

*Lígia Márcia da Silveira Viana Baracioli*

**Processo oxidativo em doadores de sangue  
portadores de Hemoglobina S e mutantes no  
gene *HFE***



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

Programa de Pós-Graduação em Genética

---

*Lígia Márcia da Silveira Viana Baracioli*

**PROCESSO OXIDATIVO EM DOADORES DE SANGUE  
PORTADORES DE HEMOGLOBINA S E MUTANTES NO  
GENE *HFE***

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

**Tese apresentada para  
obtenção do Título de Doutor  
em Genética**

---

**São José do Rio Preto – SP  
2009**

Viana-Baracioli, Lígia Márcia da Silveira.

Processo oxidativo em doadores de sangue portadores de Hemoglobina S e mutantes no gene *HFE*/ Lígia Márcia da Silveira Viana Baracioli. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009 .  
135 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini Domingos

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

1. Hemoglobinopatias. 2. Hemoglobina S. 3. Hemocromatose. 4. Capacidade antioxidante I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.155.16

**Lígia Márcia da Silveira Viana-Baracioli**

**PROCESSO OXIDATIVO EM DOADORES DE SANGUE  
PORTADORES DE HEMOGLOBINA S E MUTANTES NO  
GENE *HFE***

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof(a) Dra Claudia Regina Bonini Domingos

2º. Examinador : Prof(a). Dr(a). Rodolfo Delfini Caçado

3º. Examinador: Prof(a). Dr(a). Ivan de Lucena Angulo

4º. Examinador: Prof(a). Dr(a). Maria Tercilia de Azeredo Oliveira

5º. Examinador: Prof(a). Dr(a). Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto, 27/02/2009.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – SP, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de São José do Rio Preto SP. com auxílio financeiro do CNPq e CAPES.

Dedico este trabalho,  
aos meus pais, Alcebíades e Irma,  
aos meus filhos Matheus e  
Guilherme, e ao meu marido,  
Edson, pelo por todo o apoio  
recebido e por tudo o que  
representam para mim.

## Agradecimentos

Àos meus pais, meus irmãos, pelo apoio, incentivo para mais esta conquista.

Ao meu marido, pela colaboração e pelo carinho, em todos os momentos.

Aos meus filhos, pela paciência e por todo o amor recebido sempre.

À Dra. Cláudia Regina Bonini-Domingos, pelo apoio, incentivo, carinho e amizade sempre.

Ao Dr Octávio, diretor do Hemocentro pelo auxílio no atendimento de doadores e no desenvolvimento da pesquisa.

À Lú Ondeí, ao Fabrício, e à Maza pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos do Laboratório, Nelson, Paula, Lú, Carol, Ana Luíza, Isa, Natalia, Maza entre outros pela colaboração e sem os quais teria sido muito mais difícil a realização deste trabalho.

A Marilanda que mesmo a distância esteve sempre presente.

Aos amigos do Hemocentro pela colaboração, pela amizade e pelo incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Imunohematologia, pelo auxílio nas análises.

E a Deus, sem o qual nada teria sido possível.

## SUMARIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1 Considerações sobre as Hemoglobinopatias .....	17
1.2 Hemoglobina S.....	20
1.3 Metabolismo do Ferro.....	23
1.4 Hemocromatose Hereditária.....	28
1.5 Dano Oxidativo.....	31
1.6 Peroxidação Lipídica.....	34
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>36</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>38</b>
3.1. Considerações Éticas.....	39
3.2. Casuística.....	40
3.3. Métodos.....	43
3.3.1. Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias..	43
3.3.2. Dosagens Bioquímicas.....	46
3.3.3. Metodologias moleculares para análises dos polimorfismos.....	48
3.3.4. Exames Hematológicos.....	49
<b>4. Resultados.....</b>	<b>50</b>
4.1. Capítulo 1.....	51
4.2. Capítulo 2 .....	53
4.3. Capítulo 3.....	58
<b>5. Discussão.....</b>	<b>65</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>74</b>
<b>8. Anexo.....</b>	<b>84</b>
<b>9. Apêndice.....</b>	<b>110</b>
9.1. Apêndice 1: Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue.....	111
9.2. Apêndice 2: Estresse oxidativo e frequência dos polimorfismos no gene <i>HFE</i> em doadores de sangue portadores de Hb AS.....	115

## Lista de Figuras

- Figura 1: Esfregaço de sangue periférico de um paciente com doença falciforme, com presença de drepanócitos.....21
- Figura 2: Alteração da membrana celular por polímeros de Hb S Os polímeros rompem o citoesqueleto e formam uma saliência resultando em um desarranjo da bicamada de fosfolipídios causando a inversão da fosfatidilserina (PS) e exposição da proteína transmembrânica .....22
- Figura 3: Mecanismo de absorção do ferro intestinal.....26
- Figura 4: Ilustração com esquema representativo da absorção de Ferro em consequência da herança dos polimorfismos no gene *HFE*. Proteína HFE normal e mutações C282Y e H63D.....31
- Figura 5: Gel de agarose de resultado de reação de PCR-AE para Hb S. 1- heterozigoto para mutação Hb S; 2- homozigoto para a mutação Hb S; 3- Ausência da mutação para Hb S. M- Marcador de peso molecular.....54
- Figura 6: Gel de agarose 1,5% para identificação da mutação H63D. Marcador (M); 1 e 2- heterozigotos para H63D; 3- ausência de mutação; 4- homozigoto para H63D. B) Gel de poliacrilamida 8% para identificação da mutação C282Y. 1 e 2- ausência de mutação; 3- heterozigoto para C282Y.....55

## Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1: Distribuição das frequências genotípicas para os polimorfismos no gene <i>HFE</i> de acordo com o gênero em doadores de sangue com Hb AS e grupos controle (Hb AA e Doentes Falciformes).....	56
Tabela 2: Frequência Alélica das mutações C282Y e H63D no gene <i>HFE</i> em doadores de sangue com Hb AS e Hb AA e pacientes falciformes (Hb SS).....	56
Tabela 3: Valores médios e Desvio Padrão nos valores obtidos entre os testes realizados.....	62
Tabela 4: Valores médios e desvio padrão, resultados máximo e mínimo encontrados para as quantificações de MDA e TEAC, na população avaliada.....	63
Tabela 5: Teste ANOVA entre MDA e TEAC para comparação entre os grupos estudados.....	64
Quadro 1 Valores de referência e unidades dos testes.....	60
Quadro 2: Resultados dos parâmetros hematimétricos, bioquímicos dos processos oxidativos dos doadores portadores de Hb AS.....	61

## Lista de Abreviaturas

$\beta$	gene beta
$\beta_2$	Beta dois
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\beta^S$	beta s
2,3 BPG	2,3 Bifosfoglicerato
A	adenina
aa	aminoácido
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenziazolina ácido 6-sulfônico)
AE	Alelo específico
ATP	Adenosina Tri Fosfato
C	citosina
$\text{Ca}^{++}$	Cálcio
CLLF	Capacidade Latente de Ligação do Ferro
cm	centímetro
CONEP	comissão nacional de ética em pesquisa
CTLF	Capacidade Total de Ligação do Ferro
Dcytb	Duodenal citocromo B ( enzima)
DMT1	Transportador Divalente de Metais
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EROS	Espécies reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
$\text{Fe}^{+2}$	Ferroso, estado solúvel
$\text{Fe}^{+3}$	Ferrico, estado insolúvel
g	grama
G	guanina
$\text{H}_2\text{O}_2$	água oxigenada ou hidróxido peróxido
Hb	hemoglobina
HH	Hemocromatose Hereditária

HLA	Human Histocompatibility Leucocyte Antigens
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
Ht	Hematócrito
IBILCE	Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas
IgG	imunoglobulinas
IRE	Elementos Responsivos ao Ferro
IRP	Proteína Reguladora do Ferro
IST	Índice de Saturação da Transferrina
K <sup>+</sup>	Potássio
Kb	kilobases
Leu	Leucócitos
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinas e Genética das
Doenças	Hematológicas
M	molar
MDA	Malondialdeído
mL	mililitro
Na <sup>++</sup>	Sódio
NO	Óxido Nítrico
O <sub>2</sub>	oxigênio
pb	pares de base
PBS	(phosphate basic saline) solução salina isotônica à base de fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrofílico
PHHF	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PS	fosfatidilserina
q.s.p	quantidade suficiente para
Ret.	Reticulócitos
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
rpm	rotações por minuto

T	timina
TAA	(total antioxidant activity) atividade anti-oxidante total
TAAc	atividade anti-oxidante total corrigida
TEAC	(trolox equivalent antioxidant capacity) capacidade anti-oxidante em equivalência ao trolox
TRF1	Receptor de Transferrina 1
TRF2	Receptor de Transferrina 2
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	luz ultravioleta
V	Volt

***Resumo***

## Resumo

As hemoglobinopatias são as mais comuns das doenças genéticas e são classificadas em Talassemias e Variantes de Hemoglobinas. A Hb S é originada por uma mutação de ponto no códon que origina o aminoácido da posição seis da cadeia beta globina, resultando em uma modificação estrutural na molécula que altera sua solubilidade e cristalização. A Hb S apresenta efeito sobre as células sanguíneas, desencadeando processos oxidativos com geração de radicais livres. Efeito semelhante observa-se no acúmulo de ferro, em decorrência da hemocromatose hereditária. Os defeitos de metabolismo do ferro, em especial aqueles oriundos dos polimorfismos no gene *HFE*, levam ao acúmulo de ferro tecidual, com potencial capacidade oxidante e peroxidação lipídica. Fundamentados no possível efeito tóxico da mutação no gene da globina  $\beta^S$  (Hb S) e do acúmulo de ferro tecidual, relatados na literatura, objetivou-se avaliar a influência dos polimorfismos do gene *HFE* na peroxidação lipídica dos portadores dessa alteração de hemoglobina e sua relação com o aumento da destruição eritrocitária e geração de estresse oxidativo. Foram analisadas 16.000 amostras de doadores de sangue e encontrou-se uma frequência de Hb AS de 1,69% na região Noroeste do Estado de São Paulo. Destes, 43 apresentaram herança da Hb S e de pelo menos um dos dois polimorfismos no gene *HFE* testados. A frequência dos polimorfismos C282Y e H63D, no gene *HFE*, no grupo de doadores com Hb AS, esta de acordo com os dados da literatura. No grupo de doadores de sangue com Hb AS observamos que, na herança concomitante dos dois polimorfismos, os níveis de MDA, indicativo de peroxidação lipídica, estavam elevados, indicando a influência de ambas afecções genéticas, no aumento dos níveis de peroxidação lipídica. Entretanto, os níveis médios da TEAC, indicativo da capacidade oxidante, apresentaram-se normais, indicando que apesar de haver um aumento da peroxidação lipídica neste grupo, este não é acompanhado pelo aumento da capacidade antioxidante, podendo levar a estresse oxidativo, muito embora todos os valores médios estejam dentro da faixa de normalidade.

**Palavras-chave:** hemoglobinopatias, hemoglobina S, *HFE*, hemocromatose, capacidade antioxidante, estresse oxidativo.

*Abstract*

## **Abstract**

The hemoglobinopathies are the most common of the genetic disease and are classified in Thalassemia and Hemoglobin Variants. Hb S is originated by a point mutation in the codon that originates the sixth aminoacid of the  $\beta$  globin chain, resulting in a structural modification in the molecule that modifies the solubility and crystallization. Hb S presents an effect on the blood cells, unchaining the oxidative processes with the free radicals generation. Similar effect is observed in the iron accumulation, in result of the hereditary hemochromatosis. The iron metabolism defects, in special those one from the HFE gene polymorphism, lead to the tissue iron accumulation with potential oxidant capacity and lipid peroxidation. Based on the possible toxic effect of the mutation in the globin  $\beta^S$  gene (Hb S) and tissue iron accumulation, mentioned in the literature, we was aimed evaluate the influence of HFE gene polymorphism in the lipid peroxidation in blood donors with hemoglobin S alteration and the relation with the eritrocitary destruction increase and oxidative stress generation. 16,000 samples of blood donor had been analyzed and it was found a Hb frequency of 1,69% from the Northwest São Paulo state region. Among them, 43 had presented concomitance in the Hb S inheritance and one of the two HFE gene polymorphism. The frequency of C282Y and H63D polymorphism, in the HFE gene, in the blood donor group with Hb S, is in according to the literature. We also verified in the blood donor group with Hb AS that, in the concomitant inheritance of the two polymorphism, the MDA levels, indicative of lipid peroxidation, were raised, showing the influence of both genetic affections, in the levels of lipid peroxidation. However, the TEAC average levels, indicative of the oxidant capacity, had been presented normal, indicating that in spite of a lipid peroxidation raise, this is not followed by the increased of the antioxidant capacity, leading to oxidative stress. All the average values are inside the normality band.

**Key Words:** Hemoglobinopathies, sickle cell Disease, HFE, hemochromatosis, antioxidant capacity, stress oxidative.

## ***1.Introdução***

## 1. Introdução

### 1.1 Considerações sobre as Hemoglobinopatias

Nos vertebrados, a hemoglobina (Hb) é uma proteína globular e tetramérica, com peso molecular de 64.458 daltons, composta de duas subunidades polipeptídicas diméricas codificadas por dois grupos de genes localizados nos cromossomos humanos 11 e 16. Cada uma das quatro subunidades é composta por uma fração protéica, a globina, e um grupo prostético, o heme, contendo um átomo de ferro, capaz de se ligar a uma molécula de oxigênio, o que determina sua capacidade de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de gás carbônico no sentido inverso. Além do transporte de gases, a hemoglobina atua também no equilíbrio ácido-base, na detoxificação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), e no transporte de Oxido Nítrico (NO), para garantir a capacidade antioxidante do sangue e oxigenação dos tecidos (HONIG; ADAMS, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001; CAVIL, 2002; REISCHL et al., 2007).

A fração protéica da molécula de hemoglobina humana é formada por quatro cadeias num total de 574 aminoácidos (aa). Duas delas são constituídas por 141 aa cada, as chamadas tipo alfa (zeta e alfa), e as outras duas são formadas por 146 aa cada, conhecidas como tipo beta (epsilon, gama, delta e beta) (LEHMANN; HUNTSMAN, 1974).

As hemoglobinopatias são as mais comuns das doenças genéticas e, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, 270 milhões de pessoas possuem genes que determinam hemoglobinas anormais no mundo (CLEGG-WEATHERALL, 1999). 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 (NAOUM, 1997). Estudos epidemiológicos mostram que 300 a 400 mil crianças nascidas vivas por ano no

mundo, apresentam anemia falciforme ou alguma forma de talassemia grave. A detecção de portadores destas afecções genéticas tem importância para a saúde pública, pois esses indivíduos representam fonte de novos heterozigotos e de possíveis homozigotos (BANDEIRA et al., 2007).

As talassemias constituem um grupo heterogêneo de síndromes provocadas pela diminuição, geneticamente determinada, na síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas, gerando um desequilíbrio entre as subunidades produzidas, dificultando o processo de eritropoiese e causando hemoglobinizacão deficiente dos eritroblastos. Em nível periférico, as talassemias expressam-se com alterações morfológicas de intensidade variável, conforme o tipo de talassemia e o número de genes envolvidos. São classificadas, segundo a cadeia polipeptídica produzida em taxa reduzida. Os tipos mais comuns de talassemia na população brasileira são a alfa e beta na forma heterozigota, porém os números variam de acordo com a origem étnica do grupo analisado (RAMALHO, 1986; BONINI-DOMINGOS, 1993; NAOUM, 1997, SIQUEIRA et al., 2002; BANDEIRA et al., 2007).

Com relação às variantes de Hb, são conhecidas 1010 até o momento, sendo as mais comumente encontradas a Hb S, Hb C, Hb D e Hb E (\*). Apresentam fundamentalmente alterações em genes estruturais que promovem a formação de moléculas de hemoglobinas com características bioquímicas diferentes das hemoglobinas normais. A maioria das variantes estruturais de hemoglobina é originada pela substituição de um único aminoácido, resultante de mudanças nas seqüências dos nucleotídeos. As alterações, com conseqüências nas atividades físico-químicas da molécula dependem do local e da extensão do processo mutacional, sendo detectável por procedimentos eletroforéticos (NAOUM, 1997; GIARDINE et al., 2007).

Dentre as alterações de hemoglobina, existe ainda outro grupo, que se caracteriza pela manutenção da hemoglobina Fetal em quantidades aumentadas na vida adulta que é designado por Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal – PHHF (HONIG; ADAMS, 1986; THOMPSON et al., 1993).

(\*) [http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query\\_vars3](http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3) consulta realizada em 15/01/2009

A prevalência e o tipo de hemoglobina anormal, encontrados na população refletem a diversidade e os diferentes graus de mistura étnica entre os brasileiros de cada região. Além da população indígena nativa, originalmente de 1,5 milhões de pessoas, nos séculos 16 a 19, o Brasil recebeu em torno de 800 mil portugueses e 3,5 milhões de negros, vindos principalmente de dois grupos africanos, Bantu e Sudaneses. Em adição, outros cinco milhões de imigrantes, participaram da composição étnica da nossa população. Todos esses grupos sofreram mistura inter-racial contribuindo para determinar a população Brasileira miscigenada, com distribuição étnica diferenciada em várias regiões geográficas do país. O estudo das hemoglobinopatias no Brasil vem sendo realizado desde a década de 40 com ênfase, sobretudo à variante S. No entanto, outras variantes, talassemias e associações, têm sido encontradas (SIQUEIRA et al., 2002; DOMINGOS et al., 2004).

Os efeitos fisiopatológicos das hemoglobinopatias em adultos variam de assintomáticos até alterações graves, como em portadores de Hb S na forma homozigota (Hb SS) e talassemia beta maior. A clínica da doença falciforme é variável, pois depende de fatores genéticos, sociais, e ambientais. Três características geneticamente determinadas têm importância na gravidade da evolução clínica: as interações com a talassemia, os níveis de hemoglobina fetal (Hb F) e os haplótipos associados ao gene da Hb S. Além disso, problemas clínicos significantes acompanham também os duplos heterozigotos envolvendo a Hb S e Hb C (W.H.O., 1989; CHAMI, et al., 1994; GHANI, et al., 2002).

Estudos realizados em populações brasileiras revelam a existência de, aproximadamente, 10 milhões de pessoas com hemoglobinopatias, e de cerca de três mil nascimentos/ano de homozigotos (SIQUEIRA et al., 2002; BONINI-DOMINGOS et al., 2006). Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, quanto à prevalência da Hb S em diferentes regiões brasileiras, estima-se a existência de mais de sete milhões de portadores heterozigotos e de 25 a 30 mil afetados com a forma homozigota (Hb SS), além do nascimento de 3500 novos

casos anuais de doenças falciformes no país. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, *in* CANÇADO; JESUS, 2007)

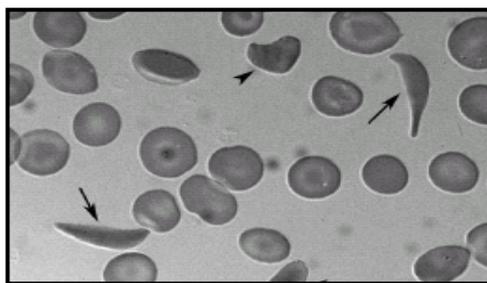
Na região Ibero-americana, a Hb S, bem estabelecida como o polimorfismo mais freqüente, junto com a Hb C, têm grande importância clínica e antropológica. Destaca-se, porém, que a migração eletroforética em pH alcalino apresenta similaridade com outras Hb, e estudos complementares para sua correta caracterização são necessários (ZAMARO *et al.*, 2000; BONINI-DOMINGOS *et al.*, 2006). Contudo, a maioria das variantes como Hb E e Hb D Punjab, originárias da Ásia, e Hb Korle-Bu e Hb G-Philadelphia, originárias da África, que apresentam um traçado eletroforético semelhante à Hb S, são menos freqüentes (SAENS-RENAULD *et al.*, 1993; CHINELATO, 2003; ONDEI, 2005; ZAMARO, 2007).

## **1.2 Hemoglobina S**

A Hb S, originada por mutação pontual do códon GAG (ácido glutâmico), que foi substituído por GTG (valina) correspondente ao 6º aminoácido da cadeia polipeptídica no braço curto do cromossomo 11, ocasiona alterações na estabilidade e solubilidade da Hb falcizada (FRENETTE; ATWEH, 2007). A mudança de carga elétrica negativa do ácido glutâmico, para carga elétrica neutra, como o da valina, tem como conseqüência, alteração na mobilidade eletroforética desta Hb, deixando-a mais lenta que a Hb A em eletroforese pH alcalino. Esta característica. Favorece sua polimerização, em condições de baixa tensão de oxigênio, com alteração do eritrócito que também torna-se rígido, sem elasticidade conforme ilustra a Figura 1 (HIGGS;WEATHERALL, 1993; NAOUM, 1997; WEATHERALL; CLEGG, 2001; FRENETTE; ATWEH, 2007).

As alterações celulares são dependentes da concentração de Hb S, mediadas pelo oxigênio, temperatura e desidratação, afetando a membrana, tornando-a falcizada, aumentando a concentração de cálcio, diminuindo a concentração de potássio e diminuindo também ATP. As alterações de membrana resultantes da polimerização podem ser revertidas com a reoxigenação celular,

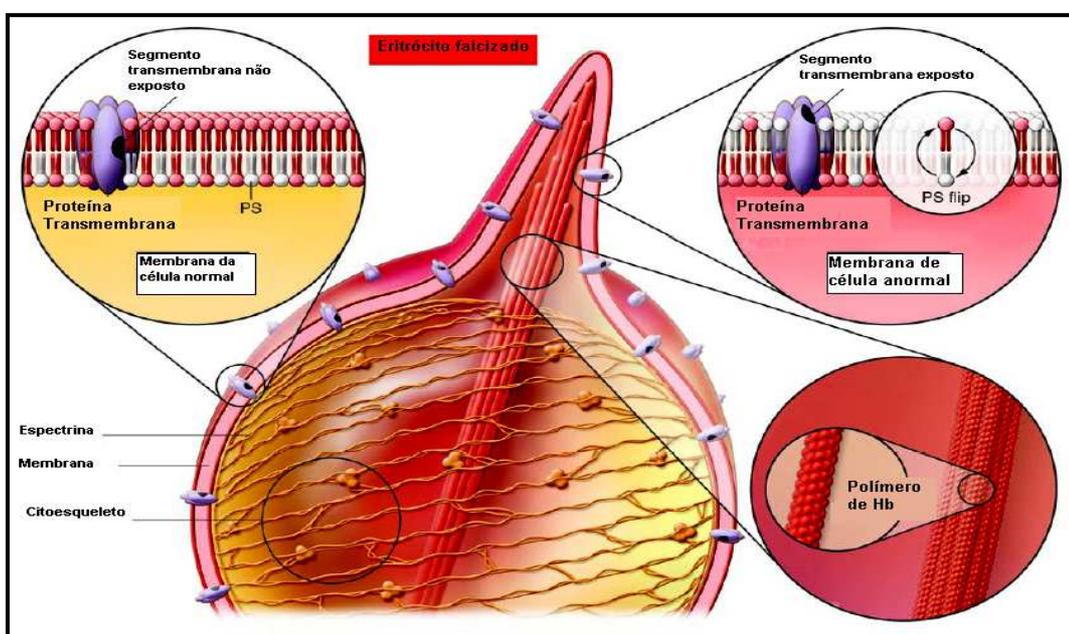
porém, como o processo de falcização é repetido, as alterações funcionais aumentam e a célula torna-se irreversivelmente falcizada (Figura 2). Indivíduos homocigotos (Hb SS) possuem de 4% a 44% de eritrócitos falcizados, irreversíveis, na circulação periférica, que são retiradas da circulação sanguínea mais precocemente do que o tempo médio de 120 dias.



**Figura 1:** Esfregaço de sangue periférico de um paciente com doença falciforme, com presença de drepanócitos (setas) (modificado de FRENETTE; ATWEH, 2007).

As lesões celulares causadas por radicais livres derivados de espécies ativadas de oxigênio ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $HO^{\cdot}$ ) estão associadas com a diminuição da sobrevivência do eritrócito em vários tipos de anemias hemolíticas, sejam de ordem adquirida, hereditária, induzida por drogas oxidantes ou metais pesados. Os eritrócitos falcêmicos têm suas lesões intensificadas em uma relação direta com a concentração de Hb S intra-eritrocitária, sendo que em alguns casos, quando a concentração de Hb S é superior a 90%, a vida média dos eritrócitos é de aproximadamente 30 dias (BEUTLER, et al., 1995; FRENETTE; ATWEH, 2007). Qualquer situação patológica que aumente a geração de radicais, seja pela elevação de processos pró-oxidantes ou pelo desequilíbrio das defesas antioxidantes, acentuará a produção de espécies ativadas de oxigênio (NAOUM; SOUZA, 2004).

O gene da Hb S apresenta alta prevalência em várias regiões da África e em outras partes do mundo onde a malária por *Plasmodium falciparum* é endêmica, ou onde existam grupos de imigrantes portadores do gene S. A alta prevalência de Hb S nessas áreas pode ser explicada por dois mecanismos: seleção de heterozigotos em áreas altamente malarígenas e imigração espontânea ou forçada dos portadores do gene alterado (ALLISON, 1964; CLEGG-WEATHERALL, 1999; ASHLEY-KOCH et al.,2000).



**Figura 2** - Alteração da membrana celular por polímeros de Hb S. Os polímeros rompem o citoesqueleto e formam uma saliência resultando em um desarranjo da bicamada de fosfolípidios causando a inversão da fosfatidilserina (PS) e exposição da proteína transmembrânica (modificado de FRENETTE; ATWEH, 2007).

Estudos antropológicos associados às análises biomoleculares sugerem que o gene anormal para a síntese da globina S tenha primeiramente ocorrido na região centro-oeste da África, Índia e leste da Ásia. Admite-se, portanto, que a

origem da Hb S foi multirregional, atingindo populações com diferentes haplótipos e, por essa razão, certamente é possível entender a diversidade clínica que se observa entre os pacientes com a doença falciforme (NAOUM; BONINI-DOMINGOS, 1997).

Por meio de seis diferentes enzimas de restrição (*Hinc I*, *Hinc III*, *Xnm I*, *Hinf I*, *Hpa I* e *Bam HI*) é possível identificar os cinco haplótipos para o gene  $\beta^S$ , classificados conforme a origem geográfica em: Asiático (ou Indiano-Asiático), Senegal, Benin, Bantu e Camarões. A maioria dos cromossomos com o gene  $\beta^S$  tem um dos cinco haplótipos comuns, mas em alguns pacientes (5% - 10%) podem ser encontrados haplótipos menos comuns, usualmente denominados como haplótipos atípicos. Estes são provavelmente gerados por uma variedade de mecanismos genéticos como mutações em ponto nos sítios de restrições, simples ou duplas trocas entre dois haplótipos  $\beta^S$  típicos ou, mais freqüentemente, associação entre um haplótipo  $\beta^S$  típico e um haplótipo  $\beta^A$  diferente (ZAGO et al., 2000).

A população da região noroeste do estado de São Paulo é, em sua maioria, formada por descendentes de caucasóides do mediterrâneo, com pouca influência africana (NAOUM et al., 1984). A freqüência da Hb S para a região de São José do Rio Preto sofre influência dos fluxos migratórios internos e está estimada entre 2,5% e 3,0% (BONINI-DOMINGOS, 1993; NAOUM, 1997, SIQUEIRA, et al., 2002; DOMINGOS et al., 2004).

### **1.3 Metabolismo do Ferro**

O ferro é o metal mais abundante na Terra, sendo freqüentemente encontrado na forma insolúvel ( $Fe^{+3}$ ). A capacidade de doar elétrons torna este metal fundamental para funções celulares, como síntese de DNA, transporte de oxigênio e respiração celular. Uma importante função do ferro é a sua participação na eritropoiese. Entretanto, devido ao seu potencial oxi-redutor, suas quantidades devem ser rigorosamente controladas, pois, quando em excesso, podem produzir

radicais livres que agredem as biomoléculas (PIETRANGELO, 2002, ANDREWS, 2005; FRAZER; ANDERSON, 2005).

Em condições normais, o conteúdo de ferro no organismo humano é estável, podendo ser encontrado entre quatro e cinco gramas, com a prioridade de satisfazer a necessidade eritropoiética, de aproximadamente 20 mg por dia, na incorporação pela Hb. As reservas desse elemento nos seres humanos são variáveis. Em mulheres pré-menopausa estão ao redor de 300mg, devido às perdas sanguíneas menstruais e ao aumento das necessidades nas gestações, e, em adultos do sexo masculino, pode alcançar até um grama (PIETRANGELO, 2006).

O controle de absorção férrica é realizado pela superfície do lúmen duodenal, sendo necessária a atuação de um sistema metabólico eficiente, capaz de regular os níveis do metal, impedindo sua ação tóxica nos componentes celulares. O ferro é um metal hidrofílico polar e incapaz de atravessar membranas, por isso, sua entrada na célula é mediada por especializações de membrana, garantindo sua redução para um estado solúvel ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e favorecendo sua ligação a transportadores celulares (PIETRANGELO, 2002).

O ferro presente nos alimentos se encontra sob duas formas: heme e não heme (MACKENZIE; GARRICK, 2005). Os mecanismos de regulação do ferro heme são pouco conhecidos. Sua absorção no lúmen da porção proximal do intestino delgado ocorre pela digestão proteolítica da hemoglobina e da mioglobina. O heme liberado é absorvido pela membrana apical e, clivado no lisossomo pela enzima heme oxidase em bilirrubina e  $\text{Fe}^{2+}$ . O mecanismo de liberação do ferro desse compartimento para o citosol também não está totalmente esclarecido (MACKENZIE; GARRICK, 2005).

Nas últimas décadas estudos foram realizados para elucidar os mecanismos que controlam o processo de absorção do ferro não heme. Na primeira etapa desse mecanismo, o ferro, presente na luz intestinal, é captado para o enterócito, através da membrana apical. A proteína responsável por esse transporte é um transportador de metal bivalente, a DMT1. Portanto, o ferro que em sua maioria se encontra no estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), necessita ser reduzido para a

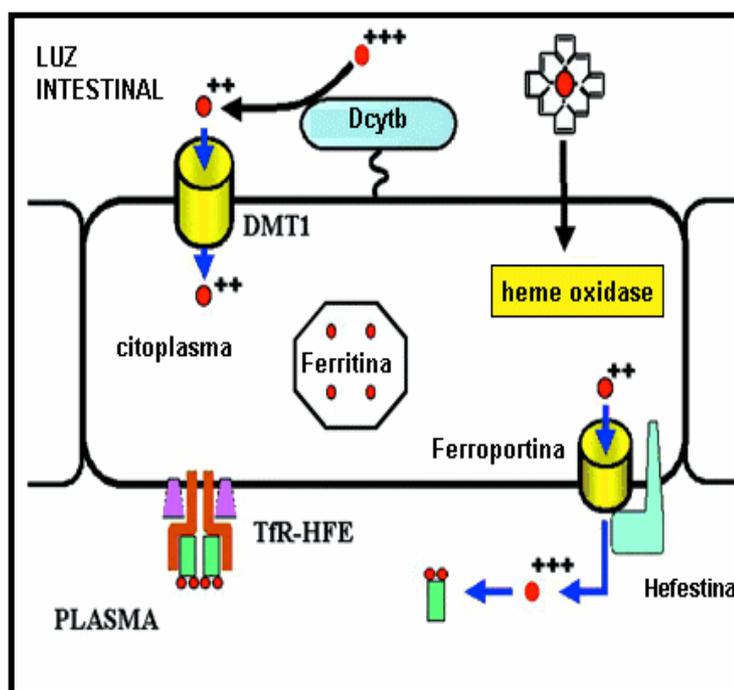
forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ), para ser absorvido. A enzima responsável por esse processo parece ser uma ferredutase, a Dcytb (ANDREWS, 2005). A DMT1 e a Dcytb estão presentes na membrana apical dos enterócitos, nas vilosidades do duodeno proximal e a regulação está associada à quantidade de ferro corporal disponível (MACKENZIE; GARRICK, 2005).

Dentro da célula o ferro pode ser armazenado sob a forma de ferritina, e posteriormente, perdido na descamação celular, ou absorvido para a corrente sanguínea. O mecanismo de transporte para a membrana basocelular é pouco conhecido, sendo provável que o ferro se ligue a uma chaperona, o que manteria sua solubilidade (ANDREWS, 2005). O transporte pela membrana basocelular para o plasma é mediado por uma proteína transportadora, a ferroportina 1, encontrada em grande quantidade no fígado, baço, rins, coração, placenta e células duodenais, sendo também responsável pela liberação do ferro armazenado nos macrófagos e hepatócitos (DONOVAN et al., 2000). Finalmente, na corrente sanguínea, o ferro necessita ser novamente oxidado para ser captado pela transferrina. A enzima responsável por esse processo parece ser a hefestina. (VULPE et al., 1999; DONOVAN et al., 2005) (Figura 3).

O ferro ligado a transferrina é transportado, pelo sistema porta, para o fígado onde é armazenado, associado à ferritina e hemossiderina (KAWABATA, 1999). A transferrina é uma proteína plasmática que tem a capacidade de transportar dois átomos de ferro. O transporte para dentro das células é realizado pelos receptores da transferrina, TRF1 e TRF2, localizados na superfície celular. Cada receptor pode se ligar a duas moléculas de transferrina. O TRF1 é expresso em todas as células do organismo, geralmente, em pequena quantidade, porém, é altamente expresso nos precursores eritróides, linfócitos ativados, trofoblastos do sincício placentário e células tumorais. O TRF2 se expressa principalmente nos hepatócitos, não sendo regulado pela sobrecarga de ferro hepático (KAWABATA et al., 2000; FLEMING et al., 2000).

As principais células de armazenamento do ferro são os macrófagos e os hepatócitos, oriundos de fontes diferentes. O ferro liberado pela destruição dos

eritrócitos e o ferro medicamentoso são estocados nos macrófagos. Os hepatócitos armazenam o ferro livre e o que estava ligado a transferrina. Essas células têm grande capacidade de armazenamento, podendo conter até 10 vezes a quantidade normal, sem evidências de dano hepatocelular (ANDREWS, 2005). Em nível molecular, o ferro é armazenado primariamente na forma de ferritina, e cada molécula desta proteína acomoda cerca de 4500 átomos de ferro. A degradação da ferritina forma a hemosiderina, um conglomerado de ferro não homogêneo com restos de produtos de membrana e proteínas. O ferro da hemosiderina não consegue ser mobilizado (THEIL, 2003).



**Figura 3.** Mecanismo de absorção do ferro intestinal (Adaptado de BRITTENHAM et al., 2001).

A ferritina é encontrada em pequenas quantidades no plasma. Sua concentração é diretamente relacionada com a quantidade de ferro armazenado e, por isso, sua dosagem tem sido usada, rotineiramente, para avaliação das reservas orgânicas (WALTERS et al., 1973; BASSET et al., 1984). A absorção de ferro é

influenciada por vários fatores como: reservas de ferro, taxa de eritropoiese, hipóxia, inflamação e gravidez. Esses fatores atuam modificando a expressão duodenal da DMT1, Dcytb e ferroportina 1. Vários mecanismos de regulação têm sido sugeridos. A concentração de DMT1 e Dcytb é fortemente afetada pelas quantidades de ferro nos enterócitos. Esse mecanismo de regulação parece ser mediado pelas proteínas reguladoras do ferro (IRPs), que se ligam aos elementos responsivos (IREs) presentes no RNAm, da enzima DMT1 intestinal, estabilizando a molécula, e aumentando sua concentração enzimática. A molécula da enzima Dcytb não possui domínio para ligação com proteínas reguladoras do ferro, sugerindo um mecanismo de controle diferente (MACKENZIE; GARRICK, 2005; FRAZER; ANDERSON, 2005).

O mais recente e importante avanço nessa área foi o reconhecimento do fígado como órgão central desse mecanismo. Sua ação está relacionada à síntese de um pequeno peptídeo de 25 aminoácidos, a hepcidina. Estudos indicam que a hepcidina se liga diretamente a ferroportina ocasionando sua interiorização e posterior degradação. Nas células intestinais a ausência da ferroportina leva a uma diminuição da liberação do ferro para a corrente sanguínea e, conseqüentemente ao aumento do ferro celular e ao bloqueio de sua absorção (NEMETH *et al.*, 2005; WESSLING-RESNICK, 2006.) Da mesma maneira, a liberação do ferro dos macrófagos é inibida.

A síntese da hepcidina é regulada pelas quantidades de ferro, de oxigênio e por citocinas liberadas durante processos inflamatórios. O aumento da oferta de ferro, pela alimentação ou por transfusões sanguíneas, estimula sua síntese. Com o aumento compensatório da eritropoiese, diminui a concentração desse hormônio, facilitando a absorção intestinal e a liberação do ferro armazenado. Estudos em portadores de sobrecarga de ferro têm identificado três moléculas que desempenham um papel fundamental na regulação da expressão da hepcidina (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2004; GANZ, 2005; FRAZER; ANDERSON, 2005; PIETRANGELO, 2006). A primeira a ser descrita foi a HFE, uma proteína da superfície celular, cuja estrutura inclui um grande domínio extracelular, formado

de três alças ( $\alpha 1$  a  $\alpha 3$ ), um único domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. Para estabilização, transporte intracitoplasmático e expressão da HFE na superfície celular e nas membranas endossomais, é necessário a ligação com a  $\beta_2$  microglobulina, que se faz pela alça  $\alpha 3$ . Nesse mesmo sítio ocorre a interação com o TfR1. Mutações que afetam essa associação podem ocasionar sobrecarga de ferro. A proteína HFE é expressa em vários tecidos, principalmente no fígado, sendo pouco influenciada pelas mudanças da concentração do ferro orgânico (FLEMING; BRITTON, 2006).

Outra proteína importante no metabolismo do ferro e expressa principalmente pelas células hepáticas é o receptor de transferrina 2 (TfR2). Mutações no gene que a codifica ocasionam distúrbios semelhantes aos do gene *HFE*.

A última proteína envolvida no processo a ser descrita, foi a hemojuvelina. Até o momento, sua função não foi totalmente elucidada, porém indivíduos com mutações no gene *HJV* apresentam importante diminuição dos níveis de hepcidina, evoluindo com rápida sobrecarga de ferro e acentuado dano orgânico (PIETRANGELO, 2006). Os mecanismos exatos de como essas moléculas identificam a quantidade de ferro orgânico e regulam a expressão da hepcidina ainda não foram esclarecidos.

#### **1.4 Hemocromatose Hereditária**

A hemocromatose é uma doença multifatorial caracterizada pela progressão de uma anormalidade bioquímica para a toxicidade nos órgãos. A hemocromatose hereditária (HH) é caracterizada pelo acúmulo de ferro (Fe) no organismo, freqüente em descendentes do norte europeu, sendo provavelmente de origem celta. A primeira referência dessa doença data de 1865, na França, por Trousseau. Passados 25 anos, Von Recklinghausen, em 1889 na Alemanha, utilizou-se pioneiramente do termo “hemocromatose” descrevendo uma doença relacionada a problemas de estocagem e difusão de ferro. Apenas em 1935, foi

caracterizada como uma doença hereditária gerada pelo excesso de ferro depositado nos tecidos (SHELDON, 1935; PIETRANGELO, 2006).

A HH tem herança autossômica recessiva, e sua descoberta permitiu grande avanço no entendimento dessa patologia. A alteração da proteína HFE representa um papel essencial no processo, mas sua presença, somente, não é suficiente para explicar o amplo espectro das conseqüências metabólicas e patogênicas atribuídas à HH. Dentro deste contexto, existem muitos fatores relacionados ao indivíduo, como idade, gênero, genes modificados, ou adquiridos, dieta e consumo de álcool, exercendo um importante papel na penetrância desse gene. O diagnóstico precoce da HH é essencial, pois o tratamento pode ser iniciado antes da instalação dos danos irreversíveis aos órgãos, podendo o indivíduo ter uma boa expectativa de vida (PIETRANGELO, 2006).

Os sintomas clínicos têm início ao redor da quarta década de vida e são inespecíficos. Os mais comuns são fadiga, indisposição e dores articulares. Nas fases avançadas, a doença pode se manifestar com cirrose hepática, diabetes mellitus, hipogonadismo, cardiomiopatia, artrite, hiperpigmentação da pele e carcinoma hepatocelular. Pacientes com HH apresentam estoques aumentados de ferro (25 a 30g), em conseqüência da intensa absorção intestinal (LIMDI; CRAMPTON, 2004), mas, apesar desse mecanismo não estar ainda bem determinado, acredita-se que esse aumento seja provocado por um descontrole das células duodenais superficiais em captar o metal mais avidamente (PIETRANGELO, 2004). A excreção do ferro é bem limitada, fazendo com que o organismo tenha dificuldade em livrar-se do excesso por ele mesmo, exceto por hemorragias (PIETRANGELO, 2006).

O gene *HFE* está localizado no braço curto do cromossomo seis, dentro do Complexo Principal de Histocompatibilidade, com sete éxons e aproximadamente 10 Kb. Codifica um polipeptídeo de 343 resíduos de aminoácidos, a proteína HFE, com características histoquímicas semelhantes às proteínas de classe I do HLA. Duas mutações foram identificadas inicialmente no gene *HFE*, em pacientes caucasóides com HH:

a) C282Y: troca de guanina por adenina no nucleotídeo 845, que leva a uma substituição de um aminoácido cisteína para tirosina na posição 282. Esta mutação gera uma proteína defeituosa que não permite a interação com a proteína plasmática acessória,  $\beta 2$  Microglobulina, responsável pelos mecanismos regulatórios do ferro no organismo. A proteína mutante fica retida no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático onde é degradada (FLEMING; BRITTON, 2006). Desta forma há uma diminuição na captação do ferro ligado a transferrina, pelas células duodenais, levando a diminuição da sua concentração nessas células e, portanto, sinalizando para o aumento da expressão das proteínas reguladoras do ferro (IRPs), da enzima DMT1 e da ferroportina (SIAH et al.,2006).

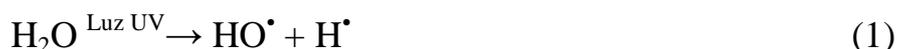
b) H63D: troca de citosina por guanina no nucleotídeo 187 que resulta na substituição de um aminoácido histidina por um aminoácido ácido aspártico na posição 63 (FEDER et al.,1996). A mutação H63D produz uma proteína que diminui a afinidade do ferro ao receptor da transferrina, mas não altera a interação da HFE com a  $\beta 2$  Microglobulina (Figura 4) (BITTENCOURT et al.,2002).

Das 37 variantes alélicas descritas no gene, a C282Y e a H63D respondem por 90% dos casos de HH (SOUZA; CARVALHO, 2001; BEUTLER, 2004; HUNT; HUAWEI, 2004).

Na hemocromatose associada ao gene *HFE*, a elevação da saturação da ferritina é o marcador bioquímico mais precoce e freqüente, estando acima de 45% na maioria dos pacientes (SWINKELS et al.,2006). Os exames mais utilizados para triagem laboratorial de sobrecarga de ferro são a saturação de transferrina e a ferritina sérica. Porém, a dosagem de ferritina é menos sensível que a saturação para a detecção da doença e, além disso, o aumento de sua concentração está relacionado à outras patologias como doenças inflamatórias, neoplasias e necrose hepatocelular (SWINKELS et al.,2006; SIAH et al.,2006). Níveis de ferritina acima de 200ng/mL e 300 ng/mL, em mulheres e homens, respectivamente, na ausência dessas patologias, são indicativos do aumento das reservas de ferro e necessitam de melhor investigação (CAZZOLA et al.,2003; CAMASCHELLA, 2005).

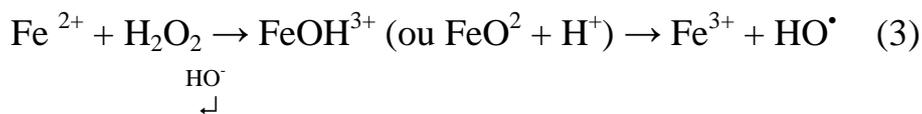


radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares, do núcleo e mitocondrial. Ele é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante (Equação 1). O ataque intensivo e frequente deste radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos.



O peróxido de hidrogênio isoladamente é praticamente inócuo, porém pode se difundir facilmente pelas das membranas celulares. Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical  $\text{HO}^\bullet$  em seu interior.

Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são  $\text{Cu}^{1+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ . Nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade e, no organismo, na maior parte do tempo ele encontra-se complexado com proteínas de transporte (ex. transferrina), e armazenamento (ex. ferritina e hemossiderina). A reação do  $\text{Fe}^{2+}$  com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reação de Fenton) pode ser representada de maneira simplificada na Equação 2 ou de forma mais complexa na Equação 3 (BARREIROS et al., 2006).



Antioxidantes atuam na defesa do organismo contra danos provocados por substâncias oxidantes, que podem ser endógenos ou absorvidos pela dieta. O potencial antioxidante das amostras biológicas pode ser determinado por meio de um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E (JAN et al., 2002).

Um dos fatores que predispõe o processo hemolítico nas células falciformes induzindo-o às múltiplas conseqüências patológicas da doença falciforme deve-se à degradação oxidativa da Hb S (DAS, 1990; STEINBERG, 1998; SOUZA, 1999). Com a desoxigenação, a afinidade ao oxigênio pela Hb S cai e, dessa forma, qualquer fator que estabilize o estado desoxi reduzirá a afinidade pelo oxigênio, perpetuando esse estado e a polimerização (BEUTLER, 1983; FRENETTE; ATWEH, 2007). A desoxigenação da Hb S favorece a sua metahemoglobinização (meta-Hb S) e a conseqüente elevação desse pigmento dentro do eritrócito. Quando a concentração de meta-Hb S supera a ação da enzima meta-Hb redutase, é desencadeada a degradação da meta-Hb S, com formação de hemicromos ou subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina S, oxidada sob forma de corpos de Heinz (WINTERBOURN, 1990; NAOUM, 1996).

Durante a transformação do eritrócito discóide com Hb S em eritrócito afoiçado, além dos eventos bioquímicos e polimerizantes da célula, ocorre também a degradação oxidativa da Hb S, com liberação de espécies ativadas de oxigênio ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $HO^{\cdot}$ ) que alteram a distribuição das moléculas de IgG na superfície da membrana eritrocitária. As alterações de membrana resultantes da polimerização, levam à falência parcial da bomba de sódio/potássio/ATPase, com conseqüente perda de potássio e água pela célula, aumentando a concentração de Hb S e favorecendo ainda mais a polimerização. Ocorre também, aumento na concentração de cálcio intracelular, por alteração na bomba de cálcio/ATPase e aumento da permeabilidade da membrana a esse íon (NAGEL et al., 1991; NAOUM, 1997).

A disposição desordenada da molécula de IgG em determinadas regiões da célula falciforme facilitam as ligações com os receptores Fc das células endoteliais e, dessa forma, induzem a ação fagocitária dos macrófagos no sistema fagocitário mononuclear, causando hemólise e anemia (SOUZA, 1999).

## 1.6 Peroxidação Lipídica

Os radicais livres superóxido e peróxido de hidrogênio, apesar de pequena ação direta sobre os constituintes celulares são considerados agressivos principalmente pelo fato, de na reação de Haber-Weiss, reagirem para produzir os radicais hidroxila, os verdadeiros responsáveis pela lesão celular. Os radicais hidroxila atuando sobre lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, promoverão “estresse oxidativo”, gerando modificações da função e estrutura celular que poderão levar esta célula à morte. Da ação dos radicais hidroxila sobre os ácidos nucleicos, decorrem modificações estruturais da molécula do DNA, implicando em alterações, como mutações gênicas, e envolvimento na inicialização do câncer. Em proteínas, os radicais livres causam oxidação com quebra de cadeias polipeptídicas e/ou perda ou alteração de atividade enzimática, e sobre lipídios resultam em peroxidação lipídica, que é o principal responsável por alterações da permeabilidade da membrana celular (FELIPE JR; PERCÁRIO, 1995; PERCÁRIO, 2007; ZANELLA, et al.,2007)

A peroxidação lipídica ocorre em ácidos graxos poliinsaturados e é iniciada por um radical HO<sup>•</sup> que captura um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia polialquil do ácido graxo. O fato do oxigênio ser sete a oito vezes mais solúvel em meio não polar que em meio polar, permite que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração de oxigênio na região hidrofóbica medial, com potencial para realizar maior dano aos ácidos graxos poliinsaturados da membrana, pois é a estrutura mais suscetível à desestruturação provocada pela peroxidação lipídica. Assim, um ácido graxo, com um elétron desemparelhado, reage com oxigênio, gerando um radical peroxil. Este produto é altamente reativo e pode se combinar com outros radicais semelhantes, alterando as proteínas de membrana (GATE *et al.*,1999).

As principais conseqüências da lipoperoxidação da membrana são: alteração de permeabilidade, alteração do transporte de substâncias orgânicas e inorgânicas, alteração da bomba de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> e ATPase; danos ao DNA e morte celular (NAOUM; SOUZA, 2004). Um dos produtos da peroxidação

lipídica da membrana é o malondialdeído (MDA), um dialdeído altamente reativo, que eventualmente reage com o grupo amino, proteínas, fosfolípidios ou ácidos nucleicos, induzindo modificações estruturais das moléculas biológicas (MCBRIDE; KRAEMER, 1999).

O aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, pode levar a peroxidação lipídica observada na anemia falciforme, situação em que ocorre também, liberação anormal de ferro e baixa atividade antioxidante (DASGUPTA, et al., 2006). A Hb S apresenta efeito sobre as células sanguíneas, desencadeando processos oxidativos com geração de radicais livres (SOUZA, 1999; MANFREDINI et al., 2008). Efeito semelhante observa-se no acúmulo de ferro, em decorrência da hemocromatose hereditária. Os defeitos de metabolismo do ferro, em especial aqueles oriundos dos polimorfismos no gene *HFE*, levam ao acúmulo de ferro tecidual, com potencial capacidade oxidante e peroxidação lipídica (McCULLOUGH; BARTFAY, 2008).

Tendo como base o possível efeito tóxico da hemoglobina S e do acúmulo de ferro em decorrência de destruição eritrocitária e/ou Hemocromatose Hereditária, relatados na literatura, objetivou-se avaliar a frequência dos polimorfismos do gene *HFE*, em doadores de sangue portadores de Hb S, e sua relação com peroxidação lipídica e estresse oxidativo.

## ***2.Objetivos***

## 2. Objetivos

### Hipótese:

Os doadores de sangue, portadores de Hb S e de mutantes no gene *HFE*, apresentam aumento do processo oxidativo e conseqüente destruição eritrocitária.

### 2.1. Gerais:

2.1.1. Identificar os mutantes C282Y e H63D, do gene *HFE*, em doadores de sangue com a hemoglobina S, para avaliação dos possíveis efeitos fisiopatológicos e de danos oxidativos, auxiliando desta maneira, no acompanhamento dos portadores desses defeitos, para um melhor entendimento sobre a variabilidade genética da população da região Noroeste do Estado de São Paulo.

### 2.2. Específicos:

2.2.1. Identificar as isoformas de Hb, com padrão de migração semelhantes em pH alcalino, por diferentes metodologias como: Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC), PCR-RFLP, PCR-AE; contribuindo para o conhecimento dos genótipos de Hb humanas a partir do fenótipo, com a finalidade de isolar as amostras com Hb S;

2.2.2. Verificar a frequência dos polimorfismos C282Y e H63D em portadores de Hb S;

2.2.3. Avaliar, nos portadores de Hb S e de mutantes C282Y e H63D, a influência do processo de oxidação das células sanguíneas, por meio da avaliação do estresse total e peroxidação lipídica.

### ***3. Material e Métodos***

## **3. Material e Métodos**

### **3.1. Considerações Éticas**

A população de estudo foi composta por doadores de sangue, de ambos os gêneros, da área de abrangência do Hemocentro de São José do Rio Preto, SP. Foram incluídos na pesquisa doadores com idade entre 18 e 65 anos de idade, independente da etnia, com aspecto físico saudável e que apresentaram hematócrito mínimo de 38% (para mulheres) ou de 40% (para homens), com valor máximo de 55%, critérios esses incluídos nos procedimentos de seleção de doadores de sangue do Hemocentro. Os doadores foram expostos somente a um risco considerado mínimo para sua saúde, caracterizado pela possibilidade de hematoma no local da punção para a coleta de sangue. Todas as informações fornecidas pelos sujeitos da pesquisa e os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram mantidos em sigilo sendo que estes últimos, só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Amostras de DNA e sangue foram armazenadas no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH – UNESP), para estudos posteriores com outros marcadores genéticos, após obtenção de novo consentimento livre e esclarecido. Este projeto teve aprovação do Comitê de Ética local (parecer n° 29/2004) e da CONEP, registrado sob o n° 11586.

Os dados referentes às amostras serão somente do conhecimento do responsável pela pesquisa, garantindo a identidade dos envolvidos. Os doadores foram convidados por carta e/ou telefone, a retornar ao Hemocentro, para a orientação final das análises, quando os resultados foram repassados, em conjunto com os responsáveis pelo serviço de hematologia do Hemocentro.

### 3.2. Casuística

Foi realizado um estudo observacional a partir de análises realizadas com amostras de sangue periférico, de doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto, que após a triagem inicial para hemoglobinopatias por eletroforese em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965) apresentaram alguma fração de Hb anormal.

Foram analisados no período de 16 meses, de Janeiro de 2002 a Abril de 2003, 16.000 amostras de sangue de doadores que vieram ao Hemocentro e/ou núcleo de Catanduva e Votuporanga, espontaneamente, sendo todos doadores de 1ª vez, e que, consultados sobre a pesquisa, concordaram em participar da mesma.

Foi realizada inicialmente uma coleta de 10 mL de sangue por punção venosa em um tubo contendo EDTA 5%, de cada doador, por profissionais capacitados, utilizando-se materiais descartáveis. As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C até o momento das análises que não excedeu uma semana. Foram realizados os testes usuais para a rotina do Hemocentro e a fração restante foi submetida à triagem inicial para hemoglobinopatias, por eletroforese em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965). Todas as amostras que apresentaram alguma fração de Hb diferente de AA (normal), foram encaminhadas ao LHGDH - UNESP de São José do Rio Preto-SP.

Nas amostras encaminhadas foram realizados os seguintes testes: Eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968), análise da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS et al., 2006), resistência globular osmótica em NaCl a 0,36% (SILVESTRONI; BIANCO, 1975), pesquisa de agregados de hemoglobina H (PAPAYANNOPOULOS ; STAMATAYANNOPOULOS, 1974), dosagens de Hb A2 (MARENGO; ROWE, 1965) e Fetal (BETKE et al., 1959). As amostras com algum tipo de Hb variante foram submetidas a HPLC (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 1999), eletroforese de globinas em pH alcalino e ácido (SCHNEIDER, 1974) e, a partir dessa etapa, foi realizada extração de DNA e

teste confirmatório específico para determinação do tipo de hemoglobina existente.

Nas amostras com suspeita de Hb S e Hb C foram realizadas PCR Alelo Específica – PCR-AE (BERTHOLO; MOREIRA, 2006) e nos casos não confirmados, sequenciamento, para a identificação das variantes de Hb mais raras. Ao término desta etapa inicial de triagem e identificação das hemoglobinopatias, foram selecionadas as amostras que apresentaram Hb S, totalizando 270 amostras.

Para a identificação das mutações C282Y e H63D no gene *HFE*, foram convocados por carta, os 270 doadores portadores de Hb AS e obtivemos o retorno de 211. Nas novas amostras foi realizada a técnica de PCR-RFLP para identificação de ambas as mutações (LYNAS, 1997). Foram avaliadas também dois grupos controle com 119 amostras de doadores de sangue com Hb AA e 28 Doentes Falciformes. Para determinação dos polimorfismos C282Y e H63D no gene *HFE*.

Dos 211 doadores com Hb AS analisados, foram reconvocados 43 doadores, portadores de ambas as alterações – Hb S e no gene *HFE*, para realização de testes de verificação do *status* de ferro (ferritina, saturação da transferrina, ferro sérico, hemograma), de destruição eritrocitária (reticulócitos), de processos inflamatórios (Proteína C reativa) e para determinação dos processos oxidativos por meio da avaliação da capacidade anti-oxidante em relação ao Trolox (TEAC) modificado (Re et al., 1999) e peroxidação lipídica (MDA) (PERCÁRIO, 2004). Foram avaliados também, nesta etapa do trabalho, para verificação de processos oxidativos e capacidade antioxidante, grupos controle com 84 doadores de sangue com Hb AA, sendo 21 com polimorfismos no gene *HFE*, 63 sem estes polimorfismos, e 25 Doentes Falciformes, sendo 8 com mutação no gene *HFE*, e 17 sem esta mutação.

Aplicou-se o teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) com nível de significância de 95% ( $p=0.05$ ) e a correção de Yates com  $n<5$  para a comparação das freqüências dos polimorfismos. Para freqüências alélicas, aplicou-se o teste Qui-quadrado e posteriormente a fórmula para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para

comparação dos valores médios e desvio padrão em processos oxidativos, foi utilizado o teste (ANOVA) (com *post-hoc* Tukey quando necessário) para comparação de todos os grupos, e teste t para comparação entre dois grupos, pelo *software* Statistica 7.0.

### **3.3 Métodos**

Os protocolos completos das metodologias utilizadas nesse trabalho estão descritos em Anexo.

#### **3.3.1 Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias:**

- **Preparação de hemolisados:**

As células foram lisadas com saponina para obtenção da solução de Hb, a fim de que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e testes bioquímicos.

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

(SILVESTRONI; BIANCO, 1975)

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. Esta metodologia não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e em outras hemoglobinopatias, como nos heterozigotos para Hb C.

- **Análise a fresco da morfologia eritrocitária** (BONINI-DOMINGOS et al.,2006)

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados ao microscópio óptico, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos. Algumas hemoglobinopatias apresentam alterações morfológicas específicas.

- **Pesquisa de agregados de Hemoglobina H** (PAPAYANNOPOULOS; STAMATAYANNOPOULOUS, 1974)

Os corpos de inclusão de hemoglobina H são formados por cadeias Beta, oriundas da desnaturação do tetrâmero. Após coloração por Azul Crezil Brilhante, esses corpúsculos apresentam-se dispostos homogeneamente no interior dos eritrócitos, como pequenos pontos azulados. Sua presença é indicativa de alfa talassemia.

- **Eletroforese em pH alcalino** (MARENGO; ROWE, 1965)

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

- **Eletroforese em pH ácido** (VELLA, 1968)

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

- **Eletroforese quantitativa em acetato de celulose pH 8,6** – Dosagem de Hemoglobina A<sub>2</sub> (MARENGO-ROWE, 1965)

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais, com posterior eluição da fita de acetato de celulose para realização da dosagem da fração de Hemoglobina de interesse, por espectrofotometria. O aumento de hemoglobina A<sub>2</sub> na grande maioria dos casos está associado às talassemias beta heterozigotas. Porém, em algumas condições patológicas e de origem adquiridas, os níveis dessa hemoglobina estão acima dos normais.

- **Dosagem de Hemoglobina Fetal** (BETKE et al., 1959)

A hemoglobina Fetal é alcali-resistente, enquanto que as hemoglobinas A, A<sub>2</sub> e os tipos anormais são facilmente desnaturáveis por soluções alcalinas. Esse método é sensível para detectar pequenas quantidades de hemoglobina Fetal. Em sangue de cordão umbilical a quantidade desta hemoglobina é de aproximadamente 70 a 90%, em indivíduos com talassemia beta homozigota oscila entre 60 a 98% e na interação talassemia beta/Hb S, o valor varia entre 5,0 a 21,2%. Na talassemia Beta heterozigota, a hemoglobina Fetal pode estar normal ou discretamente aumentada.

- **Eletroforese de cadeias polipeptídicas** (SCHINEIDER, 1974)

A caracterização estrutural das hemoglobinas anormais é realizada em condições muito especiais devido ao seu custo operacional e às dificuldades inerentes aos métodos utilizados. Desta forma, para dar seqüência ao estudo de uma hemoglobina anormal não identificável pelos métodos de qualificação e quantificação, utiliza-se inicialmente, a eletroforese de cadeias polipeptídicas. A separação eletroforética de cadeias polipeptídicas anormais constitui-se em uma análise pré-molecular, muitas vezes conclusiva para o diagnóstico de hemoglobina anormal, sem que haja necessidade de se aplicar métodos de disposição bidimensional de peptídeos e análises de aminoácidos.

- **Cromatografia líquida de alta performance** (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 1999)

Cromatografia de troca catiônica em que moléculas com cargas positivas são adsorvidas em uma fase estacionária da coluna cromatográfica, seguida por eluições induzidas pela passagem de um líquido com alta concentração de cátions. O eluato é detectado opticamente e quantificado computando a área do gráfico correspondente à fração eluída. Os valores de Hb A<sub>2</sub> e Hb Fetal obtidos por esse

sistema são precisos e utilizados como diferencial diagnóstico nas interações com talassemia.

### **3.3.2 Dosagens Bioquímicas:**

- **Dosagem do Malondialdeído (MDA) (PERCÁRIO, 2004)**

O método se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar o complexo MDA-TBA, de cor rósea e absorção máxima de 535 nm. É utilizado para inferir a peroxidação lipídica. Os valores de referência para os níveis de MDA total relatados na literatura apresentam grande variabilidade, estando relacionados com as condições experimentais utilizadas nos diferentes ensaios, com base no MDA plasmático obtido a partir da análise de amostras de indivíduos saudáveis. Valor de referência: 0-440 ng/mL.

- **Dosagem de Ferro Sérico (Kit comercial)**

O ferro férrico é dissociado da proteína transportadora, a transferrina, em meio ácido e reduzido, simultaneamente, para a sua forma ferrosa. O ferro ferroso é, em seguida, complexado com ferrozina, um indicador sensível ao ferro, produzindo um cromóforo colorido que apresenta absorção máxima a 571 nm. Este teste determina a quantidade de ferro livre no soro. Valor de referência: 50-168 µg/dL.

- **Capacidade de Ligação do ferro e frações (Kit comercial)**

Os íons férricos contidos no Reagente 1 saturam os sítios disponíveis para a ligação de ferro da proteína transportadora, a transferrina. O excesso de ferro não ligado forma com o ferrozine presente no Reagente 2 um complexo magenta brilhante, cuja absorbância é medida entre 540 e 580 nm. A diferença entre esta quantidade de ferro e aquela contida no Reagente 1 é a Capacidade Latente de

Ligação do Ferro (CLLF). Medindo-se a concentração de ferro sérico e somando este valor a CLLF, obtém-se a Capacidade Total de Ligação de Ferro (CLTF). O índice de Saturação da Transferrina (IST) pode ser obtido pela fórmula:

$$\text{IST (\%)} = \frac{\text{Ferro sérico}}{\text{CLTF}} * 100$$

Valor de referência: CLTF: 250- 450 µg/dL.

CLLF: 112-346 µg/dL.

IST: 20-50%.

- **Proteína C Reativa - PCRt (Kit comercial)**

Proteína C-Reativa é uma proteína não específica de fase aguda que aparece no sangue durante o processo inflamatório, como medida da reação antígeno/anticorpo pelo método de turbidimetria. Valor de Referência: 0-1,0 mg/dL.

- **Ferritina (Kit comercial)**

A ferritina é encontrada no soro em baixas concentrações e é diretamente proporcional aos depósitos de ferro no corpo. Sua concentração no soro quando analisada com fatores como ferro, capacidade de ligação do ferro, e depósitos de ferro nos tecidos, é útil no diagnóstico de anemias devido à deficiência de ferro, a infecções crônicas e condições como talassemia e hemocromatose, associadas com sobrecarga de ferro. O método consiste de um ensaio imunológico, de duas etapas utilizando tecnologia quimioluminescente direta, que usa quantidades constantes de dois anticorpos anti-ferritina. O primeiro é anti-ferritina policlonal caprino marcado com éster de acridina. O segundo, na fase sólida, é um anti-ferritina monoclonal de rato, covalentemente ligado a partículas paramagnéticas.

Valor de Referência: Homens: 30-400 ng/dL.

Mulheres: 13-150 ng/dL.

- **Dosagem da Capacidade Antioxidante Total em Equivalência ao Trolox (TEAC) modificado** (Re et al.,1999).

A presente dosagem objetiva a capacidade antioxidante total de amostras biológicas. O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Foi utilizado o método proposto por Miller et al., (1993), modificado por Re et al., (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de mensuração. Valor de Referência: 1,78-2,30 mM/L

### **3.3.3. Metodologias moleculares para análise dos polimorfismos**

- **Extração de DNA de Sangue Periférico por fenol-clorofórmio** (PENA et al., 1991), com modificações.

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

- **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares, sob a ação da enzima DNA polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde.

- **PCR-AE para Hb S** (BERTHOLO; MOREIRA, 2006)

Para confirmar a mutação pontual referente à Hb S, o DNA foi amplificado a partir de duas misturas, utilizando três iniciadores para cada

mistura: 1.um par de iniciadores específicos (B5`a e B5`b) para o trecho de interesse e o iniciador específico para o ponto da mutação (BS); 2.a segunda mistura com o iniciador específico (BA) para o alelo normal com modificações (LYNAS, 1997).

- **PCR-RFLP para Análise do Polimorfismo do Gene *HFE*** (LYNAS, 1997)

A pesquisa dos polimorfismos C282Y e H63D foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP, e a digestão enzimática dos produtos amplificados obtida com a utilização das enzimas *Bcl* I, para o polimorfismo H63D e *Rsa* I para o polimorfismo C282Y.

### 3.3.4 Exames Hematológicos

- **Eritrograma**

Realizado em aparelho automatizado Coulter.T890, para contagem de Hematócrito, Hemoglobina e Leucócitos, segundo metodologias clássicas e parâmetros internacionalmente estabelecidos.

Valor de Referência: Hb: 12-16g/dL.

Ht: Homens: 40-55%

Mulheres: 36-47%

Leucócitos: 4.000-11.000 mm<sup>3</sup>

- **Reticulócitos**

Contagem de reticulócitos corados com Azul Crezil Brilhante e confirmados em lâminas com aumento 100x, calculado sobre os valores absolutos.

Valor de Referência: até 1,5%

## ***4. Resultados***

## **4. Resultados**

Os resultados correspondentes a cada um dos objetivos propostos foram separados em capítulos e descritos a seguir.

### **4.1 Capítulo 1**

#### **Freqüência de Hemoglobinas:**

##### **4.1.1. Casuística**

Foram analisadas, em uma triagem inicial para hemoglobinopatias, 16.000 amostras de sangue de novos doadores (primeira doação no período de estudo), sendo que destas, todas as que apresentaram traçado eletroforético diferente de Hb AA, foram encaminhadas ao LHGDH-UNESP para confirmações diagnósticas.

##### **4.1.2. Resultados**

Os resultados deste capítulo foram publicados na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.26- de Janeiro/Março, n.01, 2004. O artigo pode ser encontrado no Apêndice 1.

Do total de amostras analisadas, foram obtidas 397 (2,48%) com hemoglobinas variantes, sendo que destas, 284 (71,53%) com Hb S e similares, 89 (22,41%) com Hb AC e 24 (6,04%) de portadores de outras hemoglobinas incluindo nove hemoglobinas de rara freqüência.

Foram implementadas no laboratório de imunohematologia, onde são realizadas triagem para hemoglobinopatias do serviço, novos métodos para identificação de hemoglobinas variantes, principalmente para diferenciação das “S-like”, de forma a melhorar a orientação aos doadores e a qualidade do sangue a ser transfundido.

Todos os doadores portadores de Hb S e outras variantes de hemoglobinas, após confirmação por testes complementares e/ou moleculares, foram convocados por carta a retornarem ao Hemocentro para atendimento médico. Durante este atendimento, realizado pelo médico hematologista, responsável pelo Hemocentro, foram esclarecidos sobre o tipo de hemoglobina da qual são portadores e sobre a probabilidade de vir a ter um filho com a mesma alteração, ou com algum problema maior caso a (o) parceira (o) também seja portadora (o) desta ou de outra hemoglobina alterada. Os portadores de Hb S foram também orientados, a não efetuarem novas doações de sangue, uma vez que há algumas restrições quanto ao uso de concentrado de hemácias em transfusões (RDC 153, 2004). Há, também durante esta orientação um cuidado especial, com relação à linguagem utilizada, para que seja entendida por todos, nenhum indivíduo se sinta excluído, e a abordagem se torne um problema social. A maioria destes doadores é de afrodescendentes ou do grupo étnico miscigenado e têm a Hb S como herança genética. Em nosso serviço particularmente, uma grande porcentagem dos doadores têm baixo grau sócio-cultural, gerando uma certa dificuldade no entendimento de alterações genéticas e seu padrão de herança.

## 4.2 Capítulo 2

### **Freqüência das Mutações C282Y e H63D no gene HFE**

#### **4.2.1 Casuística**

De 270 doadores avaliados como portadores de Hb S e convocados para nova coleta, retornaram 211 (78,15%). Foram realizadas então, análises por PCR-AE para confirmação do tipo de Hb, e PCR-RFLP para identificação das mutações no gene *HFE*.

Foram selecionadas e avaliadas também para esta etapa, 119 amostras de doadores de sangue com Hb AA e 28 amostras de doentes falciformes utilizados como grupo controle combinado para fins de comparação das freqüências dos polimorfismos no gene *HFE*.

#### **4.2.2 Resultados**

Os doadores avaliados apresentaram idade entre 18 e 65 anos com média de 36,41 anos. Com relação à etnia, apesar de 70% terem se declarado caucasóides, 11% negros, 5% asiáticos e apenas 24% mestiços, a grande maioria, tanto do grupo de estudo quanto do grupo controle, era composta por indivíduos miscigenados e, portanto foram considerados como pertencentes ao grupo étnico miscigenado (Afro/Americanos, Caucasianos e descendentes de Ameríndios), segundo classificação para a população Brasileira (PARRA *et al.*, 2003). Quanto ao gênero, no grupo de portadores de Hb AS, 65,87% dos indivíduos, eram do sexo masculino e no grupo controle com Hb AA, 71,42%.

Entre os portadores de Doença Falciforme, a idade variou entre 15 e 47 anos, com média de 25,48 anos. Quanto à etnia 24 (85,71%) se declararam negros e quatro (14,29%) de descendência caucasóide, embora a presença do alelo mutante  $\beta^s$ , seja um marcador africano. Quanto ao gênero, dos 28 pacientes estudados, 14 (50%) pertenciam ao sexo masculino.

Dos 211 doadores de sangue confirmados como portadores de Hb AS, por PCR-AE, (Figura 5), foram identificados 43 (20,38%) com ao menos uma das duas mutações no gene *HFE* avaliadas (Figura 6), sendo que destes, 28 (65,11%) pertenciam ao gênero masculino. Entre o grupo controle de doadores com Hb AA, das 119 amostras avaliadas 34 (28,57%) apresentaram alguma das mutações no gene *HFE*, e destes 24 (70,58%) eram do gênero masculino. Para o grupo de pacientes falciformes, controle positivo para Hb S, dos 28 avaliados, oito (28,57%) eram portadores de algum dos dois polimorfismos no gene *HFE*, sendo 50% pertencentes ao gênero masculino.

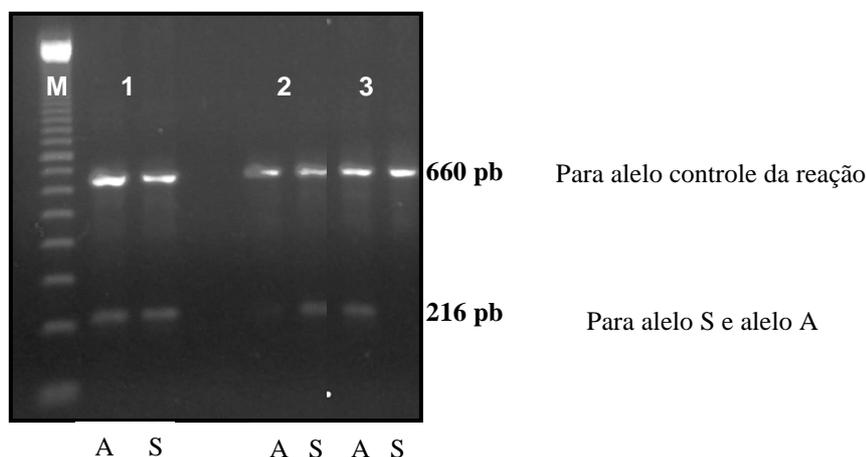
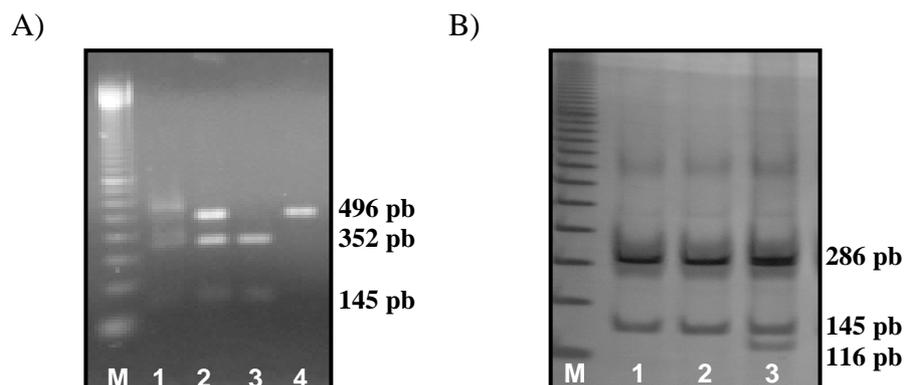


Figura 5: Gel de agarose de resultado de reação de PCR-AE para Hb S. 1- heterozigoto para mutação Hb S; 2- homozigoto para a mutação Hb S; 3- Ausência da mutação para Hb S. M- Marcador de peso molecular.

Foram encontrados entre portadores do traço falciforme, 37 (17,54%) heterozigotos, e três (1,42%) homozigotos para a mutação H63D, dois (0,95%) portadores heterozigotos para a mutação C282Y e um (0,47%) duplo heterozigoto (C282Y/H63D). No grupo controle com Hb AA, foram identificados 28 (23,53%) portadores heterozigotos e um (0,84%) homozigoto para a mutação H63D; três (2,52%) portadores heterozigotos para a mutação C282Y e dois (1,68%) duplos

heterozigotos (C282Y/H63D). Entre os pacientes foram identificados seis (21,43%) heterozigotos para a mutação H63D e dois (7,14%) heterozigotos para a mutação C282Y. A distribuição dos genótipos de acordo com o gênero e o tipo de hemoglobina estão demonstradas na Tabela 1.



**Figura 6:** A) Gel de agarose 1,5% para identificação da mutação H63D. Marcador (M); 1 e 2- heterozigotos para H63D; 3- ausência de mutação; 4- homozigoto para H63D. B) Gel de poliácridamida 8% para identificação da mutação C282Y. 1 e 2- ausência de mutação; 3- heterozigoto para C282Y.

Quando comparadas, as frequências genóticas para as mutações no gene *HFE*, utilizando o teste Qui-quadrado com máxima verossimilhança, não foram encontradas diferenças significativas, entre os portadores de Hb AS e os grupos controle, com Hb AA e Doentes Falciformes ( $\chi^2 = 2,482601$ , grau de liberdade=4,  $p=0,650$ ).

De acordo com as análises realizadas, utilizando o teste Qui-quadrado, verificamos que, para os três grupos estudados, os genótipos dos mutantes no gene *HFE* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em doadores com Hb AS, as frequências alélicas foram de 10,42% para o H63D e 0,71% para o C282Y. No grupo controle Hb AA, as frequências foram de 13,44% e 2,10% e em doentes falciformes de 10,71% e 3,57% respectivamente para os alelos H63D e C282Y conforme demonstrado na Tabela 2. Quando

comparamos as frequências por Qui-quadrado, para o alelo H63D, entre os doadores com Hb AS e cada um dos grupos controle, observamos que não houve diferença significativa ( $p=0,122939$ ) com Hb AA, e com doentes falciformes ( $p=0,890874$ ).

**Tabela 1:** Distribuição das frequências genótípicas para os polimorfismos no gene *HFE* de acordo com o gênero em doadores de sangue com Hb AS e grupos controle (Hb AA e Doentes Falciformes Hb SS).

		C282Y/Wt	H63D/H63D	H63D/Wt	H63D/C282Y	Wt/Wt
Hb AS n=211	Masc	-	2 (0,94%)	26 (12,31%)	-	123 (58,28%)
	Fem	2 (0,94%)	1 (0,47%)	11 (5,21%)	1 (0,47%)	45 (21,32%)
Hb AA n=119	Masc	2 (1,68%)	1 (0,84%)	19 (15,97%)	1 (0,84%)	55 (46,22%)
	Fem	1 (0,84%)	-	9 (7,56%)	1 (0,84%)	30 (25,21%)
Hb SS N=28	Masc	-	-	4 (14,28%)	-	10 (35,71%)
	Fem	2 (7,14%)	-	2 (7,14%)	-	10 (35,71%)

Wt= alelo selvagem; C282Y= alelo mutante para C282Y; H63D= alelo mutante para H63D.

**Tabela 2.** Frequência Alélica das mutações C282Y e H63D no gene *HFE* em doadores de sangue com Hb AS e Hb AA e pacientes falciformes (Hb SS).

Tipo de Hb	Mutação no gene HFE	nº de alelos	Alelos mutados	Frequência Alélica
AS n=211	C282Y	422	3	0,71%
	H63D	422	44	10,42%
AA n=119	C282Y	238	5	2,10%
	H63D	238	32	13,44%
SS N=28	C282Y	56	2	3,57%
	H63D	56	6	10,71%

Nas comparações para o alelo C282Y, entre doadores com Hb AS e com Hb AA, pelo teste Qui-quadrado, também não houve diferença significativa ( $p=0,101333$ ). O mesmo não ocorreu entre doadores com Hb AS e doentes falciformes, em que observamos a frequência alélica para o polimorfismo significativamente aumentada entre os doentes falciformes ( $p=0,047377$ ).

As frequências alélicas dos polimorfismos C282Y e H63D entre os doadores de sangue estão de acordo com a literatura. A frequência do alelo C282Y entre os Doentes Falciformes esteve aumentada, principalmente sendo este um grupo formado principalmente por indivíduos afro-descendentes, e a mutação para o gene *HFE* ter sua origem ligada a populações caucasóides da Europa.

As frequências de polimorfismos no gene *HFE* obtidas através das análises realizadas com as amostras do grupo de doadores de sangue com Hb AS, e também dos grupos controle com doadores com Hb AA e Doentes Falciformes, foram utilizadas para comparações com relação à avaliação dos processos oxidativos destes grupos.

### 4.3 Capítulo 3

## **Avaliação dos parâmetros hematológicos e de estresse oxidativo**

### **4.3.1 Casuística**

Os 43 doadores portadores de Hb AS e de alguma das mutações no gene *HFE* (C282Y e/ou H63D) foram convocados por carta e/ou contato telefônico, para realização dos testes de verificação do depósito de ferro (ferritina, saturação da transferrina, ferro sérico, hemograma e reticulócitos), de processos inflamatórios (Proteína C reativa) e para determinação da capacidade antioxidante (TEAC) e peroxidação lipídica (MDA). Dentre eles, obtivemos a comunicação de um óbito de causa desconhecida e o retorno de 23 doadores totalizando 53,49%. A diferença de casuística observada nos dois itens deveu-se a inviabilidade de realização da técnica com amostras previamente armazenadas colhida com EDTA e ao não retorno dos indivíduos convidados para nova coleta de amostras frescas e com heparina.

A baixa adesão de retorno ao serviço para a nova coleta, deveu-se em alguns casos à impossibilidade financeira para o deslocamento, pois muitos os doadores residiam em outro município. Em outros casos, ao desinteresse dos indivíduos em deixar seus afazeres para a realização de exames, já que aparentemente estavam saudáveis, apesar de receberem todos os esclarecimentos com relação à presença dos polimorfismos. E, além disso, após a doação da amostra para a pesquisa sete doadores tiveram modificação de endereço e telefone, não sendo possível entrar em contato.

Para a verificação dos processos oxidativos, foram avaliados em conjunto com o grupo de estudo composto por doadores com Hb AS e mutações no gene *HFE*, grupos controle para análise comparativa, descritos abaixo:

- Indivíduos com Hb AS, com mutação no gene *HFE*; n= 23
- Indivíduos com Hb AS, sem mutação no gene *HFE*; n= 19

Grupo Controle:

- Indivíduos com Hb AA, com mutação no gene *HFE*; n= 21
- Indivíduos com Hb AA, sem mutação no gene *HFE*; n= 63
- Doentes Falciformes, com mutação no gene *HFE*; n= 8
- Doentes Falciformes, sem mutação no gene *HFE*; n= 17

#### 4.3.2 Resultados

Para verificar a possível influência dos mutantes do gene *HFE* entre os portadores de Hb S avaliamos os parâmetros hematológicos, o perfil de ferro e a capacidade antioxidante. Dos 23 doadores com traço falciforme e algum dos polimorfismos no gene *HFE*, 19 (44,18%) eram portadores heterozigotos da mutação H63D, dois (4,65%) portadores heterozigotos da mutação C282Y, uma (2,32%) portadora de dupla heterozigose H63D/C282Y e um (2,32%) portador homozigoto para a mutação H63D.

No Quadro 1 estão relacionados os valores de referência e unidades dos testes realizados. Os parâmetros bioquímicos individuais encontrados estão demonstrados no Quadro 2. Não foi possível a realização das avaliações de perfil de ferro nos grupos controle, por inviabilidade e insuficiência de amostras, além do fato das análises de perfil de ferro terem sido realizadas em um outro laboratório.

Os valores médios e desvio padrão para cada um dos parâmetros estão descritos na Tabela 03. Destaca-se que por serem doadores de sangue, aqueles indivíduos com anemia ferropriva são previamente excluídos da doação. Assim, todos os resultados hematológicos encontram-se dentro da faixa de normalidade, mesmo na co-herança de defeitos hereditários avaliados. Alguns valores de hematócrito um pouco abaixo do limite preconizado para a doação podem ser explicados porque estas análises foram realizadas não nas amostras colhidas por ocasião da doação de sangue e sim em uma convocação posterior. Quanto aos índices de avaliação do metabolismo de ferro, alguns se encontram acima do

limite superior, porém são casos isolados e deverão ser avaliados individualmente, uma vez que não apresentaram relação com os parâmetros estudados. Destaca-se somente um caso de ferritina aumentada (633ng/dL) em uma mulher de 63 anos portadora da mutação C282Y em heterozigose.

Quadro 1: Valores de referência e unidades dos testes.

Teste	Sexo	Valor de referência
Contagem automatizada de Eritrócitos	M	4,5-5,8 x 1000mm <sup>3</sup>
	F	4,0-5,0 x 1000mm <sup>3</sup>
Dosagem de Hb		12-16g g/dL
Hematócrito (Ht)	M	40-55%
	F	36-47%
Contagem de Leucócitos		4.000-11.000 mm <sup>3</sup>
Reticulócitos		até 1,5%
Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF)		250-450 ug/dL
Capacidade Latente de Ligação do Ferro (CLLF)		112-346 ug/dL
Saturação da Transferrina (IST)		20-50%
Ferro Sérico (Ferro)		50-168 ug/dL
Proteína C Reativa (PCRt)		0-1,0 mg/dL
Ferritina	M	30-400 ng/dL
	F	13-150 ng/dL
Malondialdeído (MDA)		0-440 ng/mL
Dosagem da Capacidade Anti-oxidante Total em Equivalência ao Trolox (TEAC)		1,78-2,30 mM/L

Os valores individuais de Malondialdeído (MDA), que são indicativos de peroxidação lipídica apresentaram-se aumentados em três (15,79 %) indivíduos do grupo de portadores de traço falciforme. O maior valor encontrado foi em um indivíduo portador da mutação H63D em homozigose, e os outros dois em portadores da mesma mutação em heterozigose.

Quadro 2: Resultados dos parâmetros hematimétricos, bioquímicos dos processos oxidativos dos doadores portadores de Hb AS

Hbpatia	Mutação gene <i>HFE</i>		Testes hematimétricos				Testes Bioquímicos							Processos Oxidativos		Id.	sexo
	H63D	C282Y	Ht %	Hb g/dL	GV mm3	Leu mm3	Ret %	CLLF µg/dL	CTLF µg/dL	IST %	Ferro µg/dL	PCRt mg/dL	Ferritina ng/dL	MDA	TEAC		
AS	HET	N	40	13,8	4,61	8,4	1,2	204	318	36	114	0,3	118	428	2,11	66	F
AS	HET	N	48	15,8	5,45	7,4	1,8	155	257	40	102	0,1	126	297	2,12	51	M
AS	HET	N	48	16	5,47	4	1,2	208	288	28	80	0,2	221	112	2,08	30	M
AS	HET	HET	36	11,9	3,97	6,5	1,2	192	263	27	71	0,4	110	335	2,13	26	F
AS	N	HET	44	14,7	4,9	6	1,4	158	270	42	112	0,1	42	223	2,13	27	F
AS	HET	N	46	15	5,24	5,7	1,3	237	319	26	82	1,8	377	186	2,13	36	M
AS	HET.	N	47	15,7	5,14	5,6	2,7	180	254	29	74	0,7	134	260	2,12	57	M
AS	HET.	N	47	15,4	5,4	6,3	0,8	267	361	26	94	0,4	208	260	2,09	54	M
AS	HET.	N	37	12,3	3,98	3,4	0,8	234	355	34	121	0,2	91	394	2,09	34	M
AS	HET	N	44	14,3	4,88	7,5	0,9	272	383	29	111	0,6	218	429	2,21	34	M
AS	HET.	N	39	13,1	4,31	6,6	1,3	211	303	30	92	0,4	45	279	2,15	22	F
AS	HET	N	46	15	5,14	7,3	0,7	204	361	44	157	0,9	177	566	2,11	30	M
AS	HET.	N	40	12,7	4,79	4,1	0,8	311	386	20	75	0,5	38	360	2,15	31	F
AS	HET.	N	45	45	4,88	5	1,1	145	267	46	122	0,1	247	372	2,19	24	M
AS	HET.	N	44	14,5	4,89	3,2	1	190	306	38	116	0,1	38	335	2,13	36	M
AS	HOM.	N	44	14,7	5,22	8,1	1,1	191	266	28	75	1,1	180	600	2,18	20	M
AS	HET	N	46	15,5	5,19	6,8	1,6	241	349	31	108	0,1	331	316	2,15	27	M
AS	HET	N	44	14,9	4,97	4,2	1	186	259	28	73	0,1	71	502	2,21	25	M
AS	HET	N	46	15,2	4,71	5,2	1,2	-	-	-	292	0,1	65	353	2,12	50	M
AS	HET	N	40	13,2	5,54	6,8	1,6	172	297	42	125	0,6	63	409	2,12	32	F
ASH	HET	N	47	14,9	4,96	8,9	1	159	253	37	94	0,2	196	185	2,1	34	M
ASH	HET.	N	38	13	3,7	7,5	1	176	254	31	78	2,6	152	149	2,14	42	F
ASH	N	HET.	44	14,8	4,75	5,5	1,5	129	222	42	93	0,2	633	279	2,04	63	F

Legenda: Ht : Hematócrito;

Ret: Reticulócitos;

CLLF: Capacidade Latente de Ligação do Ferro;

CTLF: Capacidade Total de Ligação do Ferro;

IST: Índice de Saturação da Transferrina;

Ferro: Ferro Sérico;

PCRt: Proteína C Reativa

MDA: Malondialdeído;

TEAC: Capacidade Antioxidante equivalente ao Trolox.

Hb: Hemoglobina;

GV: Glóbulos Vermelhos;

Leu: Leucócitos;

Tabela 3. Valores médios e Desvio Padrão nos valores obtidos entre os testes realizados.

	Ht	Hb	Leu	Ret	CLLF	CTLF	IST	Ferro	PCR	ferritina	Id.
<b>Média</b>	43,36	15,73	6,12	1,22	201	299,59	33,36	98,59	0,53	173,45	36,40
<b>Desvio Padrão</b>	3,59	6,48	1,58	0,42	43,76	48,11	7,09	21,77	0,60	134,87	13,06

Os valores médios de MDA entre os doadores estavam dentro dos limites de normalidade. Foram encontrados valores aumentados apenas entre os doentes falciformes (Tabela 4). Ao se comparar o grupo de doadores com Hb S com o grupo controle com Hb AA, na presença ou não das mutações no gene *HFE* verificamos que não houve diferença significativa. Na comparação dentro do mesmo grupo de doadores com Hb AS, observamos diferença, porém, não significativa. Só foram observadas variações, nas comparações entre o grupo de Doentes Falciformes com ou sem os polimorfismos no gene *HFE* e os grupos de doadores, portadores ou não do traço falciforme, sendo que. Portadores de Doença falcifome apresentaram maiores índices médios de peroxidação lipídica do que os outros grupos. Entre os Doentes Falciformes, não houve diferença significativa entre os portadores ou não das mutações no gene *HFE*. A Tabela 5 mostra as comparações estatísticas, duas a duas, para esses dois parâmetros, nos grupos avaliados

Todos os valores de TEAC obtidos tanto para os doadores heterozigotos para a Hb S quanto para ambos os grupos controle estavam dentro dos limites normais. Doadores com traço falciforme apresentaram os maiores valores médios encontrados. Na análise comparativa realizada entre doadores com Hb AS e ambos os grupos controle, na presença ou não dos polimorfismos no gene *HFE*, as diferenças foram significativas, ou seja, a capacidade antioxidante dos portadores de Hb AS independente da herança ou não dos polimorfismos no gene *HFE* apresentou-se maior do que a dos grupos controle. Na comparação das médias de

TEAC dentro do grupo de portadores de Hb AS com ou sem os polimorfismos para o gene *HFE*, observou-se diferença significativa, o grupo de doadores com Hb AS e sem o polimorfismo no gene *HFE*, apresentou maior capacidade antioxidante do que o grupo com o polimorfismo. Dentro dos grupos controle com e sem a mutação para o gene *HFE* e entre eles não observamos diferença nos valores encontrados.

**Tabela 4:** Valores médios e desvio padrão, resultados máximo e mínimo encontrados para as quantificações de MDA e TEAC, na população avaliada.

Grupos	Sub-grupos	MDA		TEAC	
		Média ± SD (ng/mL)	Min-max (ng/mL)	Média ± SD (µMol/L)	Min-max (µMol/L)
Hb AA	<i>c/HFE</i>	294,61± 107,52	112-578	2,07±0,09	1,86-2,2
	<i>s/HFE</i>	278,80±104,18	93-483	2,07±0,11	1,78-2,31
Hb AS	<i>c/HFE</i>	335 ± 128,38	112-600	2,13±0,03	2,04-2,21
	<i>s/HFE</i>	253,63 ± 122	120-461	2,16±0,05	2,07-2,27
DF	<i>c/HFE</i>	766,87±353	335-1524	2,04±0,07	1,94-2,16
	<i>s/HFE</i>	903,58±507	372-2362	2,05±0,08	1,88-2,21

Legenda: MDA: Malondialdeído; TEAC: Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox;

SD= desvio padrão; Min-max= valores mínimo e máximo.

Com os resultados dos capítulos 2 e 3 do presente trabalho, elaboramos o artigo Estresse oxidativo e frequência dos polimorfismos no gene *HFE* em doadores de sangue portadores de Hb AS, que será submetido à Archives of Medical Science, Fator de Impacto 2,44. Artigo completo pode ser encontrado no Apêndice

**Tabela 5:** Teste ANOVA entre MDA e TEAC para comparação entre os grupos estudados

<b>Grupos</b>	<b>MDA</b>	<b>TEAC</b>
Hb AA c/HFE x Hb AA s/HFE	p=0,5518	p=0,9999
Hb AA c/HFE x Hb AS c/HFE	p=0,2859	p=0,0089*
Hb AA c/HFE x Hb AS s/HFE	p=0,2693	p=0,0004*
Hb AA c/HFE x DF c/HFE	p=0,0075*	p=0,3565
Hb AA c/HFE x DF s/HFE	p=0,0001*	p=0,4736
Hb AA s/HFE x Hb AS c/HFE	p=0,0936	p=0,0003*
Hb AA s/HFE x Hb AS s/HFE	p=0,4229	p=0,0001*
Hb AA s/HFE x DF c/HFE	p=0,0006*	p=0,3129
Hb AA s/HFE x DF s/HFE	p=0,0001*	p=0,4074
Hb AS c/HFE x Hb AS s/HFE	p=0,0530	p=0,0399*
Hb AS c/HFE x DF c/HFE	p=0,0120*	p=0,0086*
Hb AS c/HFE x DF s/HFE	p=0,0003*	p=0,0010*
Hb AS s/HFE x DF c/HFE	p=0,0051*	p=0,0013*
Hb AS s/HFE x DF s/HFE	p<0,0001*	p<0,0001*
DF c/HFE x DF s/HFE	p=0,4450	p=0,7549

Intervalo de confiança e significância  $p < 0.05$ ; \*valores significativos.

DF: Portadores de Hb SS e Hb SS/ $\beta$ talassemia

## ***5. Discussão***

## 5. Discussão

Os portadores de anemia falciforme têm níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio, gerada por diversos fatores, dentre eles o acúmulo de ferro devido a liberação anormal de ferro na hemólise, agravado por transfusões freqüentes, podendo levar a danos celulares por peroxidação lipídica (CESQUINI et al., 2003; DASGUPTA et al., 2006;. MANFREDINI et al., 2008). O ferro liberado tem um papel catalítico importante nas reações de Fenton e de Haber-Weiss produzindo Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) que provocam danos às biomoléculas resultando em alteração na integridade e função celulares (BRITTON, 1996; WALKO et al, 2005). Efeito semelhante em membranas observa-se no acúmulo de ferro decorrente da HH. Os defeitos do metabolismo do ferro, em especial aqueles oriundos dos polimorfismos no gene *HFE*, levam ao acúmulo de ferro tecidual, com potencial capacidade oxidante e peroxidação lipídica (McCULLOUGH; BARTFAY, 2007).

Em nosso trabalho, não foram encontrados valores aumentados de MDA, indicativos de peroxidação lipídica, no grupo de doadores de sangue portadores de Hb AS, independente da presença ou não de polimorfismos no gene *HFE*. Os valores de referência para os níveis de MDA relatados na literatura apresentam grande variabilidade, estando relacionados com as condições experimentais utilizadas nos diferentes ensaios, e desta forma, torna-se necessário a determinação de um intervalo de referência individualizado para cada método desenvolvido, com base na análise de uma população saudável (ANTUNES et al, 2008).

A comparação do grupo de portadores de Hb AS, com e sem a herança dos polimorfismos no gene *HFE*, verificamos que os valores de MDA, apesar de estarem dentro da normalidade, foram mais elevados, na herança concomitante dos dois polimorfismos, indicando a influência de ambas as afecções genéticas, no aumento dos níveis de peroxidação lipídica. Apesar do aumento observado, não foram verificados indícios de destruição eritrocitária aumentada pelos índices hematimétricos.

Valores aumentados de MDA acima dos níveis normais só foram encontrados no grupo controle positivo para HB S, formado por doentes falciformes, independente da co-herança ou não dos polimorfismos no gene *HFE*, evidenciando o potencial oxidativo da alteração de hemoglobina. Conforme relatos da literatura, acreditávamos que a presença do alelo mutante no gene *HFE*, teria uma contribuição importante no aumento da peroxidação lipídica, pelo aumento de ferro tecidual, nos portadores de Hb S. Relata-se ainda que, na HH, muito dos problemas decorrentes do acúmulo do ferro seja influenciado pelo aumento de radicais livres e peroxidação lipídica de membranas (ALMEIDA et al., 2006; McCULLOUGH; BARTFAY, 2007). Porém, na comparação entre Doentes Falciformes com ou sem mutação para o gene *HFE*, por análises estatísticas, quando se elimina a influencia do alelo S, a diferença não foi significativa, e observamos somente, influência dos polimorfismos do gene *HFE*, quando em conjunto com Hb S em heterozigose.

A mutação que origina a Hb S, leva a alterações que podem modificar o balanço entre os radicais livres e a capacidade antioxidante, provocando diminuição nessa última (BLANN et al., 2003; MARWAH et al., 2003; FASOLA et al., 2007). Os valores de TEAC, indicativos da capacidade antioxidante em relação ao TROLOX, análogo da vitamina E, em todas as amostragens desse estudo, estavam dentro da faixa de normalidade. Porém, observamos que, para o grupo com Hb S e polimorfismo no gene *HFE*, foram encontrados valores médios significativamente menores do que em portadores de Hb S sem a mutação para o gene *HFE*. Médias menores para o mesmo marcador foram observadas também nos Doentes Falciformes. Diferente do relatado por MARWAH et al., 2003, mesmo com a terapia transfusional, a capacidade antioxidante destes doentes não se apresentou abaixo dos valores de normalidade, porém, a produção de antioxidantes destes indivíduos, talvez não seja suficiente para compensar o aumento na produção de radicais livres que levam ao estresse oxidativo e à peroxidação lipídica, evidenciado pelo MDA.

A frequência dos polimorfismos no gene *HFE*, descritas na literatura, demonstram que estas mutações são a forma mais comum de defeitos metabólicos do ferro em caucasóides (PIETRANGELO, 2006). Foram encontrados no grupo de doadores de sangue portadores de Hb AS estudados, frequências que estão de acordo com as descritas para estudos populacionais brasileiros, mesmo esse grupo apresentando um marcador de origem africana que é a Hb S (AGOSTINHO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2006; TORRES et al., 2008).

A presença de polimorfismos no gene *HFE*, indicam a existência de alteração genética relacionada à hemocromatose e maior predisposição do doente em desenvolver o fenótipo da doença, entretanto, não é suficiente para o diagnóstico de Hemocromatose Hereditária (HANSON, 2001; BEUTLER, 2003).

Jeng et al., 2003 estudando pacientes falciformes da África, encontrou uma frequência genotípica, que, segundo ele estava de acordo com a população na qual ele realizou o estudo. Observamos, porém, a frequência alélica da mutação C282Y significativamente aumentada no grupo de pacientes falciformes aqui estudados. Destacamos que, sendo esse um grupo formado na sua maioria por indivíduos de origem étnica negra, e a alteração no gene *HFE* ser proveniente de indivíduos de descendência caucasóide, provavelmente a miscigenação da população brasileira, e a presença de portadores de Hb S/ $\beta$ talassemia explique este resultado. Ressaltamos que a clínica de pacientes falciformes é variável e dependente de vários fatores, porém, a grande maioria necessita de transfusão, o que poderia maximizar os efeitos da sobrecarga de ferro.

Segundo Agostinho et al., 1999, a frequência de C282Y é três a oito vezes menor em Brasileiros quando comparados aos caucasóides do norte da Europa, enquanto que a frequência alélica de H63D é praticamente similar. Esta baixa frequência vem sendo observada em populações não-caucasóides, ou que possuem origem étnica bastante diversificada. Em um estudo realizado por Cançado et al., 2007, com pacientes brasileiros com evidências de sobrecarga de ferro, encontraram uma alta frequência de mutações no gene *HFE*, sendo o genótipo homozigoto para C282Y o mais prevalente. Desta forma, observamos que a

freqüência das mutações H63D e principalmente a C282Y apresentam ampla variação dependendo não apenas da população estudada, mas também dos critérios adotados na seleção dos grupos de estudo, principalmente com relação ao diagnóstico da sobrecarga de ferro (CANÇADO et al., 2007). Como a hemocromatose hereditária afeta predominantemente caucasóides de descendência européia, a manutenção do polimorfismo do gene *HFE* pode ser explicada por flutuação alélica ocorrida pelo constante fluxo entre as populações.

A distribuição quanto ao gênero foi mantida entre os grupos avaliados em sua totalidade e após identificação dos mutantes no gene *HFE*. Considerando que doadores de sangue são representativos de uma amostra de indivíduos saudáveis da população, e que as mutações no gene *HFE* estudadas, podem levar à manifestações de sintomas clínicos após os 40 anos de idade, especialmente em homens, o grande número de homens portadores desses polimorfismos deve ser avaliado e acompanhado com cautela. Atualmente o número de homens doadores de sangue é maior do que o de mulheres, e a doação poderiam ter um “efeito protetor”, uma vez que realizam a melhor forma de prevenção e tratamento para as manifestações clínicas da hemocromatose

As freqüências de hemoglobinas variantes encontradas na população de doadores de sangue, do Hemocentro de São José do Rio Preto estão de acordo com as descritas na literatura (SIQUEIRA et al., 2000, ZAMARO, 2007). A implementação de novas técnicas de diagnóstico viabilizaram a identificação de isoformas de Hb, principalmente as “Hb S-like” (ONDEI, 2005). O que possibilitou uma orientação correta ao doador, realizada por um hematologista do serviço, sobre o tipo de hemoglobinopatia da qual era portador, e da necessidade da realização dos exames em seus familiares.

Entre as amostras normalmente classificadas como Hb S, foram identificadas Hb “S-like” (BONINI-DOMINGOS et al., 2006). Este estudo contribuiu para a implementação de diagnóstico diferencial no Hemocentro, para a realização da análise de rotina, visando a correta orientação dos doadores, e melhor qualidade no sangue a ser transfundido. Durante a orientação os doadores

são esclarecidos com relação ao tipo de anemia hereditária da qual é portador e da possibilidade de transmissão desta alteração genética aos filhos.

## ***6. Conclusões***

## 6. Conclusões:

A frequência dos polimorfismos de Hemoglobinas e dos alelos C282Y e H63D no gene *HFE*, em doadores portadores da Hb S em heterozigose, estão de acordo com as encontradas na literatura para grupos de indivíduos sem indícios prévios de sobrecarga de ferro, para a população brasileira. Verificamos também no grupo estudado que, na herança concomitante dos dois polimorfismos, os níveis de MDA, indicativo da peroxidação lipídica, foram mais elevados, indicando a influência de ambas afecções genéticas, no aumento dos níveis de peroxidação lipídica. Apesar do resultado observado, não foram verificados indícios de destruição eritrocitária aumentada. Concluimos também, que na herança dos dois polimorfismos, os níveis médios da TEAC, indicativo da capacidade oxidante, foram diminuídos, indicando que apesar de haver um aumento da peroxidação lipídica, neste grupo, este, não é acompanhado pelo aumento da capacidade antioxidante, podendo levar a estresse oxidativo, muito embora todos os valores médios estejam dentro da faixa de normalidade.

### **Frequência de Hemoglobinas Anormais**

As frequências de hemoglobinas anormais encontradas nos doadores de sangue estão de acordo com as relatadas na literatura para a região. A implementação de novas metodologias de análise no Hemocentro, permitiu a identificação de genótipos de hemoglobinas específicos à partir do fenótipo, contribuindo para a melhoria no diagnóstico e orientação ao portador, e conseqüentemente, da qualidade do sangue a ser transfundido.

### **Frequência das Mutações C282Y e H63D no gene HFE.**

A frequência alélica da mutação H63D foi maior do que a C282Y em todos os grupos avaliados, quanto ao gênero, a maioria dos doadores pertencem ao grupo étnico miscigenado e dos Doentes Falciformes ao grupo de afrodescendentes

A incidência das mutações H63D e C282Y observadas no grupo de estudo está de acordo com os dados encontrados na literatura para estudos populacionais brasileiros. Para os pacientes com Doença Falciforme a frequência encontrada para a mutação C282Y está aumentada, o que não é esperado principalmente por ser este um grupo formado em sua maioria por indivíduos de origem étnica negra, e esse mutante (C282Y) ser de origem caucasóide.

#### **Avaliação dos Parâmetros hematológicos, da sobrecarga de ferro e estresse oxidativo**

Os parâmetros hematológicos em doadores de sangue portadores de Hb AS e polimorfismos no gene *HFE*, se apresentaram dentro da faixa de normalidade. Verificamos também no grupo de doadores de sangue com Hb AS estudado que, na herança concomitante dos dois polimorfismos, os níveis de MDA, indicativo da peroxidação lipídica, foram mais elevados, indicando a influência de ambas afecções genéticas, no aumento dos níveis de peroxidação lipídica. Além disso, os níveis médios da TEAC, indicativo da capacidade anti-oxidante, foram diminuídos, indicando que apesar de haver um aumento da peroxidação lipídica, neste grupo, este, não é acompanhado pelo aumento da capacidade antioxidante, podendo levar a estresse oxidativo, muito embora todos os valores médios estejam dentro da faixa de normalidade.

## ***7. Referências***

## 7. Referências:

Segundo normas ABNT de 2002.

AGOSTINHO, M.F. et al. Mutations analysis of the *HFE* gene in Brazilian populations. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 25, n. 3, p. 324-327, 1999.

ALLISON, A.C. Polymorphism and natural selection in the human populations. **Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.**, v. 29, p. 137-149, 1964.

ALMEIDA, et al. Mitochondrial DNA damage associated with lipid peroxidation of the mitochondrial membrane induced by Fe<sup>2+</sup>-citrate. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 78, n.3, p.505-514, 2006.

ANDREWS, N. C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 159-168, 2005.

ANNUAL MEETING OF THE W.H.O. WORKING GROUP ON THE FEASIBILITY STUDY ON THE HEREDITARY DISEASE COMMUNITY CONTROL PROGRAMES (HEREDITARY ANAEMIAS), 5, 1989, Cagliari. Report of 5th annual meeting of the WHO Working group on the feasibility study on the hereditary disease community control programmes (hereditary anaemias). Cagliari, W.H.O. 1989.

ANTUNES, M.V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.44, n.2, p. 279-287, 2008.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R.S. Sickle Hemoglobin (Hb S) Allele and Sickle Cell Disease. **Am. J. Gen.**, v.151, n.9, p.839-845, 2000.

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

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova** v.29 n.1 São Paulo jan./fev. 2006.

BASSETT, M. L. et al. Diagnosis of hemochromatosis in young subjects: predictive accuracy of biochemical screening tests. **Gastroenterology**, v. 87, n. 3, p. 628-633, 1984.

BERTHOLO, L.C.; MOREIRA, H.W. Amplificação gênica, alelo específica na caracterização das Hb S, C e D e as interações entre elas e talassemias Beta. **Jornal Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial**. v. 42, n. 4 , p.245-251, 2006.

BETKE, K., MARTI, N.R. , SCHLICHT,I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature*, v.184, n.2134, p.1877, 1959.

BEUTLER, E. **The sickle cell diseases and related disorders**. In Hematology – WILLIAMS, W. J. *et al.* 4<sup>th</sup> Ed. New York, Mc Graw Hill, p. 583-609,1983.

BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J. **Williams Hematology**. 5<sup>a</sup> ed. New York, International Edition, 1995.

BEUTLER, E. The *HFE* Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. **Blood**. v.101, p.3347-3350, 2003.

BEUTLER, E. Iron absorption in carriers of the C282Y hemochromatosis mutation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.80, p.799-800, 2004.

BITTENCOURT, P. L. et al. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of HFE gene in Brazilian patients with Hemochromatosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 329-335, 2002.

BLANN, AD, et al. Platelet activation and endothelial cell dysfunction in sickle cell disease is unrelated to reduced antioxidant capacity. **Blood Coagul Fibrinolysis**. V.14, n.3, p.255-259, 2003.

BONINI-DOMINGOS, C.R.B., *Prevenção das hemoglobinopatias no Brasil: diversidade genética e metodologia laboratorial*. São José do Rio Preto, 1993. 231 p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, 1993.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Protocolos de metodologias laboratoriais clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2003. Disponível em: <<http://www.lhgdh.ibilce.unesp.br>>. Acesso em 22 de julho de 2006.

BONINI-DOMINGOS, C. R.; ONDEI, L.S.; ZAMARO, P.J.A. Hemoglobinas similares a S no Brasil - um guia prático de identificação. 1. ed. São José do Rio Preto, SP: Editora HN, 2006. v. 1. 59 p.

BRITTENHAM, G. M. et al. Preserving the national blood supply. **Hematology**, p. 422-432, 2001.

- BRITTON, R.S. Metal-induced hepatotoxicity. **Semin. Liver. Dis.**, v.16, n.1, p.3-12,1996.
- CAMASCHELLA, C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of Hemochromatosis and related disorders. **Blood**, v. 106, n.12, 2005.
- CANÇADO, R.D.; JESUS, J. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, vol.29, no.3, p.204-206, 2007.
- CANÇADO, R.D. et al. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene *HFE* em doentes com sobrecarga de ferro. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.29, n.4, p.351-360, 2007.
- CAVIL, I. Erythropoiesis and iron. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 15, p. 399-409, 2002.
- CAZZOLA M. et al. Juvenile idiopathic haemochromatosis: a life threatening disorder presenting as hypogonadism. **Human Genetics**, v. 65, p. 149-154, 2003.
- CESQUINI, M. et al. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. **Biomed Pharmacother.** v. 57, n. 3-4, p.127-129, 2003
- CHAMI, B., et al. Hemoglobin variants in North Africa. **Hemoglobin**, v.18, n.1, p.39-51, 1994.
- CHINELATO, A.R., **Caracterização Molecular e estudo funcional de mutantes de cadeias globínicas.** São José do Rio Preto, 2003. 231 p. Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, 2003.
- CLEGG, J.B.; WEATHERALL, D.J. Thalassaemia and malaria: new insights an old problem.. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v.111, n.4, p. 278-282,1999.
- DAS, D. K.; ERSMAN, W. B. Oxygen radicals. Systemic events and disease processes. Basel. **Karger**, 196 p, 1990.
- DASGUPTA T; HEBBEL RP; KAUL DK. Protective effect of arginine on oxidative stress in transgenic sickle mouse models . **Free Radic. Biol. Med.** 41 (12): 1771-80, 2006.
- DOMINGOS, A.C.B. et al. Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.** v.26, n.4, p. 57-59, 2004.
- DONOVAN, A. et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1, identifies a conserved vertebrate iron exporter. **Nature**, v. 403, p.776-781, 2000.

DONOVAN, A. et al. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. **Cell Metabolism**, v.1, p. 191-200, 2005.

FASOLA, F. et al. Total antioxidants status and some hematológicas values in sickle cell disease patients in steady state. **N. Natl Med Assoc** . v. 99, n.8, p. 891-894, 2007.

FEDER, J. N. et al. A novel MHC class I – like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nature Genetics**, v. 13, p. 399-408, 1996.

FELIPPE JR, J.; PERCARIO, S. Efeito de antioxidantes endovenosos sobre a peroxidação lipídica em humanos.. **Journal of Biomolecular Medicine & Free Radicals**, v. 1, n. 5, p. 19-23, 1995.

FLEMING, R.E. et al. Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary hemochromatosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 2214-2219, 2000.

FLEMING, R. E.; BRITTON, R. S. HFE and regulation of intestinal iron absorption. **AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. GI 290, p. 590-594, 2006.

FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. I. Intestinal iron absorption and its regulation. **AJP-Gastrointestinal Liver Physiology**, v.289, p. G831- G8335, 2005.

FRENETTE, P.S.; ATWEHM G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts and future promise. **J. Clin. Invest.**, v.117, p.850-528, 2007.

GANZ, T. Hepcidin – a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Practice ; Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p.171-182, 2005.

GATÉ, L.; et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidant stress. **Biomed Pharmacother**, v. 53, p. 169-80, 1999.

GHANI, R.; MANJI, M.A.; AHMED, N. Hemoglobinopathies among five major ethnic groups in Karachi, Pakistan. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 33, n.4, p.855-61, 2002.

GIARDINE, B. et al. Hb Var database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. **Hum. Mutat**. v.28, p.206, 2007.

HANSON, E.H.; IMPERATORE, G.; BURKE, W. *HFE* gene e hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology*. (Review). **Am. J. Epidemiol.**v. 154, p. 193-206, 2001.

HIGGS, D.R.; WEATHERALL, D.J. The haemoglobinopathies. **Clinical Hematology**, v.6, n.1, 1993.

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

HUNT, J.R.; HUAWEI, Z. Iron absorption by heterozygous carriers of HFE C282Y mutation associated with hemochromatosis. **Acta Gastroenterol. Latino Am.** v.80, p. 924-931, 2004.

INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante  $\beta$ -Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 1999.

JAN W., et al. The effect of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in plasma on the formation of 4-aminobiphenylhaemoglobin adducts in smokers. **Biomarkers**, v. 7, n. 4 July, p 291 – 298, 2002.

JENG MR, et al. Identification of hemochromatosis gene polymorphisms in chronically transfused patients with sickle cell disease. *Am. J. Hematol.*, v.74, p.243-248, 2003.

KAWABATA, H. Molecular cloning of transferrin receptor-like family. **Journal Biological Chemistry**, v.274, p. 20826-20832, 1999.

KAWABATA, H. et al. Transferrin receptor 2 alpha supports cell growth both in iron chelated cultured cells and in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 16618-16625, 2000.

LEHMANN, H , HUNTSMAN, R.G. **Man's haemoglobin**. Amsterdam: North Holland, 1974, 478 p.

LIMDI, J.K.; CRAMPTON, J.R. Hereditary haemochromatosis. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 97, p.315-324, 2004.

LYNAS, C. A cheaper and more rapid polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for the detection of the HLA-H gene mutations occurring in hereditary hemochromatosis. **Blood**, v. 90, p. 4235-4236, 1997.

MANFREDINI, V. et al. Blood antioxidant parameters in sickle cell anemia patients in steady state. **J. Natl. Med. Assoc.**v. 100, n.8, p. 897-902, 2008.

MC BRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J. Free radicals, exercise and antioxidants. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 13, p.175-183, 1999.

MC CULLOUGH K.D; BARTFAY, W.J.; The dose-dependent effects of chronic iron overload on the production of oxygen free radicals and vitamin E concentrations in the liver of a murine model. **Biol. Res. Nurs.** V.8, n.4, p.300-4, 2007.

MACKENZIE, B.; GARRICK M. D. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. **AJP- Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 289, p. G 981-G 986, 2005.

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

MARWAH, SS, et al. Reduced vitamin E antioxidant capacity in sickle cell disease is related to transfusion status but not to sickle crisis. **Am J Hematol.** v. 69, n 2, p.144-146, 2002.

MILLER, N.; et al. 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.

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

NAOUM, P. C. ; MATTOS, L. C. ; CURI, P. R. . Prevalencia e Distribuicao Geografica de Hemoglobinas Anormais No Estado de Sao Paulo.. **Bol. of. Sanit. Panam.**, v. 97, n. 5, p. 534-547, 1984.

NAOUM, P. C. **Eletroforese, técnicas e diagnósticos**. São Paulo: Santos, 174p, 1990.

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

NAOUM, P.C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo, Sarvier, 1997. 168p.

NAOUM, PC, BONINI-DOMINGOS, CR. Doença falciforme no Brasil. Origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. **J Bras Patol** v.;3, n.3, p.45-53, 1997.

NAOUM, P. C. ; SOUZA, P. C. . Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da HbS nos genótipos SS, SF (S/beta 0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. **Jornal Brasileira de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 249-259, 2004.

- NEMETH, E. et al. Hfeidin is decrease in TFR2 hemochromatosis. **Blood**, v. 105, p. 1803-1804, 2005.
- OLIVEIRA, T.M. et al. *HFE* gene mutations in Brazilian thalassemic patients. *Braz. J. Me. Biol. Res.* v. 39, n.12, p. 1575-1580, 2006
- ONDEI, L.S. **Perfil eletroforético e cromatográfico das hemoglobinas “S-like”**. São José do Rio Preto, 2005. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.
- PAPANIKOLAOU, G. et al. Mutation in HFE 2 cause iron overload in chromosome 1q linked juvenile hemochromatosis. ***Nature Genetics***, v. 36, p. 77-82, 2004.
- PAPAYANNOPOULOS, R.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Stains for inclusions bodies. **Standartizationof laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies**. Atlanta: Hew publications, 1974.
- PARRA, F. C; et al . Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS.*, v.100, p. 177–182, 2003.
- PENA, S.D.J., et al. DNA Bioprints: Simple non isotopic DNA fingerprints whet biotinylated probes. **Electroforesis**. vol. 12, pag 14-52, 1991.
- PERCÁRIO, S.; et al. Dosagem do dialdeido malônico, **NEWSLAB**, v. 6, p. 46-50, 2004.
- PERCARIO, S. . Lípides, radicais livres e exercício físico. **Arquivos de Ciências da Saúde (FAMERP)**, v. 14, p. 1, 2007
- PIETRANGELO, A. Physiology of iron transport and the HFE gene. **American Journal of Physiology**, v. 282, p. 6403-6414, 2002.
- PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 2383-2397, 2004.
- PIETRANGELO, A. Hereditary Hemochromatosis. **BBA–Molecular Cell Research**, p. 700-710, 2006.
- RAMALHO, A.S. As hemoglobinopatias hereditárias. Um problema de saúde pública no Brasil. **Ed. Soc. Bras. Genética**, 1986.
- RDC nº 153 de 14 de junho de 2004, Ministério da Saúde para normas técnicas de processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados.

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

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

SAENZ-RENAULD, G.F.; RODRIGUEZ ROMERO,W., CHAVES VILLALOBOS, M. Structural variants of hemoglobin in Ibero-America. **Rev. Biol. Trop.** V.41, n.3A, 1993.

SHELDON, J.H. **Haemochromatosis**. London: Oxford University Press; 1935.

SCHNEIDER, R.G. Differentiation of electrophoretically hemoglobins - such as S, D, G and P or A2, C, E and O - by electrophoresis of the globin chains. **Clinical Chemistry**, v.20, p.1111-1115, 1974.

SIAH, C. W. et al. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 27, n.1, p. 5-16, 2006.

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.

SIQUEIRA, F.A.M., et al. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto – S.P. **Rev. Bras. Hematol. Hemot.** V.24, n.4, P.302-305, 2002.

SOUZA, A.F.M., CARVALHO FILHO, R.J.Hereditary hemochromatosis: case report and review of the literature. **Arq. Gastroenterol.**, v.38, n.3, p. 194-202, 2001.

SOUZA, P.C. **Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da hemoglobina S em eritrócitos de doentes falcêmicos**. São José do Rio Preto, 1999. 142p. Tese (Mestrado em Ciências), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, 1999.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Clinical Haematology**, v. 11, p. 163-84, 1998

SWINKELS, D. W. et al. Hereditary Hemochromatosis: Genetic complexity and new diagnostic approaches. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 950-968, 2006.

THEIL, E. C. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1549s-1553s, 2003.

THOMPSON, M.W., McINNES. R.R., WILLARD, H.F. As hemoglobinopatias: Modelos de doença molecular. In: --- **Thompson & Thompson Genética Médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c.. cap.11, p.167-185, 1993.

TORRES, F.R. et al. Frequency of the HFE C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 60-64, 2008.

VALKO, M.; MORRIS, H. CRONIN, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n.10, p. 1161-1208, 2005.

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **Am. J. Clin. Path.**, v.49, p.440, 1968.

VULPE et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologua implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. **Nature Genetics**, v. 21, p. 195-199, 1999.

WALTERS, G. O.; MILLER, F. M.; WORWOOD, M. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. **Journal of Clinical Pathology**, v. 26, n. 10, p. 770-772, 1973.

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.

WESSLING-RESNICK, M. Transfer of iron from the mucosa into circulation. **AJP – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. GI 290, p. 1-6, 2006.

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

ZAGO MA, et al. Atypical haplotypes are generated by diverse genetic mechanism. *Amer Journal of Hematol* 2000;63:79-84.

ZAMARO, P.J.A. et al Diagnóstico laboratorial das isoformas de Hb semelhantes à Hb S (Hb S). Anais do 45º Congresso de Genética de Águas de Lindóia, 2000.

ZAMARO, P.J. **Contribuição para o estudo dos defeitos moleculares da hemoglobina humana na população brasileira**. São José do Rio Preto, 2007. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

ZANELLA, A. M.; DOROTÉIA S.R; GODOY, M. F.. Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo. **Arquivos de Ciências da Saúde (FAMERP)**, v. 14, p. 111-116, 2007.

***8.Anexo***

## 8. Anexo

### Métodos

Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias:

Foram realizadas as metodologias de triagem de hemoglobinopatias para caracterização das Hb variantes, as quais foram listadas a seguir:

Preparação de hemolisados:

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

Hemolisado Rápido - com saponina (NAOUM, 1990).

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

#### ***Hemolisado Rápido: com saponina***

Reativo hemolisante:

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

*Procedimento:*

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

#### ***Solução de Hb: com Clorofórmio***

*Procedimento:*

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

centrifugada a 2.000 rpm, por 20 minutos. A solução de Hb sobrenadante, ou hemolisado, foi retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo limpo com identificação da amostra. A concentração do hemolisado, preparado conforme a metodologia apresentada variou de 10 a 15 g/dL.

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

*Princípio:*

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

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

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

Solução trabalho

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

*Procedimento:*

Em tubo de hemólise colocou-se 2,0 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 visualizou as linhas negras, pois a resistência aumentada à hemólise do eritrócito, torna a amostra opaca. Em amostras com resistência normal à hemólise visualizou-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 divulgados da seguinte maneira, segundo padronização do LHGDH para cada um dos parâmetros avaliados.

alterações discretas: (+)

alterações moderadas: (++)

alterações acentuadas: (+++)

células normais: (N)

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

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

*Reagentes:*

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

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

Conservado em geladeira

*Corante:*

**Ponceau**

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

*Solução descorante:*

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

*Procedimento:*

As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão TEB por 15 minutos, no mínimo, e seis horas, no máximo. Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multi-uso). A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo. Passaram-se 300 volts por 30 minutos. As frações foram analisadas, primeiramente, sem coloração e coradas com Ponceau. Para corá-las, as fitas foram colocadas no corante por cinco minutos e, posteriormente, em solução descorante por 30 minutos, com agitação da vasilha.

**Eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968)***Princípio:*

Técnica utilizada para diferenciar alguns tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino e caracterização semi-quantitativa 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 microondas até completa dissolução, tomando cuidado para a mistura não ferver. Foram pipetados 5,0 mL do gel em lâminas de microscópio que gelificaram à temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel. Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos foi utilizado tecido absorvente (pano multi-uso).

Passaram-se 100 volts por 30 minutos. As frações foram analisadas sem corar e coradas com Ponceau.

**Eletroforese quantitativa em acetato de celulose pH 8,6**

(Dosagem de hemoglobina A2) (MARENCO-ROWE, 1965)

*Princípio:*

O aumento de hemoglobina A2 na grande maioria dos casos está associado às talassemias beta heterozigotas. Porém em algumas condições patológicas e de origem adquiridas, os níveis dessa hemoglobina estão acima dos normais. Para quantificá-la um dos procedimentos é o seguinte:

*Reagentes:*

São os mesmos utilizados na eletroforese em acetato de celulose pH 8,6 para análise qualitativa de hemoglobinas.

*Procedimento:*

Aplicar 20 microlitros de solução de hemoglobina, em fitas de acetato de celulose com 5,7 cm de largura.

Passar 300 volts por 40 minutos e após a separação das frações de Hemoglobina A2 e A, recortá-las com tesoura e eluí-las em tubos de ensaio contendo 3 ml de água destilada para hemoglobina A2, e 15 ml de água destilada para hemoglobina A.

Deixar eluir de duas a seis horas, com agitação periódica e ler as densidades ópticas (D.O.) em 415 nm, usando água destilada como branco.

*Cálculo:*

$$\% \text{ HbA2} = \frac{\text{D.O. HbA2} \times 100}{\text{D.O. Hb A2} + (\text{D.O. HbA} \times 5)}$$

*valores normais:* de 2,5 a 3,7%

### **Dosagem de Hemoglobina Fetal. (BETKE et al., 1959)**

*Princípio:*

A hemoglobina Fetal é alcali-resistente, enquanto que as hemoglobinas A, A2 e os tipos anormais são facilmente desnaturáveis por soluções alcalinas. Esse método é sensível para detectar pequenas quantidades de hemoglobina Fetal. Em sangue de cordão umbilical a quantidade desta hemoglobina é de aproximadamente 70 a 90%, em indivíduos com talassemia beta homocigota oscila entre 60 a 98% e na interação talassemia beta/Hb S, o valor varia entre 5,0 a 21,2%. Na talassemia Beta heterocigota, a hemoglobina Fetal pode estar normal ou discretamente aumentada.

*Reagentes:*

Solução de ferricianeto de potássio (Drabkin)

- Ferricianeto de potássio.....0,20g
- Cianeto de potássio.....0,20g
- Água destilada q.s.p.....1000ml

Solução de hidróxido de sódio 1,2N

- Hidróxido de sódio.....48,0g
  - Água destilada q.s.p.....1000ml
- Solução saturada de sulfato de amônio
- Sulfato de Amônio..... 500g
  - Água destilada q.s.p..... . 500ml

*Procedimento:*

Diluir 0,6 ml da solução de hemoglobina em tubo contendo 10 ml da solução de Drabkin. Homogenizar por inversão.

Colocar 5,6 ml da solução de hemoglobina diluída em um tubo rotulado "Hb F". Adicionar 0,4 ml da solução de hidróxido de sódio 1,2N e acionar o cronômetro. Agitar cuidadosamente por 10 segundos.

Ao final de 2 minutos exatos, adicionar 4 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Homogenizar por inversão e deixar em repouso por 5 a 10 minutos, no máximo. Filtrar o conteúdo do tubo "Hb F" em duplo papel de filtro.

Preparar a solução padrão, colocando em um tubo de ensaio de 1,4 ml da solução de hemoglobina diluída, 0,6 ml de água destilada e 2 ml da solução saturada de sulfato de amônio. Transferir 1 ml desta solução para outro tubo e juntar 9 ml de solução de Drabkin. A solução de hemoglobina total é 10 vezes mais diluída que a solução de hemoglobina alcali-resistente.

Ler a densidade óptica dos tubos padrão e "Hb F" em 540 nm, usando solução de Drabkin como branco.

*Cálculo:*

$$\% \text{ de Hb F} = \frac{\text{D.O. Hb F}}{\text{D.O. Padrão} \times 10} \times 100$$

*Interpretação:*

Adultos normais apresentam valores entre 0,0 e 2,0% de hemoglobina fetal.

**Eletroforese de cadeias polipeptídicas: (SCHNEIDER, 1974).**

*Princípio:*

A caracterização estrutural das hemoglobinas anormais é realizada em condições muito especiais devido ao seu custo operacional e às dificuldades

inerentes aos métodos utilizados. Desta forma, para dar seqüência ao estudo de uma hemoglobina anormal não identificável pelos métodos de qualificação e quantificação, utiliza-se inicialmente, a eletroforese de cadeias polipeptídicas. A separação eletroforética de cadeias polipeptídicas anormais constitui-se em uma análise pré-molecular, muitas vezes conclusiva para o diagnóstico de hemoglobina anormal, sem que haja necessidade de se aplicar métodos de disposição bidimensional de peptídeos e análises de aminoácidos.

*Reagentes:*

- A) Tampão Tris-EDTA-borato pH 8,4
- B) Corante Ponceau
- C) Uréia
- D) 2-mercaptoetanol

*Procedimento:*

No dia anterior ao teste preparar o tampão trabalho, misturando 72 g de uréia e 140 ml de tampão Tris-EDTA-borato pH 8,4 (Tampão Tris-uréia), em um “becker”. Homogeneizar a solução em agitador magnético, até o momento do uso, à temperatura ambiente.

Misturar 50 µl do tampão Tris-Uréia, 50 µl de 2-mercaptoetanol e 50 µl de solução de hemoglobina em um pequeno tubo. Deixar em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente.

Adicionar 6,4 ml de 2-mercaptoetanol ao tampão Tris-uréia, misturar bem e colocar a solução tampão Tris-uréia-mercaptoetanol nos compartimentos eletrolíticos, reservar 40 ml dessa solução para embebedimento do acetato de celulose. O acetato deve ser embebido durante 30 minutos (mínimo) e 4 horas (máximo).

Retirar o excesso da solução tampão do acetato com papel de filtro e esticá-lo na cuba de eletroforese. Aplicar as amostras na porção média do acetato. Passar 150 volts por 80 minutos.

Corar as fitas com solução corante Ponceau, ou outro corante de proteínas. Descorar com ácido acético a 10%

*Controle:*

É importante realizar esse processo eletroforético comparando a amostra a ser testada com cadeias polipeptídicas de hemoglobina normal, e de hemoglobinas variantes conhecidas. por exemplo: Hb AS, Hb AC, ou Hb SC.

*Interpretação:*

O mapa de disposição de cadeias polipeptídicas, representado na figura 09, facilita a interpretação dos tipos mais freqüentes de hemoglobinas variantes. Esse mapa mostra a disposição de 33 variantes diferentes, como por exemplo a Hb J Baltimore de Hb J Oxford, entre outras.

*Precauções:*

O processo de análise eletroforética das cadeias polipeptídicas deve ser realizado pelo menos em três procedimentos eletroforéticos, com uma ou duas fitas de acetato de celulose por vez

A solução de hemoglobina, deve ser fresca, não excedendo 48 horas de sua preparação.

A voltagem pode ser elevada para 250 volts, e o tempo de corrida diminuído para 60 minutos.

**Cromatografia líquida de alta performance (Instruction Manual of Bio-Rad, 1994)***Princípio:*

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD Laboratories) com Kit de análise para Beta Talassemia Heterozigota. A HPLC neste equipamento consiste da cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados passam pela coluna, detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes (Eastman *et al.*, 1996). 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 Thalassemia Short:

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 2,0 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

**Dosagens Bioquímicas:**

**Dosagem do Malondialdeído (MDA) (PERCÁRIO, 2004)**

*Princípio:*

Este é um processo extremamente complexo que culmina com a destruição da membrana celular, inicia-se com a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno, posicionado entre as duas bandas insaturadas da molécula lipídica. Formando um novo radical livre lipídico, com carbono central que, na

presença de O<sub>2</sub>, dá origem a lipoperóxidos. Estes são posteriormente transformados em MDA, o qual é passível de ser dosado e tem sido usado como um marcador da atividade deletéria dos radicais livres. A dosagem do malondialdeído (MDA) é um método simples, baseado na reação deste com o ácido tiobarbitúrico em condições acídicas e aquecimento, e tem sido a forma mais utilizada de avaliação da peroxidação lipídica da membrana. O método se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar o complexo MDA-TBA, de cor rósea e absorção máxima em 535nm. Esta dosagem pode ser realizada em soro, plasma, líquidos corporais e homogenados de tecido.

#### Preparos dos Reagentes

- Água ultrapura (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 75Mm (pH 2,5)
- Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10 nM
- Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20µM

Álcool n-Butílico

#### Preparo de plasma

Coletar o sangue em tubo heparinizado e identificar. A amostra deverá permanecer por um período de 20 minutos em descanso, sob Banho Maria a 38°C. Após, centrifugar a 1500rpm, durante 20min. Separar em recipiente (tudo de Eppendorf de 3mL) devidamente identificado de acordo com o protocolo de identificação de peças da pesquisa 1mL (ou mais) de plasma (quantidade mínima aceitável 800µl) que deverá estar pronto para a dosagem do MDA.

#### Preparo final dos controles e amostras

Está é a etapa final de preparação, a qual antecede a leitura dos valores de absorvância em espectrofotômetro. Não esquecer que o reagente TBA (ácido

tiobarbitúrico) deverá ser sempre preparado no dia da dosagem do MDA, na medida que o mesmo não pode ser estocado. Recomenda-se que os tubos de ensaio tenham paredes reforçadas, resistentes a alta temperatura (dimensões de 11x100, parede de 2mm).

O tubo de ensaio de número 1 deverá receber nesse momento 0,5mL (500µl) de água destilada. Estes serão os tubos de controle branco

O tubo de ensaio de número 2 receberá 0,5mL (500µl) da Solução Padrão MDA 20µM. Estes serão os tubos de controle padrão MDA

Por fim, os tubos de ensaio de número 3 em diante deverão receber 0,5mL (500µl) das amostras. Após a pipetagem das amostras, todos os tubos deverão ser colocados em Banho Maria à temperatura de 94°C, onde permanecerão durante 1h. Um cuidado interessante neste ponto a fim de se evitar perda ou contaminação das amostras com água condensada dentro do Banho Maria é de tampar cada tubo utilizando-se uma bola-de-gude.

Após uma hora em Banho Maria à 94°C, as amostras deverão ser resfriadas. Durante este tempo já poderá se observar uma coloração transparente nos tubos 1 (controle branco) e rósea nos tubos 2 (controle padrão MDA). Terminado o resfriamento, acrescentar a cada tubo de ensaio 4mL do reagente álcool n-Butílico. Nessa etapa, usar um dispensador automático de 4mL. Tampar os tubos cuidadosamente com rolhas apropriadas. À seguir, cada um deles, individualmente, misturar em agitador de tubos tipo vortex, para que haja a máxima extração do MDA para a fase orgânica. Centrifugar os tubos a 2500rpm durante 10 minutos. Terminado a centrifugação a amostra obterá duas fases. Uma ao fundo, transparente e límpida e outra mais superficial de coloração mais ou menos rósea, de acordo com a quantidade de MDA na amostra. Retirar 3 mL da fase mais superficial e realizar a leitura em 535 nm no espectrofotômetro.

#### Cálculo do valor de mda da amostra

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

$MDA = A \text{ média} \times F$ , onde:

$A \text{ média} = (A1+A2)/2$

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

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

$F = 4406,1 / A \text{ padrão MDA}$

### **Dosagem da Capacidade Anti-oxidante Total em Equivalência ao Trolox (TEAC) modificado (RE et al,1999)**

*Princípio:*

A presente dosagem objetiva a capacidade anti-oxidante total de amostras biológicas. O potencial anti-oxidante será determinado segundo a sua equivalência a um potente anti-oxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Será utilizado o método proposto por Miller *et al* (1993), modificado por Re *et al* (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de mensuração. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínaácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), produzindo diretamente o radical cation ABTS•<sup>+</sup>, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de anti-oxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade anti-oxidante, concentração de anti-oxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734 nm, durante um determinado intervalo de tempo. Assim a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cation ABTS•<sup>+</sup>, 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 serão expressos em micromoles por litro (µM/L) correspondente a concentração

do trolox com capacidade antioxidante equivalente a da amostra que se pretende estudar, padrão de medida este denominado TEAC (trolox equivalente antioxidant capacity).

### PBS pH7.2

Solução Salina Isotônica com pH7.2 será usada como solvente no preparo de reagentes e diluição de amostras.

- 1,48g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fosfato de Sódio Dibásico)
- 0,43g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato de Sódio Monobásico)
- 7g de NaCl
- H<sub>2</sub>O destilada ----- 1 litro

Ajustar em Phmêtro para pH 7.2, acrescentar mais Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ou Ácido Acético se necessário. Volume final: 1l.

### SOLUÇÃO DE ESTOQUE ABTS<sup>•+</sup>

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

A solução de estoque ABTS<sup>•+</sup> deve ser preparada de **12 a 16h** antes das dosagens.

Dever-se-á misturar uma solução do sal diamônio ABTS a 7mM com uma solução de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> – Sigma-Aldrich P5592) cuja concentração final seja de 2,45mM.

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

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

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

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

**(B) K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 140mM: 0,7560g ----- 20 mL de PBS**

Retirar com pipeta automática 352 $\mu$ l da solução (A) e misturar a esta 352 $\mu$ l da solução (B):

19,648mL de (A) + 352 $\mu$ l\* de (B) \*\*

\* pipetar 176 $\mu$ l + 176 $\mu$ l

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

Foram preparados 20mL 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<sup>2</sup>.

#### SOLUÇÃO DE TRABALHO DE ABTS<sup>\*+</sup>

Misturar a solução de estoque ABTS a PBS até que a absorvância a 734nm seja de  $0.7 \pm 0.02$  (concentração de ABTS  $\pm 47\mu$ M), equilibrada a 30°C. A expectativa é diluir 2289  $\mu$ l da solução de estoque ABTS em 200mL de PBS. Calibrar espectrofotômetro na leitura de 734nm, zerando com PBS. Preparar Erlenmeyer com 200mL de PBS. Começar com 1800 $\mu$ 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 (2.5mM).

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

Cálculo base: 0,647g de TROLOX (Aldrich 23,881-3) em 1l de PBS. Não usar em hipótese alguma água destilada, essa solução deve ser preparada em PBS.

Logo, para 200mL – 0,1294g de Trolox

para 100mL – 0,0647g de Trolox

Material de difícil dissolução. Medir o volume desejado em PBS. Colocar apenas uma parte deste volume em placa agitadora magnética, turbilhonar com leve aquecimento. Acrescentar todo o soluto (trolox), despejando-o diretamente no solvente (PBS) sem diluir antes – retirar o material que ficará retido lavando o becker com PBS. Esperar diluir por completo. Esta solução é estável por uma semana quando estocada a 4°C ou 6 meses se estocada a -20°C.

### PREPARO DAS AMOSTRAS

#### *PLASMA.*

Colher o sangue usando anticoagulante (heparina). Centrifugar a 1500rpm 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. A fim de resguardar a estabilidade, têm sido demonstrado que amostras de soro, estocadas por 9 semanas a -20°C perdem 27% de sua capacidade antioxidante. Já para Miller e Rice-Evans (1993), a capacidade antioxidante do soro, quando analisada pelo método original de supressão do radical cátion ABTS, é estável por pelo menos 6 meses a -20°C. Amostras de sangue e saliva estocadas em nitrogênio líquido mantêm sua capacidade anti-oxidante por muitos meses.

### DOSAGEM

O método foi adequado para leitura em espectrofotômetro em temperatura ambiente: 25°C. O volume final de cada amostragem para leitura será de 3mL (3000µl).

Se a capacidade anti-oxidante da amostra que se pretende estudar não é conhecida ou se espera que ela seja superior a escala estabelecida na curva padrão (0 a 2,5mM), 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 deve ser feita em espectrofotômetro, a 734nm.

#### APLICANDO O FATOR DE CORREÇÃO (f)

A aplicação do fator de correção (f) tem como finalidade não tornar obrigatória a realização de uma curva padrão da atividade anti-oxidante total do trolox todas as vezes em que se pretende dosar a capacidade anti-oxidante total de amostras biológicas por este método. Para tanto, o resultado alcançado de TAAc deverá ser aplicado na fórmula apresentada para cálculo do TEAC e o resultado multiplicado pelo fator de correção (f), onde:

$$f = \frac{\text{TAAc}_{\text{CALCULADO PARA TROLOX 1mM}}}{\text{TAAc}_{\text{DOSADO PARA TROLOX 1mM}}}, \text{ onde}$$

$$\text{TAAc}_{\text{CALCULADO PARA TROLOX 1mM}} = 0,004 + 0,43 [\text{Trolox mM/l}];$$

$$\text{TAAc}_{\text{CALCULADO PARA TROLOX 1mM}} = 0,004 + 0,43 \cdot 1;$$

$$\text{TAAc}_{\text{CALCULADO PARA TROLOX 1mM}} = 0,004 + 0,43;$$

$$\text{TAAc}_{\text{CALCULADO PARA TROLOX 1mM}} = \mathbf{0,434} \text{ e,}$$

$$\text{TAAc}_{\text{DOSADO PARA TROLOX 1mM}} = \mathbf{\text{TAAc do Padrão}}$$

Portanto:  $f = \underline{\mathbf{0,434}}$  , aplicando a fórmula inicial teremos:

$$\mathbf{\text{TAAc do Padrão}}$$

$$\text{TEAC} = \frac{\text{TAAc} - \mathbf{0,004}}{\mathbf{0,43}} \cdot \frac{\mathbf{0,434}}{\mathbf{\text{TAAc do Padrão}}}.$$

#### OBSERVAÇÕES

- Há um decaimento na absorbância do reagente de trabalho em função do tempo, embora seja discreto.

- A exposição à luz não promoveu diferença importante no decaimento da absorvância do reagente de trabalho.
- Entre 12 e 16 horas de preparo do reagente de estoque ABTS não há diferença na absorvância do reagente de trabalho nem a 25°C ou a 30°C (armazenamento em geladeira ou bancada).
- Embora a reação ocorra de forma muito rápida para o trolox, em amostras biológicas o decaimento da absorvância ocorre de forma mais lenta, durante, pelo menos, 40 minutos. Todavia, para o plasma, esse decaimento gradual se torna estável à partir de 200 minutos.
- As leituras devem ser realizadas enquanto a absorvância do reagente de trabalho ABTS estiver superior a 0,680. Atingindo esse valor, preparar um novo reagente de trabalho e realizar uma nova amostragem para o Branco e para o Padrão.

## **Metodologias moleculares para análise dos mutantes**

### **Extração de Sangue Periférico (PENA et al., 1991)**

#### *Princípio:*

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

#### *Reagentes:*

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

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

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

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

3. Proteinase K (20 mg/mL)

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

Conservar em freezer.

4. Fenol

5. Clorofórmio : álcool isoamílico (24:1)

6. Etanol 70%

7. KCl 2M

*Procedimento:*

Amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA, foram colocadas em microtubos e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após 10 minutos de agitação, foi centrifugado por cinco minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foram acrescentados 1,0 mL de solução de lise 1, esse passo foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 450 $\mu$ L de solução de lise 2; 25 $\mu$ L de SDS à 10% e 5  $\mu$ L de proteinase K 20 mg/mL. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por três horas a 37°C.

Após esse período de incubação, foram adicionados 500 $\mu$ L 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 $\mu$ L da solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1.

O material foi homogeneizado e, novamente, centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Esse último passo foi repetido por mais uma vez. O sobrenadante foi

colocado em tubo com 50µL de solução de KCl 2M gelada e acrescentado 500µL etanol 100% bem gelado. O tubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA.

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

#### Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares, sob a ação da enzima DNA polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde.

#### Reagentes:

Água ultra pura

DNA polimerase com tampão e cloreto de magnésio

DMSO

dNTP

Iniciadores (desenhado de acordo com a técnica a ser desenvolvida)

Preparo de Géis

Gel de Agarose

Gel de Agarose 1 %

Agarose ultra puro 250 mg

TEB 1x

Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

Gel de Agarose 1,5 %

Agarose ultra puro 375 mg

TEB 1x

Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

Gel de Poliacrilamida

Limpar bem as placas com álcool e papel higiênico, bem como o pente e os espessadores;

Montagem da placa:

Passar glicerina nas bordas;

Colocar os cliques;

\* É importante ter as placas sempre limpas e certificar que elas estão bem alinhadas;

\* Observar se não há vazamento:

Polimerização: ocorre com o aumento da temperatura.

*Gel de poliacrilamida 6%*

Reagentes:

acrilamida 40%      6 mL

água                      30 mL

TBE 10x                4 mL

perssulf. Amônio    220 µl

TEMED                 22 µl

*Gel de poliacrilamida 8%*

**Reagentes:**

acrilamida 30%      4mL

água                      8mL

TBE 5x                 3mL

perssulf. Amônio    105µl

TEMED                 5,5µl

Aplicou-se mistura na placa (já com o pente encaixado)

Após 40 minutos, depois de bem polimerizado, as amostras foram aplicadas.

Preparo das amostras

Em cada tubo foram colocados 2 µl de tampão de carregamento e 4 micro l de amostra de DNA.

No tubo P – colocou-se 2 µl de padrão e 2 micro l de tampão de carregamento.

### **PCR – AE para Hb S**

*Princípio:*

Para o polimorfismo de Hb S, o DNA foi amplificado a partir de duas misturas, esta metodologia utiliza três iniciadores para cada mix, o primeiro utiliza-se o par de iniciadores específicos (B5 a e B5 b) para o trecho de interesse e o iniciador específico onde ocorre a mutação (BS) e o segundo mix utiliza-se o iniciador específico (BA) para o alelo normal.

Iniciadores:

B5 a: 5' – GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A – 3'

B5 b: 5' – AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A – 3'

BA: 5' – CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCT C – 3'

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

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para a Sala de Amplificação, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 3 minutos à 94°C; 30 ciclos de 45 segundos minuto à 94°C, anelamento durante 1 minuto 60°C e 30 segundos de extensão; extensão final de 10 minutos à 72°C e ∞ 4 °C.

Amplificou-se um fragmento de DNA com uma banda controle de 660 pb, como a mutação ocorre na substituição do ácido glutâmico na posição seis da cadeia por uma valina (GAG > GTG) utilizamos os dois iniciadores específicos (BS e BA), sendo assim, para a confirmação da Hb S e Hb A as misturas com a presença destes iniciadores específicos formariam uma banda de 216 pb e a não amplificação deste trecho significa que não há o alelo pesquisado. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose

1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio

### **PCR-RFLP para Hb S**

Para a amplificação do segmento que codifica a Hb S foram utilizados os seguintes iniciadores:

*Iniciador 1* – P277: 5' – GGCAGAGCCATCTATTGCTTA – 3'

*Iniciador 2* - P278: 5' – ACCTTAGGGTTGCCCATAAC – 3'

A mistura da reação foi preparado com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para o termociclador, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 30 ciclos de 30 segundos à 94°C, anelamento durante 30 segundos à 55°C; extensão 1 minuto à 72°C, extensão final por 10 minutos à 94°C e ∞ 4 °C.

Amplificou-se um fragmento de DNA de 288 pb, que foi digerido com a enzima *DdeI* (15 U). Como a mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição para enzima *DdeI* (C ↓ TNAG), após a digestão, o alelo normal gera dois fragmentos de 201 pb e 88 pb e, o alelo mutante gera um de 288 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

### **PCR-RFLP para Análise do Polimorfismo do Gene HFE**

*Princípio:*

A pesquisa dos polimorfismos C282Y e H63D foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP, modificada (Lynas, 1997) e a digestão enzimática dos produtos amplificados obtida com a utilização das enzimas *Bcl I*, para o polimorfismo H63D e *Rsa I* para o polimorfismo C282Y.

Para a amplificação do segmento que codifica o polimorfismo do gene HFE (C282Y e H63D) foram utilizados os seguintes iniciadores:

**C282Y**

*Iniciador 1* – L282: 5' – GGG TAT TTC CTT CCT CCA ACC – 3'

*Iniciador 2* – R282: 5' – CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC – 3'

**H63D**

*Iniciador 1* – L282: 5' – GGG TAT TTC CTT CCT CCA ACC – 3'

*Iniciador 2* – R282: 5' – CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC – 3'

A mistura da reação foi preparado com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para a Sala de Amplificação, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 3 minutos à 94°C; 30 ciclos de 45 segundos minuto à 94°C, anelamento durante 30 segundos 58°C e 1 minuto de extensão; extensão final de 5 minutos à 72°C e ∞ 4 °C.

Para a mutação C282Y amplificou-se um fragmento de DNA de 441 pb, que foi digerido com a enzima *Rsa I* (7 U). Como a mutação, ocorre em uma troca de guanina para adenina no nucleotídeo 845 que leva a uma substituição de uma cisteína para uma tirosina no aminoácido de posição 282, criando um sítio de restrição para enzima *RSA I*(CT ↓ AC), após a digestão, o alelo normal gera dois fragmentos de 286 pb e 145 pb, o alelo mutante gera três fragmentos de 296 pb, 116 pb e 29 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sob corrente constante de 100V por 50 minutos e visualizados na coloração de prata.

Na mutação H63D amplificou-se um fragmento de DNA de 496 pb, que foi digerido com a enzima *Bcl I* (11 U). Como a mutação ocorre em uma troca de uma citosina para uma guanina no nucleotídeo 187, resulta na substituição de uma histidina para um ácido aspártico na posição do aminoácido 63, eliminando um sítio de restrição para a enzima *Bcl I* (T↓GATCA), após a digestão, o alelo normal gera dois fragmentos de 358 pb e 138 pb, o alelo mutante não ocorre o corte, formando assim um fragmento de 496 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente

constante de 80V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

***9. Apêndice***

**9.1 Apêndice 1. Artigo:** Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue, publicado na. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.26- de Janeiro/Março, n.01, 2004.

Carta ao editor / Letter to editor

## Identificação de variantes de hemoglobina em doadores de sangue

### Identification of hemoglobin variants in blood donor

Ana C. Bonini-Domingos<sup>1,2</sup>

Lígia M. S. Viana-Baracioli<sup>3</sup>

Claudia R. Bonini-Domingos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curso de Farmácia e Bioquímica – Unip

<sup>2</sup>Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças

<sup>3</sup>Hematológicas – LHGDH; Ibilce/Unesp

<sup>4</sup>Hemocentro de São José do Rio Preto, SP

Trabalho realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas da Unesp em colaboração com o Hemocentro de São José do Rio Preto, SP.

Sr. Editor,

As hemoglobinopatias são patologias decorrentes da produção de uma molécula com estrutura anormal ou pela síntese insuficiente de globina normal. Constituem um grupo heterogêneo de distúrbios com padrão de herança recessivo, que incluem as talassemias e as variantes de hemoglobinas. Os tipos mais frequentes de talassemia em nossa população são as alfa e beta, na forma heterozigótica. Entre as variantes de hemoglobinas, cerca de 800 são conhecidas, sendo mais comumente encontradas as Hb S e Hb C. São as doenças genéticas mais comuns e afetam a população brasileira com frequências variáveis, refletindo a sua característica de formação étnica.<sup>1,2,3</sup> A Organização Mundial de Saúde estima que 5% da população mundial seja portadora de algum tipo de anemia hereditária.<sup>4</sup>

De acordo com a portaria RDC 343, de 13 de dezembro de 2002,<sup>5</sup> “todo sangue a ser coletado, processado e transfundido, deve apresentar boa qualidade, não podendo ser, portanto, veículo de propagação de patologias”. Esta portaria recomenda também que seja realizada a detecção de Hb S em doadores de sangue. O laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – LHGDH do Ibilce/Unesp, em parceria com o Hemocentro de São José do Rio Preto, SP, desenvolve estudos de hemoglobinas (Hb) anormais em doadores de sangue, visando a melhoria da qualidade do sangue a ser transfundido.

Com o objetivo de caracterizar as isoformas de hemoglobinas com migração eletroforética semelhante à Hb S em doadores de sangue, foram analisadas amostras de candidatos à doação, provenientes de São José do Rio Preto e região, colhidas por punção venosa, com EDTA como anticoagulante, de ambos os sexos e etnia variada, após consentimento informado, no Hemocentro de São José do Rio Preto-SP.

Inicialmente, foram triadas no Hemocentro as formas variantes de hemoglobinas por eletroforese pH alcalino,<sup>6</sup> e aquelas que apresentaram alguma alteração no traçado eletroforético foram enviadas para o LHGDH para estudo completo de hemoglobinopatias. Os procedimentos de análise incluíram testes de triagem tais como: Resistência osmótica em solução de NaCl a 0,36%,<sup>7</sup> para verificar a possível herança de talassemias; Morfologia eritrocitária,<sup>1</sup> que avalia a forma, o tamanho e o conteúdo de hemoglobinas dos eritrócitos, visando à identificação de achados laboratoriais característicos de hemoglobinas anormais; Eletroforese em acetato de celulose pH alcalino,<sup>6</sup> que identifica as hemoglobinas normais e grande parte das anormais.

As amostras que apresentaram suspeita de alterações nos testes de triagem foram submetidas aos testes confirmatórios que incluíram: Eletroforese pH ácido,<sup>8</sup> para diferenciação migratória de Hb S, Hb D, Hb C e Hb E; Cromatografia líquida de alta performance – HPLC, com o sistema automatizado VARIANT (Bio-Rad),<sup>9</sup> para identificação de Hb anormais e quantificação das diversas frações de Hb.

As amostras com perfis de Hb alterados nos testes de triagem e complementares foram submetidas à extração de DNA pelo método fenol-clorofórmio, com modificações.<sup>10</sup> Para confirmação dos mutantes de globina utilizou-se amplificação dos alelos por PCR,<sup>11</sup> análise por sonda oligonucleotídeo alelo específica (ASO) pelo Kit mDx (Bio-Rad Laboratories) e de fragmento de restrição (RFLP) após digestão com a enzima *Dde I* para Hb S, *Bse RI* para Hb C e *Taq I* para Hb Hasharon.<sup>12</sup>

Foram analisadas no Hemocentro, no período de janeiro de 2002 a abril de 2003, 16 mil amostras de sangue de doadores, por procedimentos, que incluíram hematócrito e eletroforese em pH alcalino. Destas, 397 amostras de sangue apresentaram alteração de hemoglobinas no perfil eletroforético em pH alcalino. O valor médio dos hematócritos foi de 40%. Do total de 397 amostras avaliadas no LHGDH, 71,53% correspondiam ao perfil eletroforético similar a Hb S; 22,41% ao perfil semelhante à Hb C e 6,04 % com perfis variados, incluindo variantes de migração mais rápida que a Hb A em eletroforese pH alcalino, destacando-se que todas estavam em heterozigose.

Dentre as amostras que apresentaram perfil inicial de Hb AS (heterozigoto para Hb S) cujo laudo geralmente é emitido por este achado laboratorial, destacou-se a frequência de 58,45% de Hb AS; 36,26% de Hb AS associada à alfa talassemia e 0,35% de Hb AS com persistência hereditária de Hb F. Foram observadas ainda neste grupo de

“prováveis Hb AS”, 2,82% de Hb AD Los Angeles associada à alfa talassemia; 0,35% de Hb A Korle – Bu e 1,05% de Hb A Hasharon.

O quadro 1 detalha os diferentes mutantes de hemoglobinas e suas interações observados nos grupos de doadores com perfil eletroforético inicial sugestivo de heterozigose para hemoglobina variante, cujos dados estão ilustrados na figura 1.

A diversidade de variantes que puderam ser observadas em doadores de sangue com a implementação de novas metodologias de análise mostrou a presença de número significativo (40,83%) de interações e outras Hb “tipo S”. A definição daqueles mutantes de Hb com migração similar em eletroforese pH alcalino foi fundamentada em princípios cromatográficos (HPLC), onde a especificidade do sistema permitiu a identificação com segurança dos diferentes fenótipos observados.

Como as variantes estavam em heterozigose, evidenciou-se a necessidade de procedimentos detalhados na identificação destas alterações de hemoglobinas, tendo em vista que o perfil eletroforético inicial sugeria Hb AS. As interações com alfa talassemia somaram 42,1% do total de amostras e puderam ser confirmadas por eletroforese em pH neutro e pesquisa citológica específica.<sup>1</sup> A análise molecular dos mutantes foi realizada para a confirmação dos fenótipos “tipo S” encontrados.

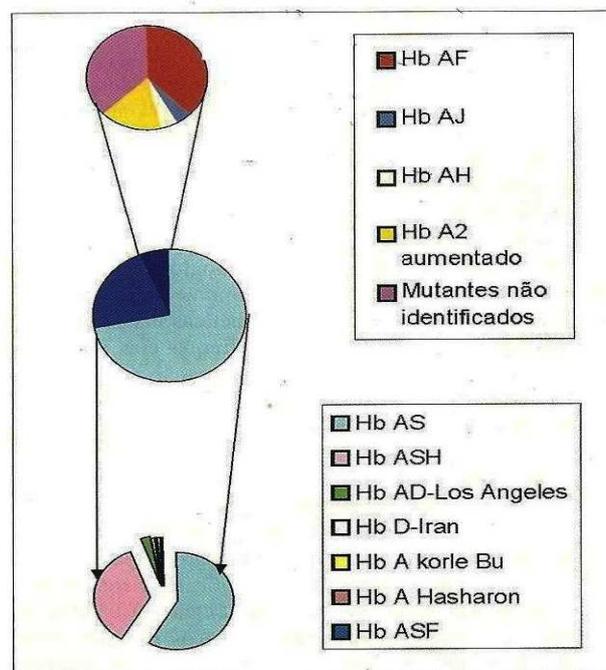
Além de destacar o enfoque social e clínico na abordagem do portador de hemoglobinas anormais, a detecção dos heterozigotos destas alterações genéticas é de grande importância para a saúde pública, pois representam fonte de novos heterozigotos e de possíveis homozigotos. As avaliações laboratoriais em doadores de sangue são fundamentais devido à necessidade de melhoria, a cada dia, da qualidade do sangue a ser transfundido. O aspecto educacional não deve ser desconsiderado, pois os portadores deverão ser orientados sobre a alteração genética e a importância da realização dos exames em seus familiares, visando melhor qualidade de vida.

#### Abstract

*Hemoglobinopathies are the most common genetic diseases and affect a great number of individuals in the world, with diverse clinical complications ranging from the almost unnoticeable to lethal consequences. In Brazil the occurrence of hemoglobinopathies is very frequent and influenced by the ethnical groups that are the basis of populations in different regions. The phenotype may be influenced by environmental and genetic factors*

**Quadro 1**  
Detalhamento dos fenótipos de Hb observados em amostras de sangue de doadores do Hemocentro de São José do Rio Preto

Total com perfil de Hb anormais	Triagem em pH alcalino	Outras metodologias	Interações com alfa talassemia	Interações com Hb Fetal	
397 amostras	Hb AS (284) [71,53%]	Hb AS (166) [58,45%]	(103) [36,26%]	(1) [0,35%]	
		Hb AD Los Angeles	(8) [2,82%]		
		Hb AD Iran	(2) [0,70%]		
		Hb A korle-Bu (1) [0,35%]			
		Hb A Hasharon (3) [1,05%]			
		Hb AC (89) [22,41%]	Hb AC (42) [47,19%]	(47) [52,80%]	
			Hb AF (4) [16,60%]	(5) [20,83%]	
			Hb AJ (1) [4,16%]		
			AH	(1) [4,16%]	
			A2 aumentado (1) [4,16%]	(1) [4,16%]	(2) [8,33%]
	Outras hemoglobinas (24) [6,04%]	Mutantes não identificados (9) [37,5%]			



**Fig. 1** – Distribuição de variantes de hemoglobinas em heterozigose observadas em doadores de sangue após a combinação de metodologias de diagnóstico

and by migration. An understanding of these genetic diseases is important for the health and quality of life of the population. In this work we assessed the presence of Hb variants in blood donors from São José do Rio Preto and region, and we observed the occurrence of variants including Hb S and Hb C but in particular the so-called "S-Like" variants. Good determination of the forms of variant hemoglobins is very important to give better guidance to blood donors and their families, and to improve the quality of blood transfusion. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2004;26(1): 57-59.

**Key words:** Variant hemoglobins; S-Like hemoglobins; Blood donors.

#### Referências Bibliográficas

1. Bonini-Domingos, C. R. Prevalência de hemoglobinopatias no Brasil – Diversidade Genética e Metodologia Laboratorial 1993. 144f. (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP.
2. Siqueira FAM, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP. *Rev Bras Hemat Hemot* 2000;21(1):63-64.
3. <http://globin.cse.psu.edu>. Acesso em 08 de outubro de 2003.
4. Clegg JB, Weatherall DJ. Thalassemia and malaria: new insights into an old problem. *Proc Assoc Am Physicians* 1999;111: 278-282.
5. Brasil. Ministério da Saúde. RDC nº 343. Brasília, 2002.
6. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Path* 1965;18:790-792.
7. Silvestroni E, Bianco I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. *Am J Hum Genet* 1975;27:198-212.
8. Vella F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. *Am J Clin Path* 1968;49(3):440-442.
9. VARIANT™ hemoglobin system; Beta thalassemia short program; Instruction Manual BIO-RAD Laboratories. 2002
10. Pena SDJ, Macedo AM, Gontijo NF, Medeiros AM, Ribeiro JCC. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis* 1991;v.12, p.14-52.
11. Saiki RK, et al. Primer-directed enzymatic amplification DNA with a thermo stable DNA polymerase. *Science* 1988;230: 487-491.
12. Bonini-Domingos CR, Mendiburu CF, Zamaro PJA. Treinamento em Biologia Molecular aplicada a triagem neonatal. Manual. São José do Rio Preto, SP, 2001.

#### Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Bióloga Ana Cristina Carneiro Villanova Vidal e ao Laboratório de Imuno-hematologia do Hemocentro de São José do Rio Preto-SP, na seleção e envio de amostras; à Bio-Rad e Bio-Oxford pelo apoio técnico e suporte científico.

#### Avaliação:

Editor e dois revisores externos.

Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 25/10/2003

Aceito após modificações: 10/03/2004

#### Correspondência para

Ana Carolina Bonini Domingos

LHGDH, Depto. de Biologia, Ibilce, UnespS. J. Rio Preto – SP

Rua: Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth

Fone: (17) 221- 2392. Fax (17) 221- 2390

E-mail: [ca\\_lilith@yahoo.com.br](mailto:ca_lilith@yahoo.com.br)

[laboratorio\\_hgdh@yahoo.com.br](mailto:laboratorio_hgdh@yahoo.com.br)

**9.2 Apêndice 2. Artigo:** Estresse oxidativo e frequência dos polimorfismos no gene *HFE* em doadores de sangue portadores de Hb AS, que será submetido à Archives of Medical Science, Fator de Impacto 2,44.

**Título: Estresse oxidativo e frequência dos polimorfismos no gene *HFE* em doadores de sangue portadores de hemoglobina S**

**Autores:** Viana-Baracioli, Lígia Márcia da Silveira<sup>1,2</sup>; Jacob, Maza Alves<sup>1</sup>; Tukamoto Junior, Nelson Cazuol<sup>1</sup>; Ricci Junior, Octávio<sup>2</sup>; Bonini-Domingos, Cláudia Regina<sup>1</sup>.

**Instituições:** 1.UNESP – IBILCE, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – São José do Rio Preto, SP. 2. Hemocentro – São José do Rio Preto, SP.

[libaracioli@yahoo.com.br](mailto:libaracioli@yahoo.com.br)

Endereço para correspondência:

Lígia Márcia da Silveira Viana Baracioli

Rua Francisco Antonio dos Santos, 156, apto42, CEP: 15.091-230

São José do Rio Preto – São Paulo – Brasil

Fone: (17)3226-6901

Fax: (17) 3201-5053

## RESUMO

**Introdução:** A mutação pontual que origina a Hb S tem efeito sobre as células sanguíneas, desencadeando processos oxidativos com geração de radicais livres. Efeito semelhante observa-se no acúmulo de ferro, em decorrência da hemocromatose hereditária. Os defeitos de metabolismo do ferro, em especial aqueles oriundos dos polimorfismos no gene *HFE*, levam ao acúmulo de ferro tecidual, com potencial capacidade oxidante e peroxidação lipídica. Fundamentados no possível efeito tóxico da Hb S e do acúmulo de ferro tecidual, objetivou-se avaliar a frequência dos polimorfismos no gene *HFE*, em doadores de sangue portadores de Hb S com possível influência na peroxidação lipídica e estresse oxidativo. **Material e Métodos:** Foram analisadas 211 amostras de sangue de doadores com Hb AS e grupos controle com 119 doadores com Hb AA e 28 doentes falciformes para identificação de mutantes de hemoglobinas e do gene *HFE*. **Resultados:** Foram encontradas frequências alélicas, em doadores com Hb AS, de 10,5% para o alelo H63D e 0,7% para C282Y. Nos grupos controle, as frequências foram de 13,4% para o grupo com Hb AA e 10,7% em Doentes falciformes para o alelo H63D, e para o alelo C282Y, 2,1% e 3,5% para o grupo com Hb AA e Doença falciforme, respectivamente. **Conclusão:** Os polimorfismos encontrados para mutações no gene *HFE* em doadores com Hb AS estão de acordo a literatura. Os valores de MDA e TEAC, foram maiores nos casos com a presença do alelo Hb S do que naqueles com os polimorfismos no gene *HFE* ou na co-herança destes.

**Palavras-chave:** hemoglobinopatias, hemoglobina S, *HFE*, hemocromatose, capacidade antioxidante.

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 270 milhões de pessoas no mundo, possuem genes que determinam hemoglobinas anormais (1,2). A Hb S, variante de hemoglobina mais prevalente no Brasil, é originada por mutação pontual do códon GAG (ácido glutâmico) por GTG (valina) na posição seis da beta globina. Esse gene está localizado no braço curto do cromossomo 11. Esta substituição leva a alterações na estabilidade e solubilidade da molécula (3). A mudança de carga elétrica do ácido glutâmico, com ponto isoelétrico negativo, para um ponto isoelétrico neutro, como o da valina, favorece sua polimerização, em condições de baixa tensão de oxigênio (4,5).

As lesões celulares causadas por radicais livres derivados de espécies ativadas de oxigênio ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  e  $HO^{\cdot}$ ) estão associadas com a diminuição na sobrevivência do eritrócito em vários tipos de anemias hemolíticas, sejam de ordem adquirida, hereditária ou induzidas, por drogas oxidantes ou metais pesados. As lesões nos eritrócitos falcêmicos são intensificadas, em uma relação direta, pela concentração de Hb S intra-eritrocitária (6,7). Qualquer situação patológica que aumente a geração de radicais seja pela elevação de estresse oxidativo ou pelo desequilíbrio das defesas antioxidantes, acentuará a produção de espécies ativadas de oxigênio desencadeando processos oxidativos com geração de radicais livres (8). Efeito semelhante observa-se na sobrecarga de ferro, em decorrência da hemocromatose hereditária. Os defeitos de metabolismo do ferro, em especial oriundos dos polimorfismos no gene *HFE*, levam ao acúmulo de ferro tecidual, com potencial capacidade oxidante e peroxidação lipídica.

A Hemocromatose Hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva caracterizada pela sobrecarga de ferro no organismo, com progressivo acúmulo deste metal em alguns tecidos, podendo levar a danos estruturais e funcionais em órgãos como coração, fígado e pâncreas dentre outros, ocasionando processos inflamatórios e oxidativos (9). As manifestações clínicas aparecem geralmente entre os 40 e 60 anos de idade e são predominantes em homens, pois nas mulheres, há um controle fisiológico devido à perda mensal de sangue e gestações

(9). A HH é freqüente em populações de descendentes do nordeste europeu, afetando aproximadamente um em cada 200 a 300 indivíduos caucasóides, sendo provavelmente de origem celta (10,11,12).

O gene HFE está localizado no braço curto do cromossomo seis, associado ao Complexo Principal de Histocompatibilidade, em uma região de aproximadamente 10 Kb e possui sete éxons. Duas mutações foram identificadas inicialmente neste gene, em pacientes com HH: a C282Y (substituição de uma cisteína para uma tirosina no aminoácido de posição 282) e a H63D (decorrente da troca de uma histidina para um ácido aspártico no aminoácido 63) (13,14).

Das 37 variantes alélicas descritas no gene, a C282Y e a H63D, correspondem a 90% dos casos de HH (9,15,16). Alterações na proteína produzida com a informação deste gene representam um papel essencial no processo de acúmulo de ferro, mas sua presença, somente, não é suficiente para explicar o amplo espectro das conseqüências metabólicas e patogênicas atribuídas a HH. O número reduzido de doentes frente à elevada freqüência dos mutantes sugere hipótese de penetrância incompleta para esse gene (17,18).

Tendo como base o possível efeito tóxico da hemoglobina S e do acúmulo de ferro em decorrência de destruição eritrocitária e/ou Hemocromatose Hereditária, relatados na literatura, objetivou-se avaliar a freqüência dos polimorfismos do gene *HFE*, em doadores de sangue portadores de Hb S, e sua relação com peroxidação lipídica e estresse oxidativo.

### **Material e Métodos:**

Foram utilizadas amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA a 5%, para a pesquisa de hemoglobinas e das mutações do gene *HFE*, e com heparina para a verificação dos processos oxidativos. A população deste estudo compreendeu 211 amostras de doadores de sangue portadores de Hb AS e, como grupos controle, foram avaliadas 119 amostras de doadores com Hb AA e 28 amostras de pacientes com doença falciforme (Hb SS ou HbS/ Beta talassemia). Quanto à faixa etária, os doadores apresentaram idade entre 18 e 65 anos com média de 36,41 anos. Quanto ao gênero, no grupo de portadores de Hb AS, 65,55% dos indivíduos, eram do sexo masculino e no grupo controle com Hb AA, eram 71,56%. Com relação à etnia, apesar de 70% terem se declarado caucasóides, 11% negros, 5% asiáticos e apenas 24% mestiços, a grande maioria, tanto do grupo de estudo quanto dos grupos controle, era composta por indivíduos miscigenados, e, portanto foram considerados como pertencentes a esse grupo étnico (Afro/Americanos, Caucasianos e descendentes de Ameríndios), segundo a classificação para a população Brasileira (19). Entre os pacientes a idade variou entre 15 e 47 anos, com média de 25,48 anos. Quanto à etnia 24 (85,71%) se declararam negros e quatro (14,29%) de descendência caucasóide, embora a presença do alelo mutante  $\beta^s$ , seja um marcador africano. Quanto ao gênero, dos 28 pacientes estudados, 14 (50%) pertenciam ao sexo masculino.

Os perfis de hemoglobina foram confirmados por eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose em pH alcalino, eletroforese em Agar-fosfato pH ácido e Cromatografia Líquida de alta performance (HPLC). O DNA de todas as amostras foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio modificado (20). Os genótipos de hemoglobinas foram identificados por PCR Alelo Específico (PCR-AE). Todas as amostras foram submetidas a realização de PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphisms) para identificação dos mutantes no gene *HFE* (21). Para determinação dos processos oxidativos, foi realizada, a avaliação da capacidade anti-oxidante em relação ao Trolox (TEAC) (22) e MDA para peroxidação lipídica (23).

Aplicou-se o teste de Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) com nível de significância de 95% ( $p=0.05$ ) e a correção de Yates com  $n<5$  para a comparação das frequências dos polimorfismos. Para comparar as frequências alélicas, aplicou-se o teste Qui-quadrado e posteriormente a fórmula para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para comparação dos valores médios e desvio padrão dos valores obtidos para inferir processos oxidativos, foi utilizado o teste (ANOVA) (com *post-hoc* Tukey quando necessário) para comparação de todos os grupos, e teste t para comparação entre dois grupos, pelo *software* Statistica 7.0.

**Resultados:**

Das 211 de doadores de sangue com Hb AS, foram identificadas 43 (20,38%) com ao menos uma das duas mutações no gene *HFE* avaliadas, sendo que destes, 28 (65,11%) pertenciam ao gênero masculino. Entre o grupo controle de doadores com Hb AA, das 119 amostras avaliadas 34 (28,57%) apresentaram alguma das mutações no gene *HFE*, e destes 24 (70,58%) eram do gênero masculino. Para o grupo com os pacientes falciformes, controle positivo para Hb S, dos 28 avaliados 8 (28,57%) eram portadores de algum dos polimorfismos no gene *HFE*, sendo 50% pertencentes ao gênero masculino. A Figura 1 ilustra essa distribuição.

Foram encontrados nos portadores do traço falciforme, 37 (17,54%) heterozigotos, e três (1,42%) homozigotos para a mutação H63D, dois (0,95%) portadores heterozigotos para a mutação C282Y e um (0,47%) duplo heterozigoto (C282Y/H63D). No grupo com Hb AA, foram identificados 28 (23,53%) portadores heterozigotos e um (0,84%) homozigoto para a mutação H63D; três (2,52%) portadores heterozigotos para a mutação C282Y e dois (1,68%) duplos heterozigotos (C282Y/H63D). Entre os pacientes foram identificados seis (21,43%) heterozigotos para a mutação H63D e dois (7,14%) heterozigotos para a mutação C282Y. A distribuição dos genótipos de acordo com o gênero e o tipo de hemoglobina estão demonstradas na Tabela I.

Quando comparadas as frequências genotípicas para as mutações no gene *HFE*, utilizando o teste Qui-quadrado com máxima verossimilhança, não foram encontradas diferenças significativas, entre os portadores de Hb AS e os grupos controle, com  $X^2 = 2,482601$ , grau de liberdade=4,  $p=0,650$ .

Pode-se observar também que, para os três grupos estudados, os alelos dos mutantes no gene *HFE* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo, portanto, representativos da população.

Em doadores com Hb AS, as frequências alélicas foram de 10,5% para o H63D e 0,7% para o C282Y. No grupo controle Hb AA, as frequências foram de 13,4% e 2,1% e em doentes falciformes de 10,7% e 3,5% respectivamente para os

alelos H63D e C282Y conforme demonstrado na Tabela II. Quando comparamos as frequências para o alelo H63D entre os doadores com Hb AS e cada um dos grupos controle, observamos que não houve diferença significativa ( $p=0,122939$ ) com Hb AA, e com doentes falciformes ( $p=0,890874$ ).

Nas comparações para o alelo C282Y, entre doadores com Hb AS e com Hb AA, também não houve diferença significativa ( $p=0,101333$ ). O mesmo não ocorreu entre doadores com Hb AS e doentes falciformes, em que observamos a frequência alélica para o polimorfismo significativamente aumentada entre os doentes falciformes ( $p=0,047377$ ).

A avaliação dos processos oxidativos foi realizada em 84 doadores de sangue com Hb AA (21 com e 63 sem mutação no gene *HFE*), 42 doadores com Hb AS (23 com e 19 sem as mutações para o gene *HFE*) e 25 Doentes Falciformes (oito com e 17 sem as mutações para o gene *HFE*). A diferença de casuística observada nos dois itens deveu-se a inviabilidade de realização da técnica com amostras previamente armazenadas e ao não retorno dos indivíduos convidados para nova coleta.

Para os valores de MDA, e de TEAC, os indivíduos foram classificados em seis grupos descritos abaixo:

- A- Indivíduos com Hb AA, com mutação no gene *HFE*; n= 21
- B- Indivíduos com Hb AA, sem mutação no gene *HFE*; n= 63
- C- Indivíduos com Hb AS, com mutação no gene *HFE*; n= 23
- D- Indivíduos com Hb AS, sem mutação no gene *HFE*; n= 19
- E- Indivíduos com Hb SS, com mutação no gene *HFE*; n= 8
- F- Indivíduos com Hb SS, sem mutação no gene *HFE*; n= 17

Os valores de MDA foram aumentados apenas entre os doentes falciformes (Tabela III). Com relação ao MDA, observamos que não houve diferença significativa, para a presença de Hb S em heterozigose, nem para as mutações no gene *HFE*, sozinhas ou em co-herança. Porém, os valores aumentaram de forma significativa na homozigose para Hb S, independente da herança ou não com o alelo mutante para o gene *HFE*.

Todos os valores de TEAC obtidos estiveram dentro da faixa de normalidade, porém, observamos que, na presença do alelo para a Hb S, com ou sem o alelo mutante para o gene *HFE*, houve uma diferença significativa, indicativa da capacidade antioxidante total aumentada em heterozigotos (Hb AS) e diminuída em homozigotos (Hb SS), quando comparados ao grupo controle de doadores com Hb AA. Quando comparamos os resultados de TEAC entre os indivíduos portadores de Hb AS, com e sem mutação para o gene *HFE*, a diferença também foi significativa, e aumentada nos casos em que ocorreu a presença da mutação para *HFE*. Ao comparar os valores obtidos entre os Doentes Falciformes, com e sem a mutação *HFE*, constatamos que não há diferença significativa. A Tabela IV mostra as comparações estatísticas, duas a duas, para esses dois parâmetros, nos grupos avaliados.

## Discussão

As frequências das mutações H63D e C282Y no gene HFE, encontradas para o grupo de doadores de sangue portadores de hemoglobina S estudados, estão de acordo com as encontradas na literatura para a população brasileira (21,24).

Segundo Agostinho et al, 1999 (24), a frequência de C282Y é 3 a 8 vezes menor em brasileiros quando comparados aos caucasianos do norte da Europa, enquanto que a frequência alélica de H63D é praticamente similar. Esta baixa frequência vem sendo observada em populações não-caucasianas, ou que possuem origem étnica bastante diversificada. Sendo que a hemocromatose hereditária afeta predominantemente caucasóide de descendência européia, assim, a manutenção do polimorfismo do gene *HFE* pode ser explicada por flutuação alélica ocorrida pelo constante fluxo entre as populações.

Um estudo realizado por Jeng *et al*, 2003 (25), com 89 pacientes falciformes, observaram frequência genotípica de 2,3% para o genótipo C282Y/WT, 6,8% para o heterozigoto H63D/WT, e nenhum homozigoto ou duplo heterozigoto. Segundo os autores, esses resultados estavam de acordo com o esperado para a população africana na qual o estudo foi realizado. Observamos, porém, a frequência alélica da mutação C282Y significativamente aumentada no grupo de pacientes falciformes aqui estudado. Destacamos que, sendo esse um grupo formado na sua maioria por indivíduos de origem étnica negra, e a alteração no gene *HFE* ser proveniente de indivíduos de descendência caucasóide, provavelmente a miscigenação da população brasileira possa explicar esse achado. Ressaltamos que a clínica de pacientes falciformes é variável e dependente de vários fatores, porém, a grande maioria necessita de transfusão, o que poderia maximizar os efeitos da sobrecarga de ferro.

Considerando que doadores de sangue são representativos de uma amostra de indivíduos saudáveis na população, e que as mutações no gene HFE estudadas representam sintomatologia após os 40 anos de idade, especialmente em homens, o grande número de homens portadores desses polimorfismos deve ser avaliado e acompanhado com cautela. Atualmente o número de homens doadores de sangue

é maior do que o de mulheres, e o ato de doar funcionaria como um “efeito protetor”, uma vez que estão realizando a melhor forma de prevenção e tratamento para as manifestações clínicas da hemocromatose.

De acordo com os resultados relatados na literatura e com nossos achados, acreditamos que a presença do alelo mutante no gene *HFE*, contribuía para o aumento da peroxidação lipídica nos portadores de Hb S. Porém, nas análises estatísticas, quando se elimina a influência do alelo S, na comparação entre pacientes com e sem mutação para o gene *HFE*, a diferença não foi significativa. Os resultados de comparações estatísticas mostraram níveis de peroxidação lipídica aumentados de forma significativa somente na presença de homozigose para Hb S, independente da presença ou não dos polimorfismos no gene *HFE*, evidenciando o potencial oxidativo da alteração de hemoglobina.

Com relação à capacidade antioxidante, a presença do alelo mutante do gene *HFE* provavelmente contribuiu para a alteração desse parâmetro, pois quando comparamos indivíduos com Hb AA, com e sem a mutação no gene *HFE*, não encontramos diferença significativa. Ao se comparar indivíduos com Hb AS, com e sem mutação para o gene *HFE*, verificamos que houve diferença significativa, com redução dos valores de TEAC entre os dois grupos. Com base nos dados encontrados em nosso estudo, acreditamos que a variação na capacidade antioxidante esteja ligada mais à presença de hemoglobina S do que à presença dos polimorfismos no gene *HFE*.

## **Conclusão**

A frequência alélica da mutação H63D foi maior do que a C282Y em doadores de sangue e pacientes falciformes da região de São José do Rio Preto. A maioria dos doadores pertence ao grupo étnico miscigenado e dos pacientes ao grupo étnico de afro descendente.

A incidência das mutações H63D e C282Y para os doadores de sangue com Hb AA e Hb AS está de acordo com os dados encontrados na literatura para estudos populacionais brasileiros. Para os pacientes com Doença Falciforme a frequência encontrada para a mutação C282Y esta aumentada, o que não é esperado principalmente por ser este um grupo formado em sua maioria por indivíduos de origem étnica negra.

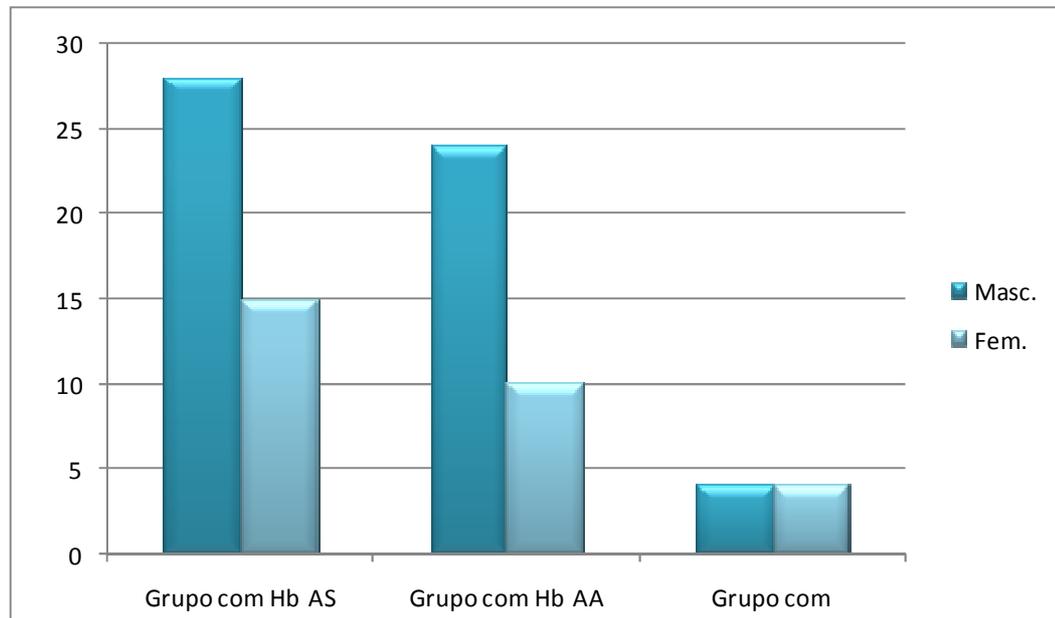
Com relação aos valores indicativos da capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica, observamos que a presença do alelo mutante para o gene *HFE*, contribui para a variação, porém não é suficiente para alterar de forma significativa a capacidade antioxidante e a peroxidação lipídica. O alelo  $\beta^s$  mostrou estar envolvido de forma significativa, quando em homozigose, com o aumento da peroxidação lipídica em indivíduos com doença falciforme. Com relação à capacidade antioxidante, esta se encontra aumentada quando em indivíduos portadores de Hb S em heterozigose.

### Referências

1. Clegg JB, Weatherall DJ. Thalassemia and malaria: new insights an old problem. *Proc. Assoc. Am. Phisicians*, 1999; 111: 278-282.
2. Bandeira FMGC, Bezerra M A C, Santos MNN, Gomes YM, Araújo AS, Abath FGC. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2007, 29: 179-184.
3. Serjeant GR. *Sickle Cell Disease*. 2<sup>a</sup>ed. New York, Oxford University Press Inc, 1992.
4. Higgs DR, Weatherall DJ.  $\beta$ -Thalassaemia. In: *The Haemoglobinopathies*. Baillière's Clinical Hematology, London,1993, 6: 6, 117p
5. Weatherall DJ, Clegg J B.; Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, 2001, 79: 704-712.
6. Beutler E, Lichtman M A, Coller BS, Kipps TJ. *Williams Hematology*. 5<sup>a</sup> ed. New York, International Edition, 1995.
7. Frenette PS, Atwehm GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts and future promise. *J. Clin. Invest.*, 2007, 117:850-528.
8. Naoum PC, Souza PC. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da HbS nos genótipos SS, SF (S/beta 0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. *Revista Brasileira de Patologia Médica e Laboratorial*, 2004, 40: 249-259.
9. Ferreira ACS, Oliveira VC, Caxito FA, Gomes KB, Castro AM, Pardini VC. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the gene of Brazilian

- individuals with clinical suspicion of hereditary hemochromatosis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2008; 30(5): 379-383.
10. Cullen LM, Gao X, Eastel S, Jazwinska EC. The hemochromatosis 845 G→A and 187 C→G mutations: prevalence in non-caucasian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62: 1403-7.
  11. Powell LW. Diagnosis of hemochromatosis. *Semin. Gastrointest. Dis.* 2002; 13(2):80-8.
  12. Pietrangelo A. Hereditary Hemochromatosis. *BBA–Molecular Cell Research*, 2006,700-710.
  13. Fleming RE, Britton RS. HFE and regulation of intestinal iron absorption. *AJP-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2006, 290:590-594.
  14. Siah CW, Ombiga J, Adams LA, Trinder D, Olynyk JK. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2006, 27:5-16.
  15. Souza AFM, Carvalho Filho RJ. Hereditary hemochromatosis: case report and review of the literature. *Arq. Gastroenterol.*, 2001, 38: 194-202.
  16. Beutler, E. Iron absorption in carriers of the C282Y hemochromatosis mutation. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, v.80:799-800.
  17. Bittencourt PL, Palacios SA, Couto CA, Cançado ELR, Carrilho FJ, Laudanna AA, *et al.* Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the *HFE* gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Braz. J. Med. Biol. Research* 2002; 35: 329-35.

18. Bonini-Domingos, C.R. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária e defeitos no gene *HFE*. O que conhecemos na população brasileira?. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2007, 29:341-342.
19. Parra, F. C.; Amado, R.C.; Lambertucci, J. R *et al* Color and genomic ancestry in Brazilians. PNAS. 2003, 100: 177–182.
20. Bonini-Domingos CR, Ondeí LS, Zamaro, P.J.A. Hemoglobinas similares a S no Brasil - um guia prático de identificação. 1. ed. São José do Rio Preto, SP: Editora HN, 2006, 1. 59 p.
21. Torres FR, Neiras WCS, Couto AARD, Couto VSCD, Cavasini CE, Rossit ARB, *et al*. Frequency of the *HFE* C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. Genetics and Molecular Research, 2008, 7: 60-64.
22. Re R, Pellegrini R, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 1999. 26:1231-1237.
23. Percário, S. Dosagem do dialdeído malônico, NEWSLAB, 2004, 6:46-50.
24. Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, Bordin, S, Soares MC, Menezes RC, *et al*. Mutations analysis of the *HFE* gene in Brazilian populations. Blood Cells, Molecules, and Diseases 1999; 25: 324-7.
25. Jeng MR, Adams-Graves P, Howard TA, Whorton MR, Li CS, Ware RE. Identification of hemochromatosis gene polymorphisms in chronically transfused patients with sickle cell disease. Am. J. Hematol., 2003, 74:243-248.

**Figura 1:** Separação por Gênero, dos indivíduos com mutação no gene *HFE*

**Tabela I:** Distribuição das frequências genótípicas para os polimorfismos no gene *HFE* de acordo com o gênero em doadores de sangue com Hb AA, Hb AS e doentes falciformes.

		C282Y/Wt	H63D/H63D	H63D/Wt	H63D/C282Y	Wt/Wt
Hb AA n=119	Masc	2 (1,68%)	1 (0,84%)	19 (15,97%)	1 (0,84%)	55 (46,22%)
	Fem	1 (0,84%)	-	9 (7,56%)	1 (0,84%)	30 (25,21%)
Hb AS n=211	Masc	-	2 (0,94%)	26 (12,31%)	-	123 (58,28)
	Fem	2 (0,94%)	1 (0,47%)	11 (5,21%)	1 (0,47%)	45 (21,32%)
Hb SS N=28	Masc	-	-	4 (14,28%)	-	10 (35,71%)
	Fem	2 (7,14%)	-	2 (7,14%)	-	10 (35,71%)

WT= alelo selvagem; C282Y= alelo mutante para C282Y; H63D= alelo mutante para H63D.

**Tabela II:** Frequência Alélica das mutações C282Y e H63D no gene *HFE* em doadores de sangue com Hb AS e Hb AA e pacientes falciformes (Hb SS).

Tipo de Hb	Mutação no gene HFE	nº de alelos	Alelos mutados	Frequência Alélica
AS n=211	C282Y	422	3	0,71%
	H63D	422	44	10,42%
AA n=119	C282Y	238	5	2,10%
	H63D	238	32	13,44%
SS n=28	C282Y	56	2	3,57%
	H63D	56	6	10,71%

**Tabela III:** Valores médios e desvio padrão, resultados máximo e mínimo encontrados para as quantificações de MDA e TEAC, na população avaliada.

Grupos	Sub-grupos	MDA		TEAC	
		Média ± SD (ng/mL)	Min-max (ng/mL)	Média ± SD (µMol/L)	Min-max (µMol/L)
Hb AA	c/ <i>HFE</i>	294,61± 107,52	112-578	2,07±0,09	1,86-2,2
	s/ <i>HFE</i>	278,80±104,18	93-483	2,07±0,11	1,78-2,31
Hb AS	c/ <i>HFE</i>	335 ± 128,38	112-600	2,13±0,03	2,04-2,21
	s/ <i>HFE</i>	253,63 ± 122	120-461	2,16±0,05	2,07
Hb SS	c/ <i>HFE</i>	766,87±353	335-1524	2,04±0,07	1,94
	s/ <i>HFE</i>	903,58±507	372-2362	2,05±0,08	1,88

Legenda: SD= desvio padrão; Min-max= valores mínimo e máximo.

Valor de referência: **MDA:** 0-440 ng/ml; **TEAC:** 1,78-2,30 mM/L

**Tabela IV:** Teste ANOVA entre MDA e TEAC para comparação entre os grupos estudados

<b>Grupos</b>	<b>MDA</b>	<b>TEAC</b>
A x B	p=0,5518	p=0,9999
A x C	p=0,2859	<b>p=0,0089*</b>
A x D	p=0,2693	<b>p=0,0004*</b>
A x E	<b>p=0,0075*</b>	p=0,3565
A x F	<b>p=0,0001*</b>	p=0,4736
B x C	p=0,0936	<b>p=0,0003*</b>
B x D	p=0,4229	<b>p=0,0001*</b>
B x E	<b>p=0,0006*</b>	p=0,3129
B x F	<b>p=0,0001*</b>	p=0,4074
C x D	p=0,0530	<b>p=0,0399*</b>
C x E	<b>p=0,0120*</b>	<b>p=0,0086*</b>
C x F	<b>p=0,0003*</b>	<b>p=0,0010*</b>
D x E	<b>p=0,0051*</b>	<b>p=0,0013*</b>
D x F	<b>p&lt;0,0001*</b>	<b>p&lt;0,0001*</b>
E x F	p=0,4450	p=0,7549

Intervalo de confiança e significância  $p < 0.05$

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, \_\_/\_\_/\_\_\_\_

---

Lígia Márcia da Silveira Viana-Baracioli