Retirar a cubeta e imediatamente acrescentar 30 µL da solução de trolox acionando neste exato momento o cronômetro.
- Homogenizar a mistura manualmente por 20 segundos e reiniciar leitura (734nm) anotando o valor após exatos 5 minutos (corresponderá a T5).
- Repetir o procedimento para cada solução de trolox (tubos de A-F).

- Fazer em triplicata anotando os resultados na tabela do protocolo curva padrão da atividade antioxidante do trolox. Aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.

- Fazer o mesmo procedimento com as amostras biológicas a serem estudadas. Fazer também um controle branco (com 30 µL de PBS) e um padrão (com 30µL de Trolox 1mM – feito conforme tubo D no quadro 1). Realizar a dosagem das mesmas em duplicatas anotando os valores referentes de T0 e T5 na tabela do protocolo de dosagem da capacidade antioxidante total em equivalência ao trolox. Aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.

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

Cálculo dos resultados

- Definir o Valor Médio da absorbância em T5 conforme descrito no item anterior.

- Calcular a Atividade Antioxidante Total (TAA) de cada amostra usando a seguinte fórmula:

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

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

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

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

#### **Avaliação da atividade enzimática da GST (KEEN et al., 1976)**

As amostras de sangue foram diluídas a 20 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 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 1 mM de GSH ( $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), e o aumento de absorvância foi acompanhado a 340 nm.



### *Preparo das amostras*

#### Solução Salina 0,9%

NaCl (Cloreto de Sódio)	9,0 g
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O ultra pura	1 litro

- 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.
- Repetir o processo anterior três vezes;
- Coletar 50 µL do precipitado (papa de eritrócitos lavados final), e acrescentar 950 µL de solução hemolisante;
- Manter por 15min a -18°C;
- Centrifugar por 15 min a 3500rpm;
- Separar o sobrenadante (hemolisado) para as análises.

### *Preparo do tampão fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5)*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato de Potássio Monobásico)	13,605 g
K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fosfato de Potássio Dibásico)	17,42 g
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	1 litro
Ajustar o pH para 6,5.	



*Análise*Referência

1mL de Solução tampão Fosfato de Potássio

Hidrólise espontânea

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

Ensaio Enzimático

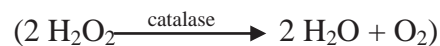
Solução tampão Fosfato de Potássio	930µL
GSH 100mM	10µL
CDNB 100mM	10µL
Amostra (hemolisado)	50µL

A atividade da GST total foi calculada de acordo com a fórmula abaixo, e, expressa em U/mL de hemolisado:

$$\left[ \frac{\text{Absorbância/minuto}}{9,6} \right] \times \text{diluição} \\ \left[ \frac{\quad}{\text{Volume da amostra}} \right]$$

**Avaliação enzimática da catalase (BEUTLER, 1975)**

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 absorbância em 240 nm, a 30° C ( $\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

*Preparo das amostras*

- 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 H<sub>2</sub>O 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 <sub>2</sub> O destilada	250 mL
Ajustar o pH para 8,0 com HCl.	

*Análise*Referência

1 mL de H<sub>2</sub>O Ultra Pura

Meio de Reação (10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

- Adicionar 250 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em 25mL de H<sub>2</sub>O Ultra Pura;
- Descartar uma aliquota de 2,5 mL;
- Adicionar 1,25mL do Tampão Tris-HCl.EDTA e 1,25mL de H<sub>2</sub>O Ultra Pura

Ensaio Enzimático

Meio de reação	990 µL
Amostra (hemolisado)	10 µL

A atividade da catalase foi calculada de acordo com a fórmula abaixo, e, expressa em U/mL de hemolisado

$$\left[ \frac{\text{Absorbância/minuto}}{0,071} \right] \times \text{diluição} \\ \left[ \frac{\text{Absorbância/minuto}}{\text{Volume da amostra}} \right] \times \text{diluição}$$

**Dosagem de glutationa reduzida (RODRÍGUEZ-ARIZA et al., 1994)**

A cromatografia é um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma móvel, geralmente de grande área, que percola através de um fluído insolúvel, a fase estacionária.

*Preparo da amostra:*

- A GSH foi extraída das amostras de plasma colhidas em EDTA por adição de ácido perclórico (10% de concentração final). Após agitação vigorosa e 10 minutos no gelo,

a mistura foi centrifugada a 8000 rpm por 10 min a 4 ° C. O extrato foi filtrado em unidades filtradoras Millex (0,22 mm) acopladas a seringa de insulina sem agulha e injetado diretamente no sistema de HPLC.

*Preparo da Fase Móvel:*

Preparo de 1 L de solução de Fosfato de Sódio Monobásico (50mM, pH = 2,5), Ácido Octanosulfônico (0,25 mM) e Acetonitrila (2%, v/v).

- Fosfato de Sódio Monobásico ..... 5,999 g
- Ácido Octanosulfônico ..... 0,054 g
- H<sub>2</sub>O Ultra pura ..... 1,0 L
- Agitar até total dissolução.
- Ajustar o pH da solução em 2,5 utilizando Ácido Orto-Fosfórico concentrado (85%).
- Filtrar a solução a vácuo.
- Colocar 980 mL da solução em uma proveta e 20 mL de Acetonitrila.
- Agitar até total mistura.

*Preparo da curva de calibração:*

Solução estoque de 10 mg/mL:

- Glutathione Reduzida (GSH) ..... 10 mg
- Diluir em 1 mL de Solução da Fase Móvel.
- Retirar uma alíquota de 100 µL da solução preparada acima e adicionar 900 µL de Solução da Fase Móvel.
- Retirar uma alíquota 10 µL da nova solução e adicionar 990 µL de Fase Móvel, obtendo Solução Estoque de 10 µg/mL.
- Diluir a Solução Estoque com Solução da Fase Móvel seguindo a tabela 2:

**Tabela 5. Diluição da Solução Estoque para construção da curva padrão de GSH.**

Concentração da injeção ( $\eta\text{g}/20\mu\text{L}$ )	Volume de Solução Estoque ( $\mu\text{L}$ )	Volume Solução Fase Móvel ( $\mu\text{L}$ )
2	10	990
5	10	390
10	10	190
30	30	170
50	50	150
100	100	100

**Análise:**

A concentração de GSH foi determinada por HPLC acoplado a um detector eletroquímico coulométrico (Coulchem III ESA, Bedford, MA), associado a uma célula condicionada Modelo 5021 mantida em um potencial de + 900 mV e uma célula dual analítica Modelo 5011 fixada em 300 mV (primeira célula) e em 650 mV (segunda célula).

As amostras foram separados em uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) a um fluxo isocrático de 0,9 mL.min<sup>-1</sup> e a identificação e quantificação do pico de GSH foi realizada por meio do software EasyChrom (Agilent Technologies). Com estas condições, a GSH, claramente, eluiu-se em cerca de seis minutos. A concentração de GSH foi expressa em  $\mu\text{M}$  e foi quantificada com base em uma curva padrão previamente injetada no aparelho com concentrações conhecidas de GSH, descritas acima.

**3.3.4. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico Statistica 9.0 (Statsoft Inc.). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e foram testados para distribuição normal utilizando o teste Shapiro-Wilk. Os dados também foram testados para homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene.

A verificação da influência da idade e gênero sobre os valores dos marcadores do estresse oxidativo foi realizada por meio da classificação de duas faixas etárias ( $\leq 20$  e  $> 20$  anos) e aplicação do teste ANOVA Fatorial.

As médias entre os grupos foram comparados pelo teste t ou ANOVA seguida do teste *post hoc* de Tukey para dados paramétricos, e o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis

seguido pelo teste *post hoc* de Dunn para dados não-paramétricos. Para avaliar o grau de associação entre as variáveis estudadas, utilizou-se a correlação de Pearson para dados paramétricos, e de Spearman para dados não-paramétricos, e regressão linear. Para comparar os genótipos da GST entre os grupos estudados foi utilizado o teste  $\chi^2$  de Pearson, complementado pelo teste exato de Fisher. O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

*Resultados*

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Perfil hemoglobínico, dos haplótipos $\beta^S$ e fenotípico dos pacientes.

Para caracterizar os grupos de estudo, traçamos o perfil hemoglobínico para a exclusão de possíveis portadores alterações hemoglobínicas no grupo controle. A tabela 6 mostra detalhadamente os valores das frações hemoglobínicas dos grupos estudados, e, observa-se que todos os parâmetros hemoglobínicos foram significativamente diferentes entre os grupos, conforme o esperado.

**Tabela 6. Valores das frações hemoglobínicas nos grupos estudados.**

	GC (n = 48)	AF (+HU) (n = 13)	AF (-HU) (n = 15)
<b>Hb A (%)</b> *	94,88 ± 2,12 <sup>a</sup>	12,58 ± 16,39 <sup>b</sup>	8,06 ± 14,2 <sup>b</sup>
<b>Hb A<sub>2</sub> (%)</b> *	2,75 ± 0,39 <sup>a</sup>	3,99 ± 0,66 <sup>b</sup>	3,75 ± 1,02 <sup>b</sup>
<b>Hb F (%)</b> *	1,08 ± 1,13 <sup>a</sup>	10,93 ± 7,07 <sup>b</sup>	6,16 ± 4,54 <sup>b</sup>
<b>Hb S (%)</b> <sup>#</sup>	0,0	70,40 ± 16,07 <sup>a</sup>	80,39 ± 16,08 <sup>b</sup>

GC: grupo controle; AF (+HU): pacientes tratados com HU; AF (-HU): pacientes não tratados com HU.

\*Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn,  $p < 0,05$ )

<sup>#</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística (teste de Mann-Whitney,  $p < 0,05$ )

Por meio da análise dos haplótipos  $\beta^S$  foram encontrados nove diferentes combinações de sítios de restrição, resultando nas seguintes combinações específicas: Bantu, Benin, Camarões e três atípicos. Os padrões atípicos foram classificados pelos números 1, 2 e 3, pois não se enquadram em nenhuma das classificações anteriormente relatadas na literatura (Tabela 7).

**Tabela 7. Caracterização dos alelos atípicos dos haplótipos  $\beta^S$ .**

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

A distribuição genotípica dos haplótipos  $\beta^S/\beta^S$ , por localidade, está representada na Tabela 8. Foram identificados oito (28,5%) Bantu/Bantu, 10 (35,7%) Bantu/Benin, dois

(7,1%) Benin/Benin, um (3,6%) Benin/Camarões, um (3,6%) Bantu/Atípico 1, um (3,6%) Benin/Atípico 1, um (3,6%) Benin/Atípico 2, um (3,6%) Benin/Atípico 3 e três (10,7%) Atípico 2/Atípico 2.

Do total de 56 cromossomos analisados foram identificados 27 (48,2%) alelos Bantu, 18 (32,1%) Benin, um (1,8%) Camarões e 10 (19,7%) Atípicos, destes, dois (3,6%) Atípico 1, sete (12,5%) Atípico 2 e um (1,8%) Atípico 3 (Tabela 9).

**Tabela 8. Distribuição genotípica dos haplótipos  $\beta^S/\beta^S$  por localidade**

Haplótipos	Frequência genotípica		
	São José do Rio Preto – SP n (%)	Rio de Janeiro – RJ n (%)	TOTAL n (%)
Bantu/Bantu	7 (36,8)	1 (11,1)	8 (28,5)
Bantu/Benin	6 (31,6)	4 (44,4)	10 (35,7)
Benin/Benin	1 (5,3)	1 (11,1)	2 (7,1)
Benin/Camar	1 (5,3)	----	1 (3,6)
Bantu/Atp1	1 (5,3)	----	1 (3,6)
Benin/Atp1	----	1 (11,1)	1 (3,6)
Benin/Atp2	1 (5,3)	----	1 (3,6)
Benin/Atp3	----	1 (11,1)	1 (3,6)
Atp2/Atp2	2 (10,5)	1 (11,1)	3 (10,7)
<b>TOTAL</b>	<b>19 (100,0)</b>	<b>9 (100,0)</b>	<b>28 (100,0)</b>

Atp: Atípico; Camar: Camarões. Atp 1, 2 e 3: haplótipos atípicos com diferentes diferentes padrões de digestão.

**Tabela 9. Distribuição alélica dos haplótipos encontrados.**

Haplótipos $\beta^S$	Frequência alélica n (%)
Bantu	27 (48,2)
Benin	18 (32,1)
Camar	1 (1,8)
Atp1	2 (3,6)
Atp2	7 (12,5)
Atp3	1 (3,6)
<b>TOTAL</b>	<b>56 (100,0%)</b>

Atp: Atípico; Camar: Camarões. Atp 1, 2 e 3: haplótipos atípicos com diferentes padrões de digestão.

A última etapa desta fase do estudo consistiu na coleta de informações sobre a incidência das complicações clínicas característica da AF, por meio de avaliação de prontuários, sob a supervisão dos clínicos responsáveis. Porém, obtivemos acesso apenas aos prontuários dos pacientes em acompanhamento no Hemocentro de São José do Rio Preto –



SP, compondo um número amostral de 19 pacientes. Este número amostral impossibilitou análises de associação com os demais parâmetros avaliados, dessa forma, a tabela 10 mostra a descrição dos dados obtidos.

**Tabela 10. Incidência de eventos clínicos da AF nos pacientes de São José do Rio Preto.**

Eventos Clínicos	n=19
	0 – 2*
<b>Crises de dor</b>	6 (31,6%)
	3 - 5*
	3 (15,8%)
	≥ 6*
	10 (52,6%)
<b>Úlceras</b>	7 (36,8%)
<b>Osteonecrose</b>	2 (10,5%)
<b>Priapismo<sup>#</sup></b>	1 (12,5%)
<b>Colecistocolitíase</b>	10 (52,6%)
<b>Esplenomegalia</b>	4 (21,0%)
<b>AVE</b>	3 (15,8%)
<b>STA</b>	6 (31,6%)

\*número de crises/ano nos últimos 3 anos.

<sup>#</sup>porcentagem calculada entre os indivíduos do sexo masculino (n = 08).

AVE: Acidente Vascular Encefálico.

STA: Síndrome Torácica Aguda.

#### **4.2. Frequência dos polimorfismos da glutathiona S-transferase - *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1***

A frequência da nulidade do gene *GSTT1* foi estatisticamente maior no grupo controle (GC) (56,3%) em relação ao grupo de pacientes (21,6%) ( $p = 0,01$ ). Para o *GSTM1*, observamos frequência de 43,7% para o GC e 67,8% para o grupo de pacientes ( $p = 0,04$ ). Ao compararmos a frequência da nulidade para ambos os genes (*GSTM1* e *GSTT1*), não obtivemos diferença significativa entre os grupos controle e pacientes, 16,7% e 17,9% ( $p = 0,89$ ), respectivamente, conforme demonstrado na tabela 11.

Para o polimorfismo *GSTP1* obtivemos menor frequência do alelo mutante V no GC (16,67%) em relação aos portadores de AF (53,57%) ( $p < 0,01$ ), e, conseqüentemente, do genótipo homozigoto mutante V/V (4,2% e 25,0%, respectivamente) ( $p < 0,01$ ). A tabela 12 mostra detalhadamente os resultados obtidos para este polimorfismo.

**Tabela 11. Frequências alélica e genotípica dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos controle e pacientes.**

	Grupo controle n (%)	Pacientes com AF n (%)	Valor de p*
<b><i>GSTM1</i></b>			
[+]	21 (43,7)	20 (71,4)	<b>0,0195</b>
[-]	27 (56,3)	8 (21,6)	
<b><i>GSTT1</i></b>			
[+]	27 (56,3)	9 (32,2)	<b>0,0423</b>
[-]	21 (43,7)	19 (67,8)	
<b><i>GSTM1/T1</i></b>			
M/M	13 (27,0)	14 (50,0)	<b>0,0440</b>
M/T	8 (16,7)	6 (21,4)	0,6054
T/T	19 (39,6)	3 (10,7)	<b>0,0074</b>
NULO	8 (16,7)	5 (17,9)	0,8994

[+] genótipos selvagens, [-] genótipos nulos; M/M: presença do alelo para *GSTM1* e ausência do alelo para *GSTT1*; M/T: presença do alelo para *GSTM1* e *GSTT1*; T/T: presença do alelo para *GSTT1* e ausência de alelo para *GSTM1*; NULO: ausência dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*.

\*As comparações foram feitas pelo teste de  $\chi^2$  de Pearson complementadas pelo exato de Fisher. **Negrito:** indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12. Frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *GSTP1* nos grupos controle e pacientes.**

<i>GSTP1</i>	Grupo controle n (%)	Pacientes com AF n (%)	Valor de p*
<b>Alelos</b>			
<i>I</i>	80 (83,33)	26 (46,43)	<b>0,0001</b>
<i>V</i>	16 (16,67)	30 (53,57)	<b>0,0001</b>
<b>Genótipos</b>			
<i>II</i>	34 (70,8)	5 (17,9)	<b>0,0001</b>
<i>IV</i>	12 (25,0)	16 (57,1)	<b>0,0050</b>
<i>VV</i>	2 (4,2)	7 (25,0)	<b>0,0066</b>

*II* = homozigoto selvagem; *IV* = heterozigoto; *VV* = homozigoto mutante.

\*As comparações foram feitas pelo teste de  $\chi^2$  de Pearson complementadas pelo exato de Fisher. **Negrito:** indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Relações entre marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante.

Para a avaliação dos parâmetros bioquímicos, primeiramente verificamos se a idade e o gênero influenciariam os valores dos marcadores estudados (TBARS, TEAC, atividade das enzimas GST e CAT e níveis de GSH plasmática), dentro do grupo controle e de pacientes. Para tanto, classificamos os indivíduos em duas faixas etárias ( $\leq 20$  e  $> 20$  anos) e correlacionamos com o gênero e valores dos marcadores, pelo teste ANOVA Fatorial, e, verificamos que não houve diferença estatística significativa para nenhum dos parâmetros, como mostram a tabela 13.

**Tabela 13. Análise da interferência do gênero e idade nos valores dos marcadores bioquímicos no grupo controle e pacientes.**

	Faixas etárias <sup>#</sup>		Valor de p*	Gêneros <sup>#</sup>		Valor de p*
	$\leq 20$ anos n = 19	$> 20$ anos n = 29		Masculino n = 19	Feminino n = 29	
<b>Grupo controle</b>						
<b>TBARS (ng/mL)</b>	227,45 $\pm$ 172,78	237,72 $\pm$ 154,66	0,5318	238,00 $\pm$ 153,12	230,81 $\pm$ 167,52	0,9370
<b>TEAC (mM)</b>	1,91 $\pm$ 0,15	1,89 $\pm$ 0,14	0,9851	1,97 $\pm$ 0,13	1,85 $\pm$ 0,13	0,0540
<b>GST (U/mL)</b>	1,56 $\pm$ 0,70	1,52 $\pm$ 0,75	0,4770	1,62 $\pm$ 0,85	1,47 $\pm$ 0,63	0,3151
<b>CAT (U/mL)</b>	2343,96 $\pm$ 324,01	2394,24 $\pm$ 353,00	0,7158	2371,57 $\pm$ 404,72	2376,15 $\pm$ 296,34	0,9175
<b>GSH (<math>\mu</math>M)</b>	0,24 $\pm$ 0,18	0,44 $\pm$ 0,36	0,0778	0,45 $\pm$ 0,41	0,29 $\pm$ 0,22	0,0587
<b>Pacientes</b>						
<b>TBARS (ng/mL)</b>	1452,94 $\pm$ 699,00	1577,07 $\pm$ 539,85	0,4950	1345,94 $\pm$ 413,13	1660,90 $\pm$ 655,72	0,0719
<b>TEAC (mM)</b>	1,97 $\pm$ 0,21	2,03 $\pm$ 0,15	0,6737	2,01 $\pm$ 0,23	2,01 $\pm$ 0,12	0,7292
<b>GST (U/mL)</b>	1,77 $\pm$ 0,94	1,51 $\pm$ 0,49	0,2394	1,50 $\pm$ 0,56	1,64 $\pm$ 0,72	0,3757
<b>CAT (U/mL)</b>	1660,80 $\pm$ 525,41	1912,16 $\pm$ 517,83	0,0957	1831,30 $\pm$ 634,04	1831,40 $\pm$ 461,03	0,7524
<b>GSH (<math>\mu</math>M)</b>	0,74 $\pm$ 0,49	0,70 $\pm$ 0,39	0,3644	0,59 $\pm$ 0,52	0,79 $\pm$ 0,31	0,2791

\*As comparações foram feitas pelo teste ANOVA fatorial.

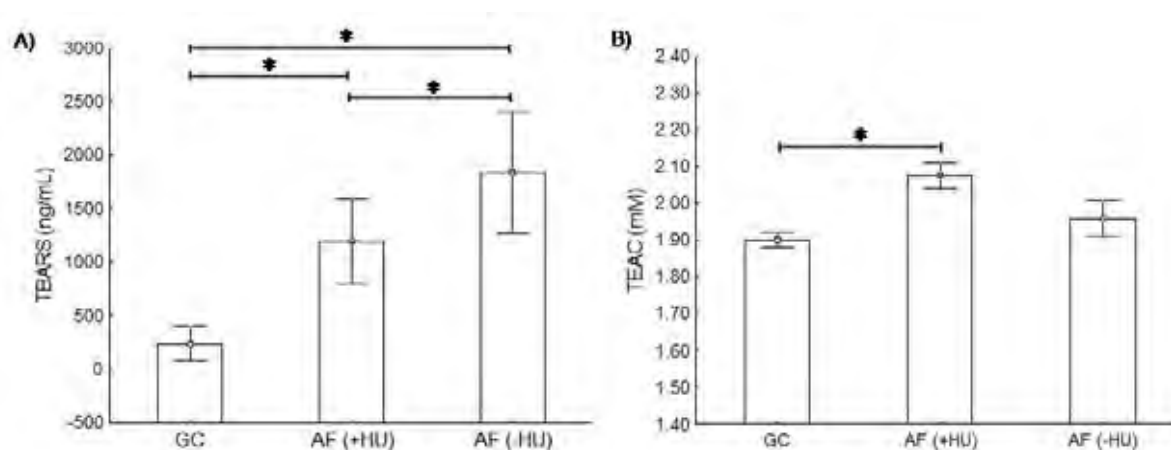
<sup>#</sup>Não houveram interações significativas entre as variáveis independentes: faixas etárias e gêneros ( $p > 0,05$ ).

Após verificar que os valores dos marcadores não apresentaram diferença estatística para a idade e gênero, foi avaliado se havia diferença entre os pacientes tratados com HU, AF (+HU), e não tratados com HU, AF (-HU), comparados ao GC.

Para a peroxidação lipídica (TBARS), foram encontrados níveis médios cerca de cinco a oito vezes maiores nos grupos AF (+HU) (1190,5  $\pm$  393,5 ng/mL) e AF (-HU) (1837,5  $\pm$  565,4 ng/mL), respectivamente, em relação ao GC (229,4  $\pm$  158,5 ng/mL). É demonstrado

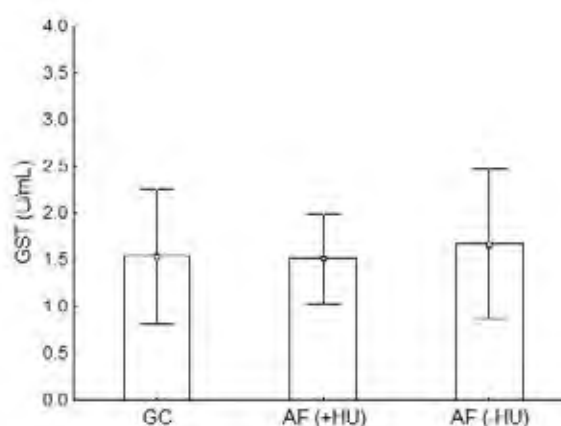
também neste estudo que o uso de HU culminou na diminuição de 35,2% nos níveis de peroxidação lipídica no grupo AF (+HU),  $p < 0,01$ , como mostra a figura 10-A.

Na análise dos níveis de TEAC obtivemos os seguintes valores médios:  $1,90 \pm 0,14$  mM para o GC,  $2,07 \pm 0,13$  mM para o grupo AF (+HU) e  $1,95 \pm 0,035$  para o grupo AF (-HU), demonstrando diferença estatística apenas entre GC e AF (+HU) ( $p < 0,01$ ), conforme mostra a figura 10-B. Além disso, foi evidenciada uma correlação baixa e positiva entre níveis de TEAC e TBARS ( $r = 0,22$ ,  $p = 0,04$ ) (Figura 10-C).

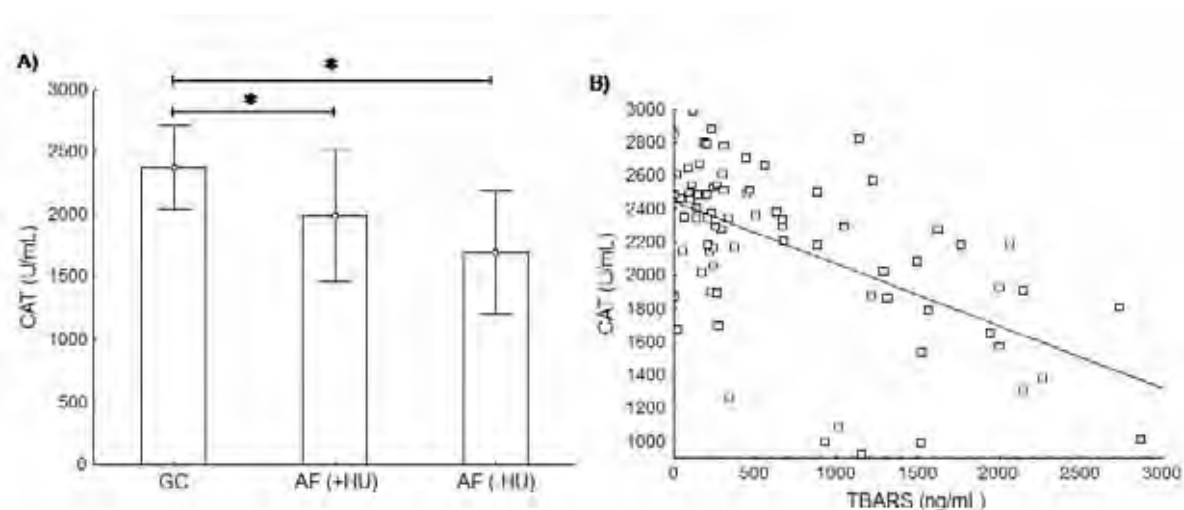


**Figura 10. Níveis de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total.** A) Níveis de TBARS foram cerca de 5 a 8 vezes maiores nos grupos AF (+HU) e AF (-HU), respectivamente, do que no grupo controle (GC) (\* $p < 0,0001$ , teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn). B) Os níveis de TEAC foram maiores nos pacientes AF (+HU) em relação ao grupo controle (\* $p = 0,002$ , teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey).

Na avaliação dos marcadores antioxidantes enzimáticos, não obtivemos diferença estatística ( $p = 0,76$ ) para a atividade enzimática da GST, que se mostrou semelhante nos três grupos avaliados,  $1,52 \pm 0,70$  U/mL para o GC,  $1,50 \pm 0,47$  U/mL para o grupo AF (+HU) e  $1,66 \pm 0,63$  U/mL para o grupo AF (-HU) (Figura 11). Por outro lado, a atividade enzimática da CAT apresentou-se diminuída cerca de 17% e 30% de nos grupos AF (+HU) ( $1991,60 \pm 532,68$  U/mL), e AF (-HU) ( $1692,48 \pm 492,27$  U/mL), respectivamente, em relação ao GC ( $2398,09 \pm 352,65$  U/mL) ( $p < 0,01$ ) (Figura 12-A). A correlação estatística e análise de regressão linear entre a atividade da CAT e os níveis de TBARS mostraram correlação negativa entre esses parâmetros ( $r = -0,56$ ,  $p < 0,01$ ) (Figura 12-B), na qual o aumento dos níveis de TBARS pode ser 31% explicado pela diminuição da atividade da CAT ( $R^2 = 0,31$ ,  $p = 0,00001$ ) (Figura 12-B).

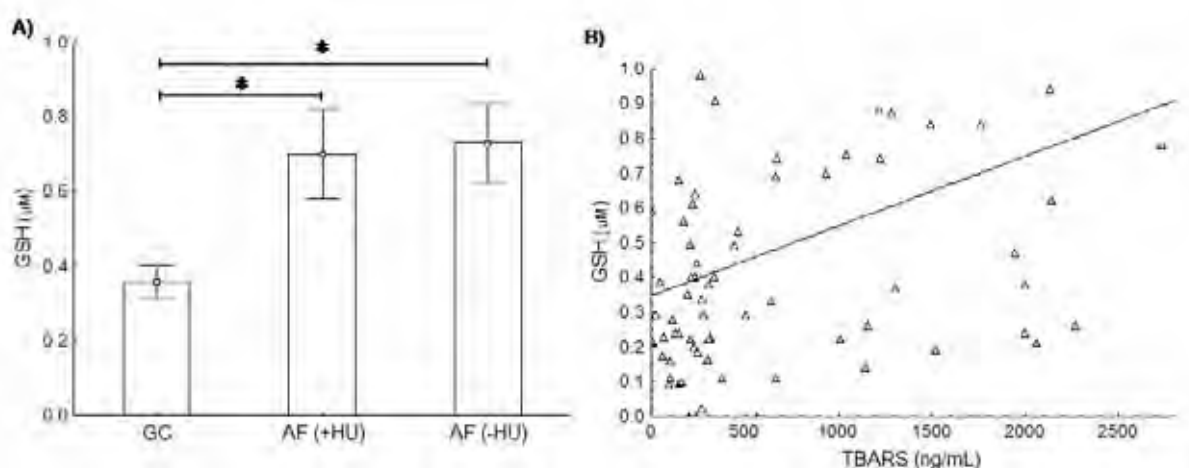


**Figura 11. Atividade enzimática da GST.** O grupo AF (-HU) apresentou atividade ligeiramente maior do que os grupos AF (+HU) e GC, porém sem diferença estatística ( $p = 0,76$ , teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey).



**Figura 12. Atividade enzimática da CAT e sua relação com a peroxidação lipídica.** A) A atividade da CAT foi menor nos pacientes com AF em relação ao grupo controle ( $p < 0,00001$ , teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn). B) Correlação linear negativa de 56% entre peroxidação lipídica e atividade da CAT ( $r = -0,56$ ,  $p = 0,00001$ ) e, também, a regressão linear mostrando que o aumento nos níveis de TBARS pode ser 31% explicado pela diminuição da atividade da CAT ( $R^2 = 0,31$ ,  $p < 0,00001$ ).

Os níveis de GSH plasmática, o marcador antioxidante não enzimático estudado, foram aproximadamente duas vezes maiores nos pacientes com AF,  $0,69 \pm 0,43 \mu\text{M}$  para o grupo AF (+HU) e  $0,73 \pm 0,40 \mu\text{M}$  para AF (-HU) em relação ao GC,  $0,35 \pm 0,30 \mu\text{M}$ , ( $p < 0,01$ ) (Figura 13-A), e mostrou uma correlação positiva com os níveis de TBARS ( $r = 0,37$ ,  $p < 0,01$ ) (Figura 13-B).



**Figura 13. Níveis de GSH no plasma e sua relação com a peroxidação lipídica.** A) Níveis de GSH plasmático foram aproximadamente duas vezes maior nos pacientes com AF em relação ao grupo controle (\* $p = 0,0005$ , teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn). B) Correlação linear positiva de 37% entre peroxidação lipídica e os níveis de GSH plasmática ( $r = 0,37$ ,  $p = 0,0008$ ).

#### 4.4. Associação dos marcadores genéticos e bioquímicos na expressão fenotípica dos pacientes.

Para verificar a influência dos haplótipos e do uso da HU sobre a concentração de Hb F e sobre os marcadores bioquímicos, formamos subgrupos - haplótipo e uso de hidroxiureia (+HU), e, haplótipo sem o uso de hidroxiureia (-HU). Os valores e/ou média dos parâmetros de acordo com subgrupo estão apresentados na tabela 14.

As comparações estatísticas só foram possíveis para aqueles subgrupos de haplótipos que tinha número de pacientes maior que dois, como destaca a Tabela 14. Com o intuito de verificar o efeito dos haplótipos sobre a expressão fenotípica, comparamos Bantu/Bantu (-HU) com Bantu/Benin (-HU), e não observamos diferença estatística (Tabela 15).

Para comprovar a contribuição do uso de HU sobre os haplótipos e expressão fenotípica, comparamos Bantu/Benin (+HU) e (-HU) e verificamos diferença para os níveis de Hb F e peroxidação lipídica (Tabela 16).

**Tabela 14. Análise descritiva da interferência dos haplótipos  $\beta^S$  nos moduladores da expressão fenotípica na AF.**

		Moduladores da expressão fenotípica na AF					
		Hb F (%)	TBARS (ng/mL)	TEAC (mM)	GST (U/mL)	CAT (U/mL)	GSH ( $\mu$ M)
<b>Haplótipos (+HU)</b>	<b>n</b>						
Bantu/Bantu	2	1,95	1201,18	2,17	1,26	1742,95	1,30
Bantu/Benin	6	17,42	1066,26	2,03	1,50	2294,01	0,62
Benin/Benin	1	5,2	1616,62	2,17	1,44	2278,17	1,10
Benin/Camar	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Bantu/Atp1	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Benin/Atp1	1	1,8	1524,30	2,20	1,20	1531,69	0,19
Benin/Atp2	1	8,4	1012,00	2,01	2,00	1084,51	0,22
Benin/Atp3	1	7,3	1216,92	2,10	1,92	1880,28	0,88
Atp2/Atp2	1	11	1308,00	1,97	1,51	1866,20	0,37
<b>Haplótipos (-HU)</b>							
Bantu/Bantu	6	6,78	2284,33	1,93	2,03	1656,10	0,77
Bantu/Benin	4	6,68	1815,50	2,09	1,27	1842,43	0,84
Benin/Benin	1	2,1	1222,00	2,09	1,65	2570,42	0,74
Benin/Camar	1	4,8	934,00	1,90	2,00	996,48	0,70
Bantu/Atp1	1	3,2	1287,00	1,95	1,18	2017,61	0,87
Benin/Atp1	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Benin/Atp2	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Benin/Atp3	0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Atp2/Atp2	2	7,45	1576,00	1,77	1,45	1248,24	0,32

(+HU) pacientes tratados com HU; (-HU): pacientes não tratados com HU.

**Tabela 15. Influência dos haplótipos  $\beta^S$  sobre moduladores da expressão fenotípica na AF.**

Moduladores	Bantu/Bantu (-HU) n = 06	Bantu/Benin (-HU) n = 04	Valor de p*
Hb F (%)	6,78 $\pm$ 3,60	6,67 $\pm$ 6,37	0.9731
TBARS (ng/mL)	2284,33 $\pm$ 435,50	1815,50 $\pm$ 334,80	0.1074
TEAC (mM)	1,92 $\pm$ 0,13	2,08 $\pm$ 0,18	0.1465
GST (U/mL)	2,03 $\pm$ 1,02	1,27 $\pm$ 0,63	0.2245
CAT (U/mL)	1656,10 $\pm$ 413,96	1842,42 $\pm$ 397,81	0.4993
GSH ( $\mu$ M)	0,77 $\pm$ 0,37	0,84 $\pm$ 0,62	0.8317

(-HU): pacientes não tratados com HU. Média  $\pm$  desvio padrão.

\*As comparações foram feitas pelo teste Mann-Whitney.

**Tabela 16. Influência do uso de HU em pacientes com o mesmo haplótipo  $\beta^S$ .**

Moduladores	Bantu/Benin (+HU) n = 06	Bantu/Benin (-HU) n = 04	Valor de p*
Hb F (%)	17,41 ± 3,10	6,67 ± 4,37	<b>0,0069</b>
TBARS (ng/mL)	1066,26 ± 495,09	1815,50 ± 334,80	<b>0,0303</b>
TEAC (mM)	2,02 ± 0,16	2,08 ± 0,18	0,6124
GST (U/mL)	1,49 ± 0,62	1,27 ± 0,63	0,5925
CAT (U/mL)	2294,01 ± 297,29	1842,42 ± 397,81	0,0725
GSH ( $\mu$ M)	0,62 ± 0,37	0,84 ± 0,62	0,4981

(-HU): pacientes não tratados com HU. (+HU): pacientes sob tratamento da HU. Média  $\pm$  desvio padrão.

\*As comparações foram feitas pelo teste Mann-Whitney. **Negrito:** indica diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Destacamos que para pacientes com o mesmo genótipo (Hb SS) e mesmo haplótipo  $\beta^S$  (Bantu/Benin), a HU promoveu aumento de 61,7% nos níveis de Hb F (Figura 14-A) que culminou na diminuição de 41,3% dos níveis de peroxidação lipídica (Figura 14-B), como mostram as análises estatísticas, com correlação negativa ( $r = -0,74$ ;  $p = 0,01$ ) e regressão linear ( $R^2 = 0,48$ ;  $p < 0,01$ ) (Figura 14-C). Os demais parâmetros bioquímicos avaliados não apresentaram expressão diferencial de acordo com haplótipos dos pacientes.

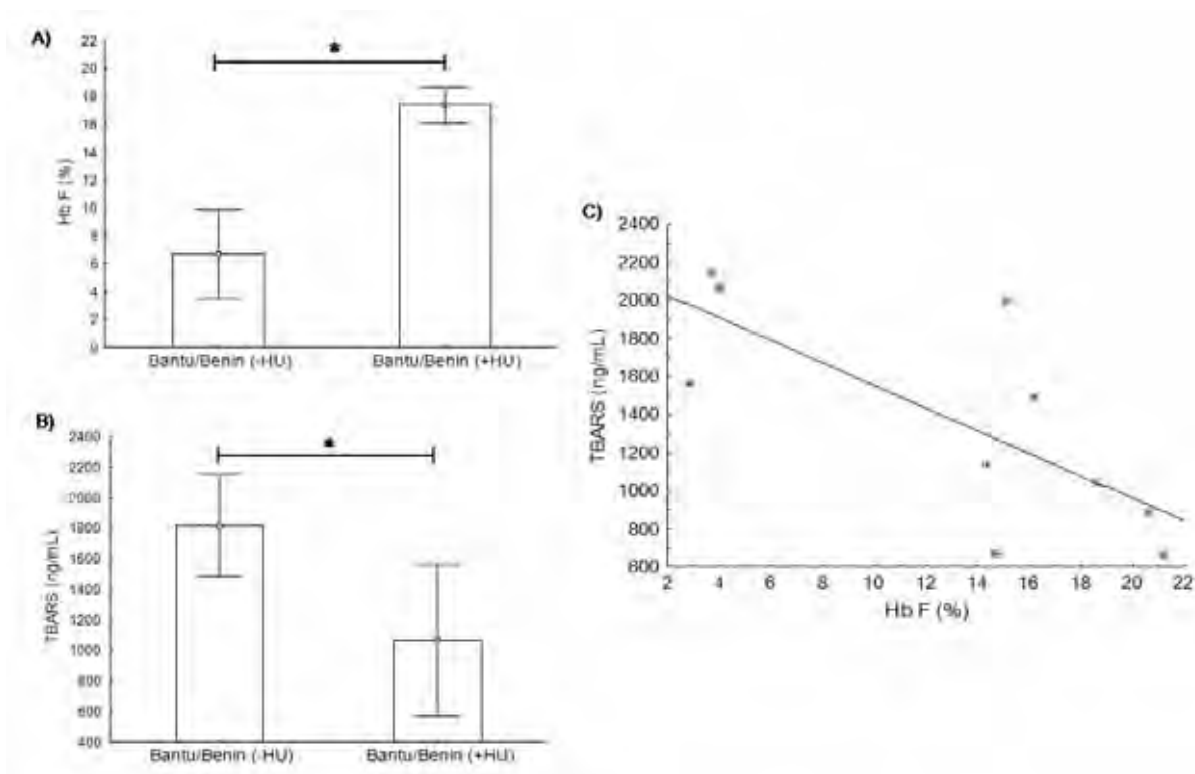
Muitos estudos têm sido realizados para tentar estabelecer uma relação entre os haplótipos  $\beta^S$  e os diferentes fenótipos na anemia falciforme. O haplótipo Bantu tem sido associado com curso clínico mais grave e uma alta incidência de lesões a órgãos, ao contrário do haplótipo Senegal, associado com curso mais brando, e do haplótipo Benin com a gravidade clínica intermediária. Por este motivo, classificamos os pacientes em grupos amostrais que favorecessem a investigação da influência do haplótipo Bantu sobre os moduladores da expressão fenotípica avaliados e, também, o efeito da HU sobre os mesmo parâmetros:

- Grupo I: pacientes com haplótipo Bantu em pelo menos um cromossomo e sem o uso de HU. Os haplótipos que compuseram este grupo foram - Bantu/Bantu, Bantu/Benin e Bantu/Atp1;
- Grupo II: pacientes que não apresentaram o haplótipo Bantu em nenhum cromossomo e sem o uso de HU. Este grupo foi composto pelos haplótipos - Benin/Benin, Benin/Camar, Atp2/Atp2;
- Grupo III: pacientes com haplótipo Bantu em pelo menos um cromossomo e sob uso de HU. Os haplótipos foram - Bantu/Bantu e Bantu/Benin;



- Grupo IV: pacientes que não apresentassem o haplótipo Bantu em nenhum cromossomo e sob uso de HU. Benin/Benin, Benin/Atp1, Benin/Atp2, Benin/Atp3 e Atp2/Atp2.

Os resultados obtidos para estas comparações estão apresentados na Tabela 17.



**Figura 14.** Níveis de Hb F e peroxidação lipídica em pacientes com mesmo haplótipo  $\beta^S$ . A) Os níveis de Hb F foram cerca de 2,6 vezes maiores nos pacientes sob tratamento de HU em relação àqueles somente sob uso de ácido fólico ( $p = 0,0069$ ; teste de Mann-Whitney). B) A peroxidação lipídica apresentou níveis 1,7 vezes menores naqueles pacientes sob tratamento de HU ( $p = 0,0303$ ; teste de Mann-Whitney). C) Correlação linear negativa de 74% entre níveis de Hb F e peroxidação lipídica ( $r = -0,74$ ,  $0,0156$ ) e, também, a regressão linear mostrando que menores níveis de TBARS podem ser 48% explicado pelos maiores níveis de Hb F ( $R^2 = 0,48$ ;  $p = 0,001$ ).

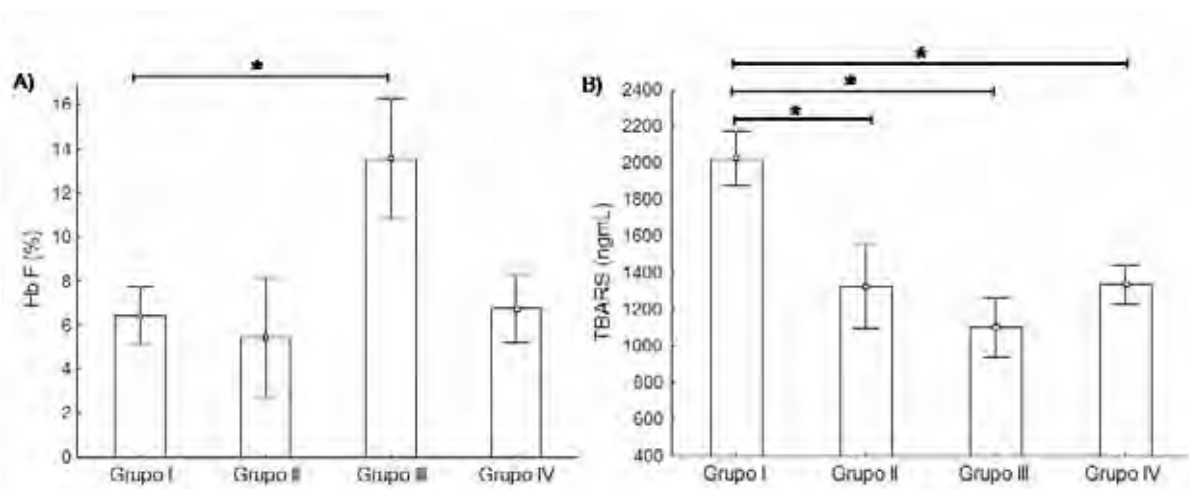
**Tabela 17.** Relação entre o haplótipo Bantu e tratamento de HU sobre moduladores da expressão fenotípica na AF.

	Grupos amostrais				Valor de p
	Grupo I n = 11	Grupo II n = 04	Grupo III n = 08	Grupo IV n = 05	
Hb F (%)	6,42 ± 4,45 <sup>a</sup>	5,45 ± 5,42 <sup>a,b</sup>	13,55 ± 7,66 <sup>b</sup>	6,74 ± 3,46 <sup>a,b</sup>	<b>0.0388*</b>
TBARS (ng/mL)	2023,18 ± 490,74 <sup>a</sup>	1327,00 ± 463,9 <sup>b</sup>	1099,99 ± 455,70 <sup>b</sup>	1335,57 ± 241,94 <sup>b</sup>	<b>0.0009*</b>
TEAC (mM)	1,99 ± 0,16	1,88 ± 0,27	2,06 ± 0,15	2,09 ± 0,10	0.2296
GST (U/mL)	1,68 ± 0,90	1,64 ± 0,53	1,44 ± 0,55	1,61 ± 0,34	0.8974
CAT (U/mL)	1756,72 ± 385,98	1515,85 ± 759,98	2156,25 ± 540,32	1728,17 ± 446,54	0.1758
GSH (μM)	0,81 ± 0,44	0,52 ± 0,24	0,79 ± 0,45	0,55 ± 0,41	0.4987

\*Letras diferentes indicam diferenças estatística (teste de ANOVA, seguido pelo *post hoc* de Tukey)

Grupo I: Bantu (-HU), Grupo II: outros haplótipos menos Bantu (-HU), Grupo III: Bantu (+HU), Grupo IV: outros haplótipos menos Bantu (+HU).

A análise, de acordo com os grupos amostrais de haplótipos, confirmou o efeito farmacológico da HU, aumentando os níveis de Hb F, naqueles pacientes com a presença do haplótipo Bantu em pelo menos um cromossomo (grupo III), em relação ao grupo de mesmo perfil molecular sem uso de HU (grupo I). Para os grupos II e IV, a HU não apresentou efeito significativo (Figura 15-A). O grupo I apresentou os maiores níveis de peroxidação lipídica, e, o grupo III apresentou melhor resposta ao tratamento com HU, comprovada pela diminuição em 45,6% dos níveis de peroxidação (Figura 15-B). Para os demais moduladores bioquímicos, não obtivemos expressão diferencial de acordo com os grupos de haplótipos.



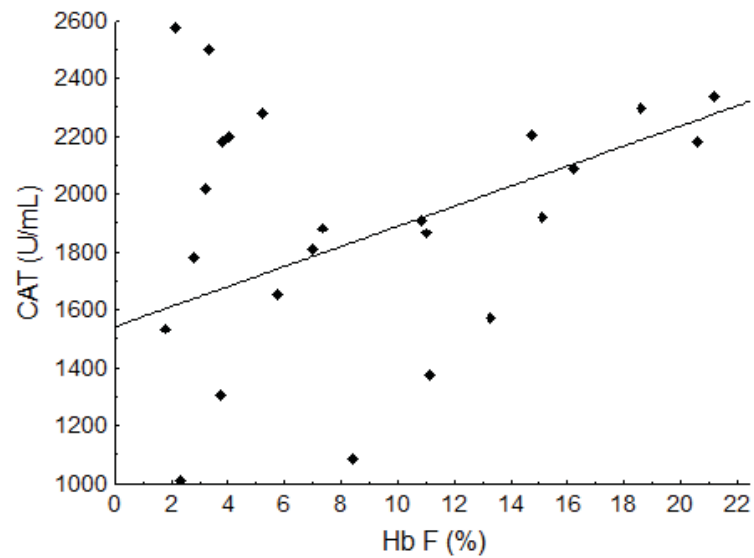
**Figura 15. Análise do efeito do haplótipo Bantu e do tratamento de HU sobre moduladores da expressão fenotípica na AF.** A) Maiores níveis de Hb F nos pacientes grupo III em relação ao grupo de mesmo perfil molecular sem uso de HU, grupo I. B) A peroxidação lipídica apresentou seu maior valor médio no grupo I em relação aos demais grupos de haplótipos avaliados. \*Indica diferença estatística (teste de ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey). Grupo I: Bantu (-HU), Grupo II: outros haplótipos menos Bantu (-HU), Grupo III: Bantu (+HU), Grupo IV: outros haplótipos menos Bantu (+HU).

Poucos estudos investigaram as relações entre os polimorfismos da GST (*GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*) e parâmetros do estresse oxidativo. Por este motivo, avaliamos a influência destes polimorfismos sobre os parâmetros de estresse oxidativo e capacidade antioxidante no grupo controle e nos pacientes (Tabela 18).

Nossos resultados mostraram que os polimorfismos da GST não influenciaram significativamente nenhum dos marcadores bioquímicos no GC, enquanto que nos pacientes falciformes, observou-se diferença significativa apenas para polimorfismo do gene *GSTP1*. Pacientes com AF com o genótipo *V/V* mostraram maiores níveis de GSH e TEAC ( $p = 0,0445$  e  $p = 0,0360$ , respectivamente) em comparação ao genótipo *I/I*.

A análise da influência dos níveis de Hb F sobre os marcadores de estresse oxidativo e capacidade antioxidante, independente do haplótipo  $\beta^S$ , também foi verificada, e, os níveis de

Hb F se associaram apenas com a atividade enzimática da CAT ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,0293$ ) ( $R^2 = 0,13$ ;  $p = 0,02$ ), como mostra a Figura 16.



**Figura 16. Associação entre os níveis de Hb F e atividade enzimática da CAT dos pacientes falciformes.** Os níveis de Hb F e atividade enzimática da CAT apresentaram correlação positiva de 41% ( $r = 0,41$ ;  $p = 0,0293$ ), sendo que a manutenção da atividade da CAT deve-se ao aumento dos níveis de Hb F ( $R^2 = 0,13$ ;  $p = 0,02$ ).

Tabela 18. Relação entre os polimorfismos de GST e parâmetros bioquímicos avaliados.

	GSTMI/ITI				valor de p*	GSTPI			valor de p*
	M/M	M/T	T/T	NULO		I/I	I/V	V/V	
<b>TBARS (ng/mL)</b>									
Grupo controle	290,03 ± 209,15	220,12 ± 65,95	191,77 ± 139,21	252,87 ± 187,29	0,4166	218,20 ± 158,26	245,91 ± 164,59	331,00 ± 169,70	0,5916
Portadores da AF	1501,00 ± 472,72	1532,40 ± 775,47	1466,78 ± 558,57	1634,19 ± 837,66	0,9867	1624,80 ± 535,62	1535,28 ± 629,53	1478,89 ± 590,81	0,8505
<b>TEAC (mM)</b>									
Grupo controle	1,93 ± 0,15	1,91 ± 0,14	1,87 ± 0,13	1,87 ± 0,14	0,4166	1,88 ± 0,02	1,93 ± 0,12	1,98 ± 0,12	0,3811
Portadores da AF	2,00 ± 0,18	2,02 ± 0,14	2,13 ± 0,08	1,96 ± 0,21	0,5733	1,86 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,02 ± 0,18 <sup>a,b</sup>	2,08 ± 0,11 <sup>b</sup>	<b>0,0445<sup>#</sup></b>
<b>GST (U/mL)</b>									
Grupo controle	1,72 ± 0,81	1,26 ± 0,54	1,63 ± 0,70	1,32 ± 0,76	0,4166	1,51 ± 0,64	1,51 ± 0,92	1,78 ± 0,61	0,7015
Portadores da AF	1,62 ± 0,51	1,97 ± 0,96	1,13 ± 0,33	1,52 ± 0,52	0,3454	1,58 ± 0,61	1,54 ± 0,57	1,70 ± 0,92	0,9576
<b>CAT (U/mL)</b>									
Grupo controle	2339,65 ± 466,35	2332,74 ± 298,25	2427,23 ± 314,53	2301,05 ± 167,25	0,5623	2387,81 ± 388,69	2439,55 ± 256,80	2334,50 ± 219,10	0,8751
Portadores da AF	1804,98 ± 445,88	1828,63 ± 587,26	1685,44 ± 763,56	1921,12 ± 691,05	0,9600	1823,23 ± 689,74	1769,58 ± 492,94	1978,37 ± 526,04	0,7425
<b>GSH (uM)</b>									
Grupo controle	0,37 ± 0,31	0,29 ± 0,16	0,37 ± 0,39	0,33 ± 0,27	0,9960	0,33 ± 0,31	0,34 ± 0,26	0,71 ± 0,43	0,2333
Portadores da AF	0,57 ± 0,37	0,73 ± 0,07	0,99 ± 0,53	0,87 ± 0,64	0,5681	0,38 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,44 <sup>a,b</sup>	0,96 ± 0,24 <sup>b</sup>	<b>0,0360<sup>#</sup></b>

M/M: presença do alelo para *GSTM1* e ausência do alelo para *GSTT1*; M/T: presença do alelo para *GSTM1* e *GSTT1*; T/T: presença do alelo para *GSTT1* e ausência de alelo para *GSTM1*; NULO: ausência para os alelos para *GSTM1* e *GSTT1*. I/I = homocigoto selvagem; I/V = heterocigoto; V/V = homocigoto mutante.

\*As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de Dunn.

<sup>#</sup>Letras diferentes indicam diferença estatística.

*Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

A anemia falciforme (AF) tem significativa importância epidemiológica em virtude da prevalência, morbidade e mortalidade, sendo considerada um problema de saúde pública no Brasil. Os processos fisiopatológicos complexos e diversificados que caracterizam essa afecção genética desencadeiam manifestações clínicas variadas, desde anemia até recorrência de acidentes vasculares encefálicos, por exemplo, e estão intimamente ligados ao quadro de estresse oxidativo crônico e podem influenciar a resposta ao tratamento (STUART; NAGEL, 2004; FRENETTE; ATWEH, 2007; BANDEIRA, 2007; REES et al., 2010). Dessa forma, estudos ligados a esta afecção que permitam o estabelecimento de relações entre o perfil genético do portador com fatores associados à fisiopatologia da doença, tanto genéticos quanto bioquímicos e a resposta ao tratamento, possibilitam melhor entendimento dos eventos clínicos e, direcionam ao tratamento individualizado aos pacientes. Visto que estes fatores são potenciais moduladores da expressão fenotípica na AF, neste trabalho foram analisados, em homocigotos para Hb S, marcadores da capacidade antioxidante e estresse oxidativo correlacionando-os com os polimorfismos da glutathione *S*-transferase, haplótipos do grupamento beta e uso de hidroxiureia (HU), comparados a um grupo controle.

A reativação da expressão de Hb F na vida adulta fornece abordagem terapêutica eficaz para pacientes com hemoglobinopatias, sintomáticos e com importância clínica. Entre os agentes de indução de Hb F, a HU é utilizada com sucesso para tratar a AF (RODGERS et al., 1990; ZENG et al., 1995; FUCHAROEN et al., 1996). Os altos níveis de Hb F verificados no grupo AF (+HU) confirmam o efeito farmacológico do fármaco, que melhora as condições clínicas dos pacientes (ALIYU et al., 2006). Porém, é interessante ressaltar que o grupo AF (-HU) também apresentou níveis de Hb F acima do esperado, mesmo sem o tratamento com HU. Os valores observados para este grupo podem ter sido influenciados por fatores genéticos, como os três principais *loci* - polimorfismo de nucleotídeo único *Xmn1-HBG2*, a região intergênica *HBS1L-MYB* no cromossomo 6q e *BCL11A* - que contribuem de 20-50% com a variação da característica, Hb F, em pacientes com AF (THEIN; MENZEL, 2009). E, os níveis de Hb A encontrados em pacientes são, possivelmente, remanescentes de transfusão sanguínea, pois as transfusões são indispensáveis e muito frequentes no tratamento da AF (KWIATKOWSKI et al., 2010).

O perfil molecular do *cluster* da  $\beta$ -globina também foi verificado nos pacientes, para melhor entendimento do envolvimento dos haplótipos  $\beta^S$  como moduladores genéticos,

fornecendo informações não só sobre a origem dos genes  $\beta^S$ , mas também sobre as diferenças que determinam a gravidade clínica da AF, e a resposta ao tratamento específico (NAGEL et al., 1984; ZAGO et al., 2000). Foi encontrada neste trabalho maior frequência do haplótipo Bantu/Benin, seguido pelo Bantu/Bantu, Atp2/Atp2 e Benin/Benin. Segundo relatos científicos existem aproximadamente mil cromossomos mapeados para os haplótipos do *cluster*  $\beta^S$  no Brasil, e, estes apontam o predomínio do haplótipo Bantu, seguido do haplótipo Benin, sendo raros os casos de Camarões e Senegal. Essa distribuição reflete a proporção de escravos africanos de diferentes etnias trazidos ao Brasil durante o período de tráfico de escravos, e a frequência dos haplótipos encontrados nas regiões estudadas são semelhantes às encontradas por outros autores (ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992; LEMOS; GUERREIRO, 2006; BELISÁRIO et al., 2010; BELINI-JUNIOR, 2010). Os haplótipos “atípicos” representam cerca de 5 a 10% dos cromossomos avaliados em estudos envolvendo haplótipos (GARNER et al., 2002), e, encontramos 19,7% de haplótipos atípicos, frequência maior do que o esperado; e, nenhum dos haplótipos identificados, tanto os já descritos pela literatura quanto os atípicos, tinham a presença do sítio polimórfico *XmnI*, substituição de uma C→T na posição - 158 no gene  $\gamma^G$ . A presença deste sítio em pacientes está associada ao aumento de expressão do gene  $\gamma^G$  e, conseqüentemente, à maior síntese de Hb F, e melhora clínica (NEMATI; RAHIMI; BAHRAMI, 2010). Assim sendo, outros polimorfismos genéticos não-alvo deste estudo devem estar envolvidos nos altos níveis de Hb F obtidos no grupo AF (-HU).

Atualmente, muitas pesquisas priorizam a identificação de variações genéticas inter-individuais, subjacentes às diferentes respostas farmacológicas ao uso de fármacos (COLLINS et al, 2003). Na AF, esse paradigma está sendo aplicado para elucidar a patogênese das complicações vasculares e para desenvolver terapias individualizadas (STEINBERG, 2005). Porém, não existem relatos na literatura de resposta diferencial ao tratamento de HU de acordo com os haplótipos  $\beta^S$  em pacientes com AF. Nossos resultados evidenciam que pacientes com a presença do haplótipo Bantu em pelo menos um cromossomo, sob uso de HU, apresentaram aumento de 52,6% dos níveis de Hb F em relação aos pacientes de mesmo perfil molecular sem, uso de HU. A variável de tempo de uso do medicamento foi afastada, uma vez que os pacientes (+HU) estavam há pelo menos um ano sob uso do fármaco. Mais estudos são necessários para se comprovar a existência de resposta “haplótipo-dependente” no tratamento com HU.

Desde a descoberta dos haplótipos  $\beta^S$  como moduladores genéticos da expressão fenotípica na AF, vários estudos foram desenvolvidos para verificar o efeito dos haplótipos sobre as características clínicas e hematológicas dos pacientes, porém estudos que relacionem os haplótipos aos marcadores do estresse oxidativo e a capacidade antioxidante são escassos. Assim, investigamos a influência dos haplótipos sobre os marcadores, e, identificamos maiores níveis de peroxidação lipídica naqueles pacientes com a presença do haplótipo Bantu em pelo menos um cromossomo, o que corrobora com os estudos que vinculam este haplótipo às manifestações clínicas mais graves e início de crises vasclusivas mais precoce, uma vez que a AF esta intimamente ligada a quadros inflamatório e oxidativo crônicos (POWARS; CHAN; SCHOREDER, 1990; STEINBERG 1994, CONRAN et al., 2009). Sobre os demais parâmetros bioquímicos avaliados, os haplótipos não exerceram influência com diferença significativa. Rusanova et al (2010), em espanhóis portadores da AF, não obteve diferença significativa nos níveis de peroxidação lipídica e GSH entre os pacientes que apresentavam haplótipo Bantu em comparação ao haplótipo Benin e Senegal ou Árabe-Indiano. Estes resultados foram semelhantes aos de Belini-Júnior (2010) que também comparou os níveis TBARS e TEAC entre os haplótipos Bantu/Bantu e Bantu/Benin que não exerceram influência sobre os parâmetros bioquímicos nos grupos avaliados.

No nosso estudo, o haplótipo Bantu/Benin foi o mais freqüente e, por este motivo, nestes pacientes, comprovamos o efeito protetor da Hb F proporcionado pelo uso de HU, pois o aumento dos níveis de Hb F culminou na diminuição de 41,3% dos níveis de peroxidação lipídica, corroborando com Dasgupta et al (2010) que demonstram, em camundongos transgênicos falciformes, que o efeito protetor da Hb F é mediado principalmente pela diminuição da falcização intravascular resultando na diminuição do estresse oxidativo, e, também, no aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico.

Além dos haplótipos  $\beta^S$ , outros marcadores genéticos como a coerança de polimorfismos associados a fisiopatologia da AF podem modular a expressão fenotípica. Diante dessa afirmação, investigamos a frequência dos polimorfismos da GST (*GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*) e sua relação com os marcadores do estresse oxidativo nos pacientes falciformes, comparados ao grupo controle. A frequência dos polimorfismos das diferentes classes de GST humana tem sido caracterizada como étnico-dependente e amplamente divergente entre as populações em todo o mundo (ROSSINI et al., 2002; MO et al., 2009). Os dados de frequência obtidos para o grupo controle são semelhantes aos descritos na literatura, enquanto o grupo de pacientes com AF apresentou frequência mais baixa do genótipo nulo para *GSTM1* (21,6%) e do genótipo homozigoto selvagem para *GSTP1*, *I/I* (17,9%), quando



comparados com dados da população brasileira. A distribuição genotípica relatada na população brasileira varia de 42 a 73% nulo para *GSTM1*, de 25 a 47% nulo para *GSTT1*, e 9-41% para o genótipo nulo para ambos os genes. As frequências do polimorfismo *GSTP1* nesses indivíduos variaram de 40 a 62% para genótipo *I/I*, de 30 a 46% para *I/V* e 6 a 17% para *V/V* (ROSSINI et al., 2002; LIMA et al., 2008; PINHEL et al., 2008; ONDEI, 2009; MAGNO et al., 2009). Em um grupo composto por 86 portadores de doença falciforme (DF) provenientes da região sudeste do Brasil, foram relatadas as seguintes frequências genotípicas: 29,0% apresentaram o genótipo *M/T*, 18,6% genótipo *T/T*, 38,4% genótipo *M/M* e para o genótipo nulo para ambos os genes foram encontrados 14,0% das amostras, e, para o gene *GSTP1*, 37,2% das amostras com o genótipo *I/I*, 45,4% com o genótipo *I/V* e 17,4% com o genótipo *V/V*; frequências genotípicas semelhantes às obtidas em nosso estudo, exceto para o genótipo *I/I* (TUKAMOTO-JÚNIOR, 2008). Porém, devido à falta de estudos relatando a frequência dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em pacientes com DF e a diferença significativa, quando comparados a grupos controles, estudos posteriores com número amostral maior e associação com manifestações clínicas da AF poderão predizer o risco relativo gerado pela coerância desses polimorfismos e a mutação da Hb S no desenvolvimento da fisiopatologia da doença.

A associação dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com predisposição a desenvolvimento de câncer, doenças inflamatórias e com a eficácia e a toxicidade de alguns medicamentos têm sido amplamente investigada, mas poucos estudos relatam a relação com parâmetros do estresse oxidativo (TAMER et al., 2004; ZHONG et al., 2006; KILBURN et al., 2010). Nossos resultados mostraram que os polimorfismos da GST não influenciaram significativamente nenhum dos marcadores bioquímicos no grupo controle, enquanto que nos pacientes falciformes, observou-se diferença significativa apenas para polimorfismos do gene *GSTP1*. Pacientes com AF com o genótipo *V/V* mostraram maiores níveis de GSH e TEAC em comparação ao genótipo *I/I*, indicando uma possível correlação entre estes polimorfismos com o estresse oxidativo em pacientes com AF. No entanto, devido à escassez de estudos sobre a influência dos polimorfismos GST em processos oxidativos, mais pesquisas são necessárias para lidar melhor com essa hipótese. Bessa et al. (2009) mostraram que indivíduos com genótipo nulo para *GSTM1* e *GSTT1* ou nulo para ambos os genes tiveram atividade eritrocitária da GST significativamente mais baixa do que aqueles indivíduos com genótipos *GSTM1+/GSTT1+*, e, também, maiores níveis de peroxidação lipídica, menores níveis de GSH eritrocitária, além da diminuição das atividades da CAT, SOD e GPx, entretanto não houveram diferenças significativas nestes parâmetros relacionados ao estresse oxidativo entre

os genótipos *GSTM1* e *GSTT1*. O número de estudos de associação entre os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* e  $\beta$ -hemoglobinopatias são raros. Em portadores da DF não foi observada qualquer influência destes polimorfismos sobre os níveis de TBARS e TEAC no grupo avaliado (TUKAMOTO-JÚNIOR, 2008). Enquanto que em pacientes com Hb E/talassemia beta foi demonstrado que o genótipo nulo para ambos os alelos (*GSTT1/GSTM1*) acarretou níveis de ferro sérico e de ferritina significativamente mais elevados em comparação aos pacientes com genótipo normal para tais deleções gênicas (SHARMA et al, 2010).

Embora o estresse oxidativo e alterações na atividade das enzimas antioxidantes tenham sido extensivamente descritos na AF, os resultados são, às vezes, contraditórios e, sua relação com o tratamento com HU permanece obscura. Tukamoto-Júnior (2008) avaliou a influência das variáveis idade e gênero sobre os valores TBARS e TEAC, e, encontrou menor peroxidação lipídica em indivíduos com idade entre seis meses a 17 anos, em relação a indivíduos com idade entre 18 a 65 anos. Todavia, as variáveis gênero e idade não interferiram nos valores dos marcadores bioquímicos avaliados em ambos os grupos do nosso estudo, possibilitando comparações entre grupos homogêneos e evitando vieses.

Altos níveis de peroxidação lipídica em pacientes com AF foram amplamente divulgados, mas nós demonstramos neste estudo que o uso de HU culminou na diminuição de 35,2% nos níveis de peroxidação lipídica para o grupo AF (+HU), confirmando as propriedades antioxidantes *in vivo*, como descrito anteriormente por Agil e Sadrzadeh (2000) em um modelo experimental e, evidenciando o efeito protetor da Hb F proporcionado pelo seu uso (MANFREDINI et al., 2008; ALSUTAN et al., 2010; REPKA; HEBBEL, 1991; SESS et al., 1998, DASGUPTA et al., 2010). Além disso, os níveis de TBARS e TEAC apresentaram correlação baixa e positiva, o que, possivelmente, indica resposta ao estresse oxidativo crônico da doença, corroborando com a publicação recente do nosso grupo de pesquisa (SHIMAUTI et al., 2010). O grupo AF (+HU) aduziu maiores níveis de TEAC em comparação ao grupo controle, provavelmente, devido às propriedades antioxidantes da HU, neutralizando os altos níveis de ERO gerados pela doença ou devido ao efeito protetor promovido pela Hb F. No entanto, mais estudos são necessários para compreender esse fenômeno.

O principal papel das GSTs nas células está relacionado com a desintoxicação de xenobióticos e produtos da lipoperoxidação, apesar de algumas isoformas também conterem a atividade da peroxidase (RINALDI et al., 2002; MAHER, 2006). Devido a isso, a avaliação das GSTs tem sido utilizada como importante biomarcador de estresse oxidativo em muitas

doenças humanas, tais como hipertensão arterial, a doença de Alzheimer, doença hepática não-alcoólica, e também o câncer (BESSA et al., 2009; KILBURN et al., 2010; NAM et al., 2010; HARDWICK et al., 2010; BURLAKOVA et al., 2010). Como na AF, todas as doenças acima citadas são caracterizadas por inflamação crônica, intimamente associada com o estresse oxidativo. No entanto, não há relatos sobre a avaliação da atividade da GST em pacientes com AF. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na atividade da GST entre os grupos estudados, sugerindo que esta enzima não tenha sido afetada pela doença. Apesar de o estresse oxidativo ser característico na AF e a GST nas defesas antioxidantes, pode ser que outras enzimas antioxidantes presentes nos glóbulos vermelhos, como SOD, CAT, GPx e peroxiredoxina tenham papel mais importante na resposta ao estresse oxidativo (JOHNSON et al., 2005; RHEE et al., 2005; LOW et al., 2007). Portanto, este aspecto continua sem total elucidação e deve ser melhor explorado em outros estudos. Além disso, deve-se mencionar que a atividade da GST foi medida por meio do CDNB como substrato, um substrato comum a várias isoformas de GST. E estudos utilizando substratos específicos para determinadas isoformas são necessários para a melhor compreensão dos efeitos derivados do estresse oxidativo na AF com a modulação da GST.

A diminuição da atividade da CAT verificada em nosso estudo está de acordo com as conclusões de Alsultan et al (2010) em pacientes com AF e de Dasgupta et al (2006), em modelos de camundongos transgênicos falciformes. Entretanto, Manfredini et al. (2008) e Cho et al (2010) não observaram diferenças na atividade da CAT entre os grupos controle e AF avaliados. Redução na atividade da CAT também foi observada em doenças inflamatórias intestinais, provavelmente devido ao seu consumo por ERO geradas pelo processo inflamatório crônico, nessas afecções (KRZYSZEK-KORPACKA et al., 2010). Venkatesha et al (2008) submeteram culturas de células humanas epiteliais de mama não-malignas a altos níveis de ERO e observaram aumento significativo na frequência de micronúcleos e na fosforilação da histona 2AX. Quando estas culturas foram tratadas com CAT, foi demonstrado que CAT suprimiu danos celulares, validando a sua ação antioxidante.

Há relatos sobre a avaliação dos níveis de GSH em eritrócitos de pacientes com AF ou em tecidos de camundongos transgênicos falciformes (DASGUPTA et al., 2006; TATUM; CHOW, 1996; CHAVES et al., 2008; SOMJEE et al., 2005; DASGUPTA et al., 2010), mas o presente estudo foi o primeiro que correlacionou os níveis plasmáticos de GSH com parâmetros bioquímicos na AF. O plasma humano contém concentrações muito baixas de GSH, na faixa de 0,1 a 20 $\mu$ M, que são coerentes com os nossos dados (MANSOOR et al., 1996). Os níveis de GSH no plasma foram aproximadamente duas vezes maiores nos

pacientes em relação ao grupo controle, e mostrou correlação positiva com os níveis de TBARS, possivelmente devido à hemólise característica da fisiopatologia da AF, ou à resposta ao estresse oxidativo crônico, confirmando sua função. Mais estudos são necessários para validar o mecanismo envolvido no aumento dos níveis de GSH plasmática na AF.

As hemácias podem sintetizar GSH a partir da cisteína, glicina e ácido glutâmico, pois as mesmas possuem todas as enzimas necessárias para a sua biossíntese, e uma porcentagem significativa de sua GSH é produzida *de novo* por dia (DASS et al., 1992). Além disso, tanto a glutathiona dissulfeto (GSSG) quanto os conjugados de glutathiona (GS-X) são ativamente exportados das hemácias, quando as suas concentrações intracelulares estão altas. Essa re-síntese *de novo* pode equilibrar a perda de GSH, devido à exportação de GSSG e GS-X e, é regulada por um mecanismo de *feedback* (THOM et al., 1997; ROSSI et al., 2001). Giustarini et al (2008) demonstraram que as hemácias contribuem significativamente para o *pool* de GSH plasmática, e, sugeriram que anormalidades nas hemácias podem influenciar os níveis de GSH plasmática. Assim, a hemólise na AF pode interferir na síntese *de novo* de GSH e, conseqüentemente, no seu mecanismo de *feedback*. Dumaswala et al (2001) mostraram que a suplementação *in vitro* de eritrócitos com aminoácidos precursores da síntese de GSH melhoram sua síntese e manutenção, evitando a perda da função antioxidante indireta das hemácias, que pode ser afetada pelas ERO. Na AF, estudos complementares são necessários para elucidar esses mecanismos.

Com a evidência destes resultados, sugerimos que os parâmetros avaliados podem desempenhar importantes papéis em outras  $\beta$ -hemoglobinopatias ou anemias hemolíticas, que possuam envolvimento com o estresse oxidativo; e, também, que a GSH possa ser utilizada como adjuvante na redução do estresse oxidativo, melhorando o estado oxidativo e inflamatório da doença.

*Conclusões*

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

- A confirmação por biologia molecular da homozigose para Hb S foi fundamental para obtenção de um grupo teste mais homogêneo, evitando análises tendenciosas. As frequências dos haplótipos, para os alelos  $\beta^S$ , estavam de acordo com outros estudos brasileiros, sendo o haplótipo Bantu o mais frequente seguido pelo Benin. Porém, encontramos frequência de haplótipos atípicos superior ao relatado na literatura científica; e, nenhum dos haplótipos encontrados apresentou a presença do sítio *XmnI*.
- A frequência dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* nos pacientes apresentou diferenças significativas quando comparada ao grupo controle, porém similares às relatadas para a população brasileira;
- Foram observadas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos avaliados, exceto para a atividade de GST, confirmando o quadro oxidativo crônico nos pacientes. O uso de HU contribuiu para menor peroxidação lipídica;
- A co-herança dos polimorfismos da GST e Hb S não influenciou significativamente aos parâmetros avaliados;
- A presença do haplótipo Bantu relacionou-se com maiores níveis de peroxidação lipídica, porém, também, demonstrou melhor resposta ao tratamento com HU;
- Foi confirmada a influência da HU sobre os níveis de Hb F, e, o efeito protetor destes níveis elevados sobre a peroxidação lipídica.

*Referências*

**REFERÊNCIAS**

ABDELRAHMAN, S. Z.; ELZEIN, R. A.; ANWAR, W. A.; AU, W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. **Cancer Letter**, v. 107, p. 229-233, 1996.

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

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

ALIYU, Z. Y.; TUMBLIN, A. R.; KATO, G. J. Current therapy of sickle cell disease. **Haematologica**, v. 91, p. 7-11, 2006.

AL-SAQLADI, A. M.; BRABIN, B. J.; BIN-GADEEM, H. A.; *et al.* Beta-Globin Gene Cluster Haplotypes in Yemeni Children with Sickle Cell Disease. **Acta Haematologica**, v. 123, p. 182-185, 2010.

ALSULTAN, A. I.; SEIF, M. A.; AMIN, T. T.; NABOLI, M.; ALSULIMAN, A. M. Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 14, p. 527-538, 2010.

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

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

AUST, S. D.; MILLER, D. M. Role of iron in oxygen radical generation and reactions. *In* PROBST, G. S.; VODICNIK, M. J., DORATO, M. A. (eds): **New horizons in molecular toxicology: a symposium. Lilly Research Laboratories Symposium/Molecular Toxicology**. p. 29-34, 1991.

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



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

BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle Cell Biomechanics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, p. 345-367, 2010.

BELCHER, J. D.; BRYANT, C. J.; NGUYEN, J.; *et al.* Transgenic sickle mice have vascular inflammation. **Blood**, v. 101, p. 3953–3959, 2003.

BELCHER, J. D.; MAHASETH, H.; WELCH, T. E.; *et al.* Critical role of endothelial cell activation in hypoxia-induced vasoocclusion in transgenic sickle mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, p. H2715–H2725, 2005.

BELINI-JUNIOR, E. **Estresse oxidativo em doentes falciformes: influência dos haplótipos e uso de medicação específica**. 2010. 165 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

BELISÁRIO, A. R.; MARTINS, M. L.; BRITO, A. M. S.; *et al.*  $\beta$ -Globin Gene Cluster Haplotypes in a Cohort of 221 Children with Sickle Cell Anemia or  $S\beta^0$ -Thalassemia and Their Association with Clinical and Hematological Features. **Acta Haematologica**, v. 124, p. 162-170, 2010.

BERNARDINI, S.; BELLINCAMPI, L.; BALLERINI, S.; *et al.* Glutathione S-Transferase PI \*C Allelic Variant Increases Susceptibility for Late-Onset Alzheimer Disease: Association Study and Relationship with Apolipoprotein E  $\epsilon 4$  Allele. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 944-951, 2005.

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

BESSA, S. S.; ALI, E. M. M.; HAMDY, S. M. The role of glutathione S- transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in Egyptian patients with essential hypertension. **European. Journal of International Medicine**, v. 20, p. 625-630, 2009.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. Ed. Grune & Stratton– New York, 1975.

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

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

BRIEHL, R. W. Rheology of hemoglobin S gels: possible correlation with impaired microvascular circulation. **American Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 5, p. 390–398, 1983.

BRITTENHAM, G. M.; SCHECHTER, A. N.; NOGUCHI, C. T. Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. **Blood**; v. 65, p. 183–189, 1985.

BRUHN, C.; BROCKMOLLER, J.; KERB, R.; *et al.* Concordance between enzyme activity and genotype of glutathione S-transferase theta (GSTT1). **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p. 1189–1193, 1998.

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

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 762-769, 1997.

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

BURLAKOVA, E. B., ZHIZHINA, G. P., GUREVICH, S. M., *et al.* Biomarkers of oxidative stress and smoking in cancer patients. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 6, p. 47-53, 2010.

CAMASCHELLA, C.; MAZA, U.; ROETTO, A.; *et al.* Genetic interactions in thalassemia intermedia: analysis of beta-mutations, alpha-genotype, gamma-promoters, and beta-LCR hypersensitive sites 2 and 4 in Italian patients. **American Journal of Hematology**, v. 48, p. 82–87, 1995.

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

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

CAPPELLINI, M. D.; FIORELLI, G.; BERNINI, L. F. Interaction between homozygous  $\beta$  thalassaemia and the Swiss type of hereditary persistence of fetal haemoglobin. **British Journal of Haematology**, v. 48, p. 561–572, 1981.

CARRAGER, B.; BLUEMKE, D. A.; GABRIEL, B.; POTEL, M. J.; JOSEPHS, R. Structural analysis of polymers of sickle cell hemoglobin. I. Sickle cell hemoglobin fibers. **Journal of Molecular Biology**, v. 199, p. 315–331, 1988.

CARTRON, J. P.; ELION, J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. *Transfusion Clinique et Biologique*, v. 15, p. 39–50, 2008.

CAVIL, I. Erythropoiesis and iron. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 15, p. 399-409, 2002.

CHAVES, M. A. F., LEONART, M. S. S., DO NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**, v. 13, p. 187-192, 2008.

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. **Antioxidants Redox Signaling**, v. 13, p. 1-11, 2010.

COLLINS, F. S.; GREEN, E. D.; GUTTMACHER, A. E.; GUYER, M. S. A vision for the future of genomics research. **Nature**, v. 422, p. 835–847, 2003.

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

DASGUPTA T; HEBBEL RP; KAUL DK. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models . **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 12, p. 1771-80, 2006.

DASGUPTA, T.; FABRY, M. E.; KAUL, D. K. Antisickling property of fetal hemoglobin enhances nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout sickle mice. **American Journal of Physiology**, v. 298, p. R394-R402, 2010.

DASS, P. D., BERMES, E. W.; HOLMES, E. W. Renal and Hepatic Output of Glutathione in Plasma and Whole-Blood. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1156, p. 99-102, 1992.

DUMASWALA, U. J., ZHUO, L., MAHAJAN, S.; et al. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. **AJP – Cell Physiology**, v. 280, p. C867-C873, 2001.

DUSINKÁ, M.; FICEK, A.; HORSKÁ, A.; *et al.* Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. **Mutation Research**, v. 482, p. 47-55, 2001.

DYKES, G. W.; CREPEAY, R. H.; EDELSTEIN, S. J. Three dimensional reconstruction of 14-filament fibers of hemoglobin S. **Journal of Molecular Biology**, v. 130, p. 451–472, 1979.

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

ECKMAN, J. R. Techniques for blood administration in sickle cell patients. **Seminars in Hematology**, v. 38, p. 23-29, 2001.

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

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-147, 2000.

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

FRENETTE, P. S.; ATWEH G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts and future promise. **Journal of Clinical Investion**, v.117, p. 850-528, 2007.

FRONTICELLI, C.; GOLD, R. Conformational relevance of the beta6Glu replaced by Val mutation in the beta subunits and in the beta (1–55) and beta (1–30) peptides of hemoglobin S. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 4968–4972, 1976.

FUCHAROEN, S.; SIRTANARATKUL, N.; WINICHAGOON, P.; et al. Hydroxyurea increases hemoglobin F levels and improves the effectiveness of erythropoiesis in beta-thalassemia/hemoglobin E disease. **Blood**, v. 87, p. 887–892, 1996.

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

GIUSTARINI, D., MILZANI, A., LE-DONNE, I.; ROSSI, R. Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 40, p. 174-179, 2008.

GLADWIN, M. T. Deconstructing endothelial dysfunction: soluble guanylyl cyclase oxidation and the NO resistance syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 2330–2332, 2006.

GLADWIN, M. T.; SACHDEV, V.; JISON, M. L.; et al. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 886–895, 2004.

GULICK, A. M.; FAHL, W.E. Forced evolution of glutathione S-transferase to create a more efficient drug detoxification enzyme. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, v. 92, p. 8140–8144, 1995.

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

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

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

HARDWICK, R. N., FISHER, C. D., CANET, M. J., LAKE, A. D., CHERRINGTON, N. J. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human non-alcoholic fatty liver disease. **Drug Metabolism and Disposition**, in Press; 2010.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology. Toxicology**, 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, 2000.

HAYES, J.; PULFORD, D. The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the iso-enzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 445–600, 1995.

HEBBEL, R. P.; MORGAN, W. T.; EATON, J. W.; HEDLUND, B. E. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, v. 85, p. 237–241, 1988.

HIGGS, D. R.; ALDRIDGE, B. E.; LAMB, J.; *et al.* The interaction of alpha-thalassemia and homozygous sickle-cell disease. **New England Journal of Medicine**, 306, 1441–1446, 1982.

HIRVONEN, A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. **Journal of Occupational Environmental Medicine**, v. 37, p. 37–43, 1995.

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

HUISMAN H, J. *et al.* HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canada, 1996. Disponível em <<http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em: 03 jan. 2011.

JOHNSON, R. M., GOYETTE, G., RAVINDRANATH, Y., HO, Y. S. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, p. 1407-1417, 2005.

KATO, G. J.; HSIEH, M.; MACHADO, R.; *et al.* Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. **American Journal of Hematology**, v. 81, p. 503–510, 2006.

KEEN, J. H.; HABIG, W.H.; JACOBY, W. B. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6168, 1976.

KILBURN, L., OKCU, M. F., WANG, T.; *et al.* Glutathione S-Transferase Polymorphisms Are Associated With Survival in Anaplastic Glioma Patients. **Cancer**, v. 116, p. 2242-2249, 2010.

KINNEY, T. R.; WARE, R. E.; SCHULTZ, W. H.; FILSTON, H.C. Long-term management of splenic sequestration in children with sickle cell disease. **Journal of Pediatrics**; v. 117, p. 194–199, 1990.

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

KRZYTEK-KORPACKA, M., NEUBAUER, K., BERDOWSKA, I.; et al. Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: impact of anemia and treatment. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 16, p. 1467-1475, 2010.

KWIATKOWSKI, J. L.; et al. Effect of Transfusion Therapy on Transcranial Doppler Ultrasonography Velocities in Children With Sickle cell Disease. *Pediatric Blood and Cancer*, "In Press", 2010.

LANZKRON, S.; STROUSE, J. J.; WILSON, R.; et al. Systematic review: hydroxyurea for the treatment of adults with sickle cell disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 48, p. 939–955, 2008.

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

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

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

LIMA, M. M., JR., OLIVEIRA, M. N., GRANJA, F.; et al. Lack of association of *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTO1*, *GSTP1* and *CYP1A1* polymorphisms for susceptibility and outcome in Brazilian prostate cancer patients. **Folia Biologica**, v. 54, p. 102-108, 2008.

LIU, R. M.; PRAVIA, K. A. G. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 1-15, 2010.

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

LOU, T. F.; SINGH, M.; MACKIE, A.; LI, W.; PACE, B. S. Hydroxyurea generates nitric oxide in human erythroid cells: mechanisms for gamma-globin gene activation. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, p. 1374–1382, 2009.

LOW, F. M., HAMPTON, M. B., PESKIN, A. V., WINTERBOURN, C. C. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. **Blood**, v. 109, p. 2611-2617, 2007.

MAGNO, L. A. V.; TALBOT, J.; TALBOT, T.; et al. Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population. **Pharmacology**, v. 83, p. 231-236, 2009.

MAHER, P. Redox control of neural function: background, mechanisms, and significance. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 8, n. 11-12, p. 1941-70, 2006.

MANFREDINI, V., LAZZARETTI, L. L., GRIEBELER, I. H.; et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **Journal of the National Medical Association**, v. 100, p. 897-902, 2008.

MANNERVIK, B.; ALIN, P.; GUTHENBERG, C.; *et al.* Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, v. 82, p. 7202-7206, 1985.

MANSOOR, M. A., SVARDAL, A. M.; UELAND, P. M. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 200, p. 218-229, 1992.

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

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

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

MO, Z.; GAO, Y.; CAO, Y.; GAO, F.; JIAN, L. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. **The Prostate**, v. 69, p. 662-668, 2009.

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



NAM, D. T., ARSENEAULT, M., MURTHY, V., RAMASSAMY, C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. **Current Molecular Pharmacology**, v. 3, p. 66-78, 2010.

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

NEMATI, H.; RAHIMI, Z.; BAHRAMI, G. The Xmn1 polymorphic site 5' to the  $G_{\gamma}$  gene and its correlation to the  $G_{\gamma}:\gamma^A$  ratio, age at first blood transfusion and clinical features in  $\beta$ -Thalassemia patients from Western Iran. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 01, p. 159-164, 2010.

NOCK, N. L.; BOCK, C.; NESLUND-DUDAS, C., et al. Polymorphisms in glutathione S-transferase genes increase risk of prostate cancer biochemical recurrence differentially by ethnicity and disease severity. **Cancer Causes & Control**, v. 20, p. 1915-1926, 2009.

NOGUCHI, C. T.; RODGERS, G. P.; SERJEANT, G.; SCHECHTER, A. N. Levels of fetal hemoglobin necessary for treatment of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, v. 318, p. 96-99, 1988.

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

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

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

OHENE-FREMPOG, 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, 1998.

OLD, J. M.; AYYUB, H.; WOOD, W. G., CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. Linkage analysis of nondeletion hereditary persistence of fetal hemoglobin. **Science**, v. 215, p. 981-982, 1982.

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

PADMOS, M. A.; ROBERTS, G. T.; SACKEY, K.; et al. Two different forms of homozygous sickle cell disease occur in Saudi Arabia. *British Journal of Haematology*, v. 79, p. 93–98, 1991.

PAGNIER, J.; MEARS, J. G.; DUNDA-BELKHODJA, O. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.**, v. 81, p. 1771–1773, 1984.

PEARSON, H. A.; GALLAGHER, D.; CHILCOTE, R.; et al. Developmental pattern of splenic dysfunction in sickle cell disorders. **Pediatrics** v. 76, p. 392-397, 1985.

PEGELOW, C. H.; COLANGELO, L.; STEINBERG, M.; *et al.* Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *American Journal of Medicine*, v. 102, p. 171–177, 1997.

PEMBLE, S.; SCHROEDER, K. R.; SPENCER, T. S. R.; *et al.* Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Biochemistry Journal**, v. 300 p. 271–276, 1994.

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

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. **Clinical. Chemistry.and Laboratory. Medicine**, 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. **New England Journal of Medicine**; v. 330, p. 1639–1644, 1994.

PLATT, O. S.; ORKIN, S. H.; DOVER, G.; et al. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anaemia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, p. 652–656, 1984.

PLATT, O. S.; THORINGTON, B. D.; BRAMBILLA, D. J.; et al. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *New England Journal of Medicine*, v. 325, p. 11-16, 1991.

POWARS, D. R.; HITI, A. Sickle cell anemia: beta S gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression. **American Journal of Diseases of Children**, v. 147, p. 1197–1202, 1993.

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

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

RAHGOZAR, S.; POORFATHOLLAH, A. A.; MOAFI, A. R.; OLD, J. M.  $\beta$ S gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. **American Journal of Hematology**, v. 65, p.192-195, 2000.

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

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

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

REITER, C. D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J. E.; *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1383–1389, 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, 1991.

REPKA, T.; HEBBEL, R. P. Hydroxyl Radical Formation by Sickle Erythrocyte-Membranes - Role of Pathological Iron Deposits and Cytoplasmic Reducing Agents. **Blood**, v. 78, p. 2753-2758, 1991.

RHEE, S. G., CHAE, H. Z., KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, p. 1543-1552, 2005.

RINALDI, R., ELIASSON, E., SWEDMARK, S., MORGENSTERN, R. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, p. 1053-1058, 2002.

RODGERS, G. P.; DOVER, G. J.; NOGUCHI, C. T., SCHECHTER, A. N.; NIENHUIS, A. W. Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. **New England Journal of Medicine**, v. 322, p. 1037–1045, 1990.

RODRÍGUEZ-ARIZA, A.; TORIBIO, F; LÓPEZ-BAREA, J. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 656, p. 311-318, 1994.

ROSSI, R., MILZANI, A., LE-DONNE, I.; et al. Different metabolizing ability of thiol reactants in human and rat blood - Biochemical and pharmacological implications. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 7004-7010, 2001.

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

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

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. **European Journal of Haematology**, v. 85, p. 529-537, 2010.

RUSHMORE, T. H.; PICKETT, C. B. Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 11475–11478, 1993.

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

SAMUEL, R. E.; SALMON, E. D.; BRIEHL, R. W. Nucleation and growth of fibres and gel formation in sickle cell haemoglobin. **Nature**, v. 345, p. 833–835, 1990.

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

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

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

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

SESS, E. D., CARBONNEAU, M. A., MEITE, M.; et al. Markers of lipid peroxidation, inflammatory proteins and plasma tocopherols in homozygotic and heterozygotic sickle cell anemia. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 91, p. 238-241, 1998.

SHARMA, V.; KUMAR, B.; SAXENA, R. Glutathione S-transferase gene deletions and their effect on iron status in HbE/beta thalassemia patients. **Annals of Hematology**, v. 89, p. 411-414, 2010.

SHIMAUTI, E. L. T., SILVA, D. G. H., ALMEIDA, E. A.; et al. Serum melatonin levels and oxidative stress in sickle cell anemia. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 45, n. 4, p. 297-301, 2010.

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

SOMJEE, S. S., WARRIER, R. P., THOMSON, J. L., ORY-ASCANI, J., HEMPE, J. M. Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 128, p. 112-118, 2005.

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

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

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

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, 129, 465-481, 2005.

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

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

STROUSE, J. J.; LANZKRON, S.; BEACH, M. C.; *et al.* Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. **Pediatrics**, v.122, p.1332–1342, 2008.

STUART, M. J.; NAGEL, R. Sickle-Cell Disease. *Lancet*, v. 364, p. 1343-1360, 2004.

STUART, M. J.; SETTY, B. N. Acute chest syndrome of sickle cell disease: new light on an old problem. **Current Opinion of Hematology**, v. 08, n. 02, p. 111-122, 2001.

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

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

TAMER, L., CALIKOGLU, M., ATES, N. A.; *et al.* Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (*GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*) as increased risk factors for asthma. **Respirology**, v. 9, p. 493-498, 2004.

TATUM, V. L.; CHOW, C. K. Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. **Free Radical Research**, v. 25, p. 133-139, 1996.

THEIN, S. L. Genetic modifiers of the b-haemoglobinopathies. *British Journal of Hematology*, v. 141, p. 357-366, 2008.

THEIN, S. L.; MENZEL, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. **British Journal of Haematology**, v. 145, p. 455-467, 2009.

THEIN, S. L.; WEATHERALL, D.J. **A non-deletion hereditary persistence of fetal hemoglobin (HPFH) determinant not linked to the beta-globin gene complex.** In: Hemoglobin Switching, Part B: Cellular and Molecular Mechanisms, pp. 97–111. New York, Alan R Liss, Inc., 1989.

THOM, S. R., KANG, M., FISHER, D.; ISCHIROPOULOS, H. Release of glutathione from erythrocytes and other markers of oxidative stress in carbon monoxide poisoning. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, p. 1424-1432, 1997.

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

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

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

VAN DELFT, P.; LENTERS, E.; BAKKER-VERWEIJ, M.; et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 31, p. 484-495, 2009.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 05, p. 1323-1338, 2007.

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

VENKATESHA, V. A., VENKATARAMAN, S., SARSOOR, E. H.; et al. Catalase ameliorates polychlorinated biphenyl-induced cytotoxicity in nonmalignant human breast epithelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 1094-1102, 2008.

VICHINSKY, E.; ONYEKWERE, O.; PORTER, J. B.; et al. A randomised comparison of deferasirox versus deferoxamine for the treatment of transfusional iron overload in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 136, n. 501–508, 2007.

WEATHERALL, D. J., CLEGG, J. B. The thalassemia syndromes. **Blackwell Scientific Publications**. 3<sup>a</sup> ed., p. 859, 1981.

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

WEATHERALL, D.; HOFMAN, K.; RODGERS, G.; RUFFIN, J.; HRYNKOW, S. A case for developing North-South partnerships for research in sickle cell disease. **Blood**, v. 105, p. 921-923, 2005.

WIENCKE, J. K.; KELSEY, K. T.; LAMELA, R. A.; *et al.* Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage. **Cancer Research**, v. 50, p. 1585–1590, 1990.

WISHNER, B.; WARD, K.; LATTMAN, E.; LOVE, W. Crystal structure of sickle-cell deoxyhemoglobin at 5 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 179–194, 1975.

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

WOOD, K. C.; HSU, L. L.; GLADWIN, M. T. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance, *Free Radical Biology Medicine*, v. 44, n. 8, p. 1506–1528, 2008.

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

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

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

ZENG, Y. T.; HUANG, S. Z.; REN, Z. R.; *et al.* Hydroxyurea therapy in beta-thalassaemia intermedia: improvement in haematological parameters due to enhanced beta-globin synthesis. **British Journal of Haematology**, v. 90, p. 557–563, 1995.

ZHONG, S. L.; ZHOU, S. F.; CHEN, X.; *et al.* Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. **European Journal of Pharmacology**, v. 28, p. 77-85, 2006.

ZHONG, S. L.; HOWIE, A.; KETTERER, B.; WOLF, C. R.; SPURR, N. K. Glutathione S-transferases mu locus: Use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1533–1537, 1991.



*Apêndices*

**APÊNDICE I - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido****Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Você está sendo convidado à participar como voluntário do projeto de pesquisa “**Expressão fenotípica da homozigose para hemoglobina S em relação aos haplótipos da beta globina, polimorfismos da glutathione S transferase e enzimas de detoxificação**” sob responsabilidade do pós-graduando Danilo Grünig Humberto da Silva. O estudo será realizado com amostras de sangue periférico para avaliar a expressão fenotípica de homozigotos para Hb S e a relação da diferença de seus valores de MDA e TEAC com os polimorfismos da GST, o uso de hidroxiureia e os haplótipos do grupamento beta, da ação dos antioxidantes enzimáticos, GST, Catalase, e, não enzimáticos, Glutathione. O risco é considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de mancha roxa no local da picada da agulha de coleta. Você poderá consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou por telefone, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. O material biológico cedido será armazenado e você poderá ser chamado para dar a sua autorização para novo(s) projeto(s). Caso isso seja impossível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 347/2005.

Diante das explicações, se você concorda em participar deste projeto, coloque sua assinatura a seguir e forneça os dados solicitados.

Nome: \_\_\_\_\_ R.G. \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.\_\_\_\_\_  
Usuário ou responsável legal\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

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

**Danilo Grünig Humberto da Silva****Cargo/função: Pós-graduando; Biólogo****Instituição IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas / UNESP – Universidade Estadual Paulista****Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – CEP: 15054-000.****Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP****São José do Rio Preto – fone 17-3221.2456 / 3221.2317**

**APÊNDICE II - Questionário**

**Questionário do projeto de Pesquisa “Expressão fenotípica da homozigose para Hemoglobina S em relação ao haplótipo da beta globina, polimorfismos da Glutathione S Transferase e enzimas de detoxificação”.**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Informações Pessoais**

Nome completo: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) feminino ( ) masculino

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade e estado onde mora: \_\_\_\_\_

Telefone residencial: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ Telefone comercial: (\_\_\_\_)  
\_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Local de nascimento (cidade, estado e país):  
\_\_\_\_\_**Histórico Clínico**Nº de crises de dor nos últimos 3 anos:  0 a 2  3 a 5  ≥ a 6

Data da última crise: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nº de infecções nos últimos 3 anos:  0 a 2  3 a 5  ≥ a 6

Data da último evento infeccioso:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nº de internações nos últimos 3 anos:  0 a 2  3 a 5  ≥ a 6

Motivo: \_\_\_\_\_ Data da última internação:

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pulmonar:

Síndrome Torácica Aguda  Não  Sim Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Cardíaca:

• Cardiomegalia  Não  Sim Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## Hepatobiliar:

- Cálculo Biliar  Não  Sim Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
- Colectomia  Não  Sim Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Neurológica:

- AVC  Não  Sim Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Osteoarticular:

- Osteonecrose  Não  Sim Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

## Cutânea:

- Úlcera isquêmica  Não  Sim Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_

## Urológica:

- Priapismo  Não  Sim Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Outra:

- Esplenectomia  Não  Sim Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Histórico Transfusional**

- Nº de unidades de concentrado de hemácias transfundidas até o início do estudo?

- 10  10 a 20  21 a 30  31 a 40  > 40

- Em regime regular de transfusão de hemácias?

- Não  Sim Intervalo: \_\_\_\_\_ Data da última transfusão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Medicamentos em uso**

- Hidroxiuréia:  Não  Sim Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_
- Desferroxamina (Desferal):  Não  Sim Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_
- Deferiprona (Ferriprox):  Não  Sim Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_
- Deferasirox (Exjade):  Não  Sim Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_
- Ácido fólico:  Não  Sim Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_
- Vitaminas:  Não  Sim Data última ingestão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Quais? \_\_\_\_\_

- Analgésicos:  Não  Sim Data última ingestão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Quais? \_\_\_\_\_

- Outros:  Não  Sim Data última ingestão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Quais? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

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

não

sim – Quais? \_\_\_\_\_

Fuma?  não  sim - A quanto tempo? \_\_\_\_\_

Toma bebidas alcoólicas?

não

sim - Quando foi a última vez que você ingeriu bebida alcoólica? \_\_\_\_\_

## APÊNDICE III - Planilhas

Planilha 1. Resultados dos testes laboratoriais e informações coletadas dos prontuários/questionários dos pacientes

ID	Procedência	Data de Coleta	Gênero	Idade	Etnia	Eletroforese		HPLC			Biologia molecular				
						pH 8,6	pH 6,2	Hb A2	Hb F	Hb A	Hb S	Hb S	Haplotipos	GSTM/T	GSTP
AF 1	Hemorio	03/12/2009	F	9	Multi	SF	SF	4,1	21,2	3,5	71,3	Homo	bantu/benin	NULO	I/V
AF 2	Hemorio	03/12/2009	F	27	Multi	S+A	SAF	3,7	5,2	34,4	51,5	Homo	benin/benin	M/M	I/V
AF 3	Hemocentro SJRP	09/11/09	F	28	Multi	SS	SS	2,6	3,2	4,1	90,2	Homo	bantu/atp1	M/M	V/V
AF 4	Hemocentro SJRP	30/11/09	M	54	Multi	SF	SF	3,6	16,2	3,4	76,9	Homo	bantu/benin	M/T	V/V
AF 5	Hemocentro SJRP	22/09/2009	F	21	Multi	SF	SF	3,6	3,8	5,2	88,2	Homo	bantu/bantu	M/M	I/I
AF 6	Hemocentro SJRP	19/10/09	F	65	Multi	SS	SS	5,9	2,1	3,8	88,7	Homo	benin/benin	M/T	V/V
AF 7	Hemocentro SJRP	14/09/2009	F	43	Multi	AS	AS	2,6	2,3	48,3	37,1	Homo	bantu/bantu	NULO	I/V
AF 8	Hemocentro SJRP	26/10/2009	F	30	Multi	SS F	SS F	3,2	11,1	1,4	82	Homo	bantu/bantu	M/M	I/I
AF 9	Hemocentro SJRP	26/10/2009	M	27	Multi	SS+F	SF	3,9	14,3	8,7	72,3	Homo	bantu/benin	NULO	I/I
AF 10	Hemorio	03/12/2009	M	24	Multi	SAF	SAF	4,4	3,3	13,7	76,2	Homo	bantu/bantu	T/T	V/V
AF 11	Hemocentro SJRP	19/10/2009	M	23	Multi	SS	SF	3,4	4	1,3	90,3	Homo	bantu/benin	M/M	I/V
AF 12	Hemocentro SJRP	23/11/09	M	12	Multi	SS	SS	4,9	4,8	2,4	87,4	Homo	benin/camer	M/T	I/V
AF 13	Hemorio	03/12/2009	F	9	Multi	SF	SF	4,4	20,6	3,7	71,5	Homo	bantu/benin	M/M	I/V
AF 14	Hemorio	03/12/2009	F	25	Multi	SS	SF	4,2	11	2,4	82,4	Homo	atp2/atp2	M/M	I/V
AF 15	Hemocentro SJRP	21/09/2009	M	11	Multi	SS + F	S + F	3,5	15,1	2	77,9	Homo	bantu/benin	M/M	I/V
AF 16	Hemorio	03/12/2009	F	47	Multi	SS + F	S + F	4,1	7,3	2,9	85,9	Homo	benin/atp3	M/M	V/V
AF 17	Hemocentro SJRP	15/09/2009	M	15	Multi	SAF	SAF	4,3	8,4	40,6	41	Homo	benin/atp2	M/M	I/I
AF 18	Hemocentro SJRP	01/09/2009	F	41	Multi	AS	AS	2,8	0,6	46,2	40,3	Homo	bantu/bantu	T/T	V/V
AF 19	Hemocentro SJRP	01/09/2009	F	47	Multi	SS	SS	4	3,7	1,5	89	Homo	bantu/benin	M/T	I/V
AF 20	Hemocentro SJRP	15/09/2009	F	19	Multi	SS F	SS F	3	10,8	2,8	83	Homo	bantu/bantu	M/M	I/V
AF 21	Hemocentro SJRP	01/09/2009	F	33	Multi	AS	AS	2,8	5,7	36,8	47,9	Homo	bantu/bantu	NULO	I/I
AF 22	Hemorio	03/12/2009	F	26	Multi	SF	SF	3,9	14,7	1,8	78,9	Homo	bantu/benin	M/T	I/V
AF 23	Hemorio	03/12/2009	M	23	Multi	SF	SF	3,1	18,6	2	75,8	Homo	bantu/benin	M/M	I/V
AF 24	Hemocentro SJRP	15/09/2009	F	20	Multi	SS F	SS F	3,7	7	2,2	84,8	Homo	bantu/bantu	M/T	V/V
AF 25	Hemorio	03/12/2009	M	29	Multi	SS	SS	5,5	1,8	1,7	90,2	Homo	benin/atp1	M/M	I/V
AF 26	Hemocentro SJRP	01/09/2009	F	25	Multi	SF	SF	2,9	13,3	3,2	79,5	Homo	atp2/atp2	T/T	I/V
AF 27	Hemocentro SJRP	23/11/09	M	20	Multi	SS	SS	5,0	1,6	3,0	90,8	Homo	atp2/atp2	M/M	I/V
AF 28	Hemocentro SJRP	19/10/09	M	17	Multi	SS	SS	5,1	2,8	1,5	90,1	Homo	bantu/benin	NULO	I/V

Legenda ID: identificação, F; feminino, M: masculino, Multi: multiétnicos, Homo: homozigoto para a mutação.

Continuação planilha 1.

ID	Análises Bioquímicas						Medicamentos						Transf. (meses)
	TBARS (ng/mL)	TEAC (mM)	GST (U/mL)	Catalase (U/mL)	GSH (µM)	HU	Per. Exp. (meses)	DFO	DFP	DFX	Vitaminas	Ácido Fólico	
AF 1	661,96	2,04	1,45	2338,03	0,69	S	12	N	N	N	N	S	24
AF 2	1616,62	2,17	1,44	2278,17	1,10	S	12	N	N	N	N	S	12
AF 3	1287,00	1,95	1,18	2017,61	0,87	N	----	N	N	N	N	S	24
AF 4	1493,00	2,20	1,02	2088,03	0,84	N	----	N	N	N	N	S	12
AF 5	1762,00	1,82	0,55	2179,58	0,84	N	----	N	N	N	N	S	12
AF 6	1222,00	2,09	1,65	2570,42	0,74	N	----	N	N	N	N	S	2
AF 7	2865,00	2,01	2,12	1010,56	1,35	N	----	N	N	S	N	S	2
AF 8	2269,00	1,95	2,05	1376,76	0,26	N	----	N	N	N	N	S	2
AF 9	1138,00	1,78	1,83	2823,94	0,14	S	36	N	N	N	N	S	6
AF 10	884,37	2,20	1,53	2500,00	1,31	S	14	N	N	N	N	S	36
AF 11	2063,00	1,99	2,18	2193,66	0,21	N	----	N	N	N	N	S	48
AF 12	934,00	1,90	2,00	996,48	0,70	N	----	N	N	N	N	S	36
AF 13	886,47	2,06	1,21	2179,58	1,16	S	12	N	N	N	N	S	25
AF 14	1308,00	1,97	1,51	1866,20	0,37	S	15	N	N	N	N	S	25
AF 15	1998,00	1,91	0,52	1922,54	0,24	S	12	N	N	S	N	S	12
AF 16	1216,92	2,10	1,92	1880,28	0,88	S	12	N	N	N	N	S	25
AF 17	1012,00	2,01	2,00	1084,51	0,22	S	25	N	N	N	N	S	12
AF 18	1518,00	2,15	1,00	985,92	1,30	S	12	S	N	N	N	S	2
AF 19	2143,00	1,88	1,16	1306,34	0,62	N	----	N	N	N	N	S	2
AF 20	2136,00	2,12	2,33	1911,97	0,94	N	----	N	N	N	N	S	12
AF 21	1943,00	1,75	1,48	1651,41	0,47	N	----	N	N	S	N	S	2
AF 22	671,41	2,17	2,38	2204,23	0,74	S	18	N	N	N	N	S	15
AF 23	1041,73	2,20	1,58	2295,77	0,75	S	22	N	N	N	N	S	25
AF 24	2731,00	1,91	3,65	1806,34	0,78	N	----	N	N	N	N	S	2
AF 25	1524,30	2,20	1,20	1531,69	0,19	S	22	N	N	N	N	S	25
AF 26	1998,00	2,04	0,89	1570,42	0,38	N	----	N	N	N	N	S	8
AF 27	1154,00	1,49	2,01	926,06	0,26	N	----	N	N	N	N	S	9
AF 28	1563,00	2,27	0,73	1781,69	1,70	N	----	N	N	N	N	S	12

Legenda: ID: Identificação; HU: hidroxureia, DFO: desferroxamina, DFP: deferiprona, DFX: deferasirox, Prod. Químico: contato com produtos químicos; Per. Exp.: período de exposição à HU a partir da data da coleta da amostra. Transf.: última transfusão sanguínea antes da data da coleta.

Continuação planilha 1.

ID	Interferentes Ambientais				Manifestações clínicas						
	Fumo	Álcool	Prod. Químico	Crises de dor	STA	Colecistectomia	AVE	Osteonecrose	Úlcera de Perna	Esplenectomia	Priapismo
AF 1	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 2	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 3	N	N	N	>6	N	S	N	N	S	N	-----
AF 4	N	N	N	>6	N	N	N	N	S	N	N
AF 5	N	N	N	0 a 2	N	S	N	N	S	N	-----
AF 6	N	N	N	0 a 2	N	S	N	N	N	S	-----
AF 7	N	N	N	>6	N	S	S	N	N	S	-----
AF 8	N	N	N	>6	S	S	N	N	N	N	-----
AF 9	N	N	N	>6	S	S	N	N	S	N	N
AF 10	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 11	N	N	N	0 a 2	N	N	N	N	N	N	N
AF 12	N	N	N	>6	N	N	N	N	N	N	N
AF 13	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 14	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 15	N	N	N	>6	N	N	S	N	N	S	N
AF 16	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 17	N	N	N	3 a 5	N	N	N	N	N	N	N
AF 18	N	N	N	0 a 2	N	S	S	N	S	S	-----
AF 19	N	N	N	3 a 5	N	S	N	N	S	N	-----
AF 20	N	N	N	0 a 2	N	N	N	N	N	N	-----
AF 21	N	N	N	>6	S	N	N	S	S	N	-----
AF 22	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 23	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 24	N	N	N	0 a 2	S	S	N	N	N	N	-----
AF 25	N	N	N	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF 26	N	N	N	>6	S	N	N	N	N	N	-----
AF 27	N	N	N	3 a 5	S	N	N	S	N	N	S
AF 28	N	N	N	>6	N	S	N	N	N	N	N

Legenda: ID: identificação; STA: síndrome torácica aguda; AVE: acidente vascular encefálico



**Planilha 2.** Resultados dos testes laboratoriais e informações coletadas dos questionários dos indivíduos do grupo controle.

ID	Gênero	Idade	Etnia	HPLC			Biologia molecular			Análises bioquímicas				
				Hb A	Hb F	Hb A <sub>2</sub>	GSTM1/T1	GSTP1	TBARS (ng/mL)	TEAC (mM)	GST (U/mL)	Catalase (U/mL)	GSH (µM)	
GC1	F	19	Mult.	97,4	0,0	2,6	M/T	I/I	112,00	1,79	1,13	2542,25	0,28	
GC2	M	23	Mult.	95,3	2,1	2,6	NULO	I/I	246,00	1,70	2,74	2528,17	0,18	
GC3	M	22	Mult.	97,6	0,0	2,4	M/M	I/I	301,00	2,03	1,24	2612,68	0,38	
GC4	M	18	Mult.	94,8	2,5	2,7	T/T	I/V	43,00	2,02	1,70	2464,79	0,39	
GC5	M	23	Mult.	95,0	0,9	2,4	T/T	I/V	88,00	2,00	2,30	2644,37	0,09	
GC6	F	19	Mult.	97,6	0,0	2,4	T/T	I/I	236,00	1,87	1,78	2373,24	0,64	
GC7	M	22	Mult.	95,1	2,3	2,6	T/T	I/I	15,00	2,10	0,63	2612,68	1,73	
GC8	F	20	Mult.	95,0	1,2	2,5	NULO	I/I	60,00	1,70	1,00	2352,11	0,23	
GC9	F	19	Mult.	94,8	2,4	2,8	M/M	I/I	0,00	2,18	1,46	1876,76	0,21	
GC10	F	18	Mult.	95,2	2,3	2,5	M/T	I/V	210,00	1,83	1,07	2345,07	0,22	
GC11	F	23	Mult.	95,1	0,0	2,6	T/T	I/I	144,00	1,75	1,23	2401,41	0,09	
GC12	F	21	Mult.	95,0	2,4	2,6	M/M	V/V	451,00	2,07	2,22	2489,44	1,02	
GC13	F	24	Mult.	95,5	1,9	2,6	M/T	I/I	333,00	1,75	0,20	2345,07	0,40	
GC14	F	20	Mult.	95,6	1,9	2,5	T/T	I/I	310,00	1,88	1,84	2778,17	0,23	
GC15	M	21	Mult.	95,0	2,5	2,5	T/T	I/I	502,00	1,83	2,40	2366,20	0,29	
GC16	M	21	Mult.	96,2	0,7	2,8	M/M	I/I	0,00	1,86	1,47	2482,39	0,59	
GC17	M	19	Mult.	95,0	2,4	2,6	M/T	I/I	231,00	2,20	1,10	1904,93	0,20	
GC18	F	20	Mult.	97,3	0,0	2,7	T/T	I/I	122,00	1,82	3,14	2982,39	0,24	
GC19	M	18	Mult.	97,2	0,0	2,8	T/T	I/I	279,00	2,00	0,47	1693,66	0,29	
GC20	M	21	Mult.	97,4	0,0	2,6	T/T	I/V	221,00	1,79	1,91	2147,89	0,61	
GC21	F	22	Mult.	96,7	0,0	3,6	M/T	I/V	269,00	1,97	1,88	2542,25	0,34	
GC22	F	26	Mult.	96,2	0,5	3,6	M/T	I/I	191,00	1,98	1,81	2802,82	0,35	
GC23	F	18	Mult.	96,6	0,3	3,5	T/T	I/V	270,00	1,82	0,47	1897,89	0,02	
GC24	F	19	Mult.	96,8	0,0	3,6	M/T	I/I	241,00	1,93	1,25	2169,01	0,00	
GC25	F	21	Mult.	97,4	0,0	2,6	T/T	I/V	465,00	1,71	1,33	2514,08	0,53	
GC26	F	18	Mult.	95,3	2,1	2,6	T/T	I/I	146,00	1,65	2,26	2348,59	0,68	
GC27	F	23	Mult.	97,6	0,0	2,4	M/M	I/I	295,00	1,67	1,26	2281,69	0,16	
GC28	F	25	Mult.	94,8	2,5	2,7	M/M	I/I	21,00	1,85	0,82	1676,06	0,29	
GC29	M	20	Mult.	96,8	0,0	3,6	T/T	I/I	203,00	1,89	2,12	2485,92	0,00	
GC30	F	19	Mult.	97,4	0,0	2,6	M/M	I/V	158,00	1,98	0,89	2672,54	0,10	
GC31	F	45	Mult.	95,1	1,9	2,6	NULO	I/I	371,00	1,76	0,70	2165,49	0,11	
GC32	F	19	Mult.	95,0	1,4	2,4	M/M	I/I	306,00	1,91	2,67	2517,61	0,22	
GC33	F	20	Mult.	96,2	0,0	2,4	NULO	I/V	634,00	2,04	1,44	2380,28	0,33	

Legenda ID: identificação, F: feminino, M: masculino, Multi: multiétnicos

ID	Gênero	Idade	Etnia	HPLC			Biologia molecular		Análises bioquímicas				
				Hb A	Hb F	Hb A <sub>2</sub>	GSTM1/T1	GSTP1	TBARS (ng/mL)	TEAC (mM)	GST (U/mL)	Catalase (U/mL)	GSH (μM)
GC34	F	22	Mult.	96,2	2,2	2,8	M/T	I/I	174,00	1,87	1,72	2010,56	0,56
GC35	F	23	Mult.	95,0	1,1	2,6	T/T	I/V	97,00	1,91	1,19	2489,44	0,16
GC36	F	26	Mult.	97,3	0,0	2,7	T/T	I/I	0,00	1,66	1,31	2852,11	0,21
GC37	F	24	Mult.	97,2	0,0	2,8	NULO	I/I	58,00	1,97	1,48	2144,37	0,17
GC38	M	22	Mult.	95,0	2,4	2,6	M/M	I/I	563,00	2,05	1,76	2661,97	0,00
GC39	M	24	Mult.	95,5	1,9	2,6	M/M	I/V	235,00	2,11	3,73	2883,80	0,40
GC40	M	24	Mult.	97,4	0,0	2,6	NULO	I/I	245,00	2,00	1,15	2059,86	0,44
GC41	F	18	Mult.	95,3	0,9	2,6	M/M	I/I	660,50	1,69	1,88	2292,25	0,11
GC42	M	20	Mult.	97,6	0,0	2,4	T/T	I/I	100,00	2,07	1,91	2457,75	0,11
GC43	M	23	Mult.	94,8	2,5	2,7	NULO	I/V	261,00	2,02	0,22	2292,25	0,98
GC44	M	25	Mult.	95,0	1,6	2,4	T/T	I/I	209,00	2,10	1,04	2792,25	0,50
GC45	M	22	Mult.	97,6	0,0	2,4	M/M	I/I	444,00	1,78	2,01	2704,23	0,49
GC46	F	21	Mult.	94,8	1,2	2,7	T/T	V/V	211,00	1,90	1,35	2179,58	0,40
GC47	F	27	Mult.	96,8	0,0	3,6	NULO	I/I	148,00	1,80	1,90	2485,92	0,24
GC48	M	22	Mult.	97,4	0,0	2,6	M/M	I/I	336,00	1,91	0,97	1264,08	0,91

Legenda ID: identificação, F: feminino, M: masculino, Multi: multiétnicos

**APÊNDICE IV – Artigo de qualificação****Relationship between oxidative stress, glutathione S-transferase polymorphisms and hydroxyurea treatment in sickle cell anemia**

Danilo Grunig Humberto Silva<sup>1,4</sup>

Edis Belini Junior<sup>1</sup>

Lidiane de Souza Torres<sup>1</sup>

Octávio Ricci Júnior<sup>2</sup>

Clarisse de Castro Lobo<sup>3</sup>

Claudia Regina Bonini-Domingos<sup>1</sup>

Eduardo Alves de Almeida<sup>4</sup>

<sup>1</sup> UNESP - Sao Paulo State University, Department of Biology, Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases Laboratory, Sao Paulo, Brazil.

<sup>2</sup> Sao Jose do Rio Preto Medical School - FAMERP, Department of Medicine, Sao Paulo, Brazil.

<sup>3</sup> Hematological State Institute “Arthur de Siqueira Cavalcanti” – HEMORIO, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>UNESP - Sao Paulo State University, Department of Chemistry and Environmental Sciences, Sao Paulo, Brazil.

Corresponding Author:

Eduardo Alves de Almeida

Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jardim Nazareth

CEP: 15054-000 Sao Jose do Rio Preto – Sao Paulo - Brasil

Telefone: +55-17-3221-2508

e-mail: [ealmeida@ibilce.unesp.br](mailto:ealmeida@ibilce.unesp.br)

**Abstract**

This study evaluated, in sickle cell anemia (SCA) patients, the oxidative stress and antioxidant capacity markers. We also correlated the results with hydroxyurea (HU) therapy. We assess GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms comparing with control group. The studied groups were composed of 48 subjects without hemoglobinopathies and 28 SCA patients, thirteen treated with HU [SCA (+HU); n=13], and fifteen SCA patients not treated with HU [SCA (-HU); n=15]. We observed significantly difference for GSTP1 polymorphisms in SCA patients with the V/V genotype that showed higher GSH and TEAC levels ( $p=0.0445$  and  $p=0.0360$ , respectively) compared with the I/I genotype. HU use provides a 35.2% decrease in the lipid peroxidation levels on the SCA (+HU) group ( $p<0.0001$ ). Moreover, the SCA (+HU) group showed higher TEAC levels as compared to the control group ( $p=0.002$ ). We did not find any significant difference in GST activity between the studied groups ( $p=0.76$ ), but the CAT activity was about 17% and 30% decreased in the SCA (+HU) and SCA (-HU) groups, respectively ( $p<0.00001$ ). Whereas the plasma GSH levels were ~2 times higher in the SCA patients than the control group ( $p=0.0005$ ). The HU use has contributed to higher CAT activity and TEAC levels, and lower lipid peroxidation in patients under treatment. These findings may contribute to highlight the influence of HU in ameliorating oxidative stress on SCD subjects.

**Key words:** sickle cell anemia, oxidative stress, hydroxyurea, GST polymorphisms

## Introduction

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

Normal RBCs are usually subjected to oxidative stress as a result of the continuous reactive oxygen species (ROS) production that accompanies the Hb autoxidation, a condition that increases in SCA, due to sickle Hb polymerization and depolymerization cycles, hemolysis, intravascular sickling and transient vaso-occlusive events that promote ischemia/reperfusion injury [3-5] with consequent vascular endothelial cell activation and injury that induce a continuous inflammatory response in the SCA individual that is propagated by elevated levels of inflammatory cytokines, a decreased nitric oxide bioavailability and oxidative stress [6].

Among the SCA-derived oxidative stress consequences are the increase in membrane lipid peroxidation levels and alterations in antioxidant defense systems like glutathione (GSH) levels and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) [7].

Due in part to this multifaceted pathophysiology, effective treatment against the primary disease process in SCA has only recently been pointed up hydroxyurea (HU) administration is considered one of the most successful therapies for SCA patients [8,9]. The pharmacologic effects that may contribute to the efficacy of HU in SCA treatment includes the induction of Hb F production and increase in RBC water content (which reduces the polymerization of Hb S). The HU also increases

microvascular navigation of sickled cells, and decreases RBC adhesion to endothelium by diminishing the expression of endothelial adhesion molecules [9,10].

Glutathione S-transferases (GSTs) constitute multifunctional enzymes that are coded by at least eight distinct loci:  $\alpha$  (*GSTA*),  $\mu$  (*GSTM*),  $\theta$  (*GSTT*),  $\pi$  (*GSTP*),  $\sigma$  (*GSTS*),  $\kappa$  (*GSTK*),  $\omega$  (*GSTO*), and  $\zeta$  (*GSTZ*), each of which composed by one or more homodimeric or heterodimeric isoforms [11,12]. These enzymes are involved in the conjugation reactions during the phase II of the xenobiotic metabolism, catalyzing reactions between GSH and a variety of potentially toxic and carcinogenic electrophilic compounds [13,14], besides, GSTs also display GPx activity and can thus protect from oxidative damage [15]. The deficiency in the activity of this enzyme can be derived from the inherited GSTs polymorphisms, e.g., *GSTT1* (22q11.23), *GSTM1* (1q13.3) and *GSTP1* (11q13), and associations between *GSTM1* and/or *GSTT1* null genotypes with iron overload in HbE/ $\beta$  thalassemia patients has been reported. Patients presenting null genotype for both the alleles (*GSTT1/GSTM1*) had significantly higher serum iron and serum ferritin levels compared to patients with normal genotype for GST deletions [16].

SCA is characterized by chronic oxidative stress caused by an imbalance between ROS production and the activity of antioxidant enzymes. However, the few studies that have examined antioxidant enzymes in SCA patients have found contradictory results. Manfredini et al. [17] showed that SCA patients had significant higher GPx and SOD activities than healthy controls and no difference in the CAT activity, while Alsultan et al. [18] found that the mean activity values of SOD, CAT and GPx were significantly decreased in SCA patients.

There are no reports about the influences of *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* polymorphisms on oxidative stress parameters in SCA patients. Therefore, the goal

of this study was to evaluate, in SCA patients, the oxidative stress and antioxidant capacity markers, correlating them with HU treatment and *GSTT1*, *GSTM1* and *GSTP1* polymorphisms compared with the control group.

## **Methods**

### ***Subjects***

Seventy-six Brazilian subjects were included in the study (30 males and 46 females; mean age: 23.8 years old; range: 9 – 65 years old). They were from the northwest region of Sao Paulo state and southwest region of Rio de Janeiro state in Brazil. The test group was composed by 28 SCA patients (11 males and 17 females; mean age: 27.7 years old) in clinical follow-up in São Jose do Rio Preto (SP) and Rio de Janeiro (RJ). The control group was composed by 48 subjects without hemoglobinopathies living also in the northwest region of Sao Paulo state (19 males and 29 females; mean age: 21.9 years old).

All the patients were screened using a questionnaire, and were excluded if they were smokers, drinkers, or had had stroke. They were also asked for pain crisis, hemolytic crisis, and if they received blood transfusion in the last two months. The medications used were also accessed, and those taking medication known to affect the analyzed parameters were excluded from the study. All subjects gave their informed consent, and the study was approved by the Data Safety Monitoring Board (DSMB) according to Brazilian Regulations.

All SCA patients received the same medication support and were then separated into two groups: SCA patients treated with HU [SCA (+HU); n=13], and SCA patients not treated with HU [SCA (-HU); n=15].

### ***Biological samples***

Blood samples (11 mL) were collected through venipuncture in heparinized and EDTA tubes. The heparinized blood (7 mL) was incubated for 20 min at 37 °C and then centrifuged at 206 g for 20 min to separate the plasma for the TBARS and TEAC analysis. The EDTA sample fraction (4 mL) was aliquoted, being 2 mL used for the hemoglobinopathies tests, genotypic determination and enzymatic activities analysis. The other 2 mL was submitted to centrifugation at 825 g for 10 min to obtain the plasma and then were frozen at -80 °C for GSH levels determination.

### ***Hemoglobin phenotypes and genotypes***

Hb identification was performed using electrophoresis on cellulose acetate pH 8.4, and agar electrophoresis at pH 6.2. The Hb fraction quantification was obtained using high performance liquid chromatography (HPLC) by the automated VARIANT™ equipment (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) [19]. Cell morphology microscopic analysis was performed on the stained blood using May-Grünwald-Giemsa. In all patient samples, the Hb genotype was developed by molecular analysis using PCR-RFLP. The segment amplification that encodes Hb S was accomplished by specific oligonucleotídeos iniciadores, and the amplicon was cleaved by the Ddel restriction endonuclease (New England BioLabs, MA, USA) [20].

### ***Glutathione S-Transferase Polymorphism Genotyping***

The genetic polymorphism analysis for the *GSTM1* and the *GSTT1* genes was determined simultaneously in a single assay using a multiplex PCR approach with a housekeeping *CYP1A* gene co-amplification as an internal control [21].



*GSTP1* polymorphism was performed using PCR-RFLP and the specific oligonucleotídeos iniciadores for exon 5 (Ile105Val). Following PCR, the product was digested with BsmA1 restriction endonuclease (New England BioLabs, MA, USA). The digest was submitted to an electrophoresis on a 3.5% agarose gel containing ethidium bromide [22].

### ***Biochemical analysis***

Lipid peroxidation levels were assessed in heparinized plasma using the thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) assay [23]. Antioxidant capacity was also determined in heparinized plasma samples according to their equivalence to Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) [24]. For the total GST activity, the blood samples were diluted in an 3.5  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol 10  $\mu\text{M}$  NADP 2.7 mM EDTA hemolyzing solution (1:20, v/v) and then assayed using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate at 340 nm. The assay was carried out in 0.2 M K-phosphate buffer, pH 6.5, 1 mM CDNB, 1 mM GSH ( $\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [25]. For the analysis of CAT activity, blood samples were diluted in ultrapure water (1:50, v/v) and then 10  $\mu\text{L}$  was used to measure CAT activity, by the decrease in absorbance at 240 nm ( $\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) due to the consumption of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 1 M Tris-HCl buffer pH 8.0 containing 5 mM EDTA) [26].

GSH concentration was determined in EDTA plasma samples using HPLC coupled to a coulometric electrochemical detector (Coulochem III ESA, Bedford, MA) according to Rodríguez-Ariza et al. [27]. Under these conditions, GSH clearly eluted ~6 min. GSH was extracted from the plasma samples by adding perchloric acid to the plasma sample (10% final concentration). After vigorous stirring and 10 min on ice, the mixture was centrifuged at 8000 rpm for 10 min at 4°C. The extract was then

filtered through Millex syringe filter units (0.22  $\mu\text{m}$ ) and directly injected into the HPLC system. The calculations were based on a calibration curve previously constructed by injecting authentic GSH standards into the HPLC system.

### ***Statistical Analysis***

Statistical analysis was performed using the Statistica 9.0 software (Statsoft Inc.). Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation and were tested for normal distribution using the Shapiro Wilk test. Data were also tested for homogeneity of variances using the Levene test. Means between the groups were compared by applying the t test or one-way ANOVA followed by the post hoc Tukey test for parametric data, and the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis followed by the post hoc Dunn test for non-parametric data. To assess the degree of association between the studied variables, we used the Pearson correlation for parametric data and the Spearman correlation for non-parametric data and linear regression. To compare the GST genotypes between the studied groups Pearson Chi-square test supplemented by Fisher's exact test was used. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

### **Results and discussion**

The hemoglobin fraction values of studied groups are detailed in Table 1. All hemoglobin parameters were significantly different between the groups, as expected, confirming the previously well-described HU effect (Hb F contents increase) that improves patients' clinical conditions [9]. It is interesting to note the high Hb F levels in the SCA (-HU) group which may have been influenced by non-target factors in this study, such as the three major loci – Xmn1-HBG2 single nucleotide polymorphism,

HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q, and BCL11A – that contribute 20–50% of the trait Hb F variance in SCA patients [28].

It should be mentioned that the Hb A<sub>2</sub> levels was slightly higher than expected for SCA, and this is due to the automated HPLC characteristics in which Hb S acetylated subfractions elute at the Hb A<sub>2</sub> window increasing Hb A<sub>2</sub> levels [29], and the high Hb A levels observed in both SCA groups are transfusion remnant, because the blood transfusion are indispensable and very frequent SCA treatment.

Human GSTs have been well characterized as ethnic-dependent polymorphism frequencies [30] and largely divergent among populations around the world [31]. The gene distribution of GST polymorphisms in this study is summarized in Table 2.

The frequency data obtained for the controls control group are similar to those described in the scientific literature whereas the SCA patients group presented lower frequencies for the null *GSTM1* (21.6%) and I/I (17.9%) genotypes when compared with the frequencies obtained for Brazilian population, which demonstrated a genotypic distribution for *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms ranging from 42 to 73% for null *GSTM1*, 25 to 47% for null *GSTT1*, and 9 to 41% for null genotype for both genes. The *GSTP1* polymorphism frequencies in these individuals ranged from 40 to 62% for I/I genotype, 30 to 46% for I/V and 6 to 17% for V/V [30,32-35]. However, this is the first study reporting the *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms frequency in SCA patients and the significant difference when compared with the control group.

The association of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms with various diseases such as cancer and inflammatory diseases, and responses in the metabolism, efficacy and toxicity of certain drugs have been widely investigated [36-

38] but few studies have investigated their relationship with oxidative stress parameters. Bessa et al. [39] showed that subjects with null *GSTM1* and *GSTT1* or null genotype for both genes had significantly lower erythrocyte GST activity than those with *GSTM1+/GSTT1+*, and also higher lipid peroxidation levels, lower erythrocyte GSH levels and decreased activities of CAT, SOD and GPx, whereas there was no significant difference in these oxidative stress-related parameters between the *GSTM1* and *GSTT1* genotypes.

Thus, we investigated the influence of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms on the oxidative stress parameters (TBARS, TEAC and GSH plasma levels, and activities of CAT and GST) in the control group and SCA patients (Table 3). Our results showed that the GST polymorphisms did not influence significantly on any of the biochemical markers in the control group, whereas in SCA patients, we observed significant difference only for *GSTP1* polymorphisms. SCA patients with the V/V genotype showed higher GSH and TEAC levels ( $p = 0.0445$  and  $p = 0.0360$ , respectively) compared with the I/I genotype, indicating a possible correlation between these polymorphisms with oxidative stress in SCA patients. However, because the studies on the influence of GST polymorphisms on oxidative processes are very scarce, further researches are needed to better address this hypothesis.

Although oxidative stress and alterations in the activities of antioxidant enzymes have been extensively described in SCA, the results are sometimes contradictory, and their relationship with HU treatment remains unclear. We, therefore, examined the lipid peroxidation levels (TBARS) and the antioxidant capacity (TEAC levels, GST and CAT activities, and plasma GSH levels) in a control group (CG;  $n = 48$ ), SCA patients treated with HU [SCD (+HU);  $n = 13$ ], and SCA patients not previously treated with HU [SCA (-HU);  $n = 15$ ] (Figure. 1).

High levels of lipid peroxidation in SCA patients were largely reported [17,18,40,41], but we demonstrated in this study that the use of HU provides a 35.2% decrease in the lipid peroxidation levels on the SCA (+HU) group ( $p < 0.0001$ ), confirming its antioxidants property *in vivo*, as previously reported by Agil and Sadrzadeh [42] in a RBC model. Moreover, the SCA patients presented higher TEAC levels when compared to the control group, and a low and positive correlation with TBARS levels ( $r = 0.22$ ,  $p = 0.04$ ) (Figure 2-A), in accordance with a recent publication by our group [43].

The significant increase in TEAC levels in the SCA (+HU) group compared to the control group ( $p = 0.002$ ) is probably due to the antioxidant property of HU, counteracting the high levels of ROS generated by the disease. However, further studies are needed to understand this phenomenon.

The main role of GSTs in cells is related to the detoxification of xenobiotics and lipoperoxidation products, despite some isoforms also contain peroxidase activity [15,44]. Because of this, the evaluation of GSTs has been used as important biomarker of oxidative stress in many human diseases such as hypertension [39], Alzheimer's disease [45], non-alcoholic fatty liver disease [46], and also cancer [47]. As in SCA, all these diseases are also characterized by chronic inflammation closely associated with oxidative stress. However, there are no reports on the evaluation of GST activity in SCA patients. We did not find any significant difference in GST activity between the studied groups ( $p = 0.76$ ), suggesting that this enzyme was not affected by the disease. Despite oxidative stress was characterized in SCA patients and GST accounts for antioxidant defenses, it may be hypothesized that other antioxidant enzymes present in RBC such as SOD, CAT, GPx and peroxiredoxin [48-50] have a more prominent role on the oxidative stress responses. However this remains

unsolved and should be accessed by other studies. Also, it should be mentioned that GST activity was measured by using CDNB as substrate, which is a general substrate for several GST isoforms. Further studies using specific substrates for different GST isoform are needed, for a better comprehension on the effects of SCA-derived oxidative stress on GST modulation.

The activity of CAT was about 17% and 30% decreased in the SCA (+HU) and SCA (-HU) groups, respectively ( $p < 0.00001$ ), in agreement with the findings of Alsultan et al [18] in SCA patients and with Dasgupta et al [5] in transgenic sickle mouse models. Contrariwise, Manfredini et al. [17] and Cho et al [51] did not observe differences in CAT activity between the evaluated control and SCA groups.

The statistical correlation and linear regression analysis between CAT activity and TBARS levels showed a negative correlation between these parameters ( $r = -0.56$ ,  $p < 0.00001$ ), in which the increase in TBARS levels can be 31% explained by the decrease of CAT activity ( $R^2 = 0.31$ ,  $p = 0.00001$ ) (Figure 2-B). Reduction in the CAT activity was also observed in inflammatory bowel disease [52] and may be due to its consumption by ROS generated by the chronic inflammatory process in these disorders. The HU seems to participate in the antioxidant defense, avoiding CAT consumption, since the SCA (+HU) group showed higher CAT activity than the SCA (-HU) group, but without statistical difference. Venkatesha et al [53] submitted cultures of human non-malignant breast epithelial cells to high ROS levels and observed a significant increase in micronuclei frequency and in histone 2AX-phosphorylation. When these cells culture were treated with CAT, it was showed that CAT blunted cell damages, validating its antioxidant action.

The tripeptide GSH is a very abundant intracellular free thiol that plays a critical role in regulating a variety of cellular functions, including xenobiotic

detoxification, the synthesis of DNA and other endogenous compounds, modulation of gene expression, and the regulation of cell cycle. However, the most important and well-known function of GSH is as a non-enzymatic antioxidant [54]. There are several reports on the evaluation of erythrocyte or tissues GSH levels in SCA patients and transgenic mice [5,55-58], but to our knowledge, the present study was the first that have correlated plasma GSH levels with biochemical parameters in SCA. Human plasma contains very low GSH concentrations, in the range of 0.1 to 20 $\mu$ M [59], which are consistent with our data. The plasma GSH levels were ~2 times higher in the SCA patients than the control group ( $p = 0.0005$ ), and showed a positive correlation with the TBARS levels ( $r = 0.37$ ,  $p = 0.0008$ ) (Figure 2-C), that may be due to arising of the characteristic hemolytic process of the SCA pathophysiology or a response to chronic stress, confirming its antioxidant function.

RBCs can synthesize GSH from cysteine, glycine and glutamic acid since they contain all the enzymes necessary for its biosynthesis, and a significant percentage of their GSH is produced *de novo* daily [60]. Furthermore, both glutathione disulfide (GSSG) and glutathione conjugates (GS-X) are actively exported from RBCs when their intracellular concentration is high. This *de novo* re-synthesis may balance the GSH loss due to GSSG and GS-X export, and is regulated by a feedback mechanism [61,62]. Giustarini et al [63] demonstrated that RBCs significantly contribute to the plasma pool of GSH and suggested that abnormalities in RBCs can influence the plasma GSH levels, thus SCA may interfere in the GSH *de novo* re-synthesis feedback mechanism. Dumaswala et al [64] showed *in vitro* that supplementing the conventional additive with GSH precursor amino acids improved RBC GSH synthesis and maintenance, preventing RBC scavenging function which can be committed by ROS. However, further studies are needed to better understand this mechanism.

In conclusion, we observed significant differences in the biochemical parameters evaluated in SCA, except for GST activity. We suggest that these parameters may play important roles in other  $\beta$ -hemoglobinopathies or hemolytic anemia, which have involvement with oxidative stress, but this remains to be further investigated. The use of HU improved the antioxidant defenses, also contributing for a higher CAT activity and TEAC levels, and a lower lipid peroxidation in SCA patients. With the evidence of these results, we also suggest that GSH can be used as an adjunct in reducing oxidative stress, improving the oxidative and inflammatory status of the disease.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the following Brazilian foundations: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant 409691/2006-2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2006/03873-1), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Ministry of Health (grant MS 3072/2007) for their financial support.

### **Abbreviations list**

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
CAT - catalase  
CDNB - 1-chloro-2,4-dinitrobenzene  
CG – control group  
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
DNA - deoxyribonucleic acid  
EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid  
FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
GPx – glutathione peroxidase  
GSH - glutathione  
GSSG – glutathione  
GST – glutathione S-transferase  
*GSTM1*<sup>-</sup> – null genotype for *GSTM1*  
*GSTM1*<sup>+</sup> – wild genotype for *GSTM1*  
*GSTT1*<sup>-</sup> – null genotype for *GSTT1*



*GSTT1+* – wild genotype for *GSTT1*  
GS-X - glutathione conjugates  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - hydrogen peroxide  
Hb - hemoglobin  
Hb F – fetal hemoglobin  
HCl - hydrochloric acid  
HPLC – high performance liquid chromatography  
HU - hydroxyurea  
I/I - wild homozygous genotype for *GSTP1*  
I/V - heterozygote genotype for *GSTP1*  
MS – Ministério da Saúde  
NADP - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
PCR-RFLP – Polymorphism Chain Reaction-Restriction Fragment Length  
Polymorphism  
RBCs – Red blood cells  
ROS – reactive oxygen species  
SCA – sickle cell anemia  
SCA (+HU) – sickle cell anemia individual treated with HU  
SCA (-HU) – sickle cell anemia individual not treated with HU  
SOD – superoxide dismutase  
TBARS - thiobarbituric-acid-reactive substances  
TEAC - Trolox Equivalent Antioxidant Capacity  
Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethane  
Trolox - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid  
V/V - mutant homozygous for *GSTP1*

## References

- [1] Taylor, J. G., Ackah, D., Cobb, C., Orr, N., Percy, M. J., Sachdev, V., Machado, R., Castro, O., Kato, G. J., Chanock, S. J., and Gladwin, M. T. Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease. *Am. J. Hematol.* **83**:6-14; 2008.
- [2] Embury, S. H., Mohandas, N., Paszty, C., Cooper, P., and Cheung, A. T. W. In vivo blood flow abnormalities in the transgenic knockout sickle cell mouse. *J. Clin. Invest.* **103**:915-920; 1999.
- [3] Hebbel, R. P., Morgan, W. T., Eaton, J. W., and Hedlund, B. E. Accelerated Autoxidation and Heme Loss Due to Instability of Sickle Hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**:237-241; 1988.
- [4] Kato, G. J. and Gladwin, M. T. Mechanisms and clinical complications of hemolysis in sickle cell disease and thalassemia. In: Steinberg, M. H.; Forget, B. G.; Higgs, D. R.; Weatherall, D. J. eds. *Disorders of Hemoglobin*. Cambridge: Cambridge University Press; 2009:201-224.
- [5] Dasgupta, T., Hebbel, R. P., and Kaul, D. K. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models. *Free Radic. Biol. Med.* **41**:1771-1780; 2006.
- [6] Conran, N., Franco-Penteado, C. F., and Costa, F. F. Newer Aspects of the Pathophysiology of Sickle Cell Disease Vaso-Occlusion. *Hemoglobin* **33**:1-16; 2009.
- [7] Nita, D. A., Nita, V., Spulber, S., Moldovan, M., Popa, D. P., Zagrean, A. M., and Zagrean, L. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. *J Cell Mol Med.* **5**:163-170; 2001.
- [8] Ware, R. E. and Aygun, B. Advances in the use of hydroxyurea. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 62-69; 2009.
- [9] Aliyu, Z. Y., Tumblin, A. R., and Kato, G. J. Current therapy of sickle cell disease. *Haematologica.* **91**:7-11; 2006.
- [10] Lanaro, C., Franco-Penteado, C. F., Albuquerque, D. M., Saad, S. T. O., Conran, N., and Costa, F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J. Leukoc. Biol.* **85**:235-242; 2009.
- [11] Hayes, J. D. and Strange, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* **61**:154-166; 2000.
- [12] Hayes, J. D., Flanagan, J. U., and Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**:51-88; 2005.
- [13] Hayes, J. D. and Pulford, D. J. The glutathione S-Transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**:445-600; 1995.
- [14] Rushmore, T. H. and Pickett, C. B. Glutathione S-Transferases, Structure, Regulation, and Therapeutic Implications. *J. Biol. Chem.* **268**:11475-11478; 1993.
- [15] Rinaldi, R., Eliasson, E., Swedmark, S., and Morgenstern, R. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug Metab. Dispos.* **30**:1053-1058; 2002.
- [16] Sharma, V., Kumar, B., and Saxena, R. Glutathione S-transferase gene deletions and their effect on iron status in HbE/beta thalassemia patients. *Ann. Hematol.* **89**:411-414; 2010.

- [17] Manfredini, V., Lazzaretti, L. L., Griebeler, I. H., Santin, A. P., Brandao, V. D. M., Wagner, S., Castro, S. M., Peralba, M. D. R., and Benfato, M. S. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. *J. Natl. Med. Assoc.* **100**:897-902; 2008.
- [18] Alsultan, A. I., Seif, M. A., Amin, T. T., Naboli, M., and Alsuliman, A. M. Relationship between oxidative stress, ferritin and insulin resistance in sickle cell disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **14**:527-538; 2010.
- [19] Bonini-Domingos, C. R. *Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias*: São José do Rio Preto: NH; 2006.
- [20] Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science* **230**:1350-1354; 1985.
- [21] AbdelRahman, S. Z., Elzein, R. A., Anwar, W. A., and Au, W. W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett.* **107**:229-233; 1996.
- [22] Nock, N. L., Bock, C., Neslund-Dudas, C., Beebe-Dimmer, J., Rundle, A., Tang, D. L., Jankowski, M., and Rybicki, B. A. Polymorphisms in glutathione S-transferase genes increase risk of prostate cancer biochemical recurrence differentially by ethnicity and disease severity. *Cancer Causes & Control* **20**:1915-1926; 2009.
- [23] Uchiyama, M. and Mihara, M. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test. *Anal Biochem* **86**:271-278; 1978.
- [24] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1231-1237; 1999.
- [25] Keen, J. H., Habig, W. H., and Jakoby, W. B. Mechanism for Several Activities of Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.* **251**:6183-6188; 1976.
- [26] Beutler, E. Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. *Ann. Intern. Med.* **83**:919; 1975.
- [27] Rodriguez-Ariza, A., Toribio, F., and Lopezbarea, J. Rapid-Determination of Glutathione Status in Fish Liver Using High-Performance Liquid-Chromatography and Electrochemical Detection. *J. Chromatogr. B, Biomed. Appl.* **656**:311-318; 1994.
- [28] Thein, S. L. and Menzel, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *Br. J. Haematol.* **145**:455-467; 2009.
- [29] Van Delft, P., Lenters, E., Bakker-Verweij, M., de Korte, M., Baylan, U., Harteveld, C. L., and Giordano, P. C. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int J Lab Hematol* **31**:484-495; 2009.
- [30] Rossini, A., Rapozo, D. C., Amorim, L. M., Macedo, J. M., Medina, R., Neto, J. F., Gallo, C. V., and Pinto, L. F. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Res.* **1**:233-240; 2002.
- [31] Mo, Z., Gao, Y., Cao, Y., Gao, F., and Jian, L. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *Prostate* **69**:662-688; 2009.
- [32] Lima, M. M., Jr., Oliveira, M. N., Granja, F., Trindade, A. C., De Castro Santos, L. E., and Ward, L. S. Lack of association of GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTP1 and CYP1A1 polymorphisms for susceptibility and outcome in Brazilian prostate cancer patients. *Folia Biol. (Praha)* **54**:102-108; 2008.

- [33] Pinhel, M. A. S., Nakazone, M. A., Cacao, J. C., Piteri, R. C. O., Dantas, R. T., Godoy, M. F., Godoy, M. R. P., Tognola, W. A., Conforti-Froes, N. D. T., and Souza, D. R. S. 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.* **46**:439-445; 2008.
- [34] Ondei, L. S. Estresse oxidativo em pacientes beta talassêmicos e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. [PhD thesis] Sao Jose do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2009.
- [35] Magno, L. A. V., Talbot, J., Talbot, T., Santos, A. M. B., Souza, R. P., Marin, L. J., Moreli, M. L., de Melo, P. R. S., Correa, R. X., Santos, F. R., and Di Pietro, G. Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population. *Pharmacology* **83**:231-236; 2009.
- [36] Tamer, L., Calikoglu, M., Ates, N. A., Yildirim, H., Ercan, B., Saritas, E., Unlu, A., and Atik, U. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. *Respirology* **9**:493-498; 2004.
- [37] Zhong, S. L., Zhou, S. F., Chen, X., Chan, S. Y., Chan, E., Ng, K. Y., Duan, W., and Huang, M. Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. *Eur. J. Pharm. Sci.* **28**:77-85; 2006.
- [38] Kilburn, L., Okcu, M. F., Wang, T., Cao, Y. M., Renfro-Spelman, A., Aldape, K. D., Gilbert, M. R., and Bondy, M. Glutathione S-Transferase Polymorphisms Are Associated With Survival in Anaplastic Glioma Patients. *Cancer* **116**:2242-2249; 2010.
- [39] Bessa, S. S., Ali, E. M. M., and Hamdy, S. M. The role of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in Egyptian patients with essential hypertension. *Eur. J. Intern. Med.* **20**:625-630; 2009.
- [40] Repka, T. and Hebbel, R. P. Hydroxyl Radical Formation by Sickle Erythrocyte-Membranes - Role of Pathological Iron Deposits and Cytoplasmic Reducing Agents. *Blood* **78**:2753-2758; 1991.
- [41] Sess, E. D., Carbonneau, M. A., Meite, M., Peuchant, E., Dumont, M. F., Receveur, M. C., Thomas, M. J., Perromat, A., Sangare, A., Le, Bras M., and 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.
- [42] Agil, A. and Sadrzadeh, S. M. H. Hydroxy-urea protects erythrocytes against oxidative damage. *Redox Report* **5**:29-34; 2000.
- [43] Shimauti, E. L. T., Silva, D. G. H., Almeida, E. A., Zamaro, P. J. A., Belini-Junior, E., and Bonini-Domingos, C. R. Serum melatonin levels and oxidative stress in sickle cell anemia. *Blood Cells. Mol. Dis.* In Press; 2010.
- [44] Maher, P. Redox control of neural function: Background, mechanisms, and significance. *Antioxid. Redox Signal.* **8**:1941-1970; 2006.
- [45] Nam, D. T., Arseneault, M., Murthy, V., and Ramassamy, C. Potential role of acrolein in neurodegeneration and in Alzheimer's disease. *Curr. Mol. Pharmacol.* **3**:66-78; 2010.
- [46] Hardwick, R. N., Fisher, C. D., Canet, M. J., Lake, A. D., and Cherrington, N. J. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human non-alcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos.* In Press; 2010.
- [47] Burlakova, E. B., Zhizhina, G. P., Gurevich, S. M., Fatkullina, L. D., Kozachenko, A. I., Nagler, L. G., Zavarykina, T. M., and Kashcheev, V. V. Biomarkers of oxidative stress and smoking in cancer patients. *J Cancer Res Ther* **6**:47-53; 2010.

- [48] Johnson, R. M., Goyette, G., Ravindranath, Y., and Ho, Y. S. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **39**:1407-1417; 2005.
- [49] Rhee, S. G., Chae, H. Z., and Kim, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **38**:1543-1552; 2005.
- [50] Low, F. M., Hampton, M. B., Peskin, A. V., and Winterbourn, C. C. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood* **109**:2611-2617; 2007.
- [51] Cho, C. S., Kato, G. J., Yang, S. H., Bae, S. W., Lee, J. S., Gladwin, M. T., and Rhee, S. G. Hydroxyurea-Induced Expression of Glutathione Peroxidase 1 in Red Blood Cells of Individuals with Sick Cell Anemia. *Antioxid. Redox Signal.* **13**:1-11; 2010.
- [52] Krzystek-Korpacka, M., Neubauer, K., Berdowska, I., Zielinski, B., Paradowski, L., and Gamian, A. Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: impact of anemia and treatment. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**:1467-1475; 2010.
- [53] Venkatesha, V. A., Venkataraman, S., Sarsour, E. H., Kalen, A. L., Buettner, G. R., Robertson, L. W., Lehmler, H. J., and Goswami, P. C. Catalase ameliorates polychlorinated biphenyl-induced cytotoxicity in nonmalignant human breast epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45**:1094-1102; 2008.
- [54] Liu, R. M. and Pravia, K. A. G. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**:1-15; 2010.
- [55] Tatum, V. L. and Chow, C. K. Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. *Free Radic. Res.* **25**:133-139; 1996.
- [56] Chaves, M. A. F., Leonart, M. S. S., and do Nascimento, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology* **13**:187-192; 2008.
- [57] Somjee, S. S., Warriar, R. P., Thomson, J. L., Ory-Ascani, J., and Hempe, J. M. Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. *Br. J. Haematol.* **128**:112-118; 2005.
- [58] Dasgupta, T., Fabry, M. E., and Kaul, D. K. 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**:R394-R402; 2010.
- [59] Mansoor, M. A., Svardal, A. M., and Ueland, P. M. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal. Biochem.* **200**:218-229; 1992.
- [60] Dass, P. D., Bermes, E. W., and Holmes, E. W. Renal and Hepatic Output of Glutathione in Plasma and Whole-Blood. *Biochim. Biophys. Acta* **1156**:99-102; 1992.
- [61] Rossi, R., Milzani, A., le-Donne, I., Giannerini, F., Giustarini, D., Lusini, L., Colombo, R., and Di Simplicio, P. Different metabolizing ability of thiol reactants in human and rat blood - Biochemical and pharmacological implications. *J. Biol. Chem.* **276**:7004-7010; 2001.
- [62] Thom, S. R., Kang, M., Fisher, D., and Ischiropoulos, H. Release of glutathione from erythrocytes and other markers of oxidative stress in carbon monoxide poisoning. *J. Appl. Physiol.* **82**:1424-1432; 1997.
- [63] Giustarini, D., Milzani, A., le-Donne, I., and Rossi, R. Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids. *Blood Cells Mol. Dis.* **40**:174-179; 2008.

- [64] Dumaswala, U. J., Zhuo, L., Mahajan, S., Nair, P. N. M., Shertzer, H. G., Dibello, P., and Jacobsen, D. W. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol Cell Physiol.* **280**:C867-C873; 2001.

**Table 1. Hemoglobin fraction concentration in SCA patients and control group**

	CG (n = 48)	SCA (+HU) (n = 13)	SCA (-HU) (n = 15)
Hb A (%)	94.88 ± 2.12 <sup>a</sup>	12.58 ± 16.39 <sup>b</sup>	8.06 ± 14.2 <sup>b</sup>
Hb A <sub>2</sub> (%)	2.75 ± 0.39 <sup>a</sup>	3.99 ± 0.66 <sup>b</sup>	3.75 ± 1.02 <sup>b</sup>
Hb F (%)	1.08 ± 1.13 <sup>a</sup>	10.93 ± 7.07 <sup>b</sup>	6.16 ± 4.54 <sup>b</sup>
Hb S (%)	0.0	70.40 ± 16.07 <sup>c</sup>	80.39 ± 16.08 <sup>d</sup>

CG: control group; SCA (+HU): patients treated with HU; SCA (-HU): patients not treated with HU. Data were expressed as mean ± standard deviation

<sup>a,b</sup>Indicate statistical difference (Kruskal-Wallis followed by post hoc Dunn test, p < 0.05)

<sup>c,d</sup>Indicates statistical difference (Mann-Whitney test, p < 0.05)

**Table 2. Prevalence of glutathione S-transferase polymorphisms in the control group and SCA patients.**

	Control group N (%)	SCA patients N (%)	p value*
<b>GSTM1</b>			
[+]	21 (43.7)	20 (71.4)	0.0195
[-]	27 (56.3)	8 (21.6)	0.0195
<b>GSTT1</b>			
[+]	27 (56.3)	9 (32.2)	0.0423
[-]	21 (43.7)	19 (67.8)	0.0423
<b>GSTM1/T1</b>			
[+]/[-]	13 (27.0)	14 (50.0)	0.0440
[+]/[+]	8 (16.7)	6 (21.4)	0.6054
[-]/[+]	19 (39.6)	3 (10.7)	0.0074
[-]/[-]	8 (16.7)	5 (17.9)	0.8994
<b>GSTP1</b>			
I/I	34 (70.8)	5 (17.9)	0.0001
I/V	12 (25.0)	16 (57.1)	0.0050
V/V	2 (4.2)	7 (25.0)	0.0066

Wild [+], and null [-] genotypes. I/I wild homozygous; I/V heterozygote; V/V mutant homozygous.

\*Comparisons were made by Pearson–Chi square test supplemented by Fisher's exact test.

Table 3. Mean values and standard deviation of measured biochemical parameters in the control group and patients in the presence of different GST polymorphisms found.

	GSTM1/T1				p value*	GSTP1			p value*
	[+]/[-]	[+]/[+]	[-]/[+]	[-]/[-]		II	IV	VV	
<b>TBARS (ng/mL)</b>									
Control group	290.03 ± 209.15	220.12 ± 65.95	191.77 ± 139.21	252.87 ± 187.29	0.4166	218.20 ± 158.26	245.91 ± 164.59	331.00 ± 169.70	0.5916
SCA patients	1501.00 ± 472.72	1532.40 ± 775.47	1486.78 ± 559.57	1634.19 ± 837.66	0.9897	1624.90 ± 535.62	1535.29 ± 629.53	1479.89 ± 590.81	0.8505
<b>TEAC (mM)</b>									
Control group	1.93 ± 0.15	1.91 ± 0.14	1.87 ± 0.13	1.87 ± 0.14	0.4166	1.88 ± 0.02	1.93 ± 0.12	1.96 ± 0.12	0.3811
SCA patients	2.00 ± 0.18	2.02 ± 0.14	2.13 ± 0.08	1.96 ± 0.21	0.5733	1.86 ± 0.11*	2.02 ± 0.19	2.06 ± 0.11*	0.0445
<b>GST (U/mL)</b>									
Control group	1.72 ± 0.81	1.26 ± 0.54	1.63 ± 0.70	1.32 ± 0.76	0.4166	1.51 ± 0.64	1.51 ± 0.92	1.78 ± 0.81	0.7015
SCA patients	1.62 ± 0.51	1.97 ± 0.96	1.13 ± 0.33	1.52 ± 0.52	0.3454	1.58 ± 0.81	1.54 ± 0.57	1.70 ± 0.92	0.9576
<b>CAT (U/mL)</b>									
Control group	2339.65 ± 466.35	2332.74 ± 298.25	2427.23 ± 314.53	2301.05 ± 167.25	0.5623	2387.81 ± 388.69	2439.55 ± 256.80	2334.50 ± 219.10	0.8751
SCA patients	1804.96 ± 445.88	1828.63 ± 587.26	1685.44 ± 763.56	1921.12 ± 691.05	0.9800	1823.23 ± 689.74	1769.58 ± 492.94	1978.37 ± 526.04	0.7425
<b>GSH (µM)</b>									
Control group	0.37 ± 0.31	0.29 ± 0.16	0.37 ± 0.39	0.33 ± 0.27	0.9960	0.33 ± 0.31	0.34 ± 0.26	0.71 ± 0.43	0.2333
SCA patients	0.57 ± 0.37	0.73 ± 0.07	0.99 ± 0.53	0.87 ± 0.64	0.5681	0.38 ± 0.28*	0.71 ± 0.44	0.96 ± 0.24*	0.0360

Wild [+ ] and null [- ] genotypes. II wild homozygous; IV heterozygote; VV mutant homozygous. Data were expressed as mean ± standard deviation.

\*Comparisons were made by Kruskal-Wallis followed by post hoc Dunn test. \*\* Indicates statistical difference between the groups.

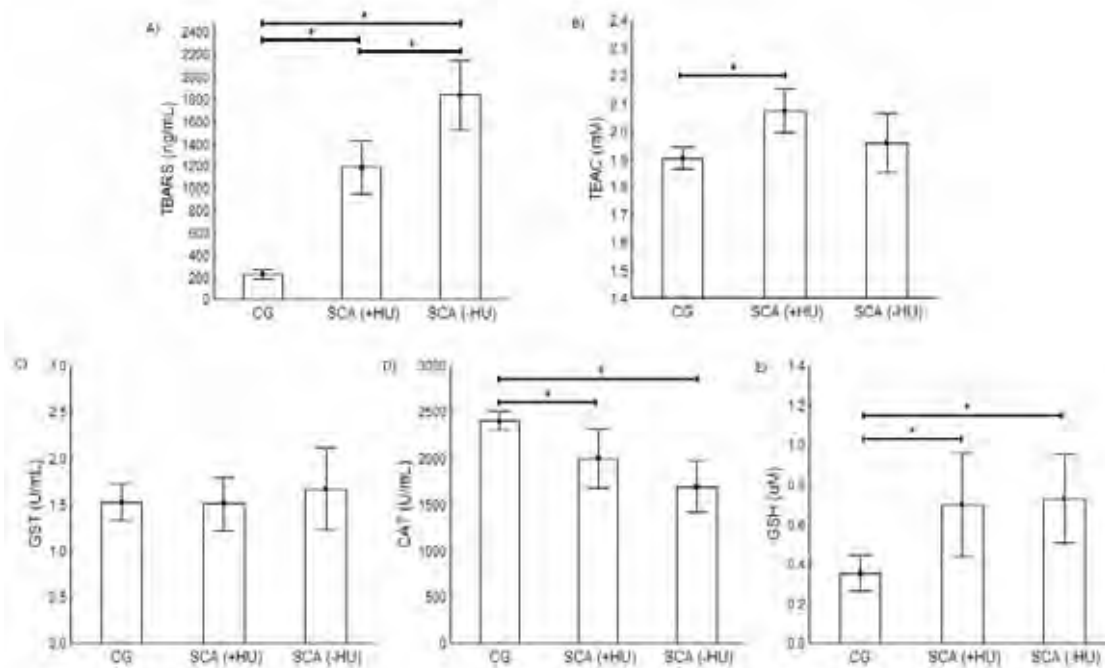


FIGURE 1

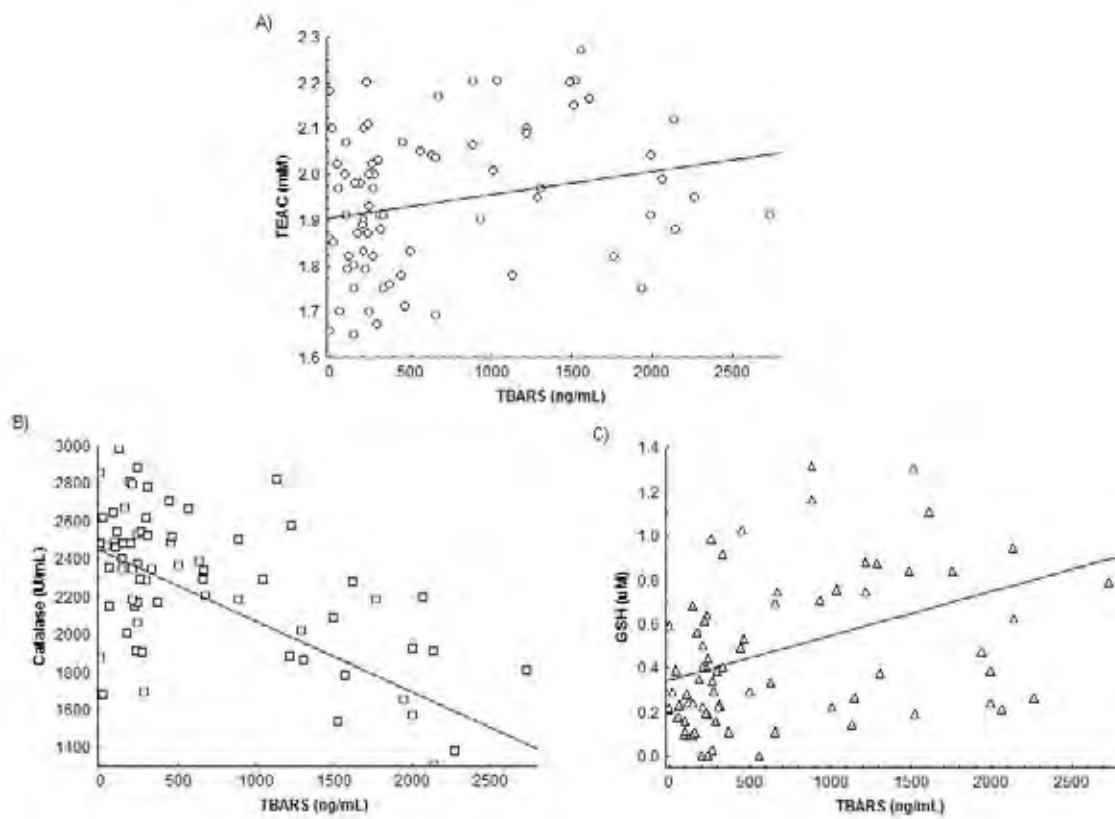


FIGURE 2



## Figure Legends

**Figure 1. The oxidative stress parameters evaluated in the control group and SCA patients.** A) TBARS levels were ~5 times and ~8 times higher in the SCA (+HU) and SCA (-HU), respectively, than in the control group (CG) ( $p < 0.0001$ ). B) TEAC levels were higher in the SCA patients than in the control group ( $p = 0.002$ ). C) GST activity was slightly higher only in the SCA (-HU) group ( $p = 0.76$ ). D) CAT activity was lower in the SCA patients than in the control group ( $p < 0.00001$ ). E) GSH levels were ~2 times higher in the SCA patients than in the control group ( $p = 0.0005$ ). \*Indicates statistical difference according to the one-way ANOVA followed by post hoc Turkey test (TEAC and GST) or Kruskal-Wallis followed by post hoc Dunn test (TBARS, CAT and GSH).

**Figure 2. Association between the biochemical parameters evaluated.** A) Positive linear correlation of 22% between lipid peroxidation and TEAC levels ( $r = 0.22$ ,  $p = 0.04$ ). B) Negative linear correlation of 56% between lipid peroxidation and CAT activity ( $r = -0.56$ ,  $p = 0.00001$ ) and, also, linear regression showing that the increase in TBARS levels can be 31% explained by the decrease of CAT activity ( $R^2 = 0.31$ ,  $p < 0.00001$ ). C) Positive linear correlation of 37% between lipid peroxidation and GSH levels ( $r = 0.37$ ,  $p = 0.0008$ ).

*Anexo*



## Serum melatonin level and oxidative stress in sickle cell anemia

Eliana Litsuko Tomimatsu Shimauti<sup>a,b</sup>, Danilo Grunig Humberto Silva<sup>a,c</sup>, Eduardo Alves de Almeida<sup>c</sup>, Paula Juliana Antoniazco Zamaro<sup>a</sup>, Edis Belini Junior<sup>a</sup>, Claudia Regina Bonini-Domingos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UNESP - Sao Paulo State University, Biology Department, Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases Laboratory, Sao Paulo, Brazil

<sup>b</sup> UEM - Maringa State University, Department of Clinical Analysis, Parana, Brazil

<sup>c</sup> UNESP - Sao Paulo State University, Department of Chemistry and Environmental Sciences, Sao Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Submitted 27 July 2010

Revised 23 August 2010

(Communicated by Sir D. Weatherall, F.R.S., 26 August 2010)

#### Keywords:

Sickle cell anemia  
Antioxidant capacity  
Melatonin

### ABSTRACT

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

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

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

SCA is often associated with oxidative stress due to increases in the generation of reactive oxygen species (ROS), which contributes to the proinflammatory, pro-thrombotic, and vaso-occlusive state of the disease, and which sometimes leads to increases in antioxidant defenses [3,4]. It has been proposed that melatonin has antioxidant properties [5–8]. The importance of melatonin as an antioxidant is also due to its capacity to cross biological barriers, which eases the removal of ROS in different biological compartments [9,10]. Clinical and experimental studies show that melatonin exerts both anti-inflammatory effect and immunoregulatory activity by inhibiting prostaglandin, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-8 biosynthesis. In addition, melatonin stimulates the activities of enzymes that metabolize reactive species [11–13].

No reports of melatonin levels or their correlation with oxidative stress parameters in SCA have been found in the literature. Therefore,

the goal of this study was to evaluate serum melatonin levels, plasma Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), and lipid peroxidation (TBARS) in SCA patients when compared to a control group (Hb AA),

### Methods

#### Subjects

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

#### Biological samples

Blood samples (20 mL) were collected through venipuncture between 6:30 am and 7:30 am. The heparinized blood (7 mL) was

\* Corresponding author. UNESP – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – IBILCE, Biology Department, Hemoglobin and Hematologic Genetic Diseases Laboratory, Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth, CEP: 15054-000 São José do Rio Preto – São Paulo – Brazil.

E-mail address: [claudiabonini@sjrp.unesp.br](mailto:claudiabonini@sjrp.unesp.br) (C.R. Bonini-Domingos).

**Table 1**  
Patient phenotypes and clinical characteristics.

Characteristics	n = 15
Age (in years) mean ± SD	21.33 ± 9.04
Hydroxyurea treatment	7 (46.7%)
β-Globin haplotypes (n, % of patients)	
Bantu/Benin	7 (46.7)
Bantu/Bantu	5 (33.3)
Benign/Benin	2 (13.3)
Bantu/Atypical	1 (6.7)
Number of painful crises (n, % of patients)	
0–2	11 (73.3)
3–5	3 (20.0)
≥6	1 (6.7)
Complications of sickle cell anemia (n, % of patients)	
Cardiac complications	5 (33.3)
Muscular/skeletal/skin complications	4 (26.7)
Gastrointestinal/hepatobiliary complications	4 (26.7)
Splenic complications	4 (26.7)
Pulmonary complications	2 (13.3)
Neurologic complications	0 (0.0)

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

incubated for 20 min at 37 °C and was then centrifuged at 1500 rpm for 20 min to separate the plasma. The blood without anticoagulants (9 mL) was submitted to centrifugation at 3000 rpm for 10 min to obtain the serum. The plasma and serum were frozen at –80 °C for further analysis. The EDTA sample fraction (4 mL) was used for the Hb tests and genotypic determination.

#### Hemoglobin phenotypes and hematologic profile

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

#### Hemoglobin genotypes and β<sup>S</sup>-globin haplotypes

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

Haplotypes were determined through the analysis of the following polymorphic restriction sites by PCR–RFLP: γG (*Hind* III), γA (*Hind* III), ψβ (*Hinc* II), 3'ψβ (*Hinc* II) e 5'β (*Hinf* I), as previously by Sutton et al. [15].

#### Biochemical analysis

Lipid peroxidation levels were assessed in the plasma using the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay [16]. Antioxidant capacity was determined in the plasma samples according to their equivalence to Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) [17]. Serum melatonin concentration was determined using HPLC coupled to a coulometric electrochemical detector (Coulchem III ESA, Bedford, MA, USA) according to Laganà et al. [18], except the mobile phase, which was adjusted to 50 mM sodium acetate, 100 mM acetic acid (pH 4.20), and EDTA<sub>Na</sub> 0.1 mM with 15% acetonitrile. Under these conditions, melatonin clearly eluted ~30 min (Fig. 1). Melatonin was extracted from the serum samples by adding

2 mL of dichloromethane to 2 mL of serum. After vigorous stirring, the mixture was centrifuged at 6500 rpm for 10 min at 4 °C, and the dichloromethane phase was collected and submitted to nitrogen flow until it was completely dry. The extract was then re-suspended in 100 μL of mobile phase, filtered through Millex syringe filter units (0.22 μm) and directly injected into the HPLC system. The calculations were based on a calibration curve previously constructed by injecting authentic melatonin standards into the HPLC system.

#### Statistical analysis

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

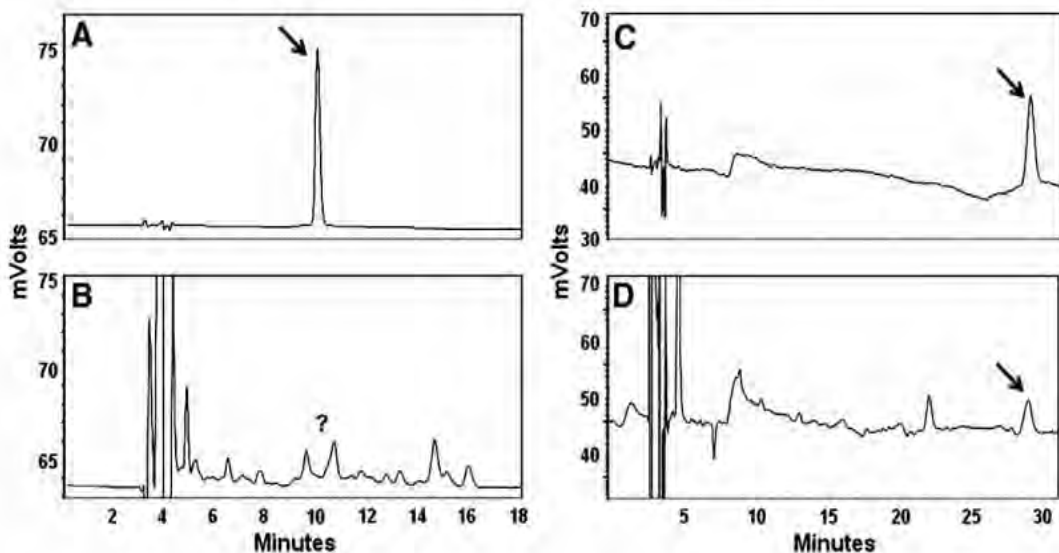
#### Results and discussion

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

The serum melatonin levels in the control group were slightly higher than the data reported in the scientific literature [21,22]. Kennaway and Voultsios [23] reported plasma melatonin levels ranging from 400 to 500 pmol/mL, which corresponds to ~90 to 120 pg/mL. Indeed, Ueno-Towatari et al. [24] found a mean melatonin level in the Japanese population of ~90 pg/mL, with individuals reaching 220 pg/mL at 7:00 am. These results are consistent with our data. In a review, Karasek [25] suggests that serum melatonin concentration reach about 180 pg/mL in children between 5 and 10 years old, and about 110 pg/mL between 15 and 35 years old. The mean age of the studied subjects is 26.2 years, thus confirming that serum melatonin levels found in the present study are in accord to the expected concentration for human blood. It should also be noted that there are no previous reports for serum melatonin levels in the Brazilian population, which is genetically mixed.

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

The SCA patients' mean age in this study was 21.33 years while the control group had a mean age of 29.25 years (*p* = 0.02). This is another indication that the disease contributes to the decrease in melatonin levels since a lower value would be expected in the older group as melatonin decreases along age [25]. Due to the significant difference in the age of SCA and control subjects, we stratified the study groups by age ranges (>20 and ≤20 years old), for a better attribution of differences in melatonin levels (Fig. 3). We observed that melatonin level decreased in control group along age, as expected, although no statistical difference was observed between



**Fig. 1.** HPLC-EC detection of serum melatonin. A and B are chromatograms of a melatonin standard (A, 100 pmol) and a human serum sample (B, undefined) following the method of Laganà et al. [18]. C and D are chromatograms of a melatonin standard (C, 10 pmol) and a human serum sample (D) after decreasing acetonitrile concentration to 15% in the mobile phase, as described in Methods. The arrows indicate the melatonin peak.

control groups with different ages. Comparing the control group with the SCA patients, we observed a significant difference in melatonin level for both group of ages, showing a clear decrease in the SCA patients, confirming that the disease contributes to a significant decrease in melatonin level.

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

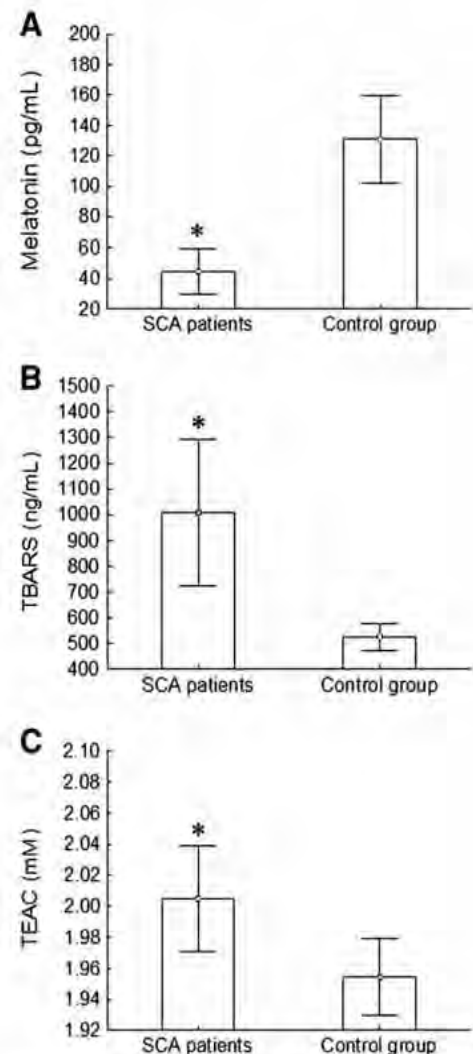
There are no reports in the literature for melatonin levels in other hemolytic anemia. However, it could be expected that this compound is affected by this kind of disease since high rates of ROS generation and iron release are generally associated with hemolytic anemia. The well-known antioxidant properties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

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

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

MCV indicates mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin.

\* Statistical difference ( $t$  test,  $p < 0.05$ ).



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

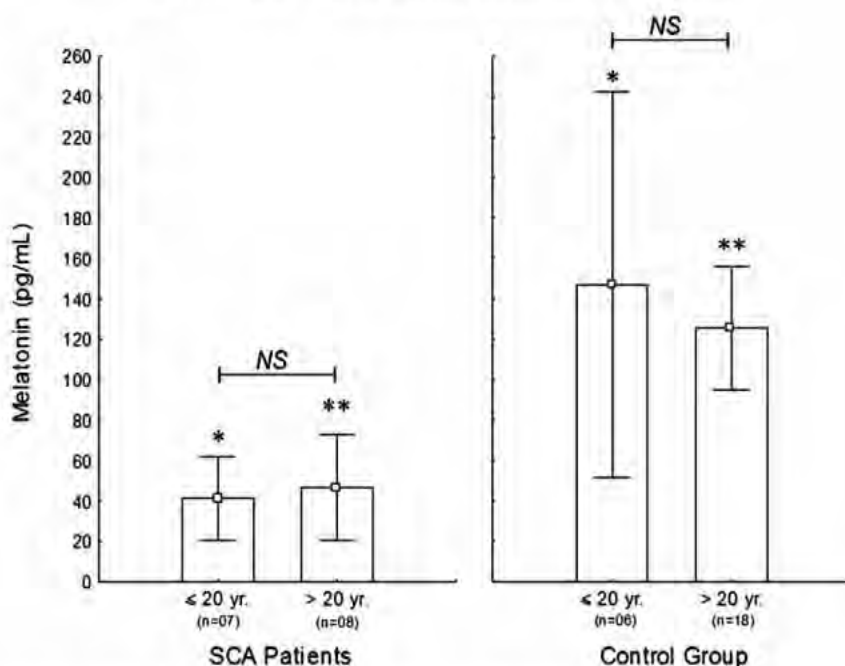


Fig. 3. Serum melatonin levels break down the age ranges in SCA patients and control group:  $\leq 20$  years and  $> 20$  years. NS indicates not significant (*t* test). Statistical difference ( $p < 0.05$ ) between patients  $\leq 20$  years\* and  $> 20$  years\*\* between the different groups (Mann-Whitney test).

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

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

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

#### Conflict of interest disclosure

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

#### Acknowledgments

The authors would like to thank the following Brazilian foundations: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant 409691/2006-2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2006/03873-1), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, and the Ministry of Health (grant MS 3072/2007) for their financial support.

#### Authorship

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

#### References

- J.G. Taylor, D. Ackah, C. Cobb, et al., Mutations and polymorphisms in hemoglobin genes and the risk of pulmonary hypertension and death in sickle cell disease, *Am. J. Hematol.* 83 (1) (2008) 6–14.
- S.H. Embury, N. Mohandas, C. Paszty, P. Cooper, A.T. Cheung, In vivo blood flow abnormalities in the transgenic knockout sickle cell mouse, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 915–920.
- K. Jong, S.K. Larkin, L.A. Styles, et al., Characterization of the phosphatidylserine exposing subpopulation of sickle cells, *Blood* 98 (3) (2001) 860–867.
- T. Dasgupta, R.P. Hebbel, D.K. Kaul, Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models, *Free Radic. Biol. Med.* 41 (12) (2006) 1771–1780.
- D.X. Tan, L.C. Manchester, R.J. Reiter, et al., Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products, *Biol. Signals Recept.* 9 (3–4) (2000) 137–159.
- D.X. Tan, L.C. Manchester, M.P. Terron, et al., One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 42 (1) (2007) 28–42.
- R.J. Reiter, D.X. Tan, C. Osuna, et al., Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress, *J. Biomed. Sci.* 7 (6) (2000) 444–458.
- G. Sener, H. Tugtepe, A. Velioglu-Ogünç, et al., Melatonin prevents neutrophil-mediated oxidative injury in *Escherichia coli*-induced pyelonephritis in rats, *J. Pineal Res.* 41 (3) (2006) 220–227.
- R.J. Reiter, D.X. Tan, J.C. Mayo, et al., Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanism and pathophysiological implications in humans, *Acta Biochim. Pol.* 50 (4) (2003) 1129–1146.

- [10] S. Cuzzocrea, R.J. Reiter, Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation, *Curr. Top. Med. Chem.* 2 (2) (2002) 153–165.
- [11] K. Erkanli, N. Kayalar, G. Erkanli, et al., Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle, *J. Pineal Res.* 39 (3) (2005) 238–242.
- [12] S. Taysi, H. Ucuncu, M. Elmastas, et al., Effect of melatonin on lipid peroxidation, glutathione and glutathione-dependent enzyme activities in experimental otitis media with effusion in guinea pigs, *J. Pineal Res.* 39 (3) (2005) 238–242.
- [13] M.Y. Lee, Y.H. Kuan, H.Y. Chen, et al., Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats, *J. Pineal Res.* 42 (3) (2007) 297–309.
- [14] C.R. Bonini-Domingos, in: HN (Ed.), *Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias*, São José do Rio Preto, 2006, 121 pp.
- [15] M. Sutton, E.E. Bouhassira, R.L. Nagel, Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of  $\beta$ -like globin gene cluster haplotypes, *Am. J. Hematol.* 32 (1989) 66–69.
- [16] M. Mihara, M. Uchiyama, Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Anal. Biochem.* 86 (1) (1978) 271–278.
- [17] R. Re, N. Pellegrine, A. Proeggente, et al., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (9–10) (1999) 1231–1237.
- [18] A. Lagana, A. Marino, G. Fago, et al., Sensitive assay for melatonin in human serum by liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 316 (1995) 377–385.
- [19] M.H. Steinberg, Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches, *Sci. World J.* 8 (2008) 1295–1324.
- [20] P. Van Delft, E. Lenters, M. Bakker-Verweij, et al., Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations, *Int. J. Lab. Hematol.* 31 (5) (Oct 2009) 484–495.
- [21] V. Rizzo, C. Porta, M. Moroni, et al., Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromat.* 774 (2002) 17–24.
- [22] S. Benloucif, H.J. Burgess, E.B. Klerman, et al., Measuring melatonin in humans, *J. Clin. Sleep Med.* 4 (1) (2008) 66–69.
- [23] D.J. Kennaway, A. Voultsios, Circadian rhythm of free melatonin in human plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (3) (1998) 1013–1015.
- [24] T. Ueno-Towatari, K. Norimatsu, K. Blazeiczky, et al., Seasonal variations of melatonin secretion in young females under natural and artificial light conditions in Fukuoka, Japan, *J. Physiol. Anthropol.* 26 (2007) 209–215.
- [25] M. Karasak, Melatonin, human aging, and age-related diseases, *Exp. Gerontol.* 39 (11–12) (Nov-Dec 2004) 1723–1729.
- [26] V. Manfredini, L.L. Lazzaretti, I.H. Griebeler, et al., Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state, *J. Natl. Med. Assoc.* 100 (2008) 897–902.
- [27] T. Repka, R.P. Hebbel, Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents, *Blood* 78 (1991) 2753–2758.
- [28] E.D. Sess, M.A. Carbonneau, M. Meité, et al., Markers of lipid peroxidation, inflammatory proteins and plasma tocopherols in homozygotic and heterozygotic sickle cell anemia, *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 91 (3) (1998) 238–241.
- [29] S. Benot, R. Goberna, R.J. Reiter, et al., Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum, *J. Pineal Res.* 27 (1) (1999) 59–64.
- [30] J. Limson, T. Nyokong, S. Daya, The interaction of melatonin and its precursors with aluminium, cadmium, copper, iron, lead, and zinc: an adsorptive voltammetric study, *J. Pineal Res.* 24 (1) (1998 Jan) 15–21.
- [31] D.S. Maharaj, J.L. Limson, S. Daya, 6-Hydroxymelatonin converts Fe (III) to Fe (II) and reduces iron-induced lipid peroxidation, *Life Sci.* 72 (12) (2003 Feb 7) 1367–1375.
- [32] N. Gumral, S. Caliskan, Özgüner, et al., Melatonin levels and enzymatic antioxidant defense system decrease in blood of patients with bronchial asthma, *Toxicol. Ind. Health* 25 (2009) 411–416.
- [33] K. Kedziora-Kornatowska, K. Szewczyk-Golec, M. Kozakiewicz, et al., Melatonin improves oxidative stress parameters measured in the blood of elderly type 2 diabetic patients, *J. Pineal Res.* 46 (3) (2009 Apr) 333–337.
- [34] Z. Akpınar, S. Tokgöz, H. Gökbül, et al., The association of nocturnal serum melatonin levels with major depression in patients with acute multiple sclerosis, *Psychiatry Res.* 161 (2) (Nov 30 2008) 253–257 Epub 2008 Oct 10.
- [35] E. Fibach, E. Rachmilewitz, The role of oxidative stress in hemolytic anemia, *Curr. Mol. Med.* 8 (7) (2008) 609–619.
- [36] J. Umbreit, Methemoglobin—it's not just blue: a concise review, *Am J Hematol.* 82 (2) (Feb 2007) 134–144.
- [37] P.P. Landburg, T. Teerlink, B.J. Biemond, et al., Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype, *Blood Cells Mol. Dis.* 44 (4) (Apr 15 2010) 229–232 Epub 2010 Feb 24.
- [38] K.C. Wood, L.L. Hsu, M.T. Gladwin, Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance, *Free Radic Biol. Med.* 44 (8) (Apr 15 2008) 1506–1528 Epub 2008 Jan 26.
- [39] E.A. Almeida, et al., Oxidation of melatonin by singlet molecular oxygen ( $O_2(^1\Delta g)$ ) produces  $N_1$ -acetyl- $N_2$ -formyl-5-methoxykynurenine, *J. Pineal Res.* 35 (2) (2003 Sep) 131–137.