



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ISABETH DA FONSECA ESTEVÃO

**Influência dos níveis de ferritina sérica, das mutações no gene da
beta globina e dos valores das enzimas de detoxificação Catalase e
Glutathione S -Transferase na expressão fenotípica de Beta
Talassemia Heterozigota**

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida

São José do Rio Preto - SP

2011

Estevão, Isabeth da Fonseca.

Influência dos níveis de ferritina sérica, das mutações no gene da beta globina e dos valores das enzimas de detoxificação Catalase e Glutathione S-transferase na expressão fenotípica da Beta Talassemia Heterozigota / Isabeth da Fonseca Estevão - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

152 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Co-orientador: Eduardo Alves de Almeida

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de

Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Hematologia. 3. Hemoglobinopatia. 4. Talassemia beta. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Almeida, Eduardo Alves de. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616.155

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

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto.

ISABETH DA FONSECA ESTEVÃO

Influência dos níveis de ferritina sérica, das mutações no gene da beta globina e dos valores das enzimas de detoxificação Catalase e Glutathione S -Transferase na expressão fenotípica de Beta Talassemia Heterozigota

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Bonini-Domingos
Professora Doutora
UNESP - São José do Rio Preto
Presidente e Orientadora

Prof^a. Dr^a. Elvira Maria Guerra Shinohara
Professora Doutora
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Prof. Dr. Ivan Lucena Angulo
Professor Doutor
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Maria Stella Figueiredo
Professora Livre-Docente
Faculdade de Medicina - UNIFESP

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Professora Adjunta
UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 28 de fevereiro de 2011.

*Dedico este trabalho aqueles que acreditam que
nenhum sonho é impossível !!!*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos** pela confiança, amizade, incentivo e por me apoiar de forma sempre positiva nesses seis anos de convivência.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Eduardo Alves de Almeida**, do Laboratório de Química e Ciências Ambientais pela inestimável ajuda e pela paciência em me acompanhar nos experimentos laboratoriais.

Aos **amigos** do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH). Muitos me acompanham desde o início desta jornada e participaram ativamente no desenvolvimento deste trabalho. Outros chegaram depois, e também fizeram parte direta ou indiretamente. Mas **todos** são colaboradores, pois independente da participação teórica ou prática, me apoiaram, riram e sofreram como se este também fosse seu projeto.

À amiga **Luciana de Souza Ondeí**, pela colaboração direta neste projeto, pelo apoio técnico e pela ajuda na fase final, mesmo estando distante.

À **Iolanda do Nascimento Camargo**, secretária e amiga que pacientemente coordenou e conciliou minha vida de consultório e estudos.

Às amigas **Fernanda T.A. Caballero** e **Edeltraut N. Zóia**, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

À amiga **Tânia Marcondes**, pelo incentivo e apoio.

Às amigas e companheiras de moradia, **Thaís, Rita, Larissa, Gabriela e Ariane** pela convivência. Obrigada por dividirem comigo esse espaço que tive como lar.

À minha **família**, que participou deste sonho. Foram anos em que estive empenhada neste projeto, sem diminuir a carga de trabalho como médica. As poucas horas do dia e finais de semana que poderiam ser para nosso convívio foram substituídas por leituras, planilhas, resumos... Mas todos (**Maria de Lourdes, Lia, Renata, Fernanda, Paula, Juliana e Fábio**) souberam entender, apoiar, ajudar... Enfim participar comigo em cada momento. Agradeço de coração!!!

*“Toda experiência que nos obriga a enfrentar o medo cara a cara nos
torna mais fortes, aumenta nosso valor e nossa confiança”*

Eleanor Roosevelt

CAPÍTULO I	9
1 Introdução.....	10
2 Objetivos	26
3 Material e Métodos	27
CAPÍTULO II	36
Artigo:Influência das mutações β^0 e β^+ sobre o perfil hematológico e as reservas de ferro em portadores de beta talassemia heterozigota	37
CAPÍTULO III	51
Artigo:Serum ferritin and transferrin saturation levels in β^0 and β^+ thalassemia trait.....	52
CAPÍTULO IV	71
Artigo:As mutações β^0 (CD 39) e β^+ (IVS 1-110) influenciam o perfil de marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante em beta talassêmicos heterozigotos?	72
CAPÍTULO V.....	88
Artigo:Frequência dos polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 e relação com o fenótipo da beta talassemia heterozigota.....	89
CAPÍTULO VI	106
4 Discussão geral	107
5 Conclusões.....	111
ANEXO I.....	125
Métodos	125
ANEXO II	142
Artigo publicado.....	142
ANEXO III.....	145
Aceite de artigo para publicação.....	145
RESUMO	147
ABSTRACT	150

CAPÍTULO I

1 Introdução

1.1 Beta talassemia

Definição e Epidemiologia

As síndromes talassêmicas são caracterizadas por redução na síntese de uma ou mais cadeias de globina (α , β , γ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$, δ e $\epsilon\gamma\delta\beta$) e são os distúrbios monogênicos mais frequentes no mundo (THEIN, 2005; CUNNINGHAN, 2008). Na beta talassemia clássica a produção de cadeias de beta globina, estruturalmente normais, está reduzida ou ausente, decorrente da diminuição direta da expressão gênica. Entretanto, variantes estruturais altamente instáveis, sintetizadas em pequenas quantidades, podem manifestar o fenótipo talassêmico e são incluídas no grupo das hemoglobinopatias beta talassêmicas (THEIN, 2005).

A beta talassemia tem sido descrita em vários grupos étnicos, sendo comum no Mediterrâneo, Ásia e algumas regiões da África. Estima-se que 1,5% da população mundial, 80 a 90 milhões de pessoas, é portadora de beta talassemia heterozigota e que aproximadamente 60.000 novos casos, sintomáticos, ocorram anualmente (GALANELLO; ORIGA, 2010). Em algumas regiões da Itália, sua incidência pode alcançar até 30% (CAO et al., 1996).

No Brasil, estima-se que 1% da população caucasóide seja portadora do traço talassêmico. Essa alta prevalência é resultado da intensa contribuição de europeus na formação da população brasileira, ocorrida no final do século XIX e início do século XX (ZAGO et al., 1983; BONINI-DOMINGOS et al., 2000; BONINI-DOMINGOS, 2004).

Aspectos Genéticos

A beta globina é codificada por um gene estrutural, localizado no braço curto do cromossomo 11, em uma região de aproximadamente 70 kb, contendo outros quatro genes funcionais e um pseudogene. Os genes estão dispostos nesse

grupamento na ordem sequencial de sua expressão durante o desenvolvimento, 5' $\epsilon - \gamma^G - \gamma^A - \psi\beta - \delta - \beta$ 3' (NUSSBAUM et al., 2002). Antes do início do complexo localiza-se a região controladora do locus (LCR), que é essencial para a expressão de todos esses genes. A região transcrita do gene beta está contida em três regiões codificantes chamadas exons, separadas por duas não codificantes, os introns ou sequências intercalantes (IVS). Sequências importantes para a função gênica são encontradas nas junções exon-intron e na região não traduzida 3' (3'-UTR) no final das sequências do RNA mensageiro (THEIN, 2005).

Diferentes tipos de lesões podem ocorrer nos genes do grupamento beta, tais como, mutações pontuais, pequenas deleções ou adições de bases tanto em regiões flangeadoras, como em regiões codificadoras. Até o momento, mais de 400 mutações, afetando o gene da beta globina, já foram descritas*. Porém, somente algumas, têm frequência elevada, provavelmente associada com a proteção, dos portadores, contra a malária (SINISCALCO et al., 1966; LEE et al., 1999).

Nas talassemias beta, as mutações pontuais são as principais causas de redução ou ausência na síntese da cadeia polipeptídica (BANK, 2005). O padrão de herança é, geralmente, autossômico recessivo. Entretanto, variantes de cadeias beta, altamente instáveis, podem ter padrão dominante (THEIN, 2005).

O grau de redução da beta globina é determinado pelo tipo de mutação herdado, sendo denominadas β^0 ou β^+ , na ausência ou diminuição da síntese das cadeias beta, respectivamente. Nas mutações β^+ , a produção de cadeia beta é ao redor de 10%. Porém, em algumas mutações, a diminuição é mais discreta e nesses casos utiliza-se à denominação β^{++} (THEIN, 2005; GALANELLO; ORIGA, 2010).

No Brasil, a frequência alélica dos mutantes herdados, depende da região estudada, sendo que nas Regiões Sul e Sudeste os alelos β^0 39 (C→T), $\beta^{+/++}$ IVS 1-6 (T→C), β^+ IVS 1-110 (G→A) e β^0 IVS 1-1 (G→A) são responsáveis pela quase totalidade dos casos. No Nordeste, além destes, também é encontrado o alelo β^0 IVS 1-5 (G→C) (ARAÚJO et al., 2003; BONINI-DOMINGOS, 2004; SONATI; COSTA, 2008).

Fisiopatologia

A redução ou ausência das cadeias de beta globina, em talassêmicos homozigotos ou com dupla heterozigose, resulta em acúmulo das cadeias alfa que se precipitam nas hemácias e em seus precursores, sob forma de corpos de inclusão, danificando a membrana celular e levando à destruição prematura das hemácias, eritropoese ineficaz e, anemia (POOTRAKUL et al., 2000; RUND; RACHMILEWITZ, 2005).

A diminuição dos níveis de hemoglobina estimula a produção de eritropoetina, com consequente expansão da medula óssea, causando as deformidades ósseas encontradas em pacientes não tratados. A manutenção da anemia e a intensa atividade eritropoética resultam em hepatoesplenomegalia e hematopoese extramedular. Em talassêmicos heterozigotos ocorre discreta diminuição da sobrevivência dos eritrócitos e eritropoese ineficaz leve (PEARSON et al., 1960; LEE et al., 1999; SKARMOUTSOU et al., 2003).

Os mecanismos pelos quais o acúmulo de cadeias alfa acelera a apoptose celular, em beta talassêmicos, não estão totalmente esclarecidos, porém o estresse oxidativo parece exercer importante papel na fisiopatologia das formas graves dessa doença (SHINAR; RACHMILEWITZ, 1990; GRINBERG et al., 1995; LANG et al., 2002; KASSAB-CHEKIR et al., 2003; NAITHANI et al., 2006; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008; MARIA et al., 2010). O aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) está relacionado ao excesso de cadeias alfa desnaturadas, sobrecarga de ferro e diminuição dos níveis de hemoglobina sendo que, mesmo pequenas quantidades de ferro livre, liberadas das cadeias alfa, são

suficientes para iniciar a geração desses radicais. O excesso desses radicais danifica constituintes celulares, tais como DNA, proteínas e, principalmente, lipídios da membrana, acarretando alterações estruturais e de permeabilidade, culminando em morte celular (SHINAR; RACHMILEWITZ, 1990; KOHEN; NYSKA, 2002; KASSAB-CHEKIR et al., 2003).

Aspectos clínicos

As mutações no gene da beta globina frequentemente causam manifestações clínicas e/ou laboratoriais, pois uma única mutação afeta 50% das cadeias beta produzidas. Por outro lado, não têm consequências pré-natais, já que a gama globina é a principal cadeia produzida antes do nascimento.

As síndromes beta talassêmicas podem ser classificadas em: beta talassemia, beta talassemia associada a outras hemoglobinopatias qualitativas, tais como, hemoglobinas S, C e E, talassemia associada a persistência de hemoglobina fetal, formas autossômicas dominantes e talassemia associada a outras manifestações tais como, a tricotiodistrofia e a trombocitemia ligada ao cromossomo X (THEIN, 2005; WEATHERALL, 2007; GALANELLO; ORIGA, 2010).

As beta talassemias são classificadas, de acordo com a gravidade do fenótipo, em *major*, *intermedia* e *minor*, sendo que as formas *major* e *intermedia* são homozigotas ou duplo heterozigotas e as formas *minor*, heterozigotas. As manifestações clínicas são diversas, variando de anemia grave, dependente de transfusões sanguíneas, até estados assintomáticos.

Nas formas *major* a produção de cadeias beta é significativamente comprometida, ocasionando anemia grave, dependente de transfusão. Os pacientes apresentam atraso no crescimento, icterícia, hepatoesplenomegalia, expansão da medula óssea e sobrecarga de ferro. Aproximadamente 80%, dos indivíduos que não recebem tratamento, sobrevivem menos de cinco anos. Aqueles que não são transfundidos regularmente, geralmente morrem antes dos 20 anos e, os que são tratados com transfusões e terapia de quelação do ferro

adequadamente, sobrevivem além da quarta década (BORGNA-PIGNATTI et al., 2004; MODELL, 2008; BORGNA-PIGNATTI, 2010; GALANELLO; ORIGA, 2010).

Na forma *intermedia* os níveis de hemoglobina são maiores e, esses pacientes, geralmente, não necessitam de transfusões regulares. Entretanto, hiperplasia da medula óssea, ocasionando deformidades ósseas, osteoporose e fraturas patológicas; hematopoese extramedular e sobrecarga de ferro, secundária ao aumento da absorção intestinal, são achados frequentes nesses indivíduos (GALANELLO; ORIGA, 2010; TAKESHITA, 2010).

Na beta talassemia *minor*, apenas um gene β -globina é defeituoso. O portador, geralmente, é assintomático, sendo o diagnóstico realizado em exames de rotina. O quadro hematológico caracteriza-se por anemia leve, ou mesmo ausente, aumento na contagem global de eritrócitos com redução acentuada do volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM) (WEATHERALL, 2007). Os valores do VCM, desses indivíduos, estão diretamente relacionados ao grau de redução na síntese da beta globina (RUND et al., 1992). A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) é normal ou ligeiramente diminuída. As hemácias apresentam resistência osmótica elevada e, na maioria dos casos, o perfil eletroforético demonstra aumento da Hb A₂ (3,5% a 8%) e níveis normais ou discretamente aumentados de Hb fetal.

São escassos os estudos que avaliam possíveis efeitos deletérios das mutações no gene β -globina, quando em heterozigose (PREMAWARDHENA et al. 2008). Todavia, está bem estabelecido, que mulheres grávidas, portadoras de traço talassêmico, manifestam anemia mais acentuada do que as não talassêmicas, sem aumento das complicações obstétricas (WHITE et al., 1985; SHEINER et al., 2004; TSATALAS et al., 2009). Sintomas gerais, tais como, cefaléia, fadiga, tontura, sonolência e adinamia são mais frequentes em beta talassêmicos heterozigotos do que em indivíduos normais e portadores de anemia ferropriva (PREMAWARDHENA et al., 2008).

Sobrecarga de ferro e alterações laboratoriais, sugestivas de dano oxidativo, tais como, alterações da capacidade antioxidante e aumento da geração

de moléculas oxidantes, também já foram relatados, em beta talassêmicos heterozigotos (EDWARDS et al., 1981; FARGION et al., 1982; FARGION et al., 1985; FARGION et al. 2000; PIPERNO et al., 2000; CHIANG et al., 2007; SELEK et al., 2007).

Modificadores do fenótipo talassêmico

A grande variabilidade do fenótipo talassêmico, tanto nas formas graves quanto nas leves, sugere que vários fatores, genéticos e ambientais, podem influenciar as características desses indivíduos (WEATHERALL, 2001; THEIN, 2005; GALANELLO; ORIGA, 2010). O tipo de mutação, β^0 ou β^+ , é o fator mais confiável e preditivo do fenótipo da beta talassemia (THEIN, 2005). Em homozigotos, variantes genéticas que possam diminuir o desequilíbrio na produção das cadeias alfa e beta, tal como a coerança com a alfa talassemia, podem resultar em fenótipo mais brando.

A coerança de mutações em genes não localizados nos *clusters* das globinas também pode modificar esse fenótipo, tais como, a presença do polimorfismo (TA)₇ na região promotora do gene difosfato-glucoronosil transferase, o alelo apolipoproteína E $\epsilon 4$, alguns haplotipos do HLA, mutações em genes relacionados ao metabolismo do ferro, ósseo e ao estresse oxidativo (THEIN, 2005; WU et al., 2006; SHARMA et al., 2009; GALANELLO; ORIGA, 2010). Recentemente, um polimorfismo no gene *MI* da Glutathione S-transferase foi associado, em talassêmicos *major*, a maior risco de sobrecarga cardíaca de ferro (ORIGA et al., 2008).

A beta talassemia heterozigota é uma condição clínica considerada benigna e que não compromete a qualidade de vida de seus portadores, por isso são raros os estudos com essa forma de talassemia. Os possíveis efeitos da associação das mutações no gene da globina, em heterozigose, com mutações em outros genes, também foram pouco explorados. Dados na literatura são conflitantes com relação ao perfil de ferro e a possibilidade de sobrecarga de ferro, associada ou não a outros distúrbios genéticos.

1.2 Metabolismo do ferro

Os seres humanos mantêm, ao longo da vida, concentração constante de ferro corpóreo, entre 35 a 45 mg/Kg de peso para homens adultos, e concentrações ligeiramente menores para mulheres em idade fértil, associadas à perda sanguínea mensal. Aproximadamente 60% a 70% do ferro orgânico é incorporado à molécula de hemoglobina durante o desenvolvimento das células eritróides precursoras e maduras, 10% estão presentes em fibras musculares (mioglobina) e outras estruturas como citocromos e enzimas. Os 20% a 30% restantes são armazenados na forma de ferritina e hemossiderina, sendo que o tamanho destes depósitos varia de indivíduo para indivíduo. Essas fontes de armazenamento estão distribuídas por todas as células do organismo humano, principalmente nos hepatócitos e nos macrófagos do sistema retículo-endotelial e da medula óssea (CONRAD et al., 1999; EMERIT et al., 2001).

O ferro é essencial para a maioria dos seres vivos. Sua principal característica é a capacidade de receber e doar elétrons, desempenhando papel crucial em vários processos metabólicos como o transporte de oxigênio, produção de energia e síntese de DNA. Entretanto, sua capacidade de oxiredução pode produzir, quando livre, radicais que agredem as células lipídicas, as proteínas e os ácidos nucléicos (ANDREWS, 2005).

A maior quantidade do ferro armazenado encontra-se sob a forma de ferritina, que captura e internaliza o excesso de ferro livre, prevenindo que esses intermedeiem a formação de ERO, sendo, portanto, fundamental na prevenção da formação de radicais livres e danos celulares. A ferritina é um multímero de peso molecular de 600.000 daltons, composto de 24 cadeias pesadas (H) e leves (L), em proporções variáveis, de acordo com o tecido de origem (CAMASCHELLA; POGGIALI, 2009).

Sua síntese é regulada pela concentração do ferro intracelular, envolvendo estruturas denominadas elementos responsivos de ferro, do inglês *iron responsive elements* (IREs), localizados na extremidade 5' e 3' da região não codificadora do ribonucleotídeo mensageiro (mRNA) da ferritina. Os IREs são reconhecidos pelas

proteínas reguladoras de ferro 1 e 2 (IRP 1 e IRP 2), *iron regulatory proteins*, as quais, em situação de baixa concentração de ferro se ligam as IREs, localizadas na extremidade 5', inibindo a tradução do mRNA e diminuindo a produção de ferritina. Por outro lado, quando as IREs estão ligadas na extremidade 3', o mRNA não se degrada, mantendo a síntese protéica (EISENSTEIN; BLEMINES, 1998; YOU; WANG, 2005). É regulada, também, por citocinas durante o desenvolvimento, diferenciação, proliferação celular, e nos processos inflamatórios. O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 1 (IL 1) podem induzir a expressão celular de cadeias H da ferritina, confirmando assim, o envolvimento das citocinas inflamatórias na síntese desta proteína.

A concentração de ferritina plasmática é baixa, entretanto, sua determinação, na prática médica, permite avaliação quantitativa das reservas do ferro orgânico, por sua correlação com os depósitos teciduais (PAIVA et al., 2000). A concentração reduzida dessa proteína, abaixo de 30 $\mu\text{g/mL}$, é indicativa de depleção das reservas de ferro (BEUTLER et al., 2003). Por outro lado, mulheres com valores de ferritina acima de 200 ng/mL e homens acima de 300 ng/mL que tenham saturação de transferrina igual ou superior a 45% devem ser investigados para sobrecarga de ferro (CAMASCHELLA, 2005).

O estresse oxidativo atua na regulação da concentração de ferritina, por ação direta na expressão gênica, ou indiretamente, pela modificação da atividade das IRPs (YOU; WANG, 2005). Desta forma, estados inflamatórios, infecciosos, neoplásicos, leucêmicos, doenças hepáticas, dentre outros, aumentam as concentrações de ferritina, independente das reservas de ferro. Portanto, a mensuração da proteína C reativa (PCR), importante marcador inflamatório, pode contribuir na correta interpretação das concentrações de ferritina sérica (CAMASCHELLA; POGGIALI, 2009).

O principal regulador dos níveis de ferro é a absorção pelas células intestinais, pois a excreção é pequena, não existindo mecanismos de regulação para esse processo. Sua eliminação é decorrente da perda sanguínea e da descamação celular. Portanto, para a manutenção da homeostase, é necessário rigoroso controle de sua absorção. O ferro presente nos alimentos se encontra sob

duas formas: a heme e a não heme. A absorção do ferro, principalmente o não heme, é extremamente difícil e dependente de vários fatores como a sua forma química, os ácidos orgânicos e a secreção ácida gástrica (MACKENZIE; GERRICK, 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 mioglobina. O heme liberado é absorvido pela membrana apical, provavelmente por uma proteína de transporte denominada HCP1 (*heme carrier protein*) e, clivado no lisossomo pela enzima heme oxidase em bilirrubina e Fe^{2+} (SHAYEGHI et al., 2005). O mecanismo de liberação do ferro desse compartimento para o citosol também não é conhecido (MACKENZIE; GARRICK, 2005).

O ferro não heme é captado para o enterócito através da membrana apical pela DMT1 (proteína transportadora de metal bivalente) e, portanto, necessita ser reduzido para a forma ferrosa (Fe^{2+}). A enzima responsável por esse processo é a Dcytb (citocromo b duodenal) (ANDREWS, 2005). O DMT1 e a Dcytb estão presentes na membrana apical dos enterócitos maduros, nas vilosidades do duodeno proximal, e sua regulação está associada à quantidade de ferro corporal (MACKENZIE; GARRICK, 2005). Os mecanismos de regulação da homeostase do ferro não heme estão esquematizados na Figura 1 (FLEMING; BACON, 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 transporte através da membrana basocelular para o plasma é mediado por uma proteína transportadora, a ferroportina, 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 é a hefaestina (VULPE et al., 1999; DONOVAN, 2005).

Nas últimas décadas muitos estudos foram realizados para elucidar os mecanismos que controlam o processo de absorção do ferro não heme. O mais importante avanço no conhecimento dos mecanismos envolvidos na homeostase do ferro foi o reconhecimento do fígado como órgão central dessa regulação. Sua ação está relacionada à síntese de um pequeno peptídeo, a hepcidina, que inibe a absorção do ferro pelas células intestinais e, também sua liberação dos macrófagos e de outras células que o contenham. O mecanismo principal de regulação, mediado pela hepcidina, é a interação com a ferroportina, ocasionando sua interiorização e degradação. A expressão da hepcidina é regulada, principalmente, pelas proteínas HFE, receptor de transferrina 2 (TfR2) e hemojuvelina.

A proteína HFE é composta de 343 aminoácidos, cuja estrutura inclui um grande domínio extracelular, formado de 3 alças ($\alpha 1$ a $\alpha 3$), um único domínio transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática (FLEMING; BRITTON, 2006). Para estabilização, transporte intracitoplasmático e expressão da HFE na superfície celular e nas membranas endossomais, é necessária a ligação com a β_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.

Outra proteína envolvida no metabolismo do ferro, e expressa pelas células hepáticas, é o receptor de transferrina 2 (TfR2), molécula semelhante ao receptor de transferrina 1. Mutações no gene responsável pela sua codificação ocasionam desequilíbrios semelhantes aos que acontecem no gene *HFE*, incluindo os baixos níveis de hepcidina (CAMASCHELLA, 2005; GRIFFITHS, 2007).

A última, dessas três proteínas, descrita na literatura e relacionada ao metabolismo do ferro foi a hemojuvelina. Mutações que levam a modificação dessa molécula ocasionam rápida sobrecarga de ferro e acentuado dano orgânico. Nesses pacientes os níveis de hepcidina são indetectáveis (CAMASCHELLA, 2005; GRIFFITHS, 2007).

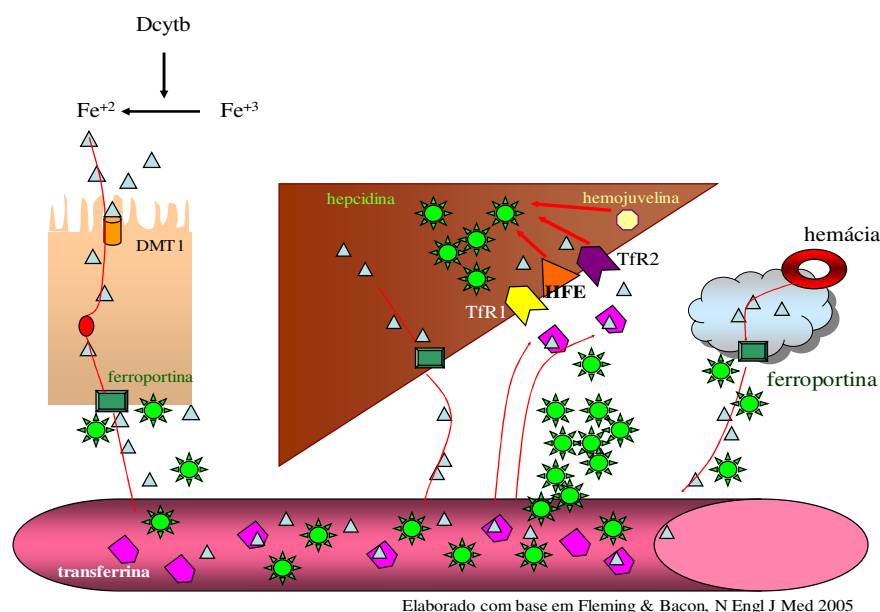


Figura 1. Mecanismos de regulação da homeostase do ferro não heme.

Legenda: ★ hepcidina; ● hemojuvelina; ↗ receptor da transferrina 2; ↘ receptor da transferrina 1; ▲ proteína HFE; ☼ proteína transportadora de metal bivalente (DMT1); ● hefaestina; □ ferroportina; △ ferro.

Os mecanismos exatos de como essas moléculas identificam a quantidade de ferro orgânico e regulam a expressão da hepcidina não são bem conhecidos. Todavia, os baixos níveis de hepcidina observados na maioria dos portadores de hemocromatose hereditária, sugerem que essa proteína seja a principal reguladora da homeostase do ferro (GANZ, 2006).

A expressão de todas essas proteínas é regulada por uma complexa rede, envolvendo vários genes relacionados a quatro componentes principais: a atividade eritropoética, a oxigenação dos tecidos, as reservas de ferro e a inflamação.

Hemocromatose hereditária é um grupo de desordens causadas por mutações em genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro. São caracterizadas por aumento da absorção intestinal do ferro, podendo resultar em severa sobrecarga de ferro e danos orgânicos irreversíveis.

A maioria dos indivíduos com hemocromatose hereditária são homozigotos para a mutação C282Y, que acarreta a troca da tirosina pela cisteína, na posição 282 da proteína HFE, perdendo sua capacidade de regular a expressão da hepcidina (BRIDLE et al., 2003; NICOLAS et al., 2003). Outra mutação comum desse gene é a H63D, que consiste na troca de histidina por ácido aspártico na posição 63 da proteína HFE. Essa mutação, raramente, causa acúmulo de ferro, mesmo em homozigose ou em componente heterozigoto com a C282Y (MCLAREN; GORDEUK, 2009).

Na beta talassemia *major* e *intermedia*, a fisiopatologia da sobrecarga de ferro está relacionada às múltiplas transfusões sanguíneas, recebidas durante a vida, e ao aumento da atividade eritropoética. (KEARNEY et al., 2007; GALANELLO; ORIGA, 2010; TANNO; TAKESHITA, 2010; MILLER, 2010).

No beta talassêmico heterozigoto, o grau de eritropoese ineficaz é pequeno e, provavelmente não suficiente, para justificar as alterações no perfil do ferro, observadas em alguns desses indivíduos. Mulheres com beta talassemia heterozigota apresentam níveis mais elevados de ferritina do que as não talassêmicas (ESTEVÃO et al., 2010). Diferenças entre os valores de ferritina e saturação de transferrina, entre talassêmicos e controles, têm sido correlacionadas a coerância com mutações no gene *HFE*, (REES et al., 1998; RUIZ-ARGUILLES et al., 2001; MELIS et al., 2002; MARTINS et al., 2004). Entretanto, os dados da literatura são controversos. Garewal e colaboradores, em indianos e Estevão, em brasileiros, não confirmaram esses achados (GAREWAL et al., 2005; ESTEVÃO, 2007).

Mutações em outros genes, associadas a hemocromatose, já foram descritas em beta talassêmicos heterozigotos com sobrecarga de ferro e, em alguns, nenhuma outra mutação, foi identificada (De GOBBI et al., 2002; RIVA et al., 2004). Na beta talassemia heterozigota, além da etiologia obscura do aumento das reservas de ferro, também não se conhece os possíveis efeitos dessa alteração. Valenti e colaboradores, em 2010, detectaram maior predisposição para acúmulo parenquimatoso de ferro e evolução para fibrose hepática em pacientes heterozigotos para beta talassemia com esteatose não alcoólica hepática

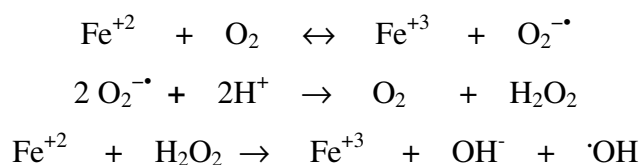
(VALENTI et al., 2010), demonstrando que, mutações beta talassêmicas, mesmo em heterozigose, em algumas circunstâncias, podem modificar a evolução clínica desses indivíduos.

1.3 Estresse oxidativo

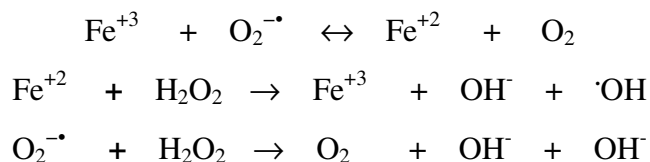
Os eritrócitos, assim como outras células, estão sujeitos aos efeitos nocivos de agentes oxidantes que podem ser resultantes do próprio metabolismo celular ou induzidos por fatores exógenos, como drogas e infecções. Se a eficiência do sistema antioxidante for superada pela magnitude destes fenômenos oxidativos, ocorrerá o estresse oxidativo, que culminará em hemólise (LEE et al., 1999; FERREIRA; MATSUBARA, 2007).

As espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são encontradas em todos os sistemas biológicos. O ferro é um importante catalisador de reações de oxidação de biomoléculas, como observado nas reações de Fenton e de Haber-Weiss, nas quais são formados diferentes tipos de ERO, conforme descrito abaixo (FERREIRA; MATSUBARA, 2007).

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Nos eritrócitos, o estresse oxidativo é marcado pela desnaturação das proteínas de membrana, oxidação da Hb a metahemoglobina e lesão oxidativa do componente lipídico da membrana, levando a lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 2007).

A maioria das células possui enzimas que estão envolvidas na detoxificação celular. A família de enzimas citocromo P450 (CYPs) converte moléculas hidrofóbicas em substâncias solúveis para que possam ser excretadas. Embora as CYPs atuem com rapidez e precisão, alguns compostos são reduzidos parcialmente, produzindo ERO, como o $O_2^{\bullet-}$ (SHARMA et al., 2000).

Outras enzimas atuantes nos mecanismos antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (BERNARDINI et al., 2005). A SOD, presente em quase todas as células, é considerada a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio e catalisa a conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . Este, por sua vez, gera outras ERO ou é degradado em água e oxigênio por enzimas como a CAT e a GPx, sendo que esta última utiliza a glutathione (GSH) como agente redutor (YENCHITSOMANUS; WASI, 1983; FERREIRA; MATSUBARA, 2007). A eliminação do H_2O_2 impossibilita a formação do radical hidroxil, como acontece na reação de Fenton, catalisada por metais de transição, como o ferro. A GPx catalisa, também, a redução de peróxidos lipídicos e de hidrogênio. Todas as isoformas utilizam a GSH como doadora de elétrons, transformando os peróxidos orgânicos em álcoois (HAYES; PULFORD, 1995).

A Glutathione *S*-transferase (GST) é uma família de enzimas que atua na detoxificação de eletrólitos, exógenos e endógenos, que podem causar danos celulares. Esses eletrólitos podem ser conjugados a GSH, não-enzimaticamente, ou por reações catalisadas pelas GSTs. A GSH-conjugada (GS-E) é então transportada, ou convertida em ácido mercaptúrico para posterior excreção. O transporte de GS-E é essencial para o funcionamento do eritrócito, pois seu acúmulo pode causar toxicidade e inibição de algumas enzimas da via glicolítica e das enzimas de detoxificação como as GSTs e a glutathione redutase (SHARMA et al., 2000).

Algumas isoenzimas de GST também exibem atividade de GPx e catalisam a redução de hidroperóxidos orgânicos em seus respectivos álcoois. Os principais substratos de redução da GST incluem os hidroperóxidos dos ácidos graxos, fosfolipídios e do DNA. Como esses compostos são gerados por peroxidação de lipídios e por dano oxidativo no DNA, a atividade de peroxidase da GST, tem papel no controle do estresse oxidativo. As GST ligadas à membrana celular são importantes na detoxificação de hidroperóxidos dos lipídios da própria membrana, enquanto a ação das GST citosólicas necessita da liberação dos hidroperóxidos de ácidos graxos pela fosfolipase A₂ (HAYES; PULFORD, 1995).

Em humanos, as GSTs são subdivididas em oito classes de enzimas multifuncionais denominadas alfa (α), mi (μ), pi (π), teta (θ), zeta (ζ), sigma (σ), Omega (ω) e Kapa (κ), as quais apresentam polimorfismos bem estabelecidos na população, sendo que alguns deles estão associados a doenças como Parkinson, esclerose múltipla, Alzheimer e vários tipos de cânceres como os de pulmão, próstata, colo-retal e outros (SRISVASTAVA et al., 2004; PINHEL et al., 2008; KONDO et al., 2009; MO et al., 2009). Os genótipos das GSTs também influenciam o processo antioxidante.

Os genes *GSTM1* (1p13.3) e *GSTT1* (22q11.23), são altamente polimórficos. Os polimorfismos são resultantes de deleções em um ou ambos os genes e são chamados genótipos nulos. Os principais polimorfismos são os do gene *GSTM1*, *GSTT1* e os do *GSTP1*. O gene *GSTM1* apresenta um alelo com atividade nula devido a uma grande deleção e outros dois genes funcionais *GSTM1a* e *GSTM1b*. O gene *GSTT1*, também apresenta genótipo nulo por deleção. Indivíduos com a deleção nos genes *GSTM1* e *GSTT1*, em homozigose, apresentam perda total da atividade enzimática dessas classes, ocasionando deficiência na metabolização de agentes oxidantes (ARAND et al., 1996; DUSINKÁ et al., 2001; BERNARDINI et al., 2005). No gene *GSTP1* (11q13), o polimorfismo secundário a transição de A→G, levando à troca do aminoácido isoleucina por valina no códon 105, codifica uma enzima que atua de forma diferente na metabolização de eletrólitos gerados do estresse oxidativo e de outros

processos de biotransformação, tendo atividade catalítica menor (BERNARDINI et al. 2005; MO et al., 2009).

Além da sobrecarga de ferro, presente na maioria dos beta talassêmicos homozigotos ou duplo heterozigotos, outros mecanismos estão envolvidos na geração de ERO, tais como, o excesso de cadeias alfa desemparelhadas e auto oxidantes, eritropoese ineficaz e hemólise (CIGHETTI et al., 2002; WALTER et al., 2006). Nesses pacientes, o dano oxidativo tem sido confirmado pelo aumento de biomarcadores, tais como, os valores de malondialdeído (MDA) e as proteínas carbonil (WALTER et al., 2006).

Apesar de poucos estudos, por ser considerada inócua para seus portadores, alterações relacionadas ao perfil do ferro e ao estresse oxidativo têm sido relatadas. A importância e a relação dessas alterações com o tipo de mutação herdado e com associações com outras mutações em genes não localizados no cluster da beta globina são desconhecidas.

A hipótese do presente estudo é a de que a coerância com diferentes polimorfismos, relacionados ao metabolismo do ferro e ao estresse oxidativo, interfiram com o fenótipo dos beta talassêmicos heterozigotos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar a influência dos níveis de ferritina sérica, das mutações nos genes β -globina e *HFE*, da atividade das enzimas de detoxificação Glutathione *S*-transferase e Catalase e dos polimorfismos das GSTs, na expressão fenotípica de indivíduos beta talassêmicos heterozigotos.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar a frequência das mutações CD 39, IVS 1-110 e IVS 1-6, em beta talassêmicos heterozigotos do Estado de São Paulo, atendidos em serviços de saúde públicos e privados.
2. Avaliar o aumento da ferritina e da saturação da transferrina, com as mutações no gene β -globina e no gene *HFE*, no grupo de talassemicos heterozigotos.
3. Avaliar a atividade das enzimas GST e Catalase, a peroxidação lipídica e a frequência dos polimorfismos de *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* em beta talassêmicos heterozigotos, previamente genotipados (β^0 e β^+), comparados a um grupo controle combinado.
4. Correlacionar o aumento da ferritina e os valores de TBARS com a atividade das enzimas GST e Catalase, no grupo de talassêmicos heterozigotos.
5. Correlacionar a expressão fenotípica dos beta talassêmicos com as mutações do gene β -globina, os polimorfismos da GST avaliados e o perfil das enzimas GST e Catalase.

3 Material e Métodos

3.1 Casuística

O grupo beta talassemia heterozigota foi constituído por 158 amostras de sangue periférico, colhidas por punção venosa, após consentimento informado, de indivíduos residentes na região Central do Estado de São Paulo, com idade entre 20 e 90 anos, sendo 102 do gênero feminino e 56 do gênero masculino. No gênero feminino a idade variou de 20 a 90 anos (46.0 ± 18.4 anos) e no masculino de 20 a 82 anos (44.3 ± 17.5 anos). Desses, 139 tiveram o tipo de mutação talassêmica detectado e 138 amostras foram utilizadas para avaliar a correlação entre os níveis de ferritina sérica e saturação da transferrina e as mutações no gene da β -globina e no gene *HFE*. A partir dessas amostras foram selecionadas, aleatoriamente, 30 com mutação β^0 (CD 39) e 30 β^+ (IVS 1-110), para análise da atividade das enzimas GST e CAT, das concentrações de TBARS, dos polimorfismos da GST e correlações.

O grupo controle foi constituído por 24 amostras de sangue periférico, de indivíduos também da região Central do Estado de São Paulo, com idade entre 18 e 82 anos, sendo 16 do gênero feminino e oito do gênero masculino. No gênero feminino a idade variou de 18 a 82 anos (44.0 ± 18.1) e no masculino de 30 a 75 anos (42.6 ± 14.9). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP/IBILCE e desenvolvido obedecendo aos princípios éticos estabelecidos pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), sob protocolo número 0010.0.229.000-8.

3.2 Metodologia

As amostras foram previamente avaliadas para o perfil hematológico e de ferro e confirmação do diagnóstico de talassemia, pelo método clássico, conforme descrito a seguir. Todos os beta talassemicos heterozigotos tinham avaliação e confirmação laboratorial prévia e estavam em acompanhamento em serviços públicos e privados.

3.2.1 Parâmetros Hematológicos

Hemograma

Em todas as amostras, de beta talassêmicos heterozigotos e de indivíduos que compuseram o grupo controle, foi realizado hemograma completo, utilizando-se contadores automatizados de células, da marca Sysmex XE2100 D, para avaliação dos parâmetros hematimétricos.

Quantificação das Hb A₂ e Hb fetal

A quantificação das Hb A₂ e Hb fetal foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com o equipamento automatizado VARIANT (Bio Rad®) e Kit de análise para beta talassemia heterozigota. Essa metodologia consiste na cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de embolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados, passa pela coluna detectando as alterações de absorbância a 415nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos ocasionados 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 com o tempo de retenção, que se refere ao período transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da hemoglobina. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Em um tubo, foram misturados 5µL 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 das amostras pré-programadas. A quantificação das diferentes frações de hemoglobina, em uma amostra, foi realizada a partir dos valores de porcentagem e tempo de retenção, comparados com os valores de calibração específicos. Aos valores de Hb A₀ obtidos pelo HPLC foram incluídas as sub-frações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas P2 e P3 respectivamente, pelo aparelho. Os valores normais de Hb A₂ e Hb F, previamente estabelecidos, fornecidos pelo fabricante e referendados pelo laboratório, foram considerados na faixa de 2,0 a 3,5% e até 1,0%, respectivamente.

Perfil do ferro

O perfil do ferro foi avaliado pela porcentagem da saturação de transferrina e a dosagem de ferritina sérica. O ferro sérico foi obtido pela técnica enzimática de dois pontos, utilizando-se o Kit Lâminas Fe VITROS Chemistry (Ortho-Clinical Diagnostics Products, Johnson & Johnson) e a ferritina por quimioluminescência direta, usando o sistema ADVIA Centaur®. A saturação de transferrina foi calculada dividindo-se o ferro sérico pela capacidade total de ligação do ferro e multiplicando-se por 100

3.2.2 Análises Moleculares

Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos de sangue periférico, segundo o método do fenol/clorofórmio e precipitação por etanol (SAMBROOK et al., 1989).

Identificação das mutações no gene β -globina

A pesquisa das mutações CD 39, IVS-I-110 e IVS I-6 foi realizada pelo método da reação em cadeia da polimerase alelo-específica (PCR-AE) (BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

Para a realização da PCR-AE foram utilizados os *primers* B5a 5'-GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC-3' (*sense*) e B5b 5'-AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA-3' (*antisense*) como controle interno da reação, e *primers* que se acoplam na posição do alelo mutante (M) e na respectiva posição do alelo normal (W). A mutação CD39 foi identificada utilizando os *primers* PS39W 5'-GAC TCA AAG AAC CTC TG-3' (*antisense*) e PS39M 5'-GAC TCA AAG AAC CTC TA-3' (*antisense*). Para a pesquisa da mutação IVS-I-110 foram utilizados os *primers* TB110W 5'-GGG TGG GAA AAT AGA CC-3' (*antisense*) e TB110M 5'-GGG TGG GAA AAT AGA CT-3' (*antisense*) e para a identificação da mutação IVS-I-6 foram utilizados os *primers* IVSI6W 5' -GTC TTG TAA CCT TGA TA- 3'(*antisense*) e IVSI6M 5' -GTC TTG TAA CCT TGA TG- 3' (*antisense*).

Identificação das mutações no gene *HFE*

A pesquisa das mutações C282Y e H63D do gene *HFE* foi realizada pelo método PCR-RFLP (LYNAS, 1997). Para a identificação da mutação C282Y foram utilizados os *primers sense* R 282 (5' CTG AGG CAC TCC TCT CAA CC

foram identificados pela ausência dos fragmentos de amplificação (ARAND et al., 1996; PINHEL et al., 2008).

O polimorfismo do gene *GSTP1*, resultante da transição de A → G no nucleotídeo 313 do códon 105 (Ile → Val), foi investigado por meio da PCR/RFLP utilizando o *primer sense* 105F: 5' ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA 3' e o *primer antisense* 105R: 5' TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT 3 para a amplificação de um fragmento de 176 pb, posteriormente digerido com a enzima *BsmI* (New England BioLabs) (ISHII et al., 1999; PINHEL et al., 2008).

3.2.3 Parâmetros Bioquímicos

Atividade das enzimas GST e Catalase em sangue periférico

Para avaliação da atividade enzimática da GST e da CAT, as amostras, de sangue venoso foram coletadas em tubo com heparina e analisadas em até 24 horas após a coleta, sendo que durante esse período permaneceram refrigeradas. Foram utilizadas duas unidades de medida, uma por mL (U/mL) e a outra por mg de proteínas (mU ou U/mg de proteínas).

A concentração de proteínas, para o cálculo da atividade enzimática, foi obtida pelo método de Bradford. Para determinar a atividade enzimática da GST, a amostra de sangue foi diluída em solução hemolisante, na proporção de 1:20, com 3.5 μ M de 2-mercaptoetanol, 10 μ M NADP e 2.7 mM de EDTA. Para o ensaio utilizou-se 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 1 mM de GSH e 0.2 M de tampão K fosfato e o pH em 6.5 ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), acompanhando-se o aumento de absorbância em 340 nm, de acordo com o método de Kenn e colaboradores.

Para análise da CAT, o sangue total foi diluído em água destilada (1:50) e sua atividade medida pelo método de Beutler, medindo-se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pelo decréscimo de absorbância em 240 nm em temperatura de 30°C (BRADFORD, 1976; KENN et al., 1976; BEUTLER et al., 1984).

Dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem plasmática de TBARS foi utilizada para avaliar a peroxidação lipídica das amostras. O método é baseado na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535nm. Valores até 440ng/mL são considerados normais (MIHARA; UCHIYAMA, 1978; PERCARIO et al., 2004).

Dosagem da Proteína C-Reativa

A dosagem de proteína C-reativa foi realizada pelo método de Imunoturbidimetria e foi utilizada para afastar a possibilidade de doenças inflamatórias agudas ou crônicas no momento da coleta sanguínea.

3.2.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por métodos descritivos e inferenciais. Após a avaliação da normalidade pela inspeção gráfica dos resíduos e da homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Foram utilizados testes paramétricos, se as premissas foram aceitas em todas as análises, caso contrário, testes não paramétricos. Quando as comparações envolveram dois grupos foi utilizado o Teste *t* independente ou Mann Whitney e quando a comparação envolveu mais de dois grupos utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Kruskal Wallis, complementado pelo teste de Dunn. Para a análise das frequências, foi empregado o teste do Qui-Quadrado (χ^2) ou Teste Exato de Fisher. Os programas utilizados foram o Statistica 7 e o Minitab. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$). As correlações entre as variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste de Pearson

4 Resultados gerais

Foram analisados 158 indivíduos com diagnóstico prévio de beta talassemia heterozigota, adultos e residentes na região Central do Estado de São Paulo. As amostras foram novamente submetidas aos testes laboratoriais de confirmação diagnóstica que incluíram hemograma, HPLC e análise molecular para as mutações CD 39, IVS 1-110 e IVS 1-6. Desses indivíduos, 88% tinham uma das mutações investigadas, 90 (57.0%) eram CD 39, 40 (25.3%) IVS 1-110 e 9 (5.7%) IVS 1-6.

Dos 139 talassêmicos caracterizados molecularmente, 87 (62.3%) mulheres e 52 (37.7%) homens, 90 (64.7%) tinham a mutação CD 39 (β^0), 40 (28.8%) a IVS 1-110 (β^+) e nove (6.5%) a IVS 1-6 (β^+). Em homens, apenas o RDW e as concentrações de A_2 foram diferentes entre β^0 e β^+ talassemia ($p < 0.01$). Em mulheres, o VCM, o HCM, o RDW, e as concentrações de Hb A_2 e fetal foram diferentes entre β^0 e β^+ talassemia ($p < 0.003$).

Nos homens a ferritina variou de 38.3 ng/mL a 1420.0 ng/mL em β^0 e de 26.0 ng/mL a 1192.0 ng/mL em β^+ . Nas mulheres, variou de 8.4 ng/mL a 2982.0 ng/mL em β^0 e de 6.2 ng/mL a 490.0 ng/mL em β^+ . Níveis de ferritina abaixo de 30 ng/mL foram detectados em dez indivíduos, nove mulheres e um homem. Ferritina acima de 200 ng/mL em mulheres e de 300 ng/mL em homens, foi observada em 37 (26.6%) beta talassêmicos heterozigotos, sendo 21 homens e 16 mulheres, representando 40.4% e 18.4% dos grupos, respectivamente.

Os resultados obtidos nos parâmetros hematológicos, nas concentrações das Hb A_2 e Hb F e na saturação de transferrina e ferritina foram utilizados na elaboração do artigo intitulado *“Influência das mutações β^0 e β^+ sobre o perfil hematológico e as reservas de ferro em portadores de beta talassemia heterozigota”* que será submetido à Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

A influência das mutações do gene da β -globina e do *HFE* nos valores da saturação de transferrina e da ferritina sérica foi avaliada em 138 beta talassemicos heterozigotos. Destes, 42 (30.4%) tinham mutações no gene *HFE*,

sendo a mutação H63D a mais frequente (20.3%). O perfil do ferro foi semelhante entre beta talassêmicos β^0 e β^+ , com ou sem mutações no gene *HFE*. Hiperferritinemia com aumento da saturação de transferrina (>45%) foi encontrada em 10 (7.2%) dos 139 beta talassêmicos heterozigotos avaliados. Esses resultados foram utilizados na elaboração do artigo intitulado “*Serum ferritin and transferrin saturation levels in β^0 and β^+ thalassemia trait*” aceito para publicação na Revista *Genetics Molecular Research*.

Com o intuito de avaliar os mecanismos antioxidantes em beta talassemia heterozigota e a influência do tipo de mutação do gene da β -globina herdado, determinamos a atividade das enzimas GST e CAT e as concentrações de TBARS em 60 amostras, 30 com mutação CD 39 (β^0) e 30 IVS 1-110 (β^+), retiradas aleatoriamente de cada um dos grupos. Para efeito de comparação, utilizamos um grupo controle constituído de 24 amostras de sangue periférico, de indivíduos que se apresentaram espontaneamente no laboratório, ou seja, sem indicação clínica, com características de gênero e idade semelhantes aos indivíduos que compuseram o grupo talassêmico e cujos resultados dos hemogramas estavam dentro dos parâmetros da normalidade.

A atividade da GST, expressa em mU/mg de proteínas, e as concentrações de TBARS foram maiores em beta talassêmicos do que nos controles e os resultados não diferiram entre os portadores de β^0 e β^+ talassemia. A atividade da CAT foi semelhante entre talassêmicos e controles. Os resultados obtidos foram utilizados para elaborar o artigo intitulado “*As mutações β^0 (CD 39) e β^+ (IVS 1-110) influenciam o perfil de marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante em beta talassêmicos heterozigotos?*”, que, após a elaboração da versão em inglês, será submetido à Revista *Blood Cells, Molecules & Diseases*.

Na última etapa do trabalho, identificamos os polimorfismos para os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*, no grupo talassêmico e controle, para compararmos as frequências nos dois grupos e analisarmos a influência desses polimorfismos na expressão fenotípica da beta talassemia heterozigota.

Para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, o genótipo mais comum em talassêmicos e controles foi o nulo para ambos os genes, 30.0% e 41.7%, respectivamente. O

perfil genotípico para esses polimorfismos foi semelhante entre os grupos, com exceção do alelo nulo para *GSTT1* que foi mais frequente no grupo controle ($p < 0.006$). Os genótipos para *GSTP1* foram semelhantes entre os grupos talassêmico e controle.

A atividade das enzimas GST e CAT, a concentração de TBARS, a saturação de transferrina e a ferritina sérica foram semelhantes entre os indivíduos portadores dos diferentes polimorfismos avaliados.

Os resultados obtidos, nessa última etapa, foram utilizados para elaboração do artigo intitulado “*Frequência dos polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 e relação como fenótipo da beta talassemia heterozigota*” que, depois de traduzido para a versão em inglês, será submetido à Revista *American Journal of Hematology*.

CAPÍTULO II

Esse artigo será submetido à Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Fator de impacto: 0.16

Qualis: B4

Influência das mutações β^0 e β^+ sobre o perfil hematológico e as reservas de ferro em portadores de beta talassemia heterozigota

Influence of β^0 and β^+ mutations on the hematologic profile and iron stores in heterozygous beta-thalassemia

Isabeth da Fonseca Estevão^{1,2}, Claudia Regina Bonini-Domingos²

¹ Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

² Universidade Federal de São Carlos, faculdade de Medicina, São Carlos, SP, Brasil

Endereço para correspondência:

Isabeth da Fonseca Estevão

UNESP/IBILCE, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth

São José do Rio Preto, SP, CEP 15054-000

Telefone: (17) 3221-2392; Fax: (17) 3221-2390

E-mail: isabeth@terra.com.br

Resumo

A beta talassemia heterozigota se caracteriza por anemia leve com redução do volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM) dos eritrócitos. Em virtude dessas alterações é frequentemente confundida com anemia ferropriva. As mutações podem ser β^0 , supressão total ou β^+ , supressão parcial, da síntese das cadeias de beta globina. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência das mutações β^0 e β^+ sobre os parâmetros hematológicos e as

reservas de ferro em beta talassemia heterozigota. O hemograma foi realizado por contadores automatizados de células, a quantificação das hemoglobinas A₂ (Hb A₂) e Fetal (F) por HPLC, a saturação de transferrina, calculada baseada no ferro e na capacidade de ligação total do ferro, a ferritina por quimioluminescência e a proteína C-reativa por imunoturbidimetria. As mutações do gene da beta globina foram identificadas pela técnica de PCR - alelo específica. Dos 139 talassêmicos, mutação β^0 (CD 39) foi encontrada em 90 (64,7%) e mutações do tipo β^+ em 49 (35,3%), sendo que 40 (28.8%) tinham mutação IVS 1-110 e nove (6.5%) a IVS 1-6. A Hb A₂, Hb F, VCM, HCM e o coeficiente de anisocitose dos eritrócitos (RWD), foram diferentes entre as mulheres β^0 e β^+ talassêmicas ($p < 0.017$) e nos homens, apenas a concentração da HbA₂ e o RWD, foram diferentes ($p < 0.034$). Concentração de hemoglobina, saturação da transferrina e ferritina foram semelhantes entre todos os indivíduos. Concluímos que o tipo de mutação talassêmica influencia o fenótipo hematológico, principalmente em mulheres, sem modificação do perfil do ferro.

Palavras-chave: Beta Talassemia; fenótipo hematológico; ferritina.

Abstract

Beta thalassemia is characterized by mild anemia with reduced mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH) of red cells. Because of these changes is often confused with iron deficiency anemia. Mutations can be β^0 , total suppression or β^+ , partial suppression, synthesis of beta globin chains. The aim of this study was to evaluate the influence of β^0 and β^+ mutations on haematological parameters and iron stores in beta thalassemia. Blood count was performed by automated cell counters; the quantification of hemoglobin A₂ (Hb A₂) and fetal (F) by HPLC; transferrin saturation calculated based on the serum iron and total iron binding capacity; ferritin by chemiluminometric and the C-reactive protein (CRP) by immunoturbidimetric assay. Mutations in the β -globin gene were identified by PCR - allele specific. Of the 139 thalassemic patients, mutation β^0 (CD 39) was found in 90 (64.7%) and mutations for β^+ in 49 (35.3%), 40 (28.8%) had mutation IVS 1-110 and 9 (6.5%), IVS 1-6. Hb A₂, Hb F, MCV, MCH and the red cell distribution width (RDW) were different between women β^0 and β^+ thalassemia ($p < 0.017$). In men, only the concentration of HbA₂ and RDW were different ($p < 0.034$). Hemoglobin concentration, transferrin saturation and serum ferritin were similar among all individuals. We conclude that the type of thalassemic mutation influences the hematological phenotype, especially in women, without changing the profile of iron.

Keywords: Beta thalassemia; hematologic phenotype; ferritin.

Introdução

As síndromes beta talassêmicas são um grupo de afecções hereditárias, caracterizadas por anormalidades na síntese das cadeias da beta globina resultando em fenótipos que variam de anemia grave, dependente de transfusões, até indivíduos clinicamente assintomáticos. São causadas por mutações pontuais ou, mais raramente, deleções no gene da β -globina localizado no cromossomo 11, são denominadas β^0 ou β^+ talassemias, de acordo com a ausência ou diminuição da síntese das cadeias de beta globina, respectivamente ^(1,2).

Clinicamente podem ser classificadas em: talassemia *major*, *intermedia* e *minor*. Na forma *major* a anemia é grave e transfusão dependente (Hb < 7.0 g/dL) e na *intermedia* é moderada sem necessidade de transfusões periódicas (Hb entre 7.0 g/dL e 10.0 g/dL) ⁽¹⁾. A forma heterozigota (beta talassemia minor ou traço talassêmico) é geralmente assintomática, porém a maioria dos indivíduos apresenta anemia leve ^(1,2). As principais características hematológicas do traço talassêmico são a diminuição do VCM e do HCM das hemácias, por isso é frequentemente confundida com anemia ferropriva e anemia de doença crônica.

O grau de atividade eritropoética e a gravidade do fenótipo se correlacionam com o tipo de mutação herdado, sendo o genótipo talassêmico o fator mais preditivo das características fenotípicas da beta talassemia. Entretanto, talassêmicos, com a mesma mutação, podem apresentar variáveis graus de gravidade ^(3,4,5). Associação com mutações de genes não localizados no *cluster* da beta globina é um dos fatores que pode modificar os aspectos clínicos e laboratoriais dos beta talassêmicos ^(1,2)

Níveis elevados de ferritina e da saturação de transferrina têm sido observados em heterozigotos e coerança com mutações do gene *HFE*, modificando o perfil do ferro, não foi confirmada ^(6,7,8,9,10).

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência das mutações β^0 e β^+ sobre os parâmetros hematológicos e as reservas de ferro em portadores de beta talassemia heterozigota.

Material e Métodos

Casuística

Foram analisados 139 indivíduos com diagnóstico prévio de beta talassemia heterozigota. Desses, 52 (37.7%) eram homens e 87 (62.3%) mulheres; todos adultos, caucasóides e residentes na região de São Carlos. Nos homens, a idade variou de 20 a 82 anos (44.9 ± 17.7 anos) e nas mulheres de 20 a 90 anos (46.0 ± 18.2 anos). O sangue periférico foi coletado, por punção venosa, em dois tubos, um com EDTA e outro seco, após autorização por consentimento informado.

Métodos

Os parâmetros hematológicos foram avaliados por contadores automatizados de células, da marca Sysmex XE2100 D. As concentrações das hemoglobinas A₂ (Hb A₂) e fetal (Hb F) foram quantificadas por HPLC em Sistema automatizado VARIANT (Bio-Rad) com o kit “ β Thalassemia Short Program”, a identificação das mutações β^0 (Cd 39), β^+ (IVS 1-110 e IVS 1-6) por PCR alelo-específica (PCR-AE)⁽¹¹⁾.

A avaliação do perfil do ferro baseou-se na saturação de transferrina, calculada dividindo-se o valor de ferro sérico pela capacidade total de ligação do ferro e multiplicando-se por 100, e na dosagem de ferritina sérica. O valor do ferro sérico e da capacidade de ligação do ferro foram obtidos pela técnica enzimática de dois pontos utilizando-se o Kit Lâminas Fe VITROS Chemistry (Ortho-Clinical Diagnostics Products Johnson & Johnson), e a ferritina pela tecnologia de quimioluminométrica direta, usando o sistema ADVIA Centaur[®]. Os valores máximos, padronizados como normais, para a ferritina sérica foram de 200ng/mL e de 300 ng/mL, em mulheres e homens, respectivamente e para a saturação de transferrina foi de 45%^(12,13).

A dosagem de proteína C-reativa (PCR), para excluir processos inflamatórios, foi realizada pelo método de Imunoturbidimetria.

A análise estatística foi realizada com o programa Statística 7. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e a homogeneidade das variâncias, pela inspeção gráfica dos resíduos e pelo teste de Levene, respectivamente. Se as premissas foram aceitas em todas as análises, utilizaram-se testes paramétricos, caso contrário, realizaram-se testes não paramétricos. Os parâmetros hematológicos e a saturação da transferrina entre portadores de β^0 e β^+ talassemia foram comparados pelo teste paramétrico *t*-Student. Para os resultados de ferritina sérica utilizou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney.

As frequências foram analisadas pelo teste do Qui-Quadrado. O nível de significância para todos os testes foi de 5% ($p < 0.05$). Para análise comparativa, os indivíduos foram separados de acordo com o gênero, pois os valores dos parâmetros avaliados são diferentes entre homens e mulheres.

Resultados

Dos 139 talassêmicos avaliados, 90 (64,7%) tinham a mutação CD 39, 40 (28,8%) a IVS 1-110 e nove (6,5%) a IVS 1-6. Para o perfil hematológico foram excluídas 10 amostras cujos valores de ferritina estavam abaixo de 30 ng/mL. Das 129 restantes, 78 eram do gênero feminino e 51 do masculino.

Não houve diferença significativa na concentração de hemoglobina entre β^0 e β^+ talassemia. O VCM e HCM foram menores em mulheres β^0 ($p < 0.017$). Nos homens, apenas o RDW e a concentração da Hb A₂ foram diferentes entre β^0 e β^+ .

Os resultados dos parâmetros hematológicos analisados estão detalhados na Tabela

1.

Tabela 1. Perfil hematológico dos portadores heterozigotos de Beta⁰ e Beta⁺ talassemias.

Parâmetros Hematológicos ¹	Feminino			Masculino		
	n = 78		p ²	n = 51		p ²
	β ⁰ n = 54	β ⁺ n = 24		β ⁰ n = 31	β ⁺ n = 20	
Glóbulos vermelhos (10 ⁶ /mm ³)	5.48 ± 0.4	5.41 ± 0.4	0.479	6.16 ± 0.9	6.05 ± 0.5	0.577
Hemoglobina (g/dL)	10.9 ± 0.8	11.2 ± 0.9	0.204	12.5 ± 1.8	12.8 ± 0.9	0.500
Hematócrito (%)	34.1 ± 2.5	34.8 ± 2.8	0.355	38.9 ± 6.1	39.8 ± 2.4	0.455
VCM (fL)	62.4 ± 3.1	64.2 ± 2.9	0.017	63.1 ± 4.0	64.8 ± 2.5	0.065
HCM (pg)	19.9 ± 1.0	20.5 ± 1.0	0.015	20.3 ± 1.3	20.7 ± 0.8	0.183
CHCM (g/dL)	31.9 ± 0.9	32.1 ± 1.1	0.509	32.1 ± 1.0	32.1 ± 1.1	0.922
RDW (%)	16.0 ± 1.3	15.0 ± 0.8	<0.001	16.1 ± 1.2	15.4 ± 1.0	0.034
Hb A2 (%)	5.8 ± 0.6	5.4 ± 0.5	0.003	6.0 ± 0.7	5.6 ± 0.6	0.016
Hb Fetal (%)	1.9 ± 1.9	0.9 ± 0.6	0.001	1.6 ± 2.1	1.0 ± 1.0	0.244

¹Valores expressos em média e desvio padrão²Test *t*-Student com nível de significância para $p < 0.05$

Para o perfil do ferro as amostras dos 139 beta talassêmicos heterozigotos foram avaliadas. A saturação de transferrina variou de 6.5% a 84.8% e a ferritina sérica de 6.2 ng/ml a 2982.0 ng/mL. Nas mulheres, a mediana da ferritina foi de 84 ng/mL e nos homens de 253 ng/mL ($p < 0.001$). A média e o desvio padrão da saturação da transferrina (%) foi de $29.1\% \pm 10.8\%$ nas mulheres e de $39.3\% \pm 14.8\%$ nos homens ($p < 0.001$). Das 87 mulheres, nove (10.3%) tinham ferritina abaixo de 30 ng/mL, cinco com mutação CD 39 (β⁰) e quatro com IVS 1-110 (β⁺),

cinco mulheres referiram, na história clínica, aumento do fluxo menstrual. Entre os 52 homens, apenas um (1.9%) apresentou ferritina abaixo de 30 ng/mL.

Níveis de ferritina, acima dos preconizados como normais, foram detectados em 37 (26.6%) talassêmicos, 40.4% dos homens e 18.4% das mulheres. Dos talassêmicos com níveis elevados de ferritina, dez (27.0%) tinham saturação de transferrina acima de 45%. Os resultados obtidos nos testes de avaliação do metabolismo do ferro estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores da saturação de transferrina (%) e das concentrações de ferritina (ng/mL) em beta talassêmicos heterozigotos, de acordo com o gênero e o tipo de mutação herdado.

Perfil do ferro	Feminino		p	Masculino		p
	n = 87			n = 52		
	β^0	β^+		β^0	β^+	
	n = 59	n = 28		n = 31	n = 21	
Saturação de transferrina (%) ¹	6.5 - 67.8 28.3 ± 11.2	14.5 - 52.7 30.8 ± 10.0	0.317	19.1 - 84.8 38.3 ± 14.5	17.3 - 77.2 40.7 ± 15.5	0.596
Ferritina (ng/mL) ²	8.4 - 2982.0 92.0	6.2 - 490.0 60.5	0.076	38.3 - 1420.0 262.0	6.0 - 1192.0 244.0	0.940

¹Valores expressos em mínimo, máximo, média e desvio padrão

²Valores expressos em mínimo, máximo e mediana

Das 16 mulheres com níveis de ferritina acima de 200 ng/mL, 12 eram β^0 talassêmicas e quatro β^+ . Entre os 21 homens com valores de ferritina acima de 300 ng/mL, 13 tinham mutação β^0 e oito β^+ . A frequência de indivíduos com valores diminuídos e aumentados de ferritina foi semelhante entre β^0 e β^+ talassêmicos ($\chi^2 = 1.027$ com $p = 0.311$ e $\chi^2 = 0.176$ com $p = 0.675$, respectivamente). Todos esses indivíduos tinham resultados de proteína C-ativada dentro dos padrões normais, estabelecidos pelo fabricante do reagente.

Discussão

O tipo de mutação talassêmica está diretamente relacionado à síntese das cadeias de β -globina e, portanto, é considerado o fator mais confiável e preditivo do fenótipo talassêmico. Porém, outros fatores genéticos e/ou ambientais podem interferir nesse fenótipo ¹. Nossos resultados demonstram que os efeitos causados pelo tipo de mutação herdado foram diferentes entre os gêneros, pois apenas em mulheres, o volume e a concentração de hemoglobina média das hemácias, foram menores em β^0 talassemia. A comparação desses achados com dados da literatura não foi possível, já que a maioria dos estudos não avaliam os gêneros, separadamente ^{3,5,14}.

Deficiência de ferro e anemia de doença inflamatória são condições nas quais o VCM e o HCM estão diminuídos e, portanto, podem modificar esses valores nos beta talassêmicos, entretanto todas as mulheres avaliadas tinham ferritina acima de 30ng/mL e não apresentavam sinais clínicos e laboratoriais de processos inflamatórios. A concentração de Hb A₂ também é considerado um parâmetro de avaliação da síntese de beta globina, refletindo o tipo de mutação, β^0 ou β^+ , herdado. Entretanto a utilização dos valores desse parâmetro, como fator de gravidade, tem sido questionada, pois resultados semelhantes, foram observados em genótipos de diferentes graus de gravidade ^{3,5,14}. No nosso estudo, ao contrário, a concentração de HbA₂ e o RDW foram os únicos parâmetros influenciados pelo genótipo talassêmico, em todos os indivíduos. As diferenças observadas no fenótipo hematológico entre mulheres talassêmicas β^0 e β^+ e, não entre os homens, sugerem a interferência de outros fatores no perfil hematológico dos portadores de beta talassemia heterozigota.

A incidência da mutação CD 39 foi semelhante à encontrada por Bertuzzo, em 1997, também em indivíduos do interior do Estado de São Paulo ¹⁴. Porém, diferente dos obtidos por Araújo e colaboradores, em talassêmicos da região Nordeste do Brasil, demonstrando, mais uma vez, a diversidade genética da população brasileira ¹⁵.

A deficiência de ferro é um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, estimando-se que 20% a 30% da população mundial tenham essa carência ^{16,17}. No Brasil, dados do Ministério da Saúde revelaram que 29,4% das mulheres brasileiras têm anemia ¹⁸. A quantidade de ferro corporal é regulada, principalmente, pela absorção do ferro pelas células intestinais. A atividade eritropoética é um dos fatores que regula a capacidade dessa absorção e, portanto, seu aumento poderia justificar a menor incidência de anemia ferropriva em beta talassemia heterozigota. Dados de literatura têm confirmado eritropoese ineficaz em indivíduos com beta talassemia heterozigota. Nossos resultados corroboram essa hipótese, já que a incidência de deficiência de ferro, em mulheres talassêmicas, foi abaixo do descrito na literatura para a população feminina brasileira ^{18, 19}.

Da mesma maneira, como ocorre na população em geral, os valores de ferritina e da saturação da transferrina foram maiores em homens do que em mulheres ($p = 0.001$), provavelmente decorrente da perda de ferro, durante a menstruação, no gênero feminino.

Nas formas *major* e *intermedia* de beta talassemia, múltiplas transfusões sanguíneas e/ou eritropoese ineficaz, resultam em sobrecarga de ferro aumentando os valores das concentrações de ferritina e da saturação de transferrina ^{1,2}. Nas formas minor, o grau de eritropoese ineficaz é pequeno e, esses indivíduos, raramente evoluem com acúmulo de ferro significativo ^{10,20,21}. Entretanto, valores elevados de ferritina sérica têm sido descritos em beta talassêmicos heterozigotos, associados ou não com mutações em genes relacionados ao controle da homeostase do ferro ^{8,9,22}. Nossos resultados demonstraram alta incidência de valores acima dos preconizados para ferritina sérica, porém apenas em uma pequena porcentagem havia aumento concomitante da saturação da transferrina

Nas mutações β^0 , mesmo em heterozigose, a produção de cadeias beta codificadas apenas por um alelo, poderia ocasionar maiores quantidades de cadeia alfa não pareadas, justificando níveis de ferritina mais elevados nesses indivíduos do que nos com β^+ talassemia⁵. Todavia, nossos resultados não corroboram essa hipótese, pois não observamos diferença significativa nos valores da saturação da transferrina e da ferritina sérica entre talassêmicos β^0 e β^+ . Além disso, a incidência de hiperferritinemia também foi semelhante entre os indivíduos com esses dois tipos de mutação.

O padrão do perfil do ferro, observado na maioria dos talassêmicos com hiperferritinemia, não é, o frequentemente encontrado na maioria dos portadores de sobrecarga de ferro^{12,13}. Nesses talassêmicos, outras causas devem ser excluídas, apesar dos resultados negativos para proteína C-reativa. Muitos casos de hiperferritinemia, na prática médica, permanecem sem diagnóstico etiológico e mesmo na população em geral, a porcentagem de pacientes com ferritina elevada e que tenham aumento das reservas de ferro, ainda é desconhecida²³.

Com base nesses resultados concluímos que o tipo de mutação herdado influencia os parâmetros hematológicos, principalmente, nas mulheres e, em ambos os gêneros, não modificam o perfil do ferro. A presença de mutações talassêmicas, em heterozigose, pode exercer papel protetor contra carência de ferro, principalmente nos grupos com maior susceptibilidade dessa deficiência, aumentando, por outro lado, o risco de hiperferritinemia em alguns desses indivíduos.

Referências

1. Thein SL. Molecular basis of diseases - Thalassemia syndrome. *Haematologica*. 2005; 90: 649-660.
2. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010. Disponível em <<http://www.ojrd.com/content/5/1/11>>. Acesso em junho de 2010.

3. Rosatelli C, Leoni GB, Tuveri T, Scalas MT, Mosca A, Galanello R et al. Heterozygous beta-thalassemia: relationship between the hematological phenotype and the type of beta-thalassemia mutation. *Am J Hematol* 1992; 39: 1-4.
4. Rund D, Filon D, Strauss N, Rachmilewitz EA, Oppenheim A. Mean corpuscular volume of heterozygotes for β thalassemia correlates with the severity of mutations. *Blood* 1992; 79: 238-243.
5. Skarmoutsou C, Papassotiriou I, Traeger-Synodinos J, Stamou H, Ladis V, Metaxotou Mavrommati A et al. Erythroid bone marrow activity and red cell hemoglobinization in iron-sufficient β -thalassemia heterozygotes as reflected by soluble transferrin receptor and reticulocyte hemoglobin content. Correlation with genotypes and Hb A₂ levels. *Haematologica* 2003; 88: 631-636.
6. Parfrey PS, Barnett M, Sachs JA, Pollock DJ, Turnbull AL et al. Iron overload in β -thalassaemia minor. *Scan J Haematol* 1981; 27: 294-302.
7. Pippard MJ, Wainscoat JK. Erythrokinetics and iron status in heterozygous β -thalassaemia, and the effect of interaction with α -thalassaemia. *Br J Haematol* 1987; 66: 123-127.
8. Piperno A, Mariani R, Arosio C, Vergani A, Bosio S, Fargion S et al. Haemochromatosis in patients with β -thalassaemia trait. *Br J Haematol* 2000; 111: 908-914.
9. Melis MA, Cau M, Deidda F, Barella S, Cão A, Galanello R. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. *Haematologica* 2002; 87: 242-245.

10. Estevão IF. Frequência dos mutantes C282Y E H63D do gene *HFE* e sua influência no metabolismo do ferro e na expressão da beta talassemia heterozigota. Tese de mestrado em Genética. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2007.
11. Bertholo LC, Moreira HW. Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e beta talassemia. J Bras Patol Med Lab 2006; 42: 245-251.
12. Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of Hemochromatosis and related disorders. Blood 2005; 106: 3710-3717.
13. Brissot P, Troadec MB, Bardou-Jacquet E, Le Lan C, Jouanolle AM, Deugnier Y et al. Current approach to hemochromatosis. Blood Rev 2008; 22: 195-210.
14. Bertuzzo CS, Sonati MF, Costa FF. Hematological phenotype and the type of thalassemia mutation in Brazil. J Med Genet 1997; 20: 319-321.
15. Araújo AS, Silva WA Jr, Leão SAC, Bandeira FCGM, Petrou M, Modell B et al. A Different Molecular Pattern of β -Thalassemia Mutations in Northeast Brazil. Hemoglobin 2003; 27: 211-217.
16. Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, et al. Prevalence of iron deficiency in United States. JAMA 1997; 277 (12): 973-976.
17. Centers for Disease Control and Prevention. Iron deficiency - United States, 1999-2000. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2002; 51: 897-899.
18. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Resultados sobre anemia e deficiência de vitamina A. Brasília (DF); 2009.

19. Lemos AR, Ismael LAS, Boato, CCM et al. A hepcidina como parâmetro bioquímico na avaliação da anemia por deficiência de ferro. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 596-599.
20. Garewal G, Das R, Alhuwalia J, Marwaha RK. Prevalence of the H63D mutation of the HFE in north India: its presence does not cause iron overload in beta thalassemia trait. *Eur Journal of Haematol* 2005; 74: 333-336.
21. Lewis M, Lee G R, Haut A. The association of hemochromatosis with thalassemia minor. *Ann Intern Med* 1965; 63:122.
22. Garcia PJ, Moreu AI, Asensio MA, Rueda GA. Disease caused by iron overload associated to minor beta-thalassemia. *An Med Interna* 1993; 10: 203.
23. Gordeuk VR, Reboussin DM, McLaren CE, Barton JC, Acton RI, McLaren GD et al. Serum ferritin concentrations and body iron stores in a multicenter, multiethnic primary-care population. *Am J Hematol* 2008; 83: 618-626.

CAPÍTULO III

Este artigo foi aceito para publicação na revista Genetics and Molecular Research.

Fator de impacto: 0,68

Qualis: B3

Serum ferritin and transferrin saturation levels in β^0 and β^+ thalassemia trait

Running Title: Hyperferritinemia in beta-thalassemia trait

I.F.Estevão^{1,2}, P. Peitl Junior¹, C.R. Bonini-Domingos¹

1. UNESP - Departamento de Biologia. São José do Rio Preto, SP.

2. UFSCar - Faculdade de Medicina, São Carlos, SP.

Corresponding author: Isabeth da Fonseca Estevão

LHGDH-IBILCE-UNESP, Laboratório de Hemoglobinas e

Genética das Doenças Hematológicas

Rua Cristóvão Colombo, 2265.

Jardim Nazareth; CEP: 15054-000

(17) 3221-2392; Fax: (17) 3221-2390

e-mail: isabeth@terra.com.br

Abstract Few studies evaluate the mutations which cause heterozygous beta thalassemia and high levels of serum ferritin and transferrin saturation. The objective of this study was to analyze the influence of thalassemic β^0 and β^+ mutations on ferritin levels and transferrin saturation. One hundred and thirty-eight individuals were analyzed, ninety β^0 and forty-eight β^+ , identified by classical and molecular methods. Mutations in the *HFE* gene, detected using the PCR-RFLP method, were found in 30.4% of these beta thalassemics and heterozygosity for H63D (20.3%) was the most frequent. The results of ferritin and the saturation of transferrin were similar in beta thalassemics with and without mutations in the *HFE* gene, and ferritin concentrations were higher in men and in individuals over forty years of age ($p < 0.03$). Transferrin saturation also was higher in men, but only in those without *HFE* gene polymorphism

($p = 0.01$). There was no significant difference in the iron profile among the β^0 and β^+ thalassemics, with and without *HFE* gene polymorphism. The incidence of ferritin values above 200 ng/mL in women and 300 ng/mL in men was also similar in β^0 and β^+ thalassemics ($p > 0.72$). Our conclusion is that ferritin levels are variable in the beta thalassemia trait regardless of the type of beta-globin mutation. Furthermore, *HFE* gene polymorphisms, especially the H63D mutation in heterozygosity, do not change the iron profile in these individuals.

Keywords: Beta-thalassemia; Ferritin; transferrin saturation; hiperferritinemia;

Introduction

Ferritin is the main iron-storage protein in the body. Its synthesis is regulated by quantities of iron by means of the interaction of cytoplasmic proteins bound to the messenger ribonucleic acid (mRNA), currently identified as iron regulatory proteins (IRPs) with specific structures of the mRNA, called iron-responsive elements (IREs) (Kannengieser et al., 2009). It has a central role in iron homeostasis, because it binds to and sequesters intracellular iron. Serum ferritin measurement has become a routine laboratory test and high levels are a common finding in clinical practice. High serum ferritin levels are found in a large spectrum of genetic and acquired conditions, whether associated or not with iron overload. The precise diagnosis of hyperferritinemia is difficult and requires a detailed medical history, blood biochemistry and sometimes, genetic tests. An increase in ferritin levels combined with an increase in transferrin saturation usually is a sign of iron overload. (Camaschella, 2005; Brissot et al., 2008; Chamaschelle and Foggiali, 2009).

The molecular basis of beta-thalassemia has been largely elucidated. The reported mutations affect all the known stages of beta-globin gene expression, resulting in a decrease (β^+) or complete absence (β^0) of beta-globin synthesis of the affected alleles (Weatherall, 2007). Beta-thalassemia *major* is clinically characterized by transfusion-dependant severe anemia. A mild course of the illness is observed in beta-thalassemia *intermedia* and a clinically discreet phenotype is common in the beta-thalassemia trait.

Hemochromatosis is frequently observed in beta-thalassemia *major* due to an increased rate of iron absorption by the gastrointestinal tract and frequent blood transfusions. In the beta-thalassemia trait, there is some degree of ineffective erythropoiesis, which leads to heightened erythropoietic activity and increased iron absorption (Demir et al., 2004). However, only a minority of patients with the beta-thalassemia trait develop iron overload, indicating that other factors are involved in these cases (Fargion et al., 2000).

Excess iron is extremely toxic to all cells of the body and can cause serious and irreversible organic damage, such as cirrhosis, diabetes, heart disease and hypogonadism (Melchiori et al., 2010). High levels of serum ferritin have been observed in beta-thalassemia trait comparative studies, and even those who had never been transfused developed clinical and laboratory signs of iron overload (Edwards et al., 1981; Fargion et al., 1982; Fargion et al., 1985; Piperno et al., 2000). The pathophysiology of this complication associated with heterozygous thalassemia is unclear. Several researchers have suggested a modulating effect of the beta globin gene mutation and proteins related to iron metabolism (Fargion et al., 1985; Piperno et al., 2000; Melis, 2002; Martins et al., 2004). Individuals with ferritin levels above 300 ng/mL in men and 200 ng/mL in women and/or transferrin saturation above 45% who show no signs of inflammatory disease must be investigated for iron overload (Camaschella, 2005, Andrew, 2006).

The aim of this study was to evaluate the influence of β^0 and β^+ mutations on serum ferritin levels and transferrin saturation and correlate this with the phenotypic manifestations and co-heritage with *HFE* gene mutations in carriers of the beta-thalassemia trait.

Material and Methods

In this study, 138 individuals were analyzed, 37.7% men and 62.3% women, between twenty and ninety years of age, with the beta-thalassemia trait identified through clinical evaluation and laboratory tests, which included the Bio-Rad VARIANT HPLC automated testing system with the “ β Thalassemia Short Program” kit and PCR-AE molecular analysis in order to identify β^0 (CD 39) and β^+ (IVS 1-110 and IVS 1-6) mutants (Bertholo and Moreira, 2006).

Transferrin saturation was calculated by dividing the serum iron level by total iron-binding capacity and multiplied by 100. Serum iron levels as well as the iron-binding capacity levels were obtained through the two-point enzymatic method using VITROS Chemistry Systems (Ortho-Clinical Diagnostics Products, Johnson & Johnson, USA) and ferritin levels were obtained through direct chemiluminometric technology, using the ADVIA Centaur[®] system. All thalassemics were submitted to the C-reactive protein test using the immunoturbidimetry method.

The upper limits for normal ferritin levels were 200 ng/mL and 300 ng/mL, in women and men, respectively. For transferrin saturation, levels above 45% were considered elevated (Carmaschella, 2005; Brissot et al., 2008). The presence of the *HFE* gene mutation was investigated using the PCR-RFLP method (Lynas, 1997).

The study was approved by the UNESP ethics committees and informed consent was obtained before the sample was collected.

Statistical Analysis

Statistical analysis was obtained by using the Minitab 14 Statistical Software. The methods used were parametric for transferrin saturation (*t*-student) and non-parametric for ferritin (Mann-Whitney). The incidences for the *HFE* gene polymorphisms in individuals with ferritin levels above those considered normal and transferrin saturation above 45% were compared by means of Fisher's exact testing. The significance level for all tests was $p < 0.05$.

Results

Ninety (65.2%) individuals with the CD 39 mutation were identified, thirty-nine (28.3%) with the IVS 1-110 mutation and nine (4.3%) with the IVS 1.6 mutation. Among the one hundred and thirty-eight evaluated individuals, forty-two (30.4%) also presented mutations in the *HFE* gene and the most frequent genotype found was heterozygous for the H63D mutation (20.3%).

Among the carriers of the CD 39 mutation, twenty-eight (31.1%) presented mutations in the *HFE* gene, twenty-four (85.7%) had H63D polymorphism, seventeen heterozygous, four homozygous and three double heterozygous, C282Y/H63D. Among the IVS 1-110 mutation carriers, fourteen (35.9%) also presented mutation for the *HFE* gene, eleven (78.6%) heterozygous for H63D. No polymorphism for the *HFE* gene was found in IVS 1-6 thalassemics. In the evaluation of *HFE* gene polymorphisms, no cases of homozygosity for C282Y or S65C mutation were detected. The results of this molecular characterization are summarized in Table 1.

Ferritin concentration in the beta-thalassemia trait with polymorphism in the *HFE* gene varied from 6.2 ng/mL to 2982.0 ng/mL and transferrin saturation, from 6.5% to 77.2%. In thalassemics without mutations in the *HFE* gene, ferritin levels varied from 10.0 ng/mL to 1420.0 ng/mL and transferrin saturation, from 12.3% to 84.8%. There was no significant difference between ferritin and transferrin saturation averages among beta-thalassemia carriers with and without polymorphism in the *HFE* gene. These results are detailed in Table 2.

In thalassemics with and without polymorphism in the *HFE* gene, ferritin values were higher in men than in women as well as in individuals over 40 years of age. Transferrin saturation also was higher in men, although only in those without polymorphism in the *HFE* gene (Table 3).

In order to better evaluate the influence of beta-globin mutations, the samples were separated according to age and gender, and carriers of polymorphism in the *HFE* gene were excluded. There was no significant difference in ferritin concentrations and transferrin saturation in the evaluated groups for β^0 and β^+ thalassemics. The results are presented in Table 4.

In those thalassemics with a concurrent presence of *HFE* gene polymorphisms, eleven (26.2%) had ferritin levels above those established as normal (eight β^0 and three β^+) and out of these, only three (7.1%) had transferrin saturation above 45% (one β^0 and two β^+) (Table 5).

Of the four patients with double heterozygosity, C282Y/H63D, three were male and one, female. All men had ferritin levels above 500 ng/mL; nonetheless, transferrin saturation above 45% was found in just one of those individuals. Ferritin concentrations above 1000 ng/mL were observed in one individual, whose transferrin saturation was below 45%. Out of those heterozygous for C282Y, four were female and two, male; two had transferrin saturation levels above 45% (45.4% and 67.8%, respectively). Homozygosity for H63D polymorphism was found in four women, and only one had ferritin values above those established as normal, although with normal transferrin saturation. Heterozygosity for H63D was found in nineteen women and nine men, four of them (10.7%) with ferritin levels above those established as normal, but all had transferrin saturation below 45%.

Out of the sixty-two carriers of β^0 (CD 39) mutation and without the presence of polymorphism in the *HFE* gene, seventeen (27.4%) had ferritin above the levels established as normal and out of these, eight (12.9%) had levels higher than 500 ng/mL. Transferrin saturation above 45% was observed in five, all with ferritin levels above 500 ng/mL.

Among the carriers of the β^+ mutation (IVS 1-110 and IVS 1-6) without polymorphisms of the *HFE* gene, nine (26.5%) had ferritin levels above those established as normal, and in four, levels were above 500 ng/mL. Two of these thalassemics had transferrin saturation above 45%. Of the thalassemics without the *HFE* gene mutation, 27.1% had ferritin levels above those established as normal and 7.3% had a concurrent increase in transferrin saturation (> 45%). Out of these, five were β^0 mutants (CD 39) and two β^+ (IVS 1-110) (Table 5).

Two thalassemics with β^0 mutation (CD 39) and one with β^+ (IVS 1-6), all males, had ferritin values above 1000 ng/mL. Out of these, only one β^0 had a concurrent increase in transferrin saturation (84.8%). Besides, the other two thalassemics presented comorbidities associated with the increase in ferritin concentration, such as diabetes mellitus and chronic alcoholism. No increase in C-reactive protein levels was detected in thalassemics with serum ferritin levels above those established as normal.

Of the four patients with double heterozygosity, C282Y/H63D, three were male and one, female. All men had ferritin levels above 500 ng/mL; nonetheless, transferrin saturation above 45% was found in just one of those individuals. Ferritin concentrations above 1000 ng/mL were observed in one individual, whose transferrin saturation was below 45%. Out of those heterozygous for C282Y, four were female and two, male; two had transferrin saturation levels above 45% (45.4% and 67.8%, respectively). Homozygosity for H63D polymorphism was found in four women, and only one had ferritin values above those established as normal, although with normal transferrin saturation. Heterozygosity for H63D was found in nineteen women and nine men, four of them (10.7%) with ferritin levels above those established as normal, but all had transferrin saturation below 45%.

Out of the sixty-two carriers of β^0 (CD 39) mutation and without the presence of polymorphism in the *HFE* gene, seventeen (27.4%) had ferritin above the levels established as normal and out of these, eight (12.9%) had levels higher than 500 ng/mL. Transferrin saturation above 45% was observed in five, all with ferritin levels above 500 ng/mL.

Among the carriers of the β^+ mutation (IVS 1-110 and IVS 1-6) without polymorphisms of the *HFE* gene, nine (26.5%) had ferritin levels above those established as normal, and in four, levels were above 500 ng/mL. Two of these thalassemics had transferrin saturation above 45%. Of the thalassemics without the *HFE* gene mutation, 27.1% had ferritin levels above those established as normal and 7.3% had a concurrent increase in transferrin saturation (> 45%). Out of these, five were β^0 mutants (CD 39) and two β^+ (IVS 1-110) (Table 5).

Two thalassemics with β^0 mutation (CD 39) and one with β^+ (IVS 1-6), all males, had ferritin values above 1000 ng/mL. Out of these, only one β^0 had a concurrent increase in transferrin saturation (84.8%). Besides, the other two thalassemics presented comorbidities associated with the increase in ferritin concentration, such as diabetes mellitus and chronic alcoholism. No increase in C-reactive protein levels was detected in thalassemics with serum ferritin levels above those established as normal.

Discussion

Among the evaluated beta-thalassemics, ferritin concentration presented a heterogeneous pattern and 27% had ferritin serum levels above those established as normal, with and without an increase in transferrin saturation. Beta-thalassemia syndromes are characterized by quantitative alterations in the synthesis of the beta chains of hemoglobin. Excess alpha chains precipitate in cellular membranes and result in variable levels of premature destruction of erythrocytes and their precursors, as well as ineffective erythropoiesis and anemia. No significant differences were observed in iron profile results among β^0 and β^+ thalassemics, suggesting that the absence or decrease in beta-globin synthesis, when in heterozygosity, influences iron absorption in these individuals in the same way.

In the severe forms of beta-thalassemia, multiple blood transfusions and a deficiency of hepcidin, a potent iron absorption inhibitor, result in iron overload with increased ferritin serum concentration and transferrin saturation (Brissot et al., 2008). This accumulation results in clinical problems similar to those of primary hemochromatosis. In the milder forms, ineffective erythropoiesis is discreet and these individuals rarely present iron excess (Lewis et al., 1965; Parfrey et al., 1981; Garcia et al., 1993). Yet, in heterozygous β^0 thalassemics, a higher imbalance between the quantities of the different globin chains could justify the increase in iron absorption and consequently, high levels of ferritin and transferrin saturation. However, our results do not corroborate that hypothesis.

High ferritin values have been described in heterozygous thalassemics with mutations in other genes related to iron homeostasis control (Fargion et al., 2000; Piperno et al., 2000; Melis et al., 2002).

C282Y and H63D mutations in the *HFE* gene, more commonly observed in individuals with hereditary hemochromatosis, are frequent in the northern region of Europe. In Italy, in spite of the smaller incidence of C282Y mutation, the prevalence of the H63D mutation is high (Restagno et al., 2000; Cassanelli et al., 2001; Girouard et al., 2002; Miniero et al., 2005). In that country, beta-thalassemia gene mutations are also frequent. Therefore, due to the influence of these peoples in the composition of the Brazilian population, the co-inheritance findings of the mutations of the beta-globin gene with the H63D mutation reinforce the incidence of this mutation among the evaluated β^0 and B^+ thalassemics.

Homozygosity for C282Y and double heterozygosity for C282Y and H63D are frequently associated with ferritin increase and transferrin saturation, but for other genotypes, these metabolic alterations are less frequent (Aranda et al., 2010). The iron profile of heterozygous thalassemics with or without mutations in the *HFE* gene was similar, but due to the high occurrence of heterozygosity for H63D, our results mainly reflect the influence of this polymorphism in the observed ferritin concentration and transferrin saturation.

Most times, serum ferritin levels are related to the quantity of iron stored in the body; however, countless other genetic and acquired conditions, with and without iron overload, can influence these results (Camanchella and Poggiali, 2009). An increase in ferritin concentrations with no excess iron body can be observed in acute or chronic inflammatory processes, autoimmune diseases, neoplasias, chronic renal insufficiency, hepatopathies and metabolic syndrome. In these conditions, transferrin saturation generally is normal or decreased. On the other hand, when there is an iron overload, except in ferroportin disease, the increase in ferritin concentrations is associated with increased saturation of transferrin (Brissot et al., 2008; Camanchella and Poggiali, 2009).

In this study, only 27.0% of thalassemia carriers with ferritin levels above 300 ng/mL in men and 200 ng/mL in women had transferrin saturation above 45%, suggesting that in most cases, this increase was probably not associated exclusively with iron reserves. However, acute or chronic inflammatory diseases were discarded due to normal results in C-reactive protein. Even among the general population, the percentage of patients with high ferritin levels who have an increase in iron reserves is still unknown (Gordeuk et al., 2008).

Based on our results, we can conclude that ferritin concentrations have a heterogeneous pattern in heterozygous beta-thalassemia, and are higher in men than in women and in individuals over forty years of age, stressing the importance in separating individuals according to gender and age group in evaluation studies for iron homeostasis. High levels of ferritin serum observed in heterozygous beta-thalassemics do not depend on the inherited mutation in the beta-globin gene and the association of heterozygous beta-thalassemia with polymorphism in the *HFE* gene, especially the H63D mutation in heterozygosity, does not modify the iron profile in these individuals. In most thalassemics with increased ferritin, levels rarely exceed 1000 ng/mL and in general, there is no concurrent increase in transferrin saturation. However, in 7.2% of all heterozygous beta-thalassemics, we can observe increased ferritin levels and increased transferrin saturation, warranting that these individuals should be evaluated and monitored for diseases associated with iron overload.

References

Andrew W, Yen MD, Tonya L, Fancher MD et al. (2006). Revisiting hereditary hemochromatosis: Current concepts and progress. *The American Journal of Medicine*. 119: 391-399.

Aranda N, Viteri FE, Montserrat C, Arijia V. (2010). Effects of C282Y, H63D, and S65C HFE gene mutations, diet, and life-style factors on iron status in a general Mediterranean population from Tarragona, Spain. *Ann Hematol.* 89: 767-773.

Bertholo LC, Moreira HW. (2006). Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 42: 245-251.

Brissot P, Troadec MB, Jacquet EB, Lan C, et al. (2008). Current approach to hemochromatosis. *Blood Reviews.* 22: 195-210.

Camaschella C (2005). Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood.* 106: 3710-3717.

Camaschella C, Foggiali E (2009). Towards explaining “unexplained hiperferritinemia”. *Haematologica* 94: 307-309.

Cassanelli S, Pignatti E, Montosi G, Garuti C, et al. (2001). Frequency and biochemical expression of C282Y/H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations in the healthy adult population in Italy. *Journal of Hepatology.* 34: 523-528.

Demir A, Yarali N, Fisgin T, Duru F et al. (2004). Serum Transferrin Receptor Levels in Beta-thalassemia Trait. *Journal of Tropical Pediatrics.* 50: 369-371.

Edwards CQ, Skolnick MH, Kushner JP (1981). Coincidental nontransfusional iron overload and thalassemia minor association with HLA linked hemochromatosis. *Blood.* 58: 844-848.

Fargion S, Taddei MT, Cappellini MD, Piperno A, et al. (1982). The iron status of Italian subjects with beta thalassemia trait. *Acta Haematologica*. 68: 109-114.

Fargion S, Piperno A, Panaiotopoulos N, Taddei MT, et al. (1985). Iron overload in subjects with beta-thalassemia trait. Role of idiopathic haemochromatosis gene. *British Journal of Haematology*. 61: 487.

Fargion S, Sampietro M, Cappellini MD (2000). Thalassemias and their interactions with hemochromatosis gene. *British Journal of Haematology*. 61: 487-490.

Garcia PJ, Moreu AI, Asensio MA, Rueda GA. (1993). Disease caused by iron overload associated to minor beta-thalassemia. *An Med Interna*. 10: 203.

Girouard J, Giguère Y, Delage R, Rousseau F (2002). Prevalence of gene C282Y and H63D mutations in a French-Canadian population of neonates and in referred patients. *Hum Mol Genet*. 11: 185-189.

Gordeuk VR, Reboussin DM, McLaren CE, Barton JC, et al. (2008). Serum ferritin concentrations and body iron stores in a multicenter, multiethnic primary-care population. 83: 618-626.

Kannengieser C, Jouanolle AN, Hetet C, Mosser A, et al. (2009). A new missense mutation in the L ferritin coding sequence associated with elevated levels of glycosylated ferritin in serum and absence of iron overload. *Haematologica*. 94: 335-339.

Lewis M, Lee G. R., Haut A (1965). The association of hemochromatosis with thalassemia minor. *Annals of Internal Medicine*. 63: 122.

- Lynas C (1997). 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*. 90: 4235-4236.
- Martins R, Picanço I, Fonseca A, Ferreira L, et al. (2004). The role of HFE mutations on iron metabolism in beta thalassemia carriers. *Journal of Human Genetics*. 49: 651-655.
- Melchiori L, Gardenghi S, Rivella S (2010). β -Thalassemia: HiJAKing ineffective erythropoiesis and iron overload. *Advances in Hematology*. 2010. <http://www.hindawi.com/journals/ah/2010/938640.html>. Accessed June 8, 2010.
- Melis MA, Cau M, Deidda F, Barella S, et al. (2002). H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. *Haematologica*. 87: 242-245.
- Miniero R, Tardivo I, Roetto A, De Gobbi M (2005). Heterozygous beta-thalassemia and homozygous H63D hemochromatosis in a child: an 18-year follow up. *Pediatr Hematol Oncol*. 22: 163-166.
- Parfrey PS, Barnett M, Sachs JA, Pollock DJ et al. (1981). Iron overload in β -thalassaemia minor. *Scandinavian Journal of Haematology*. 27: 294-302.
- Piperno A, Mariani R, Arosio C, Vergani A, et al. (2000). Haemochromatosis in patients with β -thalassaemia trait. *British Journal of Haematology*. 111: 908-914.
- Restagno G, Gomez AM, Sbaiz L, De Gobbi M, et al. (2000). A pilot C282Y hemochromatosis screening in Italian newborns by taqMan technology. *Genet Test*. 4: 177-181.

Weatherall DJ (2007). Current trends in the diagnosis and management of haemoglobinopathies. *Scand J Clin Lab Invest.* 67: 1-2

Table 1. Presence of mutations that determine heterozygous beta-thalassemia and *HFE* gene polymorphisms.

Mutations	H63D (+ / +) n = 4	H63D (+ / -) n = 28	C282Y (+ / -) n = 6	C282Y /H63D n = 4	Absence of mutation (n = 96)
CD 39 n = 90	4 (4.4%)	17 (18.9%)	4 (4.4%)	3 (3.3%)	62 (68.9%)
IVS 1-110 and IVS 1-6 n = 48	0	11 (22.9%)	2 (4.2%)	1 (2.1%)	34 (70.8%)

Table 2. Ferritin (ng/mL)¹ and transferrin saturation (%)² in heterozygous beta-thalassemics with and without polymorphism of the *HFE* gene.

Gender/age	Polymorphisms in the <i>HFE</i> gene	Ferritin	p ³	Transferrin saturation	p ⁴
Female 18 to 40 (years)	Present (n = 10)	25.7 to 226.0 53.5	0.18	21.3 to 53.1 34.4 ± 9.0	0.20
	Absent (n = 32)	10.0 to 234.0 70.1		14.1 to 49.5 29.8 ± 10.2	
Female > 40 (years)	Present (n = 18)	6.2 to 2982.0 127.0	0.82	6.5 to 67.8 30.0 ± 14.1	0.25
	Absent (n = 26)	19.0 to 536.0 128.5		12.3 to 52.7 25.3 ± 9.4	
Male 18 to 40 (years)	Present (n = 6)	58.0 to 268.0 154.0	0.09	25.4 to 44.0 35.1 ± 8.0	0.31
	Absent (n = 18)	26.0 to 1420.0 233.0		17.3 to 84.8 40.8 ± 18.3	
Male > 40 (years)	Present (n = 8)	38.3 to 1034.0 474.0	0.66	23.3 to 77.2 39.3 ± 17.1	0.98
	Absent (n = 20)	45.0 to 1192.0 268.0		19.1 to 62.9 39.1 ± 12.6	

¹ Data are expressed as minimum, maximum and median² Data are expressed as minimum, maximum and means ± standard deviation³ Mann-Whitney test, significant at p < 0.05⁴ Student *t*-test, significant at p < 0.05

Table 3. Ferritin (ng/mL)¹ and transferrin saturation (%)² in heterozygous beta-thalassemics with or without polymorphism of the *HFE* gene in different genders and age groups.

Polymorphisms in the <i>HFE</i> gene	Gender and age	Ferritin	p ³	Transferrin Saturation	p ⁴
Present	Male	38.3 to 1034.0	0.01	23.3 to 77.2	0.20
	n = 14	221.0		37.5 ± 13.7	
	Female	6.2 to 2982.0		6.5 to 67.8	
	n = 28	79.0		31.7 ± 12.4	
Absent	Male	26.0 to 1420.0	0.01	17.3 to 84.8	0.01
	n = 38	253.0		39.9 ± 15.3	
	Female	10.0 to 536.0		12.3 to 52.7	
	n = 58	87.5		27.8 ± 10.0	
Present	18 to 40 (years)	25.7 to 268.0	0.03	21.3 to 53.1	0.69
	n = 16	68.0		34.7 ± 8.4	
	> 40 (years)	6.2 to 2982.0		6.5 to 77.2	
	n = 26	183.0		33.1 ± 15.4	
Absent	18 to 40 (years)	10.0 to 1420.0	0.01	14.1 to 84.8	0.38
	n = 50	100.3		33.7 ± 14.4	
	> 40 (years)	19.0 to 1192.0		12.3 to 62.9	
	n = 46	181.9		31.2 ± 12.7	

¹ Data are expressed as minimum, maximum and median

² Data are expressed as minimum, maximum and means ± standard deviation

³ Mann-Whitney test, significant at p < 0.05

⁴ Student *t*-test, significant at p < 0.05

Table 4. Influence of the mutation of the β -globin gene, age and gender on ferritin (ng/mL)¹ values and transferrin saturation (%)² in heterozygous thalassemics without polymorphism in the *HFE* gene.

Gender /age	Mutation	Ferritina	p ³	Transferrin Saturation	p ⁴
Female 18 to 40 (years)	β^0 (n = 21)	10.0 to 134.0 69.2	0.38	14.1 to 49.1 28.1 $\pm$ 10.0	0.19
	β^+ (n = 11)	34.0 to 234.0 71.0		19.0 to 49.5 33.2 $\pm$ 10.2	
	β^0 (n = 19)	34.9 to 536.0 152.0		12.3 to 40.1 24.1 $\pm$ 8.3	
	β^+ (n = 7)	19.0 to 490.0 58.0		16.4 to 52.7 28.6 $\pm$ 12.1	
Male 18 to 40 (years)	β^0 (n = 9)	146.0 to 1420.0 342.0	0.33	21.5 to 84.8 41.7 $\pm$ 20.5	0.84
	β^+ (n = 9)	26.0 to 576.0 222.0		17.3 to 73.1 39.8 $\pm$ 16.9	
	β^0 (n = 13)	85.0 to 1010.0 262.0		19.1 to 62.9 39.3 $\pm$ 13.5	
	β^+ (n = 7)	45.0 to 1192.0 309.0		21.8 to 56.0 38.8 $\pm$ 11.7	

¹ Data are expressed as minimum, maximum and median

² Data are expressed as minimum, maximum and means $\pm$ standard deviation

³ Mann-Whitney test, significant at p < 0.05

⁴ Student *t*-test, significant at p < 0.05

Table 5. Ferritin above the values established as normal and transferrin saturation above 45% in heterozygous beta-thalassemia β^0 and β^+ , with and without polymorphism of the *HFE* gene.

Polymorphisms in the <i>HFE</i> gene	Mutation	Ferritin > 300 ng/mL in men and 200 ng/mL in women	p*	Ferritin above normal levels and transferrin saturation > 45%	p*
Present n = 42	β^0 n = 28	8 (28.6%)	0.72	1 (3.6%)	0.25
	β^+ n = 14	3 (21.4%)		2 (14.3%)	
Absent n = 96	β^0 n = 62	17 (27.4%)	1.00	5 (8.1%)	1.00
	β^+ n = 34	9 (26.5%)		2 (5.9%)	
Total n = 138	β^0 n = 90	25 (27.8%)	0.85	6 (6.7%)	0.74
	β^+ n = 48	12 (28.6%)		4 (8.3%)	

*Fisher's exact test, significant at $p < 0.05$

CAPÍTULO IV

Esse artigo será submetido à Revista Blood Cells, Molecules & Diseases

Fator de impacto: 2.901

Qualis: B

As mutações β^0 (CD 39) e β^+ (IVS 1-110) influenciam o perfil de marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante em beta talassêmicos heterozigotos?

I.F. Estevão^{1,3}, D.G.H. Silva¹, E.A. Almeida², C.R. Bonini-Domingos¹

1.UNESP - Departamento de Biologia. São José do Rio Preto, SP.

2.UNESP - Departamento de Química e Ciências Ambientais, São José do Rio Preto, SP.

3.UFSCar - Faculdade de Medicina, São Carlos, SP.

Resumo

A beta talassemia heterozigota é prevalente em todo o mundo estimando-se que 1,5% da população mundial seja portadora do traço talassêmico. Esses indivíduos, na maioria das vezes, não apresentam complicações clínicas relacionadas ao quadro hematológico. Entretanto, aumento do estresse oxidativo e alterações na capacidade antioxidante foram demonstrados em beta talassêmicos heterozigotos. O presente trabalho objetivou avaliar se a herança das mutações no gene da β -globina exerce influencia sobre marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante, comparados a grupo controle. Foram analisados 30 indivíduos com mutação CD 39 (β^0), 30 com IVS 1-110 (β^+) e 24 sem talassemia compondo o grupo controle. A atividade da enzima Glutathione S-Transferase (GST), medida em mU/mg de proteínas, foi maior em talassêmicos do que no grupo controle ($p = 0.022$). Os valores da atividade da Catalase (CAT) foram semelhantes entre talassêmicos e não talassêmicos ($p > 0.209$). A atividade de ambas as enzimas não diferiu entre os talassêmicos β^0 e β^+ . A concentração de proteínas, obtida para o cálculo da atividade enzimática foi menor no grupo talassêmico do que no controle ($p < 0.003$), porém semelhante entre os talassêmicos β^0 e β^+ ($p > 0.553$). As concentrações de TBARS foram maiores em beta talassêmicos heterozigotos ($p = 0.001$), não havendo diferença significativa entre portadores das mutações β^0 e β^+ . A atividade elevada da enzima GST, apesar da diminuição protéica, demonstra a importância dessa enzima no controle do estresse oxidativo nessa via de

detoxificação, e pode estar relacionada com o aumento de radicais livres, em portadores de beta talassemia, mesmo em heterozigose.

Palavras chave: Beta talassemia heterozigota; catalase; glutathione *S*-transferase, estresse oxidativo.

Introdução

As síndromes beta talassêmicas são um grupo heterogêneo de afecções hereditárias caracterizadas por diminuição da síntese de cadeias beta, resultando em diferentes fenótipos, que variam de anemia grave até indivíduos clinicamente assintomáticos. Essa variação fenotípica está relacionada a fatores genéticos e ambientais incluindo o tipo de mutação herdada. As mutações podem ter características de β^0 (β^0) ou β^+ (β^+) talassemias, de acordo com a ausência ou diminuição da produção das cadeias beta, respectivamente {1}.

Estudos têm demonstrado que a aceleração da apoptose nos precursores eritróides, em portadores de talassemia *major* e *intermedia*, está relacionada ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), decorrente do excesso das cadeias alfa desnaturadas, sobrecarga de ferro e diminuição da concentração de hemoglobina {2, 3, 4}. Todos os componentes celulares são susceptíveis as ERO, entretanto a membrana é um dos componentes celulares mais atingidos, em decorrência da peroxidação lipídica que altera sua estrutura e permeabilidade, acelerando a morte celular {5}. Biomarcadores de peroxidação lipídica, tal como os valores de malondialdeído (MDA), estão aumentados nas talassemias graves {6}.

Para a integridade celular é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e a capacidade antioxidante. As GST são enzimas de detoxificação que catalisam a conjugação de várias moléculas orgânicas endógenas e exógenas com a glutathione. Algumas isoenzimas de GST também exibem atividade de glutathione peroxidase e catalisam a redução de hidroperóxidos orgânicos em seus respectivos alcoóis. Como esses compostos são gerados por peroxidação de lipídios e por dano oxidativo no DNA, a atividade de peroxidase da GST, tem papel importante no controle do estresse oxidativo {7}.

A CAT é uma enzima antioxidante que atua na redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Nos eritrócitos, decompõe o peróxido de hidrogênio gerado pela dismutação do radical superóxido na auto-oxidação da hemoglobina {5}.

Os portadores de beta talassemia heterozigota, normalmente, não necessitam de tratamento específico [1], entretanto, nesses indivíduos, foram observadas alterações na capacidade antioxidante e aumento da geração de moléculas oxidantes [8,9]. Assim, os objetivos do presente estudo foram avaliar a influência das mutações β^0 e β^+ da beta globina sobre marcadores do estresse oxidativo e capacidade antioxidante, em beta talassêmicos heterozigotos comparados a grupo controle.

Material e Métodos

Amostragem

Foram avaliadas 60 amostras, de sangue periférico, de portadores de beta talassemia heterozigota, caucasóides e residentes na região Central do Estado de São Paulo. Os critérios de inclusão foram: a presença da mutação CD 39 ou IVS 1-110, ausência de sinais ou sintomas de doença inflamatória e idade acima de 18 anos. O grupo controle foi constituído por 24 amostras, de sangue periférico, de indivíduos caucasóides, residentes na mesma região, que se apresentaram por demanda espontânea no laboratório, ou seja, sem indicação clínica, com hemograma normal e que tinham características de gênero e idade semelhantes aos indivíduos que compuseram o grupo de talassêmicos. Dos 60 beta talassêmicos heterozigotos, 30 eram portadores da mutação CD 39 (β^0) e 30 da mutação IVS 1-110 (β^+). A idade dos talassêmicos variou de 20 a 88 anos e dos indivíduos que compuseram o grupo controle de 18 a 82 anos. As características demográficas dos grupos analisados estão detalhadas na Tabela 1. O sangue periférico foi coletado por punção venosa em dois tubos, um com EDTA e outro com heparina, após jejum de oito horas e com autorização por consentimento informado.

Metodologia

Eritrograma

Os parâmetros hematológicos foram obtidos por contadores automatizados de células (Sysmex XE2100 D).

Testes para diagnóstico de beta talassemia

As amostras foram submetidas às eletroforeses de hemoglobina em pH 8,6 {10} e à cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em Sistema automatizado VARIANT (Bio-Rad) com o kit “ β Thalassemia Short” para quantificação das Hb A₂ e Hb Fetal . Valores de Hb A₂ acima do valor de normalidade (2,5 a 3,5%) foram utilizados para confirmação do diagnóstico laboratorial da talassemia.

Análise molecular para beta talassemia

O DNA genômico das amostras de indivíduos com beta talassemia foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio {11}. A confirmação das mutações foi realizada por amplificação gênica alelo específica com a utilização de *primers sense*, *antisense* e *primers* que se acoplam na posição do alelo mutante e na respectiva posição do alelo normal. Como controle interno da reação, foram utilizados os *primers* B5a 5'-GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC-3' (*sense*) e B5b 5'-AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA-3' (*antisense*) que produzem um fragmento de 659 pb {12}.

Para a identificação da mutação CD39 foram utilizados os primers PS39W 5'-GAC TCA AAG AAC CTC TG-3' (*antisense*), que amplifica o alelo normal, e o PS39M 5'-GAC TCA AAG AAC CTC TA-3' (*antisense*), para a amplificação do alelo mutante, os quais produzem um fragmento de 439 pb. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C, por sete

minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C, por 50 segundos, 54°C, por 50 segundos, 72°C, por 50 segundos; seguida de uma extensão final a 72°C, por sete minutos.

A identificação da mutação IVS-I-110 foi realizada utilizando-se os *primers* TB110W 5'-GGG TGG GAA AAT AGA CC-3' (*antisense*) que amplifica o alelo normal e TB110M 5'-GGG TGG GAA AAT AGA CT-3' (*antisense*) que amplifica o alelo mutante, os quais produzem um fragmento de 377 pb. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por sete minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 50 segundos, 58°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos; seguida de uma extensão final a 72°C por sete minutos.

A escolha das mutações investigadas baseou-se em dados da literatura para as mutações talassêmicas mais frequentes na população do Estado de São Paulo {13, 14}.

Determinação da atividade das enzimas Glutathione S -Transferase e Catalase

Para avaliação da atividade enzimática da GST e da CAT, as amostras de sangue venoso foram coletas em tubo com EDTA e analisadas em até 24 horas após a coleta, sendo que durante esse período permaneceram refrigeradas. Para determinar a atividade enzimática da GST, a amostra de sangue foi diluída em solução hemolisante, na proporção de 1:20, com 3.5 μ M de 2-mercaptoetanol, 10 μ M NADP e 2.7 mM de EDTA. Para o ensaio utilizou-se meio de reação contendo 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 1 mM de GSH ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), e o aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm {15}. A concentração de proteínas, para o cálculo da atividade enzimática por miligramas de proteínas, foi determinada pelo método de Bradford {16}. Foram utilizadas duas unidades de medida, uma por mL (U/mL) e a outra por mg de proteínas (mU ou U/mg de proteínas), pois a literatura é controversa quanto a unidade que deve ser utilizada {17}.

Para análise da CAT, o sangue total foi diluído em água destilada (1:50) e sua atividade medida pelo método de Beutler {18}, medindo-se a velocidade de

decomposição do peróxido de hidrogênio através do decréscimo de absorbância em 240 nm em temperatura de 30°C ($\epsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Foram utilizadas duas unidades de medida, uma por mL (U/mL) e a outra por mg de proteínas (U ou U/mg de proteínas).

Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada para avaliação da peroxidação lipídica. O método é baseado na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535nm. Valores até 440ng/mL são considerados normais {19, 20}.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistica 7. Após a avaliação da normalidade pela inspeção gráfica dos resíduos e da homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene, foram utilizados testes paramétricos. Nas comparações entre os grupos foi utilizada Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Para comparação das frequências entre os gêneros, nos grupos avaliados, foi utilizado o teste do Qui-Quadrado (χ^2). O nível de significância para ambos os testes foi $p < 0,05$ {21}.

Resultados

Dentre os parâmetros hematológicos avaliados, os valores de volume corpuscular médio (VCM) e de hemoglobina corpuscular média (HCM) foram menores apenas em mulheres portadoras da mutação CD 39 ($p < 0.022$). A concentração de HbA₂ foi maior em portadores da mutação CD 39, tanto em

homens quanto em mulheres ($p < 0.013$), porém as concentrações de hemoglobina foram semelhantes entre os indivíduos com os dois tipos de mutação. Os resultados dos parâmetros hematológicos estão detalhados na Tabela 2.

A atividade da enzima GST, expressa em mU/mg, foi maior em ambos os grupos talassêmicos (β^0 e β^+) do que no controle ($p < 0,043$). Não houve diferença significativa entre os portadores da mutação CD 39 e IVS 1-110 ($p = 0.998$). Entretanto, não houve diferença, entre os grupos, quando a atividade da GST foi expressa em U/mL ($p = 0,710$). O maior resultado obtido na atividade da enzima GST foi considerado um outlier e por isso foi retirado das análises estatísticas (32.60 mU/mg de proteínas).

A atividade da CAT, em ambas as unidades foi semelhante entre talassêmicos e não talassêmicos e foi semelhante entre β^0 e β^+ talassemia. Os resultados da atividade de ambas as enzimas estão detalhados na Tabela 3.

A concentração de proteínas foi menor no grupo dos talassêmicos do que no controle ($p < 0.003$) e foi semelhante entre os talassêmicos com mutação CD 39 e os com mutação IVS 1-110 ($p > 0.553$).

A concentração de TBARS foi maior no grupo talassêmico do que no controle ($p = 0.001$), sendo que, em talassêmicos, a média das concentrações de TBARS foi acima dos valores de referência. Não houve diferença significativa entre os talassêmicos CD 39 e IVS 1-110.

Discussão

Indivíduos heterozigotos apresentam fenótipo brando que se caracteriza por anemia leve, hipocromia e microcitose [22]. Poucos trabalhos têm sido realizados para avaliar os efeitos deletérios das mutações beta talassêmicas quando em heterozigose [23]. Nesse estudo, não foram observadas diferenças estatísticas na atividade das enzimas GST e CAT, expressas por U/mL, entre indivíduos talassêmicos e sem talassemia. Todavia, quando os dados de atividade enzimática foram convertidos para unidades de atividade específica (U/mg de

proteínas) observou-se aumento significativo na atividade da GST nos talassêmicos em relação ao grupo controle.

Esses resultados são compatíveis com estudos anteriores que avaliaram, em sangue periférico de talassêmicos heterozigotos, o estado oxidativo e a capacidade antioxidante. Chiang e colaboradores, em 2007, detectaram níveis elevados de GST em vários tipos de anemia quando comparados ao grupo controle, sendo que os maiores valores observados foram em portadores de traço talassêmico {9}. Selek e colaboradores, em 2007, quantificando o estado oxidativo total (TOS), a capacidade antioxidante total (TAC), o índice do estresse oxidativo (TOS/TAC), e os níveis de hidroperóxido lipídico em beta talassemia heterozigota, concluíram que esses pacientes apresentavam aumento do estresse oxidativo {8}. Ondei e colaboradores, em 2009, demonstraram aumento da peroxidação lipídica (TBARS) e da capacidade antioxidante (TEAC) em portadores de beta talassemia heterozigota {24}.

Com base em nossos resultados, observamos que a dualidade obtida para a atividade da GST, de acordo com a forma de expressão dessa enzima, é decorrente do conteúdo de proteínas que esses indivíduos expressam. Em geral, os talassêmicos apresentaram um conteúdo de proteínas menor em relação aos do grupo controle, gerando assim um fator de divisão maior na equação para o cálculo da atividade enzimática específica para os indivíduos controles, refletindo, ao final, num valor menor de atividade de GST nesse grupo em comparação com os portadores de beta talassemia heterozigota.

Ao compararmos os valores obtidos, em um mesmo volume de sangue (U/mL), a atividade enzimática foi a mesma entre talassêmicos e indivíduos sem talassemia, apesar do decréscimo significativo da quantidade de proteínas, mostrando a necessidade da manutenção de níveis adequados dessas enzimas para a obtenção de condições antioxidantes ideais. Essa hipótese, fica mais evidente nos resultados obtidos para a atividade da GST, cuja atividade específica está aumentada (mU/mg de proteínas), apesar da diminuição protéica total. Esses dados demonstraram que a diminuição do conteúdo geral de proteínas em traço talassêmico, não refletiu na atividade enzimática da GST desses indivíduos.

Como algumas isoenzimas de GST exibem atividade de glutathione peroxidase {7}, catalisando a redução de hidroperóxidos e combatendo os efeitos deletérios de ERO geradas, é possível que mutações no gene da beta globina responsáveis pelo fenótipo talassêmico, mesmo que em heterozigose, também gerem estresse oxidativo, acarretando a necessidade de níveis adequados de antioxidantes como, a GST, para manutenção do equilíbrio entre os agentes pró e antioxidantes. A maior concentração de TBARS, nesses indivíduos, indicando aumento da peroxidação lipídica e, portanto aumento das ERO, corrobora essa hipótese.

Em portadores de beta talassemia *major* foram detectados oxidação lipídica e níveis elevados de enzimas antioxidantes, como a Superóxido Dismutase e Glutathione Peroxidase, sugerindo que um dano oxidativo intraeritrocitário pode estimular mecanismos antioxidantes para prevenir oxidação de proteínas, lipídios e DNA {2}.

A atividade das enzimas GST, CAT e as concentrações de TBARS não diferiram entre portadores de β^0 (CD 39) e β^+ (IVS 1-110) talassemia, sugerindo as condições que geram estresse oxidativo, em heterozigotos, são semelhantes nos dois grupos. O tipo de mutação talassêmica influenciou o fenótipo hematológico (VCM e HCM) somente em mulheres, sugerindo que outros fatores, relacionados ao gênero, possam atuar nos resultados desses parâmetros. A deficiência de ferro, frequente no gênero feminino, se concomitante com o traço talassêmico, pode diminuir os valores desses dois índices. Em 1992, Rund e colaboradores observaram valores menores de VCM em talassêmicos β^0 e o relacionaram à gravidade da mutação talassêmica, todavia os indivíduos, desse estudo, não foram separados pelo gênero {25}.

Com base nesses resultados podemos concluir que a GST tem um papel importante na manutenção do estresse oxidativo nos indivíduos beta talassêmicos heterozigotos visto que sua atividade se manteve inalterada mesmo considerando a diminuição dos níveis de proteínas sanguíneas e essa resposta pode estar associada ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, secundário ao desequilíbrio na síntese das cadeias alfa e beta, tornando esses

indivíduos mais vulneráveis, do que a população em geral, a outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como processos inflamatórios, infecção e câncer.

Assim, análises de outros parâmetros de estresse oxidativo tais como outros antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e suas correlações com polimorfismos e nível de expressão de diferentes isoenzimas de GSTs podem contribuir para o esclarecimento dos possíveis efeitos deletérios das mutações no gene da beta globina em heterozigose e expressão fenotípica diferenciada.

REFERÊNCIAS

- {1} R. Galanello, R. Origa, Beta-thalassemia, Orphanet J Rare Dis, disponível em <http://www.orphandis.com/content/5/1/11>. Acesso em 26/07/2010.
- {2} A. Kassab-Chekir et al., Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia, Clin Chim Acta 338 (2003), pp.79-86.
- {3} L.N. Grinberg, E.A. Rachmilewitz, N. Kitrossky, M. Chevion, Hydroxyl radical generation in beta-thalassemic red blood cells, Free Radic Biol Med 18 (1995), pp. 611-615.
- {4} K.S. Lang, B. Roll, S. Myssina, M. Schittenhelm, H.G. Szele-Walter, L. Kanz et al., Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and dehydrogenase deficiency, Cell Physiol Biochem 12 (2002), pp. 365-372.
- {5} A.L.A. Ferreira, L.S. Matsubara, Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo, Rev Ass Med Brasil 43 (1997), pp. 61-68.

- {6} Walter P.B. et al., Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassaemia or sickle cell disease, *Br J Haematol* 135 (2006), pp. 254-263.
- {7} J.D. Hayes, D.J. Pulford, The glutathione S-Transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer, chemoprotection and drug resistance, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30 (1995), pp. 445-600.
- {8} S. Selek, A. Mehmet, H. Mehmet, G. Mustafa, E. Ozcan, Oxidative status and serum PON1 activity in beta-thalassemia minor, *Clin Biochem* 40 (2007), pp. 287-291.
- {9} W.L. Chiang, Y.S. Hsieh, S.F. Yang, T.A. Lu, S.C. Chu, Differential expression of glutathione -S-transferase isoenzymes in various types of anemia in Taiwan, *Clin Chim Acta* 375 (2007), pp. 110-114.
- {10} A.J. Marengo-Rowe. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate, *J Clin Pathol*, 18 (1965) pp. 790-792.
- {11} J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Manatis. *Molecular cloning; a laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York, 1989.
- {12} L.C. Bertholo, H.W. Moreira, Amplificação gênica alelo-específica na caracterização das hemoglobinas S, C e D e as interações entre elas e talassemias beta, *J Bras Patol Med Lab* 42 (2006), pp. 245-251.
- {13} C.R. Bonini-Domingos, Thalassemia screening in Brazil - Results for 20 years, *Rev Bras hematol Hemoter* 26 (2004), pp. 288-289.

- {14} C.S. Bertuzzo, M.F. Sonati, F.F. Costa, Hematological phenotype and the type of thalassemia mutation in Brazil, *J Med Genet* 20 (1997), pp. 319-321.
- {15} J.H. Kenn, W.H. Habig, W.B. Jacoby, Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases, *J Biol Chem* 251 (1976), pp. 6183-6168.
- {16} M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976), pp.248–254.
- {17} S.L. Zhong et al., Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferase M1 and P1 in Chinese, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 28 (2006), pp. 77-85.
- {18} E. Beutler, *Red cell metabolism: a manual of biochemical methods*, third ed., Grune & Stratton, New York, 1975.
- {19} Mihara M and Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 1978; 86: 271-278.
- {20} Percario S, Vital ACC, Jablonka F. Dosagem do malondialdeído (TBARS). *NewsLab* 2004; 6: 46-50.
- {21} J.H. Zar, *Biostatistical Analysis*, four ed., Prentice Hall, New Jersey, 1999.
- {22} D.J. Weatherall, Current trends in the diagnosis and management of haemoglobinopathies, *Scand J Clin Lab Invest* 67 (2007), pp. 1-2.
- {23} A. Premawardhena, M. Arambepola, N. Katugaha, D.J. Weatherall, Is the thalassaemia trait of clinical importance? *Br J Haematol* 141 (2008), pp. 407-410.

{24} L.S. Ondeí, Estresse oxidativo em pacientes beta talassêmicos heterozigotos e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, Tese de doutorado em Genética. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2009.

{25} D. Rund, D. Filon, N. Strauss, E.A. Rachmilewitz, A. Oppenheim, Mean Corpuscular volume of heterozygotes for β -thalassemia correlates with severity of mutations, Blood 79 (1992), pp. 238-243.

Tabela 1. Características demográficas dos indivíduos analisados.

Dados	Beta Talassemia β^0 e β^+	CD 39 β^0	IVS 1-110 β^+	Grupo Controle	Testes
Amostra (n)	60	30	30	24	
Idade (anos) ¹	20-88 47.6 $\pm$ 18.5	22-88 47.5 $\pm$ 18.5	20-82 47.6 $\pm$ 18.8	18-82 43.5 $\pm$ 16.8	$p^2 = 0.657$
Feminino n (%)	32 (53.3%)	15 (50.0%)	17 (56.7%)	13 (43.3%)	$\chi^2 = 0.733$
Masculino n (%)	28 (46.7%)	15 (50.0%)	13 (43.3%)	8 (33.3%)	$p^3 = 0.693$

¹Dados expressos em valores mínimo, máximo, média e desvio padrão

² Teste ANOVA com nível de significância para $p < 0.05$

³ Teste do Qui-Quadrado com nível de significância para $p < 0.05$

Tabela 2. Características hematológicas dos beta talassêmicos heterozigotos analisados.

Dados Hematológicos ¹	Feminino		p^b	Masculino		p^2
	CD 39 (β^0)	IVS 1-110 (β^+)		CD 39 (β^0)	IVS 1-110 (β^+)	
Hemoglobina (g/dL)	10.9 $\pm$ 0.8	11.4 $\pm$ 0,8	0.100	13.3 $\pm$ 1.9	13.1 $\pm$ 1.0	0.732
Hematócrito (%)	34.2 $\pm$ 2.8	35.7 $\pm$ 2,2	0.073	41.5 $\pm$ 6.5	40.2 $\pm$ 2.5	0.504
VCM (fL)	61.4 $\pm$ 3,6	65.0 $\pm$ 2,8	0.004	64.1 $\pm$ 3.6	65.2 $\pm$ 2.8	0.395
HCM (pg)	19.6 $\pm$ 1,2	20.6 $\pm$ 1,1	0.022	20.5 $\pm$ 1.4	21.1 $\pm$ 0.7	0.181
Hb A ₂ (%)	5.7 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 0.5	0.013	6.0 $\pm$ 0.5	5.4 $\pm$ 0.6	0.003
Hb fetal (%)	1.1 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.7	0.345	1.3 $\pm$ 1.9	0.6 $\pm$ 0.7	0.240

¹Dados expressos em valores de média e desvio padrão

² Teste *t*-Student com nível de significância para $p < 0.05$

Tabela 3. Atividade das enzimas GST, CAT e TBARS em beta talassêmicos heterozigotos CD 39 (β^0) e IVS 1-110 (β^+) e grupo controle.

Atividade enzimática ¹		Beta talassêmicos		Controles n = 24	p ²
		CD 39 (n = 30)	IVS 1-110 (n = 30)		
GST	mU/mg de proteína	3.85 a 16.95	2.43 a 15.32	3.8 a 11.98	0.022
		9.19 $\pm$ 3.24	9.14 $\pm$ 3.20	7.11 $\pm$ 2.40	
	U/mL	0.52 a 2.11	0.35 a 2.91	0.65 a 1.98	0.710
		1.23 $\pm$ 0.39	1.24 $\pm$ 0.50	1.14 $\pm$ 0.42	
Catalase	U/mg de proteína	1.73 a 28.0	2.30 a 25.0	1.69 a 20.16	0.233
		8.82 $\pm$ 6.45	11.24 $\pm$ 6.80	8.47 $\pm$ 6.50	
	U/mL	473.6 a 4753.0	579.2 a 5394.4	515.8 a 5429.6	0.209
		1565 $\pm$ 1146	1798 $\pm$ 1335	2261 $\pm$ 1799	
TBARS	ng/mL	269.3 a 1223.9	209.0 a 979.1	220.2 a 624.2	0.001
		519.3 $\pm$ 208.9	581.9 $\pm$ 189.7	383.0 $\pm$ 123.0	

¹ Dados expressos em valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão

² ANOVA complementada por Tukey com nível de significância para $p < 0.05$

CAPÍTULO V

Esse artigo será submetido à Revista Journal American of Hematology

Fator de impacto: 2.61

Qualis: B1

Frequência dos polimorfismos GSTM1, GSTT1 e GSTP1 e relação com o fenótipo da beta talassemia heterozigota

I.F. Estevão^{1,2}, D.G.H. Silva^{1,3}, L.S.Torres¹, E.A. Almeida², C.R. Bonini-Domingos¹

1.UNESP - Departamento de Biologia, São José do Rio Preto, SP.

2. UFScar - Faculdade de Medicina, São Carlos, SP.

3.UNESP - Departamento de Química e Ciências Ambientais, São do Rio Preto, SP.

Resumo

Aumento da peroxidação lipídica e alterações da capacidade antioxidante têm sido observados em beta talassemia heterozigota. A Catalase (CAT), importante enzima de detoxificação, degrada o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio e algumas isoenzimas das glutathionas *S*-transferases (GST) exibem atividade da glutathiona peroxidase. Os polimorfismos nulos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o polimorfismo para o gene *GSTP1*, resultante da transição de A→G, codificam enzimas com menor atividade catalítica. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos da GST nos valores da atividade enzimática da GST e da CAT, na concentração de TBARS, na saturação da transferrina e na ferritina sérica em beta talassemia heterozigota. Foram analisadas 60 amostras de beta talassêmicos heterozigotos e 24 de grupo controle combinado. Os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* foram identificados por PCR multiplex e o polimorfismo *GSTP1* por PCR-RFLP. A atividade das enzimas, GST e CAT, e a concentração de TBARS foram determinadas por espectrofotometria. A saturação de transferrina foi baseada no ferro sérico e na capacidade total de ligação do ferro e, a ferritina medida por quimioluminescência. Os genótipos mais frequentes foram o nulo para *GSTM1* e o nulo para ambos os polimorfismos (*GSTM1* e *GSTT1*) em talassêmicos e grupo controle, respectivamente. A incidência do alelo

nulo para *GSTT1* foi maior no grupo controle do que no talassêmico ($p < 0.004$). Os resultados da atividade da GST e da CAT, de TBARS, da saturação de transferrina e da ferritina sérica foram semelhantes entre os indivíduos com os diferentes genótipos para os genes avaliados ($p > 0.086$). Os autores concluem que os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não modificam o fenótipo talassêmico heterozigoto.

Palavras-chave: Beta talassemia heterozigota; polimorfismos nos genes da GSTs; Catalase; estresse oxidativo; ferritina.

Introdução

A beta talassemia heterozigota (talassemia *minor* ou traço talassêmico) é considerada clinicamente assintomática, porém a maioria dos portadores apresenta diminuição das concentrações de hemoglobina com redução do volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM) dos eritrócitos. A maioria das alterações genéticas responsáveis pelo fenótipo talassêmico são mutações pontuais ou, mais raramente, deleções no gene da β globina, localizado no braço curto do cromossomo 11, podendo ter características de β^0 (β^0) ou β^+ (β^+) talassemias, de acordo com a ausência ou diminuição da síntese das cadeias beta, respectivamente. O desequilíbrio entre a produção das cadeias alfa e beta acarreta acúmulo de cadeias não pareadas que se precipitam nos eritrócitos e nos precursores eritróides ocasionando hemólise extravascular e eritropoese ineficaz, respectivamente [1,2,3].

Os portadores da forma heterozigota normalmente não necessitam de tratamento específico e poucos estudos foram realizados para detectar possíveis efeitos deletérios dessas mutações, quando em heterozigose [4]. A presença de sobrecarga de ferro, em beta talassemia heterozigota, associada ou não a mutações em genes relacionados à absorção do ferro, tem sido demonstrada [5, 6, 7, 8, 9, 10]. Aumento da ferritina sérica e da saturação de transferrina, são os achados mais precoces e comuns na suspeita diagnóstica de sobrecarga de ferro [11, 12, 13]. Homens com ferritina acima de 300 ng/mL e mulheres com valores acima de 200 ng/mL e com saturação de transferrina acima de 45%, sem sinais de doença inflamatória, devem ser investigados [11, 14].

Nos talassêmicos graves e intermedios, o acúmulo de ferro, associado ao excesso de cadeias alfa desnaturadas e anemia, aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que danificam constituintes celulares, tais como DNA, proteínas e, principalmente os lipídios da membrana ocasionando a morte celular [15, 16, 17]. Nas formas leves, apesar de anemia discreta e leve eritropoese ineficaz, estresse oxidativo e alterações na capacidade antioxidante, também foram descritos [18, 19].

Algumas GSTs têm atividade de glutathione peroxidase, catalisando a redução de hidroperóxidos orgânicos em seus respectivos alcoóis. Os principais substratos de redução da GST são gerados por peroxidação lipídica e por dano oxidativo no DNA, portanto a atividade de peroxidação desempenha papel fundamental no controle do estresse oxidativo [20].

A catalase é uma enzima antioxidante que atua catalisando a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Nos eritrócitos, decompõe o peróxido de hidrogênio gerado pela dismutação do radical superóxido na auto-oxidação da hemoglobina [21].

Um bom marcador para avaliação do grau de peroxidação lipídica é a dosagem de TBARS, pois esse teste se baseia na reação do malondialdeído e outros aldeídos, gerados na degradação das proteínas e lipídios, com o ácido tiobarbitúrico [22, 23].

Polimorfismos nos genes codificadores das subclasses da enzima GST são frequentes e podem modificar a eficácia dessas enzimas no controle do estresse oxidativo. Genótipos nulos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* têm capacidade antioxidante reduzida [24]. O genótipo nulo para *GSTM1* pode interferir no fenótipo talassêmico. Valores maiores de ferritina e da saturação da transferrina e maior predisposição ao acúmulo cardíaco de ferro foram observados em HbE/ β talassemia e talassemia *major*, respectivamente [25, 26]. Outro polimorfismo comum, cuja enzima codificada tem sua atividade diminuída, é a transição de A $\rightarrow$ G, com substituição do aminoácido isoleucina por valina no códon 105, no gene *GSTP1*[27].

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos das GSTs nos valores da atividade das enzimas GST e CAT, na concentração de TBARS, na saturação da transferrina e na ferritina sérica em beta talassêmicos heterozigotos.

Material e Métodos

Amostragem

Foram analisadas 60 amostras de beta talassêmicos heterozigotos, sendo 30 talassêmicos CD 39 (β^0) e 30 IVS 1-110 (β^+). Todos os indivíduos eram caucasóides, adultos e residentes na região Central do Estado de São Paulo. O grupo controle foi constituído de 24 amostras de indivíduos adultos, caucasóides, residentes na mesma região e com hemogramas dentro dos parâmetros da normalidade. As características demográficas de ambos os grupos estão descritas na Tabela 1. O sangue periférico foi coletado, por punção venosa, em dois tubos, um com EDTA e outro com heparina, após jejum de oito horas e autorização por consentimento informado.

Identificação dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*

O DNA genômico, das amostras, foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio [28]. Os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* foram avaliados de forma simultânea pela reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex com os *primers* *GSTM1 sense* 5' GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C 3'; *GSTM1 antisense* 5' GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G 3'; *GSTT1 sense* 5' TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC 3' e *GSTT1 antisense* 5' TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA 3'. Como controle interno da reação, foi amplificada uma sequência do gene *CYP1A1* de 312 pb utilizando os *primers sense* 5' GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT 3' e *antisense* 5' CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC 3'. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de

94°C por quatro minutos, acrescida de 40 ciclos de 94°C por dois minutos, 59°C por um minuto, 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final a 72°C por dez minutos. Os genótipos nulos (ambos os alelos com deleção) para *GSTM1* e *GSTT1* foram identificados pela ausência dos fragmentos de amplificação de 218 pb e 459 pb, respectivamente [24].

O polimorfismo *GSTP1*, resultante da transição de A→G no nucleotídeo 313 do códon 105 (Ile→Val), foi investigado por PCR-RFLP. Os *primers* utilizados para amplificação de um fragmento de 176 pb foram: *primer sense* 105F: 5' ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA 3' e *primer antisense* 105R: 5' TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT 3. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por cinco minutos, acrescida de 40 ciclos de 94°C por um minuto, 62°C por três minutos, 72°C por 1 minuto e meio; seguida de uma extensão final a 72°C por sete minutos. Após a digestão com a enzima *BsmI* (New England BioLabs), o alelo normal gerou um fragmento de 176 pb e o alelo mutante dois fragmentos, um de 91 pb e outro de 85 pb [29, 30].

Determinação da atividade das enzimas GST e CAT

Para determinar a atividade enzimática da GST e da CAT, as amostras de sangue venoso foram avaliadas em até 24 horas após a coleta, sendo que durante esse período permaneceram refrigeradas. A concentração de proteínas, para o cálculo da atividade enzimática foi determinada pelo método de Bradford [31]. Para determinação da atividade da GST, as amostras de sangue foram diluídas em solução hemolisante, na proporção de 1:20, com 3.5 µM de 2-mercaptoetanol, 10µM NADP e 2.7 mM de EDTA. Para o ensaio utilizou-se meio de reação contendo 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 1 mM de GSH ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), e o aumento da absorbância foi acompanhado a 340 nm, de acordo com o método de Kenn e colaboradores, modificado [32]. Para a determinação da atividade da enzima CAT, o sangue total foi diluído em água destilada (1:50) e sua atividade medida pelo método de Beutler [33], medindo-se a velocidade de

decomposição do peróxido de hidrogênio através do decréscimo de absorbância a 240 nm e temperatura de 30°C ($\varepsilon = 0,071 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada para avaliação da peroxidação lipídica. O método é baseado na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535nm. Valores até 440ng/mL são considerados normais [22, 23].

Determinação da saturação da transferrina e da concentração de ferritina sérica

O ferro sérico foi obtido pela técnica enzimática de dois pontos, utilizando-se o Kit Lâminas Fe VITROS Chemistry (Ortho-Clinical Diagnostics Products Johnson & Johnson) e a ferritina pela tecnologia de quimioluminométrica direta, usando o sistema ADVIA Centaur[®]. A saturação de transferrina foi calculada dividindo-se o ferro sérico pela capacidade total de ligação do ferro e multiplicando-se por 100.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Statistica 7. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade, pela inspeção gráfica dos resíduos e pelo teste Levene, respectivamente. As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas pelo teste Exato de Fisher. Para compararmos os resultados da atividade da GST e da CAT, da concentração de TBARS e dos valores da saturação de transferrina utilizamos os testes paramétricos *t*-Student independente ou ANOVA. A ferritina sérica foi comparada pelos testes não

paramétricos de Mann Whitney ou Kruskal Walls. Para as correlações entre as concentrações de TBARS e a ferritina com a atividade das enzimas GST e CAT foi utilizado o teste de Pearson. O nível de significância para todos os testes foi $p < 0.05$.

Resultados

Dos 60 beta talassêmicos heterozigotos, 18 (30%) eram nulos para *GSTM1* e *GSTT1* e 27 (45.0%) eram nulos para pelo menos um dos alelos. No grupo controle 10 (41.7%) indivíduos eram nulos para ambos os alelos, *GSTM1* e *GSTT1*, e 11 (45.8%) eram nulos para pelo menos um dos alelos. A frequência dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em beta talassêmicos heterozigotos e no grupo controle está detalhada na Tabela 2 e 3.

Os valores obtidos nas concentrações de TBARS e na atividade das enzimas GST e CAT estão descritos na Tabela 4. O valor máximo obtido na determinação da atividade enzimática da GST (32.60 mU/mg de proteínas) foi considerado *outlier* e, por isso excluído da análise estatística. A concentração de TBARS e a atividade da GST foram maiores no grupo talassêmico do que no controle ($p < 0.006$), sendo que, em talassêmicos, as concentrações de TBARS foram superiores ao valor de referência (até 440 ng/mL). A atividade da CAT foi semelhante entre talassêmicos e grupo controle ($p = 0.333$). Os resultados obtidos de TBARS, nas atividades enzimáticas da GST, na saturação da transferrina e na ferritina em beta talassêmicos heterozigotos, de acordo com os genótipos avaliados estão detalhados nas Tabelas 5 e 6. Os valores da atividade de GST, CAT, saturação de transferrina e da ferritina foram semelhantes entre todos os genótipos ($p > 0.086$).

Dos 60 talassêmicos, 15 (25%) tinham concentrações de ferritina acima de 200ng/mL em mulheres e de 300 ng/mL em homens, sendo que desses, 12 (80%) tinham genótipos nulos, seis para *GSTM1* e seis para ambos os genes *GSTM1/GSTT1*. Dos 15 talassêmicos com hiperferritinemia, apenas em seis (10%) observou-se saturação de transferrina superior a 45%, sendo que quatro tinham

genótipos nulos, dois para *GSTM1* e *GSTT1* e dois para *GSTM1*. Com relação aos polimorfismos para o gene *GSTP1*, quatro eram heterozigotos (I/V) e dois homozigotos, um para o alelo selvagem (I/I) e outro para o mutante (V/V). Nenhuma correlação foi observada entre as concentrações de ferritina e de TBARS e a atividade das enzimas GST e CAT.

Discussão

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são altamente polimórficos com variação genotípica significativa entre diferentes grupos étnicos. Nesse estudo, o genótipo nulo para um ou para ambos os genes, em talassêmicos e no grupo controle, foram mais frequentes do que o descrito na literatura [34, 35]. Este padrão genotípico pode representar as características da região estudada, já que, tanto talassêmicos quanto controles, pertencem à mesma localidade.

Portadores de beta talassemia heterozigota apresentaram níveis maiores de TBARS e da atividade específica da enzima GST do que o grupo controle. Além disso, as concentrações de TBARS, em talassêmicos, foram maiores do que as preconizadas na literatura [22, 23], sugerindo maior grau de peroxidação lipídica nesse grupo. A maior frequência do alelo nulo para *GSTT1* no grupo controle poderia explicar a diferença observada entre a atividade enzimática desse grupo e dos talassêmicos ($p < 0.01$), já que os alelos nulos não codificam a enzima correspondente [24]. Entretanto, não observamos nesses indivíduos aumento da peroxidação lipídica. Por outro lado, o aumento da peroxidação lipídica, em talassêmicos, pode ter acionado mecanismos antioxidantes compensatórios, incluindo o aumento da atividade dessa enzima [20]. Os diferentes genótipos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não influenciaram nas concentrações de TBARS e na atividade da GST.

O ferro livre é um catalisador das reações de Fenton e Haber-Weiss, que geram espécies reativas de oxigênio (ERO), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) [21]. A dosagem da concentração de ferritina e a saturação de transferrina são os métodos

mais utilizados, na prática médica, para avaliação do ferro corporal total, apesar da concentração ser influenciada por várias condições não relacionadas à quantidade de ferro, tais como, processos inflamatórios, doenças hepáticas e neoplasias [12, 13].

Em portadores de HbE/ β talassemia valores mais elevados de ferro e de ferritina foram observados em talassêmicos com genótipo nulo para *GSTM1* e *GSTT1*[25]. No nosso estudo, os genótipos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não influenciaram o perfil do ferro desses talassêmicos, entretanto a maioria dos indivíduos com hiperferritinemia tinham genótipo nulo, ou para *GSTM1* ou para ambos, *GSTM1* e *GSTT1*. Esta frequência pode estar relacionada ao grande número de talassêmicos com genótipos nulos, pois a ocorrência de hiperferritinemia entre os diferentes genótipos foi semelhante.

Com base nesses resultados os autores concluem que os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não influenciam a atividade enzimática da GST, da CAT, das concentrações de TBARS e o perfil do ferro em beta talassêmicos heterozigotos.

REFERÊNCIAS

- 1Thein SL. Molecular basis of disease - Thalassemia syndrome. Hematológica, 2005; 90: 649-660.
- 2 Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. Orphanet J Rare Dis 2010; Disponível em <<http://www.ojrd.com/content/5/1/11>> Acesso em junho de 2010.
- 3 TAKESHITA, K. Thalassemia Beta. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/med/>>. Acesso em 15 de dezembro de 2010.
- 4 Premawardhena A, Arambepola M, Katugaha N, Weatherall DJ. Is the thalassaemia trait of clinical importance? Br J Haematol 2008; 141: 407-410.

- 5 Fargion S, Taddei MT, Cappellini MD, et al. The iron status of Italian subjects with beta thalassemia trait. *Acta Haematol* 1982; 68: 109-114.
- 6 Fargion S, Piperno A, Panaiotopoulos N et al. Iron overload in subjects with beta thalassemia trait. Role of idiopathic haemochromatosis gene. *Br J Haematol* 1985; 61: 487.
- 7 Ruiz-Arguilles GJ, Garces-Eisele JG, Reyes-Nunez V et al. Heterozygosity for the H63D mutation in hereditary hemochromatosis (HFE) gene may lead into severe iron overload in beta-thalassemia minor: observations in thalassemic kindred. *Rev Invest Clín* 2001; 53: 117-120.
- 8 Melis MA, Cau M, Deidda F et al. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. *Haematologica* 2002; 87: 242-245.
- 9 Martins R, Picanço I, Fonseca A et al. The role of HFE mutations on iron metabolism in beta thalassemia carriers. *J Hum Genet* 2004; 49: 651-655.
- 10 Riva A, Mariani R, Bovo G et al. Type 3 hemochromatosis and beta-thalassemia trait. *Eur J Haematol* 2004; 72: 370-374.
- 11 Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of Hemochromatosis and related disorders. *Blood* 2005; 106: 3710-3717.
- 12 Brissot P, Troadec MB, Jacquet EB, et al. Current approach to hemochromatosis. *Blood Rev* 2008; 22: 195-210.
- 13 Camaschella C, Foggiali E. Towards explaining “unexplained hipoferferritinemia”. *Haematologica* 2009; 94: 307-309.

- 14 Andrew W, Yen MD, Tonya L et al. Revisiting Hereditary Hemochromatosis: Current concepts and progress. *Am J Med* 2006; 119: 391-399.
- 15 Kassab-Chekir A, Laradi S, Ferchichi S et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clin Chim Acta* 2003; 338: 79-86.
- 16 Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin Hematol* 1990; 27: 70-82.
- 17 Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, anti-oxidants redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620-650.
- 18 Selek S, Aslan M, Horoz M et al. Oxidative status and serum PON1 activity in beta-thalassemia minor. *Clin Biochem* 2007; 40: 287-291.
- 19 Chiang WL, Hsieh YS, Yang SF et al. Differential expression of glutathione S-transferase isoenzymes in various types of anemia in Taiwan. *Clin Chim Acta* 2007; 375: 110-114.
- 20 Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-Transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer, chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445-600.
- 21 Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43: 61-68.
- 22 Mihara, M, Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 1978; 86: 271-278.

- 23 Precario S, Vital ACC, Jablonka F. Dosagem do dialdeído malônico. Newslab 1994; 6: 46-50.
- 24 Arand M, Mühlbauer R, Hengstler J et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. Analytical Biochemistry 1996; 236: 184-186.
- 25 Sharma V, Kumar B, Saxena R. Glutathione S-transferase gene deletions and their effect on iron status in HbE/ β thalassemia patients. Ann Hematol 2009; 89: 411-414.
- 26 Wu KH, Chang JG, Ho YJ et al. Glutathione S-Transferase M1 gene polymorphism are associated with cardiac iron deposition in patients with β -thalassemia major. Hemoglobin 2006; 30: 251-256.
- 27 MO Z , Gao Y, Cao Y et al. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. The Prostate 2009; 69: 662-668.
- 28 Sambrook J, Fritsch EF, Manatis T. Molecular cloning; a laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York, 1989.
- 29 Pinhel MAS, Nakazone MA, Cação JC et al. Glutathione S-transferase variants increase susceptibility for late-onset Alzheimer's disease: association study and relationship with apolipoprotein E epsilon4 allele. Clin Chem Lab Med 2008; 46: 439-445.
- 30 Ishii T, Matsuse T, Teramoto S et al. Glutathione S-transferase P1 (*GSTP1*) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 1999; 54: 693-696.

- 31 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.
- 32 Kenn JH, Habig WH, Jacoby WB. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases. *J Biol Chem* 1976; 251: 6183-6168.
- 33 Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods, third ed., Grune & Stratton, New York, 1975.
- 34 Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM et al. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 2002; 1: 33-240.
- 35 Magno LAV, Talbot J, Talbot T et al. Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population. *Pharmacology* 2009; 83: 231-236.

Tabela 1. Características demográficas dos grupos de beta talassêmicos heterozigotos e controle.

Dados	Beta talassêmicos heterozigotos	Controle
Amostra (n)	60	24
Idade (anos) ^a	20 - 88 47.6 ± 18.5	18 - 82 43.5 ± 16.8
Feminino	32 (53.3%)	13 (43.3%)
Masculino	28 (46.7%)	8 (33.3%)

^a Valores expressos em mínimo, máximo, média e desvio padrão

Tabela 2. Distribuição genotípica para *GSTM1*, *GSTT1* entre os grupos de beta talassêmicos heterozigotos e controle.

Alelos e Genótipos	Beta talassêmicos heterozigotos	Controle	p ²
<i>GSTM1</i>	Alelos do <i>GSTM1</i>		
[+]	21 (35.0%)	11 (45.8%)	0.457
[-]	39 (65.0%)	13 (54.2%)	
<i>GSTT1</i>	Alelos do <i>GSTT1</i>		
[+]	36 (60.0%)	6 (25%)	0.004
[-]	24 (40.0%)	18 (75%)	
<i>GSTM1/GSTT1</i> ¹	Genótipos <i>GSTM1/ GSTT1</i>		
[+] / [+]	15 (25.0%)	3 (12.5%)	0.252
[-] / [-]	18 (30.0%)	10 (41.7%)	0.318
[+] / [-]	6 (10.0%)	8 (33.3%)	0.020
[-] / [+]	21 (35.0%)	3 (12.5%)	0.060

¹ Genótipo selvagem [+] e nulo [-]

² Teste Exato de Fisher com nível de significância para p < 0.05

Tabela 3. Distribuição genotípica para *GSTP1* entre os grupos de beta talassêmicos heterozigotos e controle.

Alelos e Genótipos	Beta talassêmicos heterozigotos	Controle	p ²
<i>GSTP1</i>	Alelos		
<i>I</i>	57 (0.6)	23(0.6)	1.0
<i>V</i>	37 (0.4)	15 (0.4)	1.0
<i>Total</i>	94 (1.0)	38 (1.0)	
Genótipos ¹	n (%)	n (%)	
<i>III</i>	23 (38.3%)	9 (37.5%)	1.0
<i>IV</i>	34 (56.7%)	14 (58.3%)	1.0
<i>VV</i>	3 (5.0%)	1 (4.2%)	1.0
Total	60	24	60

¹ Genótipo selvagem [I] e mutante [V]

² Teste Exato de Fisher com nível de significância para p < 0.05

Tabela 4. Valores de GST, CAT, TBARS, saturação de transferrina e ferritina em beta talassêmicos heterozigotos e grupo controle.

Testes ¹	Talassêmicos	Controle	p ²
GST (mU/mg de proteínas)	2.44 a 16.95	3.8 a 11.98	0.006
	9.16 ± 3.19	7.11 ± 2.40	
Catalase (U/mg de proteínas)	1.73 a 27.99	1.69 a 20.16	0.333
	10.03 ± 6.69	8.47 ± 6.50	
TBARS (ng/mL)	209.0 a 1223.9	220.3 a 624.2	0.001
	550.6 ± 200.3	383.0 ± 123.0	
Saturação da transferrina (%)	14.10 a 84.80	NR	NR
	36.95 ± 14.94		
Ferritina (ng/mL)	19 a 1420	NR	NR
	233.11 ± 278.17		

¹ Dados expressos em valores de mínimo, máximo, média e desvio padrão

² Teste *t*-Student com nível de significância para p < 0.05

NR - não realizado

Tabela 5. Parâmetros avaliados em beta talassêmicos heterozigotos, expressos em mínimo, máximo, média e desvio padrão, de acordo com o genótipo *GSTM1* e *GSTT1*.

Fenótipo	GSTM- /GSTT- n = 18	GSTM+/GSTT- n = 6	GSTM-/GSTT+ n = 21	GSTM+/GSTT+ n = 14	p
Saturação da Transferrina (%) ¹	16.4 - 59.5 34.1 ± 11.8	21.8 - 49.1 34.1 ± 9.8	19.0 - 77.2 37.3 ± 13.5	14.1 - 84.8 41.3 ± 21.3	0.566
Ferritina (ng/mL) ²	19.0 - 946.0 239.2 ± 261.5	26.0 - 235.0 82.9 ± 79.2	35.0 - 1034.0 249.7 ± 259.5	23.0 - 1420.0 264.9 ± 371.2	0.580
TBARS (ng/mL) ¹	354.9 - 905.7 518.6 ± 147.7	489.6 - 832.3 654.8 ± 144.3	269.3 - 893.5 510.9 ± 161.5	209.0 - 1223.9 594.5 ± 303.5	0.319
GST (mU/mg de proteínas) ¹	3.40 - 13.85 9.05 ± 2.70	2.43 - 9.95 7.85 ± 2.79	3.85 - 16.95 9.56 ± 3.60	4.13 - 16.34 9.27 ± 3.43	0.729
CAT (U/mg de proteínas) ¹	1.73 a 21.41 10.18 ± 6.33	3.68 a 20.11 8.64 ± 5.96	2.25 a 27.99 11.51 ± 8.05	2.65 a 20.13 8.20 ± 5.41	0.522

¹ Teste ANOVA com nível de significância para p < 0.05

² Teste Kruskal Walls com nível de significância para p < 0.05

Tabela 6. Parâmetros avaliados em beta talassêmicos heterozigotos, expressos em mínimo, máximo, média e desvio padrão de acordo com o genótipo *GSTP1*.

Fenótipo	III (n = 22)	II/V (n = 34)	V/V (n = 3)	p
Saturação da Transferrina (%) ¹	14.1 - 73.1 36.0 ± 14.8	16.8 - 84.8 37.3 ± 15.6	37.9 - 45.40 41.60 ± 5.3	0.845
Ferritina (ng/mL) ²	19 - 946 167.7 ± 202.6	23 - 1420 248.7 ± 288.7	35 - 1034 535.3 ± 459.5	0.086
TBARS (ng/mL) ¹	269.3 - 832.3 478.4 ± 161.8	209.0 - 1223.9 585.0 ± 213.9	489.6 - 893.5 633.3 ± 225.7	0.113
GST (mU/mg de proteínas) ¹	3.57 - 16.95 9.95 ± 3.48	2.43 - 16.34 8.74 ± 2.89	3.4 - 12.18 8.22 ± 4.45	0.340
Catalase (U/mg de proteínas) ¹	2.25 a 27.99 9.11 ± 7.69	1.73 a 23.87 10.83 ± 6.33	5.60 a 11.03 7.74 ± 2.89	0.549

¹ Teste ANOVA com nível de significância para p < 0.05

² Teste Kruskal Walls com nível de significância para p < 0.05

CAPÍTULO VI

4 Discussão geral

A beta talassemia heterozigota é uma afecção genética frequente, estimando-se que 3% da população do estado de São Paulo seja portadora do traço talassêmico (BONINI-DOMINGOS, 2004). O seu diagnóstico é fundamental para orientação genética e discriminação entre outras formas de anemia. Apesar de considerada assintomática, sinais clínicos gerais como, cefaléia, adinamia, sonolência, são observados, nos portadores, com uma frequência maior do que em grupos controle e mesmo entre os indivíduos que apresentam outros tipos de anemia (PREMAWARDHENA et al.2008).

Nossos resultados mostraram que a atividade da enzima GST foi maior entre os talassêmicos avaliados do que no grupo controle e, no entanto não diferiu entre os portadores das mutações β^0 e β^+ . Considerando que algumas isoenzimas de GST exibem atividade de glutathione peroxidase (HAYES; PULFORD, 1995), catalisando a redução de hidroperóxidos e combatendo os efeitos deletérios das ERO, é possível que o desequilíbrio entre a produção de cadeias alfa e beta oriundo de mutações no gene da β -globina, responsáveis pelo fenótipo talassêmico, mesmo que em heterozigose, propicie condições que promovam o aumento das ERO, acarretando na necessidade de níveis mais adequados de enzimas e produtos antioxidantes.

O estresse oxidativo observado nos beta talassêmicos foi confirmado pelo aumento nas concentrações de TBARS, acima dos valores de referência. Nossos resultados são concordantes com outros estudos que evidenciaram alterações nos mecanismos antioxidantes e aumento do estresse oxidativo em beta talassemia heterozigota (CHIANG et al., 2007; SELEK et al., 2007; ONDEI, 2009).

Vários fatores genéticos e/ou adquiridos podem interferir na expressão fenotípica da beta talassemia, inclusive a coerância com mutações em genes não localizados no cluster da β -globina (REES et al., 1997; RUIZ-ARGUILLES et al., 2001; MELIS et al., 2002; MARTINS et al., 2004; THEIN, 2005; ORIGA et al., 2008; GALANELLO; ORIGA, 2010).

Os polimorfismos nulos nos genes *GSTM1* e *GSTT1*; além do polimorfismo no gene *GSTP1*, diminuem a atividade catalítica das enzimas codificadas (ARAND et al., 1996; DUSINKÁ et al., 2001; BERNARDINI et al., 2005; MO et al., 2009), podendo interferir nas manifestações clínicas e/ou laboratoriais dos indivíduos portadores dessas alterações.

No grupo de talassêmicos a frequência do alelo nulo para *GSTT1* foi menor do que a observada no grupo controle ($p < 0.006$), o que poderia justificar o aumento da atividade da GST nesses indivíduos (ARAND et al., 1996). Entretanto, não observamos nos controles aumento da peroxidação lipídica, pela avaliação de TBARS. Em talassêmicos, observamos maior atividade da GST e nas concentrações de TBARS, sugerindo que o aumento da GST possa ser um dos primeiros mecanismos de controle do estresse oxidativo gerado.

Em estudos de correlação estatística os diferentes genótipos, no gene da GST avaliados, não modificaram as concentrações de TBARS e a atividade das enzimas GST e CAT, em beta talassêmicos heterozigotos.

A avaliação do metabolismo do ferro, entre os portadores das mutações, CD39 e IVS 1-110, demonstrou aumento no número de indivíduos com ferritina acima dos valores preconizados como normais. Outro estudo, do mesmo grupo, evidenciou concentrações de ferritina maiores entre mulheres beta talassêmicas heterozigotas, quando comparadas com mulheres sem talassemia (ESTEVÃO, 2010).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde, estimam que aproximadamente 30% das mulheres brasileiras têm anemia. No grupo de talassêmicas avaliadas, observamos diminuição dos níveis de ferritina em 10% delas. Por outro lado, hiperferritinemia foi detectada em 42% dos beta talassêmicos do gênero masculino, sem a presença da mutação no gene *HFE*. A frequência de hiperferritinemia na população brasileira não é conhecida. Estudo populacional multicêntrico e multiétnico realizado nos Estados Unidos e no Canadá mostrou níveis de ferritina acima de 300 ng/mL em 26% dos homens caucásios, descendentes do norte da Europa e sem mutação no gene *HFE* (ADAMS et al., 2005).

Níveis elevados de ferritina têm sido descritos em beta talassêmicos heterozigóticos com mutações também em outros genes relacionados ao controle da homeostase do ferro (DE GOBBI et al., 2000; FARGION et al., 2000; PIPERNO et al. 2000; MELIS et al., 2002). No nosso estudo, os valores da saturação da transferrina e da ferritina foram semelhantes entre os talassêmicos avaliados com e sem mutações no gene *HFE*. Devido à alta frequência de heterozigotos para a mutação H63D, nossos resultados refletem, principalmente, a influência desse polimorfismo no perfil do ferro. O tipo de mutação beta talassêmica, β^0 ou β^+ , não modificou o perfil do ferro entre os beta talassêmicos avaliados, com e sem mutações no gene *HFE*, considerando os testes de correlação estatística.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem aumento da absorção do ferro e, talvez um papel protetor contra a deficiência de ferro em beta talassemia heterozigota, independente do tipo de mutação, CD 39 ou IVS 1-110. Em alguns indivíduos (7.2%) os níveis de ferritina estavam acima de 1000 ng/mL e a saturação de transferrina maior do que 45%, indicando uma maior probabilidade de sobrecarga de ferro. Portanto, esses portadores de beta talassemia heterozigota com aumento de ferritina devem ser monitorados, principalmente quando coexistam outros fatores relacionados ao acúmulo de ferro.

A presença dos polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não influenciaram os resultados obtidos para a saturação de transferrina e na ferritina sérica. Uma observação, entretanto, merece destaque, pois 80% dos beta talassêmicos heterozigotos com hiperferritinemia era portador do alelo nulo para *GSTM1* ou para ambos os alelos, *GSTM1* e *GSTT1*. O genótipo nulo para o gene *GSTM1* foi associado com maior deposição cardíaca de ferro, em pacientes com beta talassemia *major* (WU et al., 2006; ORIGA et al., 2008) e, em portadores de HbE/ β -talassemia, o genótipo nulo para os genes *GSTM1* e *GSTT1* foi relacionado com níveis mais elevados de ferro e ferritina séricos (SHARMA et al., 2009). Entretanto, no nosso estudo, a alta frequência de genótipos nulos em beta talassêmicos heterozigotos com hiperferritinemia pode estar relacionada ao número elevado desses genótipos no grupo avaliado.

Os tipos de mutações mais encontrados em portadores do traço talassêmico foram a CD39 e a IVS 1-110, sendo que essas duas mutações corresponderam a 82% dos indivíduos avaliados. Esses resultados são semelhantes aos observados em outras regiões do estado de São Paulo, porém diferentes dos obtidos no nordeste do Brasil, demonstrando a diversidade genética da população brasileira (BERTUSSO et al., 1997; ARAÚJO et al., 2003).

Apesar do tipo de mutação herdado, β^0 ou β^+ ser o fator preditor mais confiável do fenótipo da doença talassêmica (THEIN, 2005), os perfis hematológicos e do ferro foram semelhantes entre os portadores das mutações CD 39 (β^0) e IVS 1-110 (β^+), principalmente entre os homens. Todavia, nas mulheres os índices hematológicos, VCM e HCM, normalmente relacionados com a gravidade do fenótipo beta talassêmico, foram diferentes entre essas duas mutações, sugerindo a influência de fatores não detectados, provavelmente relacionados ao gênero.

5 Conclusões

Com base nesses resultados concluímos que a mutação no gene da β -globina mais frequente no estado de São Paulo é a CD 39, uma β^0 talassemia, sendo que a pesquisa de apenas três mutações, CD 39, IVS 1-110 e IVS 1-6, é suficiente para o diagnóstico molecular de 88% dos beta talassêmicos heterozigotos do estado de São Paulo. O perfil hematológico entre os tipos de mutações, β^0 e β^+ é influenciado pelo gênero e o perfil do ferro não é modificado pelo tipo de mutação no gene da beta-globina herdado, β^0 ou β^+ .

As mutações no gene *HFE* não influenciam os valores de saturação de transferrina e ferritina entre os β^0 e β^+ talassêmicos heterozigotos. Entretanto, mutações no gene da β -globina, em heterozigose, aumentam a absorção do ferro, diminuindo, em mulheres, a prevalência de anemia ferropriva e, em homens, aumento da prevalência de hiperferritinemia. Um pequeno número de beta talassêmicos heterozigotos apresenta níveis de ferritina acima de 1000ng/mL e saturação de transferrina maior do que 45% e devem ser monitorados para sobrecarga de ferro.

Beta talassêmicos heterozigotos, β^0 e β^+ , apresentam aumento do estresse oxidativo e alterações nos mecanismos antioxidantes, evidenciados pelos aumentos de TBARS e da atividade da GST, respectivamente.

O genótipo nulo para *GSTM1* e o polimorfismo heterozigoto para o alelo selvagem e mutante do gene *GSTP1* foram os mais frequentes entre os beta talassêmicos heterozigotos sendo que nenhum dos polimorfismos avaliados interferiram na atividade das enzimas, GST e CAT, na peroxidação lipídica e no perfil de ferro desses indivíduos. Não houve correlação entre as concentrações de ferritina e de TBARS e a atividade das enzimas GST e CAT.

Assim concluí-se que portadores de beta talassemia, mesmo em heterozigose, têm dano oxidativo e que a coerância com mutações no gene *HFE* e os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não influenciam o fenótipo dos beta talassemicos heterozigotos.

6 Referências gerais

ADAMS, P.C. et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1769-1778, 2005.

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

ARAND, M. et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. **Analytical Biochemistry**, v. 236, p. 184-186, 1996.

ARAÚJO, A. S. et al. A Different Molecular Pattern of β -Thalassemia Mutations in Northeast Brazil. **Hemoglobin**, v. 27, n. 4, p. 211-217, 2003.

BANK, A. Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's as simple as α , β , γ , δ . **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 6, p. 1470-1473, 2005.

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

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

BERTUZZO, C.S et al. Hematological phenotype and the type of thalassemia mutation in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20 p. 319-321, 1997.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism** A manual of Biochemical Methods. Third. ed. London: Grune & Stratton, Inc, 1984, 188 p.

BEUTLER, E; HOFFBRAND A. V.; COOK, J. D. Iron deficiency and overload. **Haematology**, v.1, p. 40-61, 2003.

BONINI-DOMINGOS, C. R. et al. Estudo de hemoglobinas anormais em doadores de sangue e recém-nascidos de São José do Rio Preto, SP. **NewsLab**, 41. ed, p. 92-98, 2000.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Thalassemia screening in Brazil – Results for 20 years. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 288-289, 2004.

BORGNA-PIGNATTI, C et al., Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. **Haematology**, v. 89, n. 10, p. 1187-1193, 2004.

BORGNA-PIGNATTI, C. The life of patients with thalassemia major. **Haematologica**, v. 95, n. 3, p. 345-348, 2010.

BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.

BRIDLE, K. R. et al. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and the liver as a regulator of body iron homeostasis. **Lancet**, v. 61, n. 9358, p. 669-73, 2003.

CAMASCHELLA, C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. **Blood**, v.106, n. 12, p. 3710-3717, 2005.

CAMASCHELLA, C; POGGIALI, E. Towards explaining “unexplained hiperritinemia”. **Haematologica**, v. 94, p. 307-309, 2009.

CAO, A. et al. Clinical experience of managenent of thalassemia. The Sardinian experience. **Seminars Hematology**, v.33, p. 66-75, 1996.

CHIANG, W.L. et al. Differential expression of gluthathione -S-transferase isoenzymes in various types of anemia in Taiwan. **Clinica Chimica Acta**, v. 375, p. 110-114 2007.

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

CONRAD, M. E; UMBREIT, J. N.; MOORE, E.G. Iron absorpion and transport. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 318, p. 213-229, 1999.

CUNNINGHAM, M. J. Update on Thalassemia: Clinical Care and Complications. **Pediatric Clinics of North America**, v. 55, n. 2, p. 447-460, 2008.

DE GOBBI, M. et al. Natural history of juvenile haemochromatosis. **British Journal of Haematology**, v. 117, p. 973-979, 2002.

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.

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

EASTMAN, J. W. et al. Automated HPLC screening of newborns for sickle cell, anemia and other hemoglobinopathies. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 704-710, 1996.

EDWARDS, C. Q. et al. Coincidental nontransfusional iron overload and thalassemia minor association with HLA linked hemochromatosis. **Blood**, Utah, v. 58, n. 4, p. 844-848, 1981.

EISENSTEIN, R. S.; BLEMININGS, K. P. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 2295-2298, 1998.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 55, p. 333-339, 2001.

ESTEVÃO, I. F. Frequência dos mutantes C282Y E H63D do gene *HFE* e sua influência no metabolismo do ferro e na expressão da beta talassemia heterozigota. Tese de mestrado em Genética. Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 2007.

ESTEVÃO, I.F. Valores de ferritina em beta talassemia heterozigota. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n.2, p. 171-172, 2010.

FARGION, S. et al. The iron status of Italian subjects with beta thalassemia trait. **Acta Haematologica**, v. 68, p. 109-114, 1982.

FARGION, S. et al. Iron overload in subjects with beta thalassemia trait. Role of idiopathic haemochromatosis gene. **British Journal of Haematology**, v. 61, 487 p., 1985.

FARGION, S et al. Thalassemias and their interactions with hemochromatosis gene. **British Journal of Haematology**, v. 61; p. 487-490, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

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

FLEMING, R. E.; BACON, B. R. Orchestration of iron homeostasis. **New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 11741-1744, 2005.

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.

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal Rare Diseases**, disponível em <http://www.orphandis.com/content/5/1/11>. Acesso em 26/07/2010.

GANZ, T. Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. **Hematology**, < www.asheducationbook.org/cgi/content/full/2006/1/29.

GAREWAL, G. et al. Prevalence of the H63D mutation of the HFE in north India: its presence does not cause iron overload in beta thalassemia trait. **European Journal of Haematology**, v. 74, n 4, p.333-336, 2005.

GRIFFITHS, W.J.H. Review article: the genetic basis of haemochromatosis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 331-342, 2007.

GRINBERG, L.N. et al. Hydroxyl radical generation in beta-thalassemic red blood cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.18, p. 611-615, 1995.

HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione S-Transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer, chemoprotection and drug resistance. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30 p. 445-600, 1995.

ISHII, T. et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) polymorphism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 54, p. 693-696, 1999.

KASSAB-CHEKIR A. et al. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 338, p.79-86, 2003.

KEARNEY S. L. et al. Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 48, n. 1, p. 57-63, 2007.

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

KOHEN, R., NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, anti-oxidants redox reactions and methods for their quantification, **Toxicologic Pathology**, v. 30, p. 620-650, 2002.

KONDO, S. et al. *GSTM1* and *GSTT1* null polymorphisms and risk salivary gland carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, p. 68-75, 2009.

LANG, K.S. et al. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and dehydrogenase deficiency. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.12, p. 365-372, 2002.

LEE, R. G. et al. Wintrobe's Clinical Hematology. In: LUKES J. **The Thalassemias and related disorders of hemoglobin synthesis**. 10. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. v. 1, p. 1405-1448.

LEE, R. G. et al. Wintrobe's Clinical Hematology. In: DESSYPRIS E. N. **Erythropoiesis**, 10. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. v. 1, p. 169-192.

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.

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.

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

MARIA, C. et al. Erythrocytes anion transport and oxidative change in Beta-thalassemia. **Cell Biology International**, v. 34, p.655-662, 2010.

MARTINS, R. et al. The role of *HFE* on iron metabolism in beta thalassemia carriers. **Journal of Human Genetics**, v.49, p. 651-655, 2004.

MCLAREN, G. D; GORDEUK, V. R. Hereditary hemochromatosis : insights from the hemochromatosis and iron overload screening (HEIRS) study. **Hematology**, <<http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/content/full/2009/1/195>>

MELIS, M. A. et al. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. **Haematologica**, Cagliari, v. 87, n. 3, p. 242-245, 2002.

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

MO, Z. et al. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. **The Prostate**, v. 69, p. 662-668, 2009.

MODELL, B. et al. Improved survival of thalassaemia major in the UK and relation to T 2* cardiovascular magnetic resonance. **Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance**, v. 10, n.1, p. 42, 2008.

NAITHANI, R. et al. Peroxidative stress and antioxidant enzymes in children with thalassemia major. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 46, p. 780-785, 2006.

NICOLAS G. et al. Constitutive hepcidina expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. **Nature Genetics**, v. 34, p. 97-101, 2003.

NUSSBAUM, R. L. et al. Genética Médica. In:_____. **Fundamentos das Doenças Moleculares: Lições das Hemoglobinopatias**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 158-177.

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

ORIGA, R.; SATTA, S.; GALANELLO, R. Glutathione S-transferase gene polymorphism and cardiac iron overload in thalassaemia major. **British Journal of Haematology**, v. 142, p. 143-145, 2008.

PAIVA, A. A.; RONDÓ, P. H. C; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Parâmetros para a avaliação nutricional de ferro. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p. 421-426, 2000.

PEARSON, H. A. et al. Erythrokinetic studies in thalassemia trait. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 56, p. 866, 1960.

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

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

PINHEL, M. A. S. et al. Glutathione S-transferase variants increase susceptibility for late-onset Alzheimer's disease: association study and relationship with apolipoprotein E epsilon4 allele. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 4, p. 439-445, 2008.

PIPERNO A. et al. Haemochromatosis in patients with β -thalassaemia trait. **British Journal of Haematology**, Monza, v. 111, p. 908-914, 2000.

POOTRAKUL, P. et al. A correlacion of erythrokinetics ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in Thai patients with thalassemia. **Blood**, v. 96, p. 2606-2612, 2000.

PREMAWARDHENA, A. et al. Is the β thalassaemia trait of clinical importance? **British Journal of Haematology**, v. 141, p. 407-410, 2008.

REES, D. C. et al. Nontransfusional iron overload in thalassemia. Association with hereditary hemochromatosis. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 30, n. 850, p. 490-494, 1998.

RIVA, A. et al. Type 3 hemochromatosis and beta-thalassemia trait. **European Journal of Haematology**, Monza, v. 72, n. 5, p. 370-374, 2004.

RUIZ-ARGUILLES, G. J. et al. Heterozygosity for the H63D mutation in hereditary hemochromatosis (HFE) gene may lead into severe iron overload in beta-thalassemia minor: observations in a thalassemic kindred. **Revista de Investigación Clínica**, Puebla, v. 53, n. 2, p. 117-120, 2001.

RUND, D. et al. Mean corpuscular volume of heterozygotes for β thalassemia correlates with the severity of mutations. **Blood**, Jerusalém, v. 79, n. 1, p. 238-243, 1992.

RUND, D.; RACHMILEWITZ, E. Beta-Thalassemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 1135-1146, 2005.

SAMBROOK, J et al. Molecular cloning; a laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York, 1989.

SELEK, S. et al. Oxidative status and serum PON1 activity in beta-thalassemia minor. **Clinical Biochemistry**, v. 40 p. 287-291, 2007.

SHAYEGHI, M. et al. Identification of an intestinal heme transporter. **Cell**, v. 122, p. 789-801, 2005.

SHARMA, V. et al. Transport of glutathione-conjugates in human erythrocytes. **Acta Biochimica Polonica**, v. 47, n. 3, p. 751-762, 2000.

SHARMA, V; KUMAR B; SAXENA R. Glutathione S-transferase gene deletions and their effect on iron status in HbE/ β thalassemia patients. **Annals of Hematology**, v. 89, p. 411-414, 2009.

SHEINER, E. et al. Beta-thalassemia minor during pregnancy. **Obstetrics and Gynecology**, v. 103 p. 1273-1277, 2004.

SHINAR, E., RACHMILEWITZ, E.A. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. **Seminars in Hematology**, v. 27, p.70-82, 1990.

SINISCALCO, M. et al. Population genetics of haemoglobin variants, thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, with particular reference to the malaria hypothesis. **Bull WHO**, v. 34, p. 379, 1966.

SKARMOUTSOU, C. et al. Erythroid bone marrow activity and red cell hemoglobinization in iron-sufficient β -thalassemia heterozygotes as reflected by soluble transferrin receptor and reticulocyte hemoglobin content. Correlation with genotypes and Hb A₂ levels. **Haematologica**, v.88, n. 6, p. 631-636, 2003.

SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Genética das doenças Hematológicas. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. S40-S51, 2008.

SRIVASTAVA, A. et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism: a risk factor for hepatic venoocclusive disease in bone marrow transplantation. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1574-1577, 2004.

TAKESHITA, K. Thalassemia Beta. Disponível em: < <http://www.emedicine.com/med/> > Acesso em 25 de junho de 2010.

TANNO T; MILLER, J. L. Iron loading and overloading due to ineffective erythropoiesis. **Advances in Hematology** < <http://www.hindawi.com/journals/ah/2010/358283/> >

THEIN, S. L. Molecular Basis of disease – Thalassemia syndrome. **Haematologica**, v. 90, p. 649-660, 2005.

TSATALAS, C. et al. Pregnancy in beta-thalassemia trait carriers: an uneventful journey. **Hematology**, v. 14 p. 301-303, 2009.

VALENTI, L. et al. Beta-globin mutations are associated with parenchymal siderosis and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 53, p. 927-933, 2010.

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.

WALTER, P. B. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassaemia or sickle disease. **British Journal of Haematology**, v. 135, n. 2, p. 254-263, 2006.

WEATHERALL, D.J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. **Nature Reviews Genetics**, v.2, p. 245-255, 2001.

WEATHERALL, D. J. Current trends in the diagnosis and management of haemoglobinopathies. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 67, p. 1-2, 2007.

WHITE, J.M. et al. Thalassaemia trait and pregnancy. **Journal Clinical Pathology**, v. 38 p. 810-817, 1985.

WU, K. H. et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphisms are associated with cardiac iron deposition in patients with beta-thalassemia major. **Hemoglobin**, v. 30, n. 2, p. 251-256, 2006.

YENCHITSOMANUS, P.; WASI, P. Increased erythrocyte superoxide dismutase activities in β^0 -thalassaemia/haemoglobin E and in haemoglobin H diseases. **Journal Clinical Pathology**, v. 36, p. 329-333, 1983.

YOU, S. A.; WANG, Q. Ferritin in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 357, p. 1-16, 2005.

ZAGO, M. A. et al. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. **Human Heredity**, v. 33, n. 2, p. 125-129, 1983.

ANEXO I

Métodos

1 Cromatografia líquida de alta performance (Instruction Manual of BIO-RAD, 2006)

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. 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 hemoglobina. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

Procedimento:

Para o Kit Beta Thalassemia Short:

Em um tubo de 1,5mL, fornecido pelo fabricante, foram misturados 5µL de sangue total com 1,0mL 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 hemoglobinas 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 hemoglobina A₀ obtidos pela HPLC foram incluídas as subfrações de hemoglobina A glicosilada e hemoglobina A acetilada, denominadas P2 e P3 respectivamente, identificadas separadamente pelo aparelho. Os valores de hemoglobina A₂ considerados normais foram de 2,0 a 3,5% e os de hemoglobina fetal até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

2 Metodologias moleculares**2.1 Extração de Sangue Periférico (SAMBROOK, et al., 1989)**

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	10,95g
Tris HCl 10mM	1mL
MgCl ₂ 5mM	0,5mL
Triton 1% 100x	1mL
Água ultrapura q.s.p.	100mL

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

0,075M de NaCl 2,19g

0,02M de EDTA 20mL

Água ultrapura q.s.p 500mL

3. Proteinase K (20 mg/mL)

Proteinase K 20mg

Água ultrapura q.s.p. 1mL

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

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

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

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

2.2 Preparo de Géis:

2.2.1 Gel de Agarose

Agarose ultrapura

TEB 1x

Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

2.2.2 Gel de poliacrilamida 6%

Reagentes

acrilamida/bis acrilamida 40%	6mL
água destilada	30 mL
TEB 10x	4 mL
persulfato de Amônio	220µL
TEMED	22µL

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

Preparo das amostras:

Em cada tubo foram colocados 2 μ L de tampão de carregamento e 4 μ L de amostra de DNA.

2.3 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 ultrapura

DNA polimerase com tampão e cloreto de magnésio

DMSO

dNTP

Iniciadores (*primers*) - desenhados de acordo com a técnica a ser desenvolvida

2.3.1 Identificação das mutações para a talassemia beta por PCR alelo específica (BERTHOLO; MOREIRA, 2006)

Para a identificação das mutações CD39, IVS I-110 e IVS I-6, o DNA foi amplificado a partir de duas misturas. Esta metodologia utiliza três *primers* para cada mix. Um dos mix é composto por um par de *primers* específicos: B5a 5'-GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC-3' (*sense*) e B5b 5'-AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA-3' (*antisense*) para o segmento de DNA de interesse, e o *primer* específico para a mutação. O outro mix utiliza os iniciadores B5a e B5b e o *primer* específico para o alelo normal.

Para a identificação da mutação CD39 foram utilizados os *primers* PS39W 5'-GAC TCA AAG AAC CTC TG-3' (*antisense*) que amplifica o alelo normal e

o PS39M 5'-GAC TCA AAG AAC CTC TA-3' (*antisense*) para a amplificação do alelo mutante, os quais produzem um fragmento de 439 pb. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por sete minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 50 segundos, 54°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos; seguida de uma extensão final a 72°C por sete minutos.

A identificação da mutação IVS-I-110 foi realizada utilizando-se os *primers* TB110W 5'-GGG TGG GAA AAT AGA CC-3' (*antisense*) que amplifica o alelo normal e TB110M 5'-GGG TGG GAA AAT AGA CT-3' (*antisense*) que amplifica o alelo mutante, os quais produzem um fragmento de 377 pb. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por sete minutos, acrescida de 32 ciclos de 94°C por 50 segundos, 58°C por 50 segundos, 72°C por 50 segundos; seguida de uma extensão final a 72°C por sete minutos.

A mutação IVS-I-6 foi pesquisada utilizando-se os *primers* IVSI6W 5' - GTC TTG TAA CCT TGA TA- 3' (*antisense*) que amplifica o alelo normal e IVSI6M 5' -GTC TTG TAA CCT TGA TG- 3' (*antisense*) que amplifica o alelo mutante, os quais produzem um fragmento de 273 pb. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por sete minutos, acrescida de 35 ciclos de 94°C por 50 segundos, 54°C por 50 segundos, 72°C por um minuto; seguida de uma extensão final a 72°C por sete minutos.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, sob corrente constante de 80V por 40 minutos e evidenciados com brometo de etídio sob luz UV.

2.3.2 Avaliação dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* por PCR multiplex (ARAND et al., 1996; PINHEL et al., 2008)

A pesquisa dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada por meio da técnica de PCR multiplex. Os segmentos são amplificados a partir dos seus segmentos específicos e necessitam de uma banda controle, gerada pela amplificação do gene *CYP1*

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

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

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

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

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

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

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

O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por quatro minutos, acrescida de 40 ciclos de 94°C por dois minutos, 59°C por um minuto, 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final a 72°C por dez minutos. Os genótipos nulos (ambos os alelos com deleção) para os genes *GSTM1* e *GSTT1* foram identificados pela ausência dos fragmentos de amplificação de 218 pb e 459 pb, respectivamente, separado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 100V por 40 minutos e evidenciados com brometo de etídio sob luz UV.

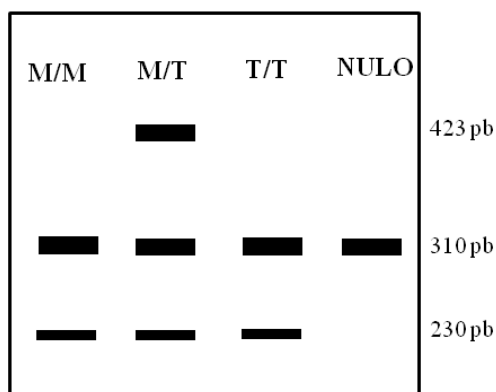


Figura 2. Representação esquemática dos produtos da PCR multiplex para *GSTM1* e *GSTT1*.

M/M = presença do alelo para *GSTM1* e ausência de alelo para *GSTT1*

T/T = presença do alelo para *GSTT1* e ausência de alelo para *GSTM1*

M/T = presença dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*

NULO = ausência para os alelos de *GSTM1* e *GSTT1*

2.3.3 Avaliação do polimorfismo *GSTP1* por PCR/RFLP (ISHII et al., 1999; PINHEL et al., 2008)

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

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

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

O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por quatro minutos, acrescida de 40 ciclos de 94°C por dois minutos, 59°C por um minuto, 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

O produto de amplificação da PCR foi submetido à enzima de restrição *Bsm*I, isômero da enzima *Alw* 26I (5U), da New England BioLabs, que elimina um sítio de restrição. O produto da amplificação após o adicionamento da enzima é colocado em banho Maria à 37° C, por 4 horas, para clivagem das sequências em regiões específicas. Após digestão, o alelo normal gera um fragmento de 176 pb e o alelo mutante gera dois fragmentos, um de 91 pb e outro 85 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel poliacrilamida 6% sob corrente constante de 120 V por 45 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio por 5 minutos.

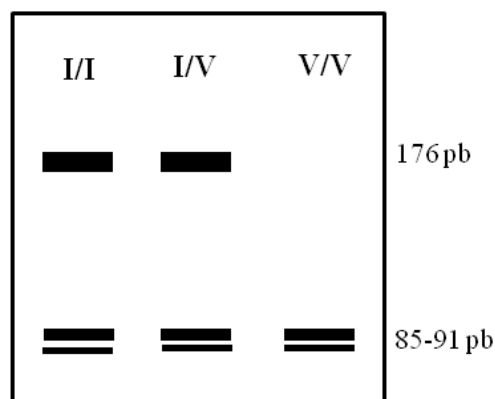


Figura 3. Representação esquemática dos produtos da PCR - RFLP para *GSTP1*.

I/I = presença dos alelos isoleucina (homozigoto selvagem)

I/V = presença do alelo isoleucina e alelo valina (heterozigoto) I/V = presença do alelo isoleucina e alelo valina (heterozigoto)

V/V = presença dos alelos valina (homozigoto mutante)

2.3.4 Identificação das mutações no gene HFE (LYNAS, 1997)

A pesquisa das mutações C282Y e H63D do gene *HFE* foi realizada pelo método PCR-RFLP.

Para a identificação da mutação C282Y foram utilizados os *primers sense* R 282 (5' CTG AGG CAC TCC TCT CAA CC 3') e o *anti-sense* L (5' GGG TAT TTC CTT CCT CCA AC 3') e para a identificação da mutação H63D foram utilizados os *primers sense* R 63 (5' ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3') e o *anti-sense* L (5' ACA TGG TTA CCT GTT GC 3').

Para amplificação, foram utilizados 5 µL de DNA numa reação de PCR contendo tampão de 1X (Invitrogen), 1,6 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, uma unidade de *taq* polimerase (Invitrogen) e 0,25 µM de cada *primer*. Os produtos foram amplificados em termociclador I Cycler (Bio-Rad) com desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 32 ciclos de 95°C por 45 segundos, acrescidos de 58°C, por 30 segundos e 72°C por 1 minuto com extensão final de 72°C por 5 minutos.

A digestão enzimática dos produtos amplificados foi obtida com a utilização das enzimas *Bcl I*, para a mutação H63D e, *Rsa I* para a C282Y. As análises dos produtos de amplificação e de digestão para H63D foram realizadas em gel de agarose a 2%, em corrida de 80 volts por 30 minutos, corados com brometo de etídio 0,2%. As análises dos produtos de digestão para C282Y foram realizadas em gel de poliacrilamida, em corrida de 80 volts por 70 minutos, corados com solução de nitrato de prata (Figura 4).

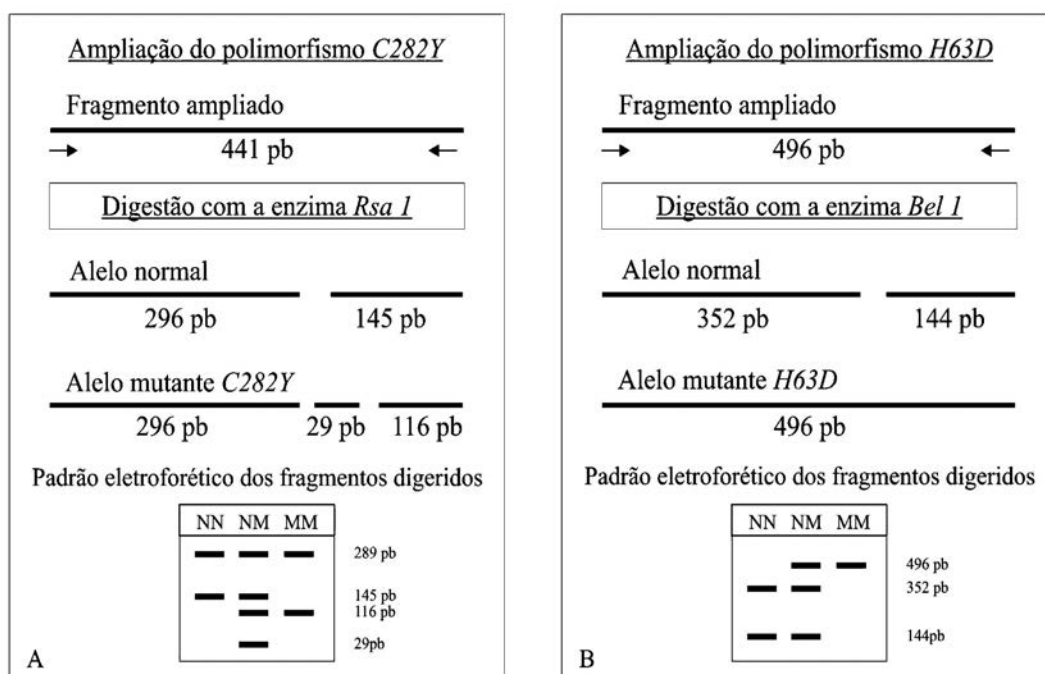


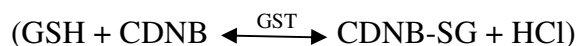
Figura 4. Representação esquemática dos produtos de amplificação e digestão dos polimorfismos C282Y e H63D.

3 Análises Bioquímicas

3.1 Determinação da atividade enzimática da GST (KEEN et al., 1976)

As amostras de sangue foram diluídas a 20 vezes em solução hemolisante e a atividade da GST será feita pelo método de Keen et al., (1976). A amostra diluída foi adicionada em um meio de reação contendo 1 mM de 1-cloro-2,4-

dinitrobenzeno (CDNB), 1 mM de GSH ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), e o aumento de absorbância foi acompanhado a 340 nm.



Preparo das amostras:

Solução Salina 0.9%

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

Solução hemolisante

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

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

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

KH ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio Monobásico)	13,605 g
K ₂ H ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio Dibásico)	17,42 g
H ₂ O destilada	1 litro
Ajustar o pH para 6,5	

Análise

Referência: 1mL de Solução tampão Fosfato de Potássio

Hidrólise espontânea

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

Ensaio Enzimático

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

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

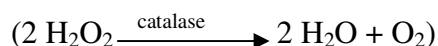
$$\left[\frac{\left[\frac{\text{Absorbância/minuto}}{9,6} \right]}{\text{Volume da amostra}} \right] \times 1000 \quad \times \text{diluição}$$

A atividade da GST total também foi expressa em mU/mg de proteínas, de acordo com a fórmula abaixo. As concentrações de proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

$$\left[\frac{\left[\frac{\text{Absorbância} \times 1000}{9,6 \times \text{volume}} \right]}{\text{Proteínas}} \right] \times 1000$$

3.2 Determinação da atividade enzimática da Catalase (BEUTLER, 1975)

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



Preparo das amostras

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

Preparo do tampão Tris-HCl 1M, pH 8,0 contendo EDTA 0,5 mM

Tris(hidroximetil)aminometano 30,27g

EDTA 0,365g

H₂O destilada 250 mL

Ajustar o pH para 8,0 com HCl.

Análise

Referência: 1 mL de H₂O Ultrapura

Meio de Reação (10 mM H₂O₂)

Adicionar 250 µL de H₂O₂ 3% em 25mL de H₂O Ultra Pura; descartar uma alíquota de 2,5 mL e adicionar 1,25mL do tampão Tris-HCl. EDTA e 1,25mL de H₂O Ultra Pura

Ensaio Enzimático

Meio de reação 990 µL

Amostra (hemolisado) 10 µL

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

$$\left[\left[\frac{\text{Absorbância/minuto}}{0,071} \right] \times 1000 \right] \times \text{diluição}$$

A atividade da CAT também foi expressa em U/mg de proteínas, de acordo com a fórmula abaixo. As concentrações de proteínas totais foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

$$\left[\frac{\left[\frac{\text{Absorbância} \times 1000}{0,071 \times \text{volume}} \right]}{\text{proteína}} \right]$$

3.3 Dosagem de TBARS (PERCÁRIO et al., 1994)

A dosagem de TBARS é baseada na reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535nm. Esta dosagem pode ser realizada em soro, plasma, líquidos corporais e homogenados de tecido.

Reagentes:

Água ultrapura ou água destilada

Cloreto de Potássio (KCl) 1,15%

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

Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10nM

Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20 μ M

Álcool n-Butílico

Preparo do plasma:

O sangue foi coletado em tubo heparinizado e identificado. Permaneceu por um período de 20 minutos em descanso, sob Banho Maria a 38°C. Após, centrifugar a 1500 rpm, durante 20min. Foi separado em recipiente (tudo 1,5mL) devidamente identificado de acordo com o protocolo de identificação de peças da pesquisa 1mL (ou mais) de plasma (quantidade mínima aceitável 800 μ L) que estará pronto para a dosagem de TBARS.

Preparo final dos controles e amostras:

Está é a etapa final de preparação, a qual antecede a leitura dos valores de absorbância em espectrofotômetro. Não esquecer que o reagente TBA deverá ser sempre preparado no dia da dosagem de TBARS, 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 recebeu nesse momento 0,5ml (500 μ L) de água destilada. Estes serão os tubos de controle branco.

O tubo de ensaio de número 2 recebeu 0,5mL (500 μ L) da Solução Padrão MDA 20 μ M. Estes serão os tubos de controle padrão MDA.

Por fim, os tubos de ensaio de número 3 em diante deverão receber 0,5mL (500 μ L) das amostras.

Após a pipetagem das amostras, todos os tubos devem foram colocados em Banho Maria à temperatura de 94°C, onde permaneceu 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 a 94°C, as amostras foram resfriadas. Durante este tempo já se observará uma coloração transparente nos tubos 1 (controle branco) e rósea nos tubos 2 (controle padrão MDA).

Terminado o resfriamento, acrescentou a cada tubo de ensaio 4mL do reagente álcool n- Butílico. Nessa etapa, foi usado um dispensador automático de 4mL.

Os tubos foram cuidadosamente tampados com rolhas apropriadas. A seguir, cada um deles, individualmente, foi misturado em agitador de tubos tipo vortex, para que haja a máxima extração de TBARS para a fase orgânica. Por fim, centrifugou os tubos a 2500 rpm durante 10 minutos. Terminado a centrifugação a amostra obteve duas fases. Uma ao fundo, transparente e límpida e outra mais superficial de coloração mais ou menos rósea, de acordo com a quantidade de TBARS na amostra.

Foram retirados 3mL da fase mais superficial e realizou-se a leitura em 535nm no espectrofotômetro.

Cálculo do valor de TBARS da amostra:

O valor final em ng/ml (ou nmol/ml) é obtido pelo emprego da seguinte fórmula:

TBARS = A média x F, onde:

A média = (A1+A2)/2

F = ([padrão MDA] x 440,61)/ A padrão MDA, como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10nM temos:

F = 10 x 440,61/ A padrão MDA,

F = 4406,1/A padrão MDA

ANEXO II

Artigo publicado

Carta ao Editor / Letter to Editor

Valores de ferritina sérica em beta talassemia heterozigota

Serum ferritin levels in beta thalassemia carrier

Isabeth F. Estevão¹

Maria Cristina S. Souza²

Antonio J. Manzato³

Claudia R. Bonini-Domingos⁴

¹Médica hematologista. Preceptora de Clínica médica da UFSCar
²Biomédica do Laboratório Unilab, São Carlos-SP

³Professor. Departamento de Ciências da Computação e Estatística - Unesp, Campus de São José do Rio Preto SP

⁴Bióloga. Professora do Depto. de Biologia, Unesp, São José do Rio Preto-SP

Sr. Editor

Estima-se que 1,5% a 3% da população mundial sejam portadores do traço talassêmico.¹ No Brasil, a incidência depende da região avaliada. No estado de São Paulo acredita-se que 2% dos indivíduos sejam portadores dessa alteração de hemoglobinas.²

Os heterozigotos geralmente são assintomáticos e o quadro hematológico se caracteriza por diminuição dos níveis de hemoglobina (Hb), redução do volume corpuscular médio (VCM), sendo frequentemente confundida com anemia ferropriva. O diagnóstico diferencial é realizado pela avaliação dos índices hematológicos, análise morfológica do sangue periférico e quantificação das Hb A2 e Hb Fetal.³ A avaliação da ferritina sérica é fundamental para a discriminação diagnóstica.

Os níveis de ferro podem ser influenciados pelo aumento na absorção, pela baixa excreção e por mecanismos que regulem esse processo.^{4,5,6} A deficiência está relacionada a estados mórbidos, como alterações neurológicas, complicações obstétricas e do recém-nascido, incapacidade para o trabalho e imunodeficiência.^{5,6,7} Os grupos mais suscetíveis são as crianças entre 1 e 3 anos de idade, adolescentes, mulheres em idade fértil e idosos.^{8,9}

Com o objetivo de comparar os níveis de ferritina sérica entre mulheres portadoras e não portadoras de beta talassemia heterozigota, avaliamos 137 mulheres no período de um ano, 63 com diagnóstico de beta-talassemia heterozigota e 74 com

hemoglobinas normais (Hb AA). Esse foi um estudo retrospectivo, fundamentado em observação clínica de que portadoras de beta talassemia heterozigota apresentavam valores de ferritina aumentados. A seleção das mulheres foi aleatória e segundo a sua busca por consulta médica. Nesse momento foram orientadas sobre a pesquisa e, após o consentimento, incluídas no estudo. Os critérios de inclusão no grupo das não portadoras foram o nível de Hb igual ou superior a 12g/dL e o VCM entre 80 e 100 pg, e os de exclusão, para ambos os grupos, o uso de medicamentos à base de ferro há pelo menos um mês e a presença de doenças inflamatórias e/ou neoplásicas. As idades encontravam-se entre 10 e 49 anos.

O diagnóstico de beta talassemia foi baseado em hemograma (Pentras 120 Retic-Horiba ABX), na quantificação das Hb A2 e Hb Fetal por HPLC (Bio-Rad) e na análise morfológica de sangue periférico. A dosagem de ferritina sérica foi realizada por quimioluminescência e esses resultados analisados estatisticamente pelo teste de Mann Whitney.

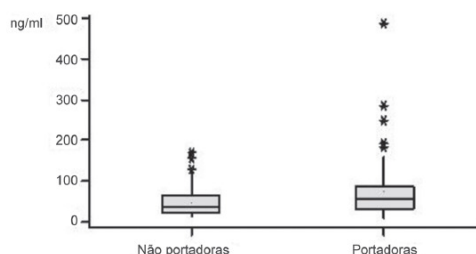
No grupo de mulheres não portadoras de talassemia beta *minor*, a idade variou de 10 a 48 anos, com média de 31,5 anos, e entre as portadoras de talassemia, de 12 a 49 anos, com média de 28,48 anos. Os valores de Hb e VCM, utilizados para a separação dos grupos, estão descritos na Tabela 1 e evidenciam as diferenças inerentes à beta talassemia heterozigota.

O valor de ferritina sérica variou de 5,00 a 489,49 ng/mL com mediana de 51,90 nas portadoras de beta talassemia e de 7,09 a 170,00 ng/mL com mediana de 31,60 nas não portadoras. Valores acima de 150 ng/mL foram observados em sete (11%) mulheres com talassemia e, em apenas duas (3%) do grupo com Hb AA, encaminhadas para avaliação de hemocromatose. Em 10 (16%) talassêmicas e em 20 (27%) não talassêmicas foram encontrados valores abaixo de 20 ng/mL indicando deficiência de ferro, posteriormente investigada. A avaliação estatística dos níveis globais de ferritina sérica mostrou diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,0052$) conforme ilustra a Figura 1.

Na beta talassemia heterozigota, geralmente a eritrocina é normal, podendo ocorrer discreta diminuição da sobrevida dos eritrócitos e leve eritropoese ineficaz. Todavia, alguns estudos têm demonstrado a presença de sobrecarga de ferro nesses pacientes.^{10,11,12} A fisiopatologia dessa associação não está esclarecida e sugere-se um sinergismo entre as mutações nos genes que codificam proteínas relacionadas à absorção de ferro e a beta talassemia.^{11,12} A diferença de ferritina entre os dois grupos estudados sugere maior poder

Tabela 1. Valores médios, mínimos e máximos de hemoglobina e VCM das mulheres avaliadas, portadoras de beta talassemia heterozigota e de Hb AA, para a definição dos grupos de estudo

Grupos	Hemoglobina (g/dL)				Volume corpuscular médio (pg)			
	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Beta Tal	9,2	13,2	11,04	0,94	57	71,6	63,7	3,2
Hb AA	12	14,6	12,9	0,67	80,5	93,7	86,4	3,3



de absorção do ferro intestinal em portadoras de beta talassemia heterozigota. Em algumas situações, como em gestantes, crianças, adolescentes e mulheres que menstruam, podem acarretar uma vantagem seletiva.¹² Por outro lado, quando não existe aumento das necessidades de absorção, há o risco do desenvolvimento de sobrecarga e, eventualmente, dano orgânico.

A heterogeneidade dos valores encontrados e a não correlação com os níveis de hemoglobina sugerem que esse aumento da absorção possa ser não só pela hemólise e eritropoese ineficaz desencadeada pela talassemia. Portanto, há necessidade de investigação de possíveis fatores genéticos e/ou ambientais que possam influenciar o mecanismo de absorção em talassêmicos do tipo beta heterozigotos.

Abstract

A low iron level, the commonest nutritional deficiency in the world, is a public health problem in developing countries. On the other hand, an excessive amount of iron is toxic, causing several organic dysfunctions, such as diabetes, cirrhosis, endocrinopathies and heart disease. Researchers have reported an association of iron overload with beta-thalassemia. The aim of this paper was to compare the serum ferritin levels of women with the beta-thalassemia trait. The results of serologic tests of 137 women of childbearing age were analyzed; 63 had the beta-thalassemia trait and 74 had Hb AA. In the beta-thalassemia carriers, the median ferritin value was 51.90 ng/mL and in the non-carriers 31.60 ng/mL ($p = 0.0052$). Levels of less than 20 and above 150 ng/mL were observed in 28% and 3% of the non-carriers and in 16% and 11% of the carriers, respectively. With these results it is possible to conclude that women in the reproductive age with the beta-thalassemia trait present higher ferritin levels in the northeastern region of São Paulo State. Further studies are necessary to clarify possible genetic and/or environment factors which interfere in iron absorption. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010;32(2):171-172.

Key words: Beta-thalassemia; ferritins; iron deficiency.

Referências Bibliográficas

- Galanello R, et al. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders. Nicosia: Thalassaemia International Federation Publications. 2003;1:190p.
- Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007;29(3):203-6.
- Clark BE, Thein SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin Lab Haematol. 2004;26(3):159-76.
- Andrews NC. Molecular control of iron metabolism. Best Pract Res Clin Haematol. 2005;18(2):159-69.
- Ganz T, Nemeth E. Iron imports. VI. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006;290(2):G199-203.
- Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis. Biochim Biophys Acta. 2006;1763(7):700-10.
- Booth IW, Aukett MA. Iron deficiency in infancy and early childhood. Arch Dis Child. 1997;76(6):549-54.
- De Maeyer EM. Preventing and controlling iron deficiency in infancy anaemia through primary health care. Geneva: WHO; 1989.
- Hallberg L, et al. Screening for iron deficiency: an analysis base on bone marrow examinations and serum ferritin determinations in a population sample of women. Br J Haematol. 1993;85(4):787-98.
- Melis MA, Cau M, Deidda F, Barella S, Cao A, Galanello R. H63D mutation in the HFE gene increases iron overload in beta-thalassemia carriers. Haematologica. 2002;87(3):242-5.
- Riva A, Mariani R, Bovo G, Pelucchi S, Arosio C, et al. Type 3 hemochromatosis and beta-thalassemia trait. Eur J Haematol. 2004;72(5):370-4.
- Martins R, Picanço I, Fonseca A, Ferreira L, Rodrigues O, Coelho M, et al. The role of HFE mutations on iron metabolism in beta-thalassemia carriers. J Hum Genet. 2004;49(12):651-5.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: sem conflito de interesse

Recebido: 26/10/2009
Aceito após modificações: 01/02/2010

Unesp – Campus de São José do Rio Preto. Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas

Correspondência: Isabeth da Fonseca Estevão
Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas,
Departamento de Biologia
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jd Nazareth
13054-000 – Unesp – Campus de São José do Rio Preto-SP – Brasil
Tel.: /Fax (55 17)3221-2392.
E-mail: isabeth@terra.com.br

ANEXO III

Aceite de artigo para publicação



Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2010.

Prezada Profa. Dra. Isabeth da Fonseca Estevão,

O artigo “Serum ferritin and transferrin saturation levels in β^0 and β^+ thalassemia trait”, (GMR 1016), foi aceito para publicação na Genetics and Molecular Research (GMR), e revisado por nosso editor técnico, a fim de manter a qualidade de nossa revista.

Peço, neste momento, que **reveja cuidadosamente o texto** (arquivo anexo) e incorpore as modificações sugeridas. Caso não aceite alguma, informe-nos em folha separada.

Por favor, devolva- nos o mais rápido possível a versão final do artigo.

Aproveito a oportunidade para solicitar o pagamento da taxa de R\$ 1.000,00 referente aos custos de publicação do artigo (GMR 1016).

Ratifico que a revista não recebe auxílio de qualquer natureza de órgãos públicos ou privados, por isso, solicitamos aos autores que colaborem conosco e com a manutenção da GMR.

Seguem as informações para pagamento via depósito bancário:

Banco do Brasil - Ag. 3312-x - C/C 160.314-0

Em favor de Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto

Assim que o depósito for realizado, favor encaminhar comprovante de pagamento e os dados para emissão da Nota Fiscal (nome/instituição, CPF/CNPJ, endereço de emissão e envio da nota). **Não esqueça de identificar, ao enviar a cópia do comprovante, o número do seu artigo GMR 1016.**

Contando com sua compreensão, agradecemos.

Atenciosamente,

Francine Muniz

Coordenadora editorial (Mtb 44.300)

Genetics and Molecular Research

www.funpecrp.com.br/gmr

Tel. (16) 3620-1251 – Fax. (16) 3621-1991

RESUMO

Resumo

A beta talassemia heterozigota pode ser decorrente de mutações β^0 ou β^+ , de acordo com ausência ou redução na produção das cadeias da beta globina, respectivamente. Poucos estudos na literatura correlacionam possíveis efeitos deletérios dessas mutações, quando em heterozigose. A coerância com mutações em genes, não localizados no cluster do gene da β -globina, podem modificar o fenótipo talassêmico. O estresse oxidativo gerado pelo aumento de ERO é um dos mecanismos responsáveis pela aceleração da apoptose celular. Há evidências que o excesso de cadeias alfa, mesmo em pequenas quantidades, seja suficiente para iniciar a geração de ERO e, portanto, estresse oxidativo em beta talassêmicos heterozigotos. Nas formas homozigotas ou com dupla heterozigose os pacientes apresentam anemia grave, transfusão dependente, e a sobrecarga de ferro é uma das mais frequentes e graves complicações nesses indivíduos. Na forma heterozigota a ocorrência de sobrecarga de ferro é rara, porém alterações no perfil do ferro são observadas. O objetivo desse trabalho foi analisar a influência dos níveis de ferritina sérica, das mutações no gene da β -globina, das mutações no gene *HFE*, da atividade das enzimas de detoxificação GST e CAT e dos polimorfismos das GSTs na expressão fenotípica de indivíduos beta talassêmicos heterozigotos.

Foram avaliados 158 portadores de beta talassemia heterozigota diagnosticados previamente por metodologias clássicas. Todos adultos, de origem caucasóide, residentes na região Central do Estado de São Paulo e acompanhados em serviços públicos ou privados da região. O grupo controle foi composto de 24 adultos, caucasóides e residentes na mesma região. A avaliação hematológica foi realizada pelo hemograma, em contadores automatizados de células e quantificação das sub frações de Hb A₂ e Hb F por HPLC. O perfil de ferro foi baseado na saturação de transferrina, calculada pela dosagem do ferro sérico e pela capacidade de ligação total do ferro, obtidos por técnica enzimática e a ferritina por quimioluminescência. A determinação da atividade das enzimas GST, CAT e a concentração de TBARS foram realizadas por espectrofotometria e a dosagem da

proteína C-reativa pela técnica de imunoturbilometria. A pesquisa das mutações beta talassêmicas foi realizada por PCR-AE, das mutações no gene *HFE* e do polimorfismo *GSTP1* por PCR-RFLP e dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* por PCR multiplex. As concentrações de Hb A₂ foram maiores em β^0 talassêmicos, porém os valores de VCM e HCM foram menores, apenas em mulheres com β^0 talassemia. A saturação da transferrina e a ferritina foram semelhantes entre β^0 e β^+ talassemia, com ou sem mutações no gene *HFE*. A atividade enzimática da GST foi maior entre talassêmicos e não diferiu para as mutações do gene da β -globina. Não houve diferença significativa na atividade da CAT entre talassêmicos e controles. A concentração de TBARS foi maior no grupo talassêmico do que no controle. Os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não influenciaram as concentrações da ferritina, da saturação da transferrina, de TBARS e das atividades das enzimas GST e CAT. Não foram observadas correlações estatísticas entre os valores de ferritina e TBARS e a atividade das enzimas GST e CAT. Assim conclui-se que portadores de beta talassemia heterozigota têm dano oxidativo, que a enzima GST é importante no controle do estresse oxidativo desses indivíduos e que as mutações do gene *HFE* e os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* não influenciaram o fenótipo dos beta talassêmicos heterozigotos avaliados.

Palavras chave: Beta talassemia; glutathione S-transferase; catalase; dano oxidativo; polimorfismos, ferritina

ABSTRACT

Abstract

Beta thalassemia may occur due to mutations β^0 or β^+ , according to absence or reduction in the production of beta globin chains, respectively. Few studies have been done correlating possible deleterious effects of these mutations, when in heterozygous. Co-inheritance with mutations in the genes, not located in the cluster of β -globin gene may modify the phenotype of the thalassemic. Stress oxidative generated by the increase of ROS is one of the mechanisms responsible for the acceleration of cell apoptosis. There are evidences that alpha chains in excess, even in small quantities, are sufficient to start ROS generation and thus oxidative stress in heterozygous beta thalassemic. In homozygous form or genetic heterozygous compound present severe anemia, transfusion dependent and iron overload is one of the complications more frequent and severe in these patients. In the heterozygous form the presence of iron overload is rare, but alterations in the profile of iron are observed. The aim of this study was to examine influence of the levels of serum ferritin, the mutations in the β -globin gene, the mutations in the *HFE* gene, activity of enzymes detoxification, GST and CAT, and polymorphisms of GSTs in the expression phenotypic of individuals heterozygous beta thalassemic. We evaluated 158 patients with beta thalassemia heterozygous previously diagnosed by classic methodologies. They were all adults, Caucasian origin, residents in the Central Region of São Paulo state and accompanied in public or private services of the region. The control group consisted of 24 adults, Caucasians and residents in the same region. Hematologic evaluation was carried out by hemogram, in automated counters of cells and quantification of the subfractions of Hb A₂ and Hb F by HPLC; the iron profile was based on the transferrin saturation, calculated on the serum iron and total iron binding capacity, obtained by the enzymatic technique and the ferritin by chemiluminescence, the determination of the activity of GST and CAT enzymes, and TBARS concentration were performed by spectrophotometry and determination of C-reactive protein by the immunoturbidimetry technique. The investigation of mutations beta thalassemia was performed by PCR-AE, the

mutations in *HFE* gene and polymorphism *GSTP1* by PCR-RFLP and polymorphisms *GSTM1* and *GSTT1* by multiplex PCR. The Hb A₂ concentrations were higher in thalassemic β^0 , but the values of MCV and MCH were lower only in women with β^0 thalassemia. Transferrin saturation and ferritin were similar β^0 and β^+ thalassemia, with or without *HFE* gene mutation. The enzyme activity of GST was higher in thalassemic and did not differ between the mutations of the β -globin. There was no significant difference in CAT activity between thalassemic and controls. The TBARS concentration was higher in group thalassemic than in control. *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphism did not influence the concentrations of ferritin, transferrin saturation, TBARS and activities of GST and CAT. There were no statistical correlations between ferritin and TBARS and the activity of GST and CAT. Thus we conclude that patients with beta thalassemia have oxidative damage, that the GST enzyme is important in controlling oxidative stress of these individuals and that mutations *HFE* and *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms do not influence the phenotype of beta thalassemia heterozygous evaluated.

Keywords: Thalassemia; glutathione *S*-transferase; catalase; oxidative stress; polymorphism; ferritin

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

Isabeth da Fonseca Estevão

São José do Rio Preto, 28/02/2011