



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

LUCIANA DE SOUZA ONDEI

**Estresse oxidativo em pacientes beta talassêmicos
heterozigotos e com deficiência de glicose-6-fosfato
desidrogenase**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP

2009

Ondei, Luciana de Souza.

Estresse oxidativo em pacientes beta talassêmicos heterozigotos e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase / Luciana de Souza Ondei. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

135 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Claudia Regina Bonini-Domingos

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

1. Hemoglobinopatia. 2. Talassemia. 3. Glicosefosfato desidrogenase - Deficiência. I. Bonini-Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. 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, com auxílio financeiro da Capes.

LUCIANA DE SOUZA ONDEI

**ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES BETA TALASSÊMICOS
HETEROZIGOTOS E COM DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO
DESIDROGENASE**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Bonini Domingos
Professora doutora
UNESP – São José do Rio Preto
Presidente e Orientadora

Prof. Dr. Antonio Fabron Junior
Professor adjunto doutor
Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA)

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
Professor adjunto doutor
Faculdade de Medicina de S.J.R.P. (FAMERP)

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior
Professor livre docente
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Sonia Maria Oliani
Professora livre docente
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 28 de agosto de 2009.

“Dedico este trabalho a minha amada família”

AGRADECIMENTOS

*A minha orientadora, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos** pela confiança, amizade e por tudo que me ensinou nesses sete anos de convivência.*

*Aos **amigos** do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH), àqueles que passaram e aos que continuam compartilhando bons momentos de amizade e discussão. Obrigada, em especial, àqueles que ajudaram diretamente na execução deste trabalho, inclusive doando amostras de sangue para a padronização de metodologias.*

*À **Lara M. Silveira e Marina I. P. Rocha**, minhas co-orientandas, por terem ajudado na realização deste trabalho.*

*À **Isabeth F. Estevão**, pela amizade, valiosas discussões e pela disponibilidade em ajudar sempre. Obrigada pelo recrutamento dos seus pacientes beta talassêmicos, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido realizado.*

*À **Gisele C. S. Carrocini e toda sua família** que, gentilmente, participaram ativamente deste trabalho, doando amostras de sangue inúmeras vezes.*

*Ao **Dr. Octávio Ricci Júnior** que autorizou a coleta de amostras de doadores de sangue e a toda equipe do Hemocentro.*

*Ao **Prof Dr. Gustavo O. Bonilla Rodriguez e Prof. Dr. Marcio J. Tiera** por terem cedido seus laboratórios para a realização de parte das metodologias.*

*Ao **Prof. Dr. Amauri A. Leite e a Rosecler I. P. Ferreira** pelo auxílio na padronização das metodologias para o diagnóstico da deficiência de G6PD.*

*À **Profa. Dra. Doroteia R. S. Souza** por colocar seu laboratório à disposição e pela valiosa colaboração. À **Marcela A. S. Pinhel** que auxiliou na implantação das metodologias para os polimorfismos das GSTs no LHGDH de forma bastante prestativa.*

*Ao **Prof. Dr. Sandro Percário** pelo auxílio na realização das técnicas para estresse oxidativo.*

*À minha mãe **Edna M. S. Ondei** e meu pai **Francisco Ondei**, meus exemplos de vida, sempre presentes trilhando meus caminhos até aqui. Ao meu irmão **Fernando S. Ondei** e minha cunhada **Simone S. T. Ondei**, pelo carinho, apoio e pelos momentos de muita conversa e descontração.*

*Ao meu noivo **Fabício Barreto Teresa** pelo amor, compreensão e pelos momentos felizes que juntos compartilhamos. Obrigada pelo auxílio nas análises estatísticas e discussão dos resultados. A toda família **Barreto Teresa**, pelo carinho e atenção.*

*A todas minhas amigas, companheiras de república, em especial, a **Thaís B. Carvalho** e **Rita L. Peruquetti** por esses anos de convivência em harmonia. Sentirei saudades das nossas conversas, dos momentos alegres e descontraídos.*

*À **Deus** pelo dom da vida.*

*"Um homem que ousa deperdiçar
uma hora ainda não descobriu o
valor da vida"*

Charles Darwin

SUMÁRIO

Capítulo I

1	Introdução geral.....	10
2	Objetivos.....	18
3	Material e Métodos.....	19
4	Resultados gerais.....	25

Capítulo II

Artigo:	A importância dos testes laboratoriais na investigação de hemoglobinas variantes, talassemias e deficiência de G6PD em população miscigenada.....	28
----------------	---	----

Capítulo III

Artigo:	Peroxidação lipídica e capacidade antioxidante na talassemia beta heterozigota: influência das mutações CD39 e IVS-I-110.....	43
----------------	---	----

Capítulo IV

Artigo:	Lipid peroxidation and antioxidant capacity in G6PD-deficient individuals with A-(202G> A) mutation.....	59
----------------	--	----

Capítulo V

Artigo:	Frequência dos polimorfismos da glutathione <i>S</i> -transferase na talassemia beta heterozigota e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.....	73
----------------	--	----

Capítulo VI

5	Discussão geral.....	88
6	Conclusões.....	91
7	Referências gerais.....	92

Anexo I

	Métodos.....	106
--	--------------	-----

Anexo II

	Resumo da monografia: Frequência da Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase na Região Noroeste do Estado de São Paulo.....	128
--	---	-----

Resumo.....	131
--------------------	------------

Abstract.....	134
----------------------	------------

Capítulo I

1 Introdução geral

1.1 Anemias hemolíticas

Em condições normais, a eritropoese no adulto ocorre na medula óssea, que produz cerca de 200 milhões de hemácias diariamente, para substituir as células que são perdidas devido ao seu esgotamento metabólico e alterações degenerativas. Após cerca de 120 dias em circulação as hemácias são removidas e destruídas, especialmente no baço, fígado e medula óssea (ZAGO et al., 2004).

Nos processos hemolíticos, os eritrócitos são destruídos antes de seu período de vida normal. Os estados hemolíticos, na maioria, são assintomáticos, e menos frequentemente, resultam numa anemia quando a eritropoese não é suficiente para repor as células vermelhas perdidas. A anemia é uma condição caracterizada, principalmente, pela diminuição da concentração de hemoglobina no sangue. Também pode ser observada redução do hematócrito ou da concentração de hemácias por unidade de volume, em comparação com parâmetros de referência. Além disso, os indivíduos podem apresentar icterícia e reticulocitose (DHALIWAL et al., 2004; ZAGO et al., 2004; COYER, 2005).

Há dois mecanismos hemolíticos, o intravascular e o extravascular. A hemólise intravascular é a destruição de eritrócitos na circulação com liberação do conteúdo celular para o plasma. A hemoglobina assim liberada liga-se a haptoglobina, proteína plasmática sintetizada pelo fígado, e o complexo formado é levado ao fígado onde é catabolizado. No entanto, se a quantidade de hemoglobina plasmática exceder a capacidade de ligação da haptoglobina, a hemoglobina é filtrada pelos rins podendo ser reabsorvida ou excretada na urina. A hemólise extravascular mais comum é a remoção e destruição dos eritrócitos, com alterações na membrana, pelos macrófagos do baço e fígado (DHALIWAL; et al., 2004; ZAGO et al., 2004).

Na anemia hemolítica, o excesso de ferro decorrente da destruição dos eritrócitos e transfusões sanguíneas periódicas pode levar à produção de radicais livres resultando em danos de órgãos e tecidos, em especial o miocárdio, os hepatócitos e as glândulas endócrinas, por catalisar reações de oxidação de

biomoléculas (COHEN; SCHUWARTZS, 1979; FERREIRA; MATSUBARA, 2007). Estudos sobre os mecanismos de danos oxidativos têm confirmado a ação de metais nas reações que levam a essas lesões. O ferro, metal pesado mais abundante nos organismos, é um catalisador de reações de oxidação e, em excesso, estimula a lipoperoxidação de membranas celulares, destruindo sua estrutura e função (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; EMERIT et al., 2001).

As anemias hemolíticas podem ser adquiridas ou herdáveis. As formas adquiridas, resultantes de fatores extrínsecos aos eritrócitos, podem ser ocasionadas por anticorpos; ruptura mecânica dos eritrócitos; agentes químicos, biológicos ou microorganismos; sequestro no baço por qualquer etiologia. As formas herdáveis, que são intrínsecas dos eritrócitos, podem ser ocasionadas por defeitos na hemoglobina, nas vias metabólicas ou na membrana do eritrócito (LEE et al., 1998; DHALIWAL et al., 2004.; ZAGO et al., 2004). As alterações na síntese da hemoglobina incluem as hemoglobinas variantes e as talassemias. Dentre as enzimopatias, a alteração mais comum é a deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), uma das alterações prevalentes no mundo (DHALIWAL et al., 2004; PRCHAL; GREGG, 2005; BEUTLER, 2008).

1.2 Talassemias

As talassemias são caracterizadas por redução na produção de uma ou mais cadeias polipeptídicas que formam o tetrâmero de hemoglobina, resultando geralmente, no desenvolvimento de anemia microcítica e hipocrômica. Os defeitos moleculares podem afetar a síntese das cadeias alfa, beta, delta ou gama, sendo que as alterações são classificadas de acordo com a cadeia globínica deficiente (CUNNINGHAM, 2008).

As talassemias são as alterações monogênicas mais frequentes no mundo com estimativa de 270 milhões de portadores, dos quais 80 milhões possuem mutações para a talassemia beta (THEIN, 2005). No Brasil, tanto a alfa quanto a beta talassemias têm alta incidência. Isto se deve à intensa miscigenação da população brasileira com a grande imigração ocorrida no final do século XIX e início do século XX, em que o Brasil recebeu milhões de imigrantes europeus e

asiáticos. A frequência das síndromes talassêmicas reflete a diversidade de origens étnicas, com prevalências diferenciadas em cada região do país (ZAGO et al., 1983; BONINI-DOMINGOS et al., 2000; BONINI-DOMINGOS, 2004).

O gene β , responsável pela síntese da globina beta, está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.4) em uma região de 70 kb que contém um grupamento com cinco genes funcionais e um pseudogene: 5' ϵ - γ^G - γ^A - $\Psi\beta$ - δ - β 3'. Antes do início do complexo da globina beta 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 *éxons*, separadas por duas não codificantes, os *introns* ou seqüências intercalantes (IVS). Sequências importantes para a função gênica são encontradas nas junções *éxon-intron* e na região não traduzida 3' (3'-UTR) no final das seqüências do RNA mensageiro (THEIN, 2005).

Nas talassemias beta, as mutações pontuais são as principais causas de redução ou ausência na síntese da cadeia polipeptídica (BANK, 2005). Quando a expressão gênica é parcial denominam-se β^+ talassemias e, quando a expressão é ausente, são chamadas de β^0 talassemias. Mais de 200 mutações afetando o gene da globina beta foram descritas até o momento, sendo as maiores prevalências encontradas em populações oriundas da Região Mediterrânea e do Sudeste Asiático (HUISMAN, 2008). No Brasil a frequência de portadores na população caucasóide é de cerca de 1%, sendo os alelos β^0 39 (C→T), β^+ IVS-I-6 (T→C), β^+ IVS-I-110 (G→A) e β^0 IVS-I-1 (G→A) responsáveis pela quase totalidade dos casos nas Regiões Sul e Sudeste. No Nordeste, além destes, também é encontrado o alelo β^+ IVS-I-5 (G→C) (ARAÚJO et al., 2003; BONINI-DOMINGOS, 2004; SONATI; COSTA, 2008).

A talassemia beta apresenta heterogeneidade molecular e expressão fenotípica variável, podendo ser assintomática ou resultar em anemia que pode variar de leve a intensa. A talassemia *menor*, também denominada traço talassêmico, é caracterizada pela heterozigose das formas β^0 ou β^+ e os indivíduos são geralmente assintomáticos, podendo apresentar anemia em situações como na infância, na gravidez e no estresse. A talassemia *maior*,

resultante da homozigose β^0/β^0 ou dupla heterozigose β^0/β^+ corresponde à anemia grave, com dependência de transfusões sanguíneas regulares. Na talassemia *intermediária*, caracterizada pela homozigose β^+/β^+ são encontrados fenótipos clínicos intermediários entre o traço talassêmico e a talassemia maior (BANK, 2005; HUISMAN, 2008; SONATI; COSTA, 2008).

Na talassemia beta, a produção deficiente de cadeias beta durante a eritropoese pode levar à anemia. As cadeias alfa em excesso formam agregados insolúveis e instáveis que danificam a membrana do eritrócito e levam à destruição prematura das células. Esse processo ocorre tanto nos precursores eritróides imaturos, gerando eritropoese ineficaz, quanto nas células maduras, levando à hemólise (RUND; RACHMILEWITZ, 2005). Hemácias talassêmicas têm uma taxa de destruição de 10 a 15 vezes maior que a observada em hemácias normais (SONATI; COSTA, 2008). Nos processos hemolíticos, a liberação do grupo heme e do ferro produzem metahemoglobina e espécies reativas de oxigênio que alteram o potencial de oxi-redução do eritrócito, ocasionando aumento de danos oxidativos (KASSABI-CHEKIR et al., 2003; CHENG et al., 2004).

1.3 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

Os eritrócitos perdem a capacidade de realizar a fosforilação oxidativa e a síntese protéica devido à perda do núcleo, mitocôndrias e ribossomos durante o seu processo de maturação. No entanto, necessitam de um metabolismo ativo para manter a flexibilidade e integridade da membrana e preservar a hemoglobina na sua forma funcional, assegurando o transporte adequado de oxigênio (PRCHAL; GREGG, 2005). A glicose, principal substrato dos eritrócitos, é, portanto, metabolizada por duas vias principais: a via bioquímica de Embden-Meyerhoff e o ciclo das pentoses. A via de Embden-Meyerhoff, também chamada de via glicolítica ou via do metabolismo anaeróbico, é responsável pela degradação de 90% da glicose até lactato, produzindo adenosina-trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e 2,3 di-fosfoglicerato (2,3 DPG). A segunda via de metabolismo, denominada ciclo das pentoses ou via metabólica da hexose monofosfato, gera gás carbônico (CO_2) e nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato reduzido (NADPH). Essa via metaboliza de 5% a 10% da glicose utilizada pelas células vermelhas (LEE et al., 1998; CAPPELLINI; FIORELLI, 2008).

A G6PD é uma enzima vital para todas as células. Ela catalisa a primeira etapa da via metabólica do ciclo das pentoses permitindo a conversão de glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconato (6PG). Nessa reação, NADP é reduzido em NADPH, o qual é utilizado nas vias de proteção contra danos oxidativos (BILMEN et al., 2001). Nos eritrócitos esta via é a única fonte de NADPH, tornando-os mais vulneráveis que outras células aos efeitos dos agentes oxidantes (SÁNCHEZ et al., 2003; BEUTLER, 2008).

A deficiência de G6PD é a enzimopatia mais comum no mundo. O gene responsável pela síntese de G6PD está situado no braço longo do cromossomo X (Xq28) e consiste de 13 *éxons* e 12 *íntrons*. O gene apresenta 20 Kb e codifica um monômero com 515 aminoácidos, sendo que a porção da região do RNA mensageiro correspondente ao primeiro códon e parte do segundo, não são traduzidas. As mutações que levam à deficiência enzimática são as que afetam as sequências codificadoras. Aproximadamente 140 mutações já foram identificadas, as quais resultam em mais de 400 variantes enzimáticas, classificadas segundo as propriedades eletroforética e bioquímica da enzima deficiente (BEUTLER; VULLIAMY, 2002; FRANK, 2005; CAPPELLINI; FIORELLI, 2008).

As variantes de G6PD podem ser divididas em três categorias dependendo do grau de hemólise. As mais comuns estão associadas à anemia hemolítica aguda intermitente. Em contraste, as variantes associadas com anemia hemolítica crônica são raras e a gravidade da hemólise é altamente variável. O terceiro tipo de variante não está associado a risco de hemólise (PRCHAL; GREGG, 2005; CAPPELLINI; FIORELLI, 2008).

A forma normal e mais comum da enzima é a B, sendo encontrada principalmente em caucasóides e asiáticos. A variante G6PD A⁺ apresenta alta frequência em africanos e não possui atividade catalítica alterada. A forma G6PD A⁺ difere da G6PD B por substituição do aminoácido asparagina por aspartato na posição 126 da proteína. Outra variante comum em negros, a G6PD A⁻, está associada à hemólise de grau leve a moderado e é resultante de mutações

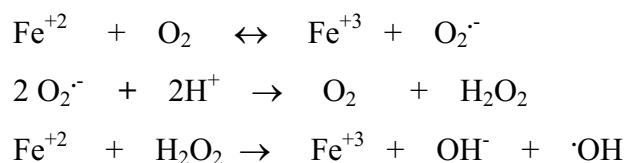
diferentes, tais como 202 (G>A), 680 (G>T) e 968 (T>C). A variante G6PD mediterrânea é a mais comum em populações caucasóides, particularmente da área mediterrânea. Apresenta atividade catalítica reduzida e a hemólise pode ser grave (LEE et al., 1998).

1.4 Estresse oxidativo

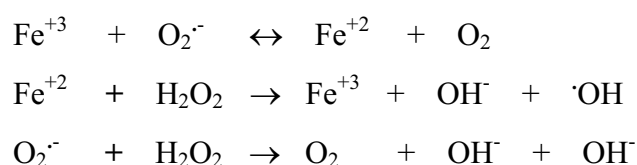
Assim como as demais células, os eritrócitos estão sujeitos aos efeitos nocivos de agentes oxidantes que podem ser resultantes do próprio metabolismo celular ou por fatores exógenos, como drogas e infecções. Se a eficiência do sistema antioxidante for superada pela magnitude destes fenômenos oxidativos, ocorrerá o estresse oxidativo, que culminará em hemólise (LEE et al., 1998; CHENG et al., 2004; FERREIRA; MATSUBARA, 2007).

As espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), como o radical 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 ERMO, conforme descrito abaixo (FERREIRA; MATSUBARA, 2007).

Reação de Fenton:



Reação de Haber-Weiss:



Os processos hemolíticos com liberação de hemoglobina e ferro favorecem as reações oxirredutoras. A produção elevada de ERMO leva ao estresse oxidativo, que é caracterizado por desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e a capacidade de neutralizá-los. Nos eritrócitos, o estresse oxidativo é marcado pela desnaturação das proteínas de membrana, oxidação da hemoglobina

à metahemoglobina e lesão oxidativa ao componente lipídico da membrana, levando a lipoperoxidação. Se a eficiência do sistema antioxidante for superada por esses fenômenos, ocorrerá lesão do eritrócito e lise celular (FERREIRA; MATSUBARA, 2007).

A maioria das células possui enzimas que estão envolvidas na detoxificação celular. Uma grande família de enzimas é conhecida como citocromo P450 (CYPs) as quais convertem moléculas hidrofóbicas em substâncias mais solúveis para a excreção. Embora as CYPs atuem com rapidez e precisão, alguns compostos são reduzidos parcialmente, produzindo espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido O_2^- (SHARMA et al., 2000).

Outras enzimas são a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase (BERNARDINI et al., 2005). A enzima superóxido dismutase, 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^- em H_2O_2 . Este, por sua vez, reage produzindo outras espécies reativas de oxigênio, as quais são degradadas em água e oxigênio por enzimas como a catalase e a glutathione peroxidase (GSH-Px), sendo que esta última utiliza a glutathione (GSH) como agente redutor (YENCHITSOMANUS; WASI, 1983; FERREIRA; MATSUBARA, 2007).

Durante o processo de detoxificação oxidativa, a GSH é convertida em glutathione oxidada (GSSG), diminuindo o nível de GSH. O restabelecimento de GSH é realizado pela ação da glutathione reductase (GSSG-Rx) que catalisa a redução de GSSG para GSH. O processo ocorre na presença de NADPH que é gerado pela G6PD na primeira reação enzimática da via metabólica da hexose monofosfato (VOET et al., 2002). Alterações nas atividades das enzimas envolvidas no sistema redox da GSH refletem na defesa celular e podem servir como marcadores para muitas doenças (RAHMAN et al., 1999).

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 à 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).

Em humanos, as GSTs são subdivididas em quatro subfamílias principais denominadas α (alfa), μ (mi), π (pi) e θ (teta) 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 pulmão, próstata, colo-retal e outros (SRISVASTAVA et al., 2004; PINHEL et al., 2008; MO et al., 2008; KONDO 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 homozigotos para os genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* não possuem a respectiva atividade enzimática, resultando em deficiência na metabolização de agentes oxidantes (DUSINKÁ et al., 2001; BERNARDINI et al., 2005).

Para o gene *GSTP1* (11q13), o polimorfismo mais estudado é o resultante da transição de A→G levando a troca do aminoácido isoleucina por valina no códon 105 (MO et al., 2009). A enzima codificada possui menor atividade catalítica e possivelmente, atua de forma diferente na metabolização de eletrólitos resultantes do estresse oxidativo e de outros processos de biotransformação (BERNARDINI et al. 2005).

Diante da possibilidade de estresse oxidativo em portadores de talassemia beta e em indivíduos com deficiência de G6PD, avaliamos se a expressão fenotípica variável depende dos mecanismos de detoxificação de agentes oxidantes. Assim, a nossa hipótese é que a expressão clínica variável observada em beta talassêmicos heterozigotos e em indivíduos com deficiência de G6PD é dependente da eficiência dos mecanismos envolvidos na detoxificação celular.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O nosso objetivo foi analisar a expressão fenotípica de indivíduos beta talassêmicos heterozigotos e indivíduos com deficiência de G6PD, identificando as mutações para as respectivas alterações, avaliando marcadores de estresse oxidativo e comparando-os com um grupo controle.

2.2 Objetivos específicos

1. Rastrear os portadores de talassemia beta heterozigota e os portadores de deficiência de G6PD por análises citológicas e bioquímicas para a composição dos grupos de estudo.
2. Identificar as mutações nos portadores de talassemia beta heterozigota e nos portadores de deficiência de G6PD por PCR alelo específica e PCR/RFLP.
3. Avaliar a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante por quantificações enzimáticas.
4. Analisar os polimorfismos das Glutathione *S*-Transferases: *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*.

3 Material e Métodos

3.1 Casuística

Foram analisadas 590 amostras de sangue, colhidas por punção venosa, após consentimento informado, no período de março de 2007 a agosto de 2008. Do total analisado, 426 amostras foram de doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto/SP, com idade entre 18 e 61 anos ($34,40 \pm 10,86$ anos), sendo 122 (29%) do gênero feminino e 304 (71%) do gênero masculino. A amostragem geral também foi constituída por 118 amostras de indivíduos de uma instituição de ensino superior da região noroeste do Estado de SP, com idade entre 15 e 85 anos ($32,19 \pm 14,39$ anos), sendo 77 (65%) do gênero feminino e 41 (35%) do gênero masculino. Essas amostras foram utilizadas para o rastreamento do grupo com deficiência de G6PD e para a seleção do grupo controle. Para a composição do grupo com talassemia beta heterozigota foram utilizadas 46 amostras de sangue de indivíduos provenientes da cidade São Carlos/SP, com diagnóstico clínico prévio de talassemia beta heterozigota, com idade entre 18 e 79 anos ($41,79 \pm 17,38$ anos), sendo 33 (69%) do gênero feminino e 15 (31%) do gênero masculino.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP/IBILCE e desenvolvido obedecendo aos princípios éticos estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), sob protocolo número 0008.0.229.000-06.

3.2 Métodos

Foram separados de acordo com a alteração avaliada. Os protocolos completos de cada metodologia utilizada encontram-se no anexo I.

3.2.1 Metodologias para o diagnóstico de talassemia beta

O fluxo de metodologias para o diagnóstico de talassemia beta seguiu os seguintes passos: Análise da morfologia eritrocitária → Resistência globular osmótica em NaCl a 0,36% → Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino →

Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) para avaliação dos valores de hemoglobina A₂ e hemoglobina fetal → PCR alelo específica para a identificação das mutações.

3.2.1.1 Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados no microscópio de luz, quanto ao tamanho, forma e quantidade de hemoglobina nos eritrócitos (BONINI-DOMINGOS, 2006).

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

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

3.2.1.3 Eletroforese em pH alcalino

As amostras de sangue, previamente hemolisadas segundo Naoum (1990), foram submetidas à eletroforese de hemoglobina em pH 8,6 para qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e grande parte das hemoglobinas anormais (MARENGO; ROWE, 1965).

3.2.1.4 HPLC em sistema automatizado VARIANT Bio-Rad

Consiste em uma cromatografia de troca catiônica em que moléculas com cargas positivas são adsorvidas em uma fase estacionária da coluna cromatográfica, seguida por eluições induzidas pela passagem de um líquido com alta concentração de cátions. O eluato é detectado opticamente e quantificado, determinando a área do gráfico correspondente à fração de hemoglobina eluída. O kit utilizado nas análises foi o “β Thalassemia Short Program” e 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 (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 2006).

3.2.1.5 Identificação dos genótipos de talassemia beta

O DNA genômico foi previamente obtido pela técnica do fenol/clorofórmio segundo PENA e colaboradores (1991) e submetido à amplificação gênica alelo específica para a identificação das mutações CD39, IVS-I-110 e IVS-I-6 (BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

Para a realização da PCR alelo específica 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*). Já 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*).

3.2.2 Metodologias para o diagnóstico de G6PD

Para o diagnóstico da deficiência de G6PD seguiram-se os seguintes passos: Rastreamento da deficiência de G6PD pelo método de Brewer → Quantificação da enzima G6PD → Identificação da mutação por PCR/RFLP.

3.2.2.1 Método de Brewer Modificado

O teste de Brewer foi utilizado para rastrear os portadores de deficiência de G6PD. Nele, a metahemoglobina (ou Hb Fe⁺³) se forma por ação do nitrito sobre a hemoglobina (Fe⁺²). Na presença de azul de metileno, ocorre estimulação

da via da pentose fosfato com produção de NADPH, reconvertendo a hemoglobina oxidada a sua forma reduzida. A velocidade de redução é proporcional à atividade de G6PD eritrocitária (BREWER et al., 1960).

3.2.2.2 Determinação da Atividade Enzimática da G6PD

Após a realização do teste de Brewer, as amostras com suspeita de deficiência de G6PD tiveram sua atividade enzimática quantificada. O teste mede a taxa de redução de NADP a NADPH quando o hemolisado é incubado com glicose-6-fosfato. A atividade enzimática é expressa em $UI.gHb^{-1}.min^{-1}$ a 37°C em pH 8,0 sendo que uma unidade de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima que reduz 1 μ mol de $NADP^{+}$ por minuto a 37°C (BEUTLER, 1984).

3.2.2.3 Identificação do genótipo de deficiência de G6PD

O DNA genômico, previamente obtido pela técnica do fenol/clorofórmio segundo Pena e colaboradores (1991), foi submetido a PCR/RFLP utilizando os *primers* 5' CAG CCA CTT CTA ACC AC 3' (*sense*) e 5' AAC CAG GCT GGG GGA G 3' (*antisense*) para a amplificação de um fragmento de 314 pb que, posteriormente, foi submetido à digestão com a enzima *Nla III* (New England BioLabs) (HAMEL et al., 2002; FERREIRA, 2004).

3.2.3 Dosagens bioquímicas para determinação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total

3.2.3.1 Dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

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

3.2.3.2 Determinação da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC)

A capacidade antioxidante das amostras (TEAC) foi determinada segundo a sua equivalência ao Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-carboxílico), um antioxidante análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. A técnica colorimétrica é baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínaácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) que produz o radical cation $ABTS^{\bullet+}$, cromóforo de coloração verde/azul. A adição de amostras contendo antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS e a descoloração é avaliada em 734nm (MILLER et al., 1993; RE et al., 1999). Os valores de normalidade estabelecidos no presente trabalho foram de 1,85 a 2,31mM/L.

3.2.4 Identificação dos polimorfismos das GSTs

O DNA genômico, previamente obtido pela técnica do fenol/clorofórmio segundo Pena e colaboradores (1991), foi utilizado para a análise dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*. Os polimorfismos para *GSTM1* e *GSTT1* foram avaliados de forma simultânea pela reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex, utilizando 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* com os *primers sense* 5' GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT 3' e *antisense* 5' CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC 3'. Os genótipos nulos (ambos os alelos com deleção) para os genes *GSTM1* e *GSTT1* 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 os *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 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).

3.3 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por meio de 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, pois as premissas foram aceitas em todas as análises. Quando as comparações envolveram dois grupos foi utilizado o Teste *t* independente e quando a comparação envolveu mais de dois grupos utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Para a análise das variáveis qualitativas, foi empregado o teste do qui-quadrado (χ^2). Nos casos em que as premissas para a realização do teste foram violadas, utilizou-se a estimativa por máxima verossimilhança. O software utilizado foi o Statistica 7 e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 Resultados gerais

As 46 amostras com resultado clínico prévio de talassemia beta heterozigota foram reavaliadas pelos métodos clássicos de triagem e a mutação foi identificada por PCR alelo específica. O valor médio de hemoglobina A₂ obtido foi igual a $5,6 \pm 0,56\%$, variando de 4,0 a 8,7% e de hemoglobina fetal igual a $1,34 \pm 1,92\%$, variando de 0,0 a 11,0%. Na análise por biologia molecular, 18 (39%) amostras apresentaram a mutação CD39 em heterozigose; 22 (48%) confirmaram a mutação IVS-I-110 em heterozigose; uma (2%) apresentou a mutação IVS-I-6 em heterozigose e cinco (11%) apresentaram resultado negativo para as três mutações analisadas. Essas amostras também foram submetidas ao teste de Brewer para a triagem da deficiência de G6PD e o resultado foi normal para todas elas.

O grupo com deficiência de G6PD foi composto a partir de um rastreamento realizado nos 426 doadores de sangue do HEMOCENTRO de São José do Rio Preto/SP e em 118 indivíduos de uma instituição de ensino, totalizando 544 amostras. Essa etapa do trabalho fez parte do projeto de conclusão de curso intitulado *Frequência da Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase na Região Noroeste do Estado de São Paulo*, cujo resumo encontra-se no anexo II. Os dados obtidos foram utilizados na elaboração do artigo *A importância dos testes laboratoriais na investigação de hemoglobinas variantes, talassemias e deficiência de G6PD em população miscigenada* (Capítulo II) que foi submetido à Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

Após o rastreamento dos portadores de talassemia beta heterozigota e dos portadores de deficiência de G6PD, bem como a identificação das mutações para as respectivas alterações, foi analisada a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante de ambos os grupos, comparando-os com um grupo controle. Este foi constituído por 81 amostras, selecionadas aleatoriamente a partir das 544 amostras tendo como critério apresentar resultado normal nos testes para hemoglobinopatias, deficiência de G6PD e análise de TBARS.

Os resultados referentes ao estresse oxidativo na talassemia beta heterozigota gerou o artigo intitulado *Peroxidação lipídica e capacidade antioxidante na talassemia beta heterozigota: influência das mutações CD39 e IVS-I-110* (Capítulo III) que será traduzido para a versão em inglês e submetido à revista “Free Radical Research”. A partir dos resultados obtidos na análise do estresse oxidativo na deficiência de G6PD foi elaborado o artigo *Lipid peroxidation and antioxidant capacity in G6PD-deficient individuals with A-(202G> A) mutation* (Capítulo IV) que foi aceito para publicação na Genetics and Molecular Research.

Os polimorfismos das GSTs: *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* foram avaliados nos grupos com talassemia beta heterozigota, com deficiência de G6PD e no controle. Os resultados obtidos estão apresentados no artigo *Avaliação dos polimorfismos da glutathione S-transferase na talassemia beta heterozigota e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase* (Capítulo V) que após a elaboração da versão em inglês, será submetido à Free Radical Biology and Medicine.

Associando os valores de TBARS e TEAC com os polimorfismos encontrados, verificou-se que para os grupos com talassemia beta heterozigota e controle, que apresentaram frequência elevada do genótipo nulo para *GSTM1*, não houve influência desse polimorfismo nos valores de ambos os parâmetros ($p > 0,18$, Teste *t* independente). Para o genótipo *GSTM1*+/*GSTT1*+ que apresentou frequência elevada no grupo com deficiência de G6PD, também não se observou influência da presença de ambos os polimorfismos sobre os valores de TBARS e TEAC ($p > 0,65$, Teste *t* independente). Além disso, o grupo com deficiência de G6PD apresentou alta frequência de homozigotos mutantes para o genótipo *GSTP1*. No entanto, não houve diferença nos valores de TBARS e TEAC comparados entre os homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutantes ($p > 0,78$, ANOVA).

Capítulo II

Este artigo foi submetido à Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.

Fator de impacto: 0,16.

Qualis: B4.

A importância dos testes laboratoriais na investigação de hemoglobinas variantes, talassemias e deficiência de G6PD em população miscigenada

The importance of laboratorial tests for hemoglobin variants, thalassemia and G6PD deficiency diagnosis in miscigenated population

Luciana de Souza Onde^I, Lara Maria Silveira^I, Amauri Antiquera Leite^{II}, Octávio Ricci Júnior^{III}, Claudia Regina Bonini-Domingos^I

^I 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.

^{II} Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas, Araraquara, SP, Brasil.

^{III} Hemocentro, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Luciana de Souza Onde

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: luondei@yahoo.com.br

Resumo

Dentre as causas de anemias hemolíticas destacam-se as hemoglobinopatias, que incluem as hemoglobinas (Hb) variantes e as talassemias, e as enzimopatias, sendo a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), a mais freqüente delas. Considerando a alta prevalência dessas alterações e a característica miscigenada da população brasileira, objetivou-se neste trabalho investigar a freqüência dessas afecções genéticas, correlacionando-as com a etnia dos portadores e com a importância das metodologias nos testes de diagnóstico laboratorial de rotina. Foram analisadas 544 amostras de sangue periférico, colhidas após consentimento informado, de indivíduos entre 16 e 65 anos, incluindo 426 doadores de sangue e 118 de indivíduos de uma instituição de ensino. As amostras foram primeiramente submetidas aos métodos clássicos de triagem, para hemoglobinopatias e deficiência de G6PD, com posterior confirmação por metodologias complementares e específicas. Para hemoglobinas, foram encontradas 15 (2,77%) amostras com fenótipo de talassemia beta heterozigota, alteração de origem mediterrânea; 12 (2,19%) com hemoglobinas variantes em heterozigose, incluindo as Hb S, Hb C, ambas de origem africana, e a Hb Hasharon, variante de origem européia. Para a deficiência de G6PD foi encontrada freqüência de 3,86%, com 81,48% das amostras apresentando a mutação A-202 (G>A), de origem africana. Os diferentes fenótipos de hemoglobinas anormais, bem como a alta freqüência da deficiência de G6PD em grupo populacional miscigenado, reforçam a importância da investigação dessas afecções hereditárias com a devida confirmação laboratorial.

Palavras-chave: Hemoglobinas variantes, Talassemias, Deficiência de G6PD, Freqüência, População brasileira, Diagnóstico laboratorial

Abstract

The hemoglobin variants and thalassemias, as well as glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency can result in hemolytic anemia. Considering the high prevalence of these genetic disorders and the Brazilian population with high admixture, this study aimed investigate the genetic disorders frequency, correlating with the ethnic origins and the importance of diagnostic tests. Were analyzed 544 peripheral blood samples from individuals between 16 and 65 years old, including 426 blood donors and 118 students from an educational institution. The samples were evaluated by traditional methods for hemoglobinopathies and G6PD deficiency, with confirmation by specific methodologies. For hemoglobinopathies, were founded 15 (2.77%) samples with beta thalassemia heterozygote, 12 (2.19%) with hemoglobin variants, including Hb S and Hb C, both African mutation and Hb Hasharon, European variant. For G6PD deficiency was founded a frequency of 3.86% with 81.48% of samples showing the mutation A-202 (G> A), an African mutation. Different hemoglobinopathies, high G6PD deficiency frequency and miscigenated population reinforce the importance of hereditary diseases research with appropriate laboratory confirmation.

Palavras-chave: Hemoglobin variants, Thalassemias, G6PD deficiency, Frequency, Brazilian population, Laboratorial diagnostic

Introdução

As hemoglobinopatias podem ser resultantes de mutações que promovem desequilíbrio no conteúdo quantitativo das cadeias polipeptídicas causando as talassemias, ou ainda, serem originadas por alterações envolvendo genes estruturais que levam à formação de moléculas de hemoglobina (Hb) com características bioquímicas diferentes das Hb normais, denominadas Hb variantes.¹ As hemoglobinopatias apresentam alta prevalência, constituindo um problema de saúde pública no mundo, inclusive no Brasil. Seu diagnóstico permite melhora na qualidade de vida dos portadores, pela adoção de medidas profiláticas e terapêuticas, além de orientação genética adequada.^{2,3}

A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é a enzimopatia mais comum no mundo. A alteração resulta de mutações que afetam a expressão normal da enzima, que catalisa a primeira etapa da via metabólica do ciclo das pentoses, permitindo a redução de NADP em NADPH, utilizado para a manutenção de enzimas antioxidantes, como a catalase. A deficiência de G6PD torna os eritrócitos mais vulneráveis aos efeitos nocivos dos agentes oxidantes, como drogas antimaláricas, analgésicos compostos por ácido acetilsalicílico e sulfonas. O diagnóstico da deficiência de G6PD permite alertar os portadores sobre os riscos de crises hemolíticas.^{4,5}

Considerando a alta prevalência dessas afecções genéticas e a característica miscigenada da população brasileira, incorporando povos de diversas origens étnicas ao longo da sua história, consideramos de grande relevância a investigação laboratorial adequada, visando a identificação e orientação dos portadores. As hemoglobinopatias e a deficiência de G6PD constituem ainda um importante marcador genético de etnias e populações, sendo úteis nos estudos populacionais.^{6,7} Dessa forma, neste trabalho realizamos o rastreamento de hemoglobinas anormais e de deficiência de G6PD em indivíduos sem sintomas clínicos, associando os achados às diferentes etnias, avaliando também as metodologias de diagnóstico utilizadas e disponíveis na rotina laboratorial.

Casuística e Métodos

Foram analisadas 544 amostras de sangue periférico, colhidas após consentimento informado, de indivíduos com idade entre 16 e 85 anos, sendo 346 (63,60%) homens e 198 (36,40%) mulheres. Segundo a etnia, 382 (70,22%) foram caucasóides, 74 (13,60%) afro-descendentes e 88 (16,18%) de diversas origens étnicas, incluindo orientais e cruzamentos entre caucasóides e afro-descendentes. Do total avaliado, 426 amostras foram provenientes do Hemocentro de São José do Rio Preto, que recebe doadores de diferentes cidades da região noroeste do Estado de São Paulo e 118 de estudantes universitários.

As amostras foram submetidas aos testes de triagem para hemoglobinopatias que consistiram de eletroforese de hemoglobina em pH 8,6 e pH 6,2,^{8,9} as quais permitem a separação das Hb normais e grande parte das anormais, e Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) em Sistema automatizado Variant (Bio-Rad).¹⁰

Para a triagem da deficiência de G6PD as amostras foram avaliadas pelo método qualitativo de Brewer (1960), o qual é baseado na formação de metaemoglobina (Fe^{+3}) por ação oxidativa do nitrito sobre a hemoglobina (Fe^{+2}). Na presença de azul de metileno, ocorre estimulação da via da pentose fosfato com produção de NADPH, reconvertendo a hemoglobina oxidada a sua forma reduzida. A velocidade de redução é proporcional à atividade de G6PD eritrocitária. No entanto, o teste não é específico para deficiência de G6PD.¹¹

A atividade da G6PD foi determinada para os casos positivos na triagem, utilizando o método preconizado por Beutler (1984), que mede a taxa de redução de NADP a NADPH quando um hemolisado é incubado com glicose-6-fosfato. A atividade enzimática é expressa em $\text{UI.gHb}^{-1}.\text{min}^{-1}$ a 37°C em pH 8,0 sendo uma unidade de atividade enzimática (UI) definida como a quantidade de enzima que reduz 1 μmol de NADP^{+} por minuto a 37°C.¹²

Para a pesquisa das mutações genéticas, por biologia molecular, o DNA genômico das amostras foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio. A técnica consiste no uso de tampões de lise para o rompimento dos eritrócitos e dos glóbulos brancos. Durante a extração orgânica, as proteínas contaminantes são

desnaturadas e mantidas na fase orgânica ou na interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. Durante a precipitação com etanol, os sais e outros solutos como os resíduos da extração fenol/clorofórmio permanecem em solução, enquanto os ácidos nucleicos formam um precipitado que é separado por centrifugação.¹³

Para a realização da PCR-RFLP para a pesquisa da Hb Hasharon foi utilizado o *primer sense* LH1: 5' AGG CCC TGG AGA GGT GAG 3' e o *primer antisense* LH2: 5' GGA GCT GTG CAG AGA AGA GG 3', amplificando um fragmento de 481 pb. O processo de amplificação consistiu de uma desnaturação prévia de 95°C por cinco minutos, acrescida de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 61°C por um minuto, 72°C por um minuto, seguida de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. A digestão enzimática foi realizada com a enzima *Taq I* (New England BioLabs). Como a mutação (GAC>CAC) elimina um sítio de restrição da enzima (tcga), o alelo normal gera três fragmentos de 189 pb, 175 pb e 117 pb e, o alelo mutante gera dois, um de 364 pb e outro de 117 pb.¹⁴

Para a pesquisa da mutação A-202(G>A) para a deficiência de G6PD, por PCR-RFLP, foi utilizado o *primer sense* 5' CAG CCA CTT CTA ACC AC 3' e o *primer antisense* 5' AAC CAG GCT GGG GGA G 3', amplificando um fragmento de 314 pb. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por cinco minutos, acrescida de 35 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por 50 segundos, seguida de uma extensão final a 72°C por cinco minutos. Após a digestão com a enzima *Nla III* (New England BioLabs), o alelo normal gera um fragmento de 314 pb e o alelo mutante dois fragmentos, um de 218 pb e outro de 96 pb.^{15,16}

Resultados

Nos testes de triagem para hemoglobinopatias, foram encontradas 31 (5,70%) amostras com resultado alterado, sendo 15 (2,77%) com fenótipo de talassemia beta heterozigota; 12 (2,19%) com hemoglobinas variantes em heterozigose e quatro (0,74%) com hemoglobina fetal acima dos valores de normalidade. Os resultados dos perfis de hemoglobinas estão apresentados na

Tabela 1. O fenótipo de talassemia beta foi avaliado pelos valores da Hb A₂, morfologia eritrocitária e resistência osmótica em NaCl a 0,36%. As Hb S e Hb C foram identificadas por meio da associação dos resultados eletroforéticos e cromatográficos, não sendo realizada a confirmação por biologia molecular, por apresentarem padrão bem definido pelas metodologias de diagnóstico utilizadas. A Hb Hasharon, uma variante “S-like”, foi identificada pela associação de metodologias clássicas, mas também confirmada por PCR/RFLP, devido à co-migração de frações.

Tabela 1: Perfis de hemoglobinas observados nas 544 amostras de sangue analisadas.

Fenótipo	N	Valor percentual
Hb AA ₂ aumentada	13	2,40%
Hb AA ₂ aumentada + Hb F	2	0,37%
Hb AS	9	1,65%
Hb ASF	1	0,18%
Hb AC	1	0,18%
Hb AHasharon	1	0,18%
Hb AA+F	4	0,74%
Hb AA	513	94,30%
Total	544	100%

N= Número de amostras

Para o rastreamento da deficiência de G6PD, as amostras foram avaliadas, primeiramente pelo teste de Brewer (1960). Das 544 amostras, 20 (3,68%) apresentaram resultado positivo, sendo seis do gênero feminino e 14 do gênero masculino; 37 (6,80%) apresentaram resultado de coloração intermediária (entre positivo e negativo), sendo classificado como duvidoso. Destas, 15 eram do gênero feminino e 22 do gênero masculino. Nas 487 (89,52%) amostras restantes, o resultado foi negativo. Como esse é um método colorimétrico pouco sensível, é

comum a presença de resultados intermediários. Na Tabela 2 foi relacionado a positividade do teste segundo o gênero e a origem da amostra.

Tabela 2: Positividade no teste de Brewer segundo o gênero e a origem da amostragem.

Resultado	Gênero Feminino		Gênero Masculino	
	Positivo	Intermediário	Positivo	Intermediário
HEMOCENTRO	3	11	12	22
Instituição de ensino	3	4	2	0
Total	6	15	14	22

As amostras que apresentaram resultado positivo e duvidoso no teste de triagem foram submetidas ao teste de Beutler (1984), para determinar a real atividade da enzima G6PD. Para a realização do presente estudo, foram estabelecidos valores de normalidade sob as condições de análise laboratorial local e grupo populacional, por meio da determinação da atividade enzimática de 45 amostras que apresentaram perfis normais na triagem de G6PD. O resultado variou de 8,03 a 14,80 UI.gHb⁻¹.min⁻¹ a 37°C, intervalo esse utilizado como referência normal para esse grupo, regionalmente estabelecido.

Das 57 amostras com suspeita da deficiência de G6PD, foi confirmada a deficiência enzimática em 27, sendo todas as 20 com resultado prévio positivo no teste de triagem, e em sete das 37 que apresentaram resultado duvidoso. Assim, foi encontrado um índice de positividade no teste de 47% e a porcentagem de erro foi de 53%. A frequência da deficiência de G6PD para o grupo avaliado foi igual a 4,96% e retirando deste grupo seis indivíduos aparentados, a real frequência obtida foi de 3,86%. Considerando apenas o conjunto amostral constituído pelos doadores de sangue, do gênero masculino, foram encontradas 14 amostras com deficiência de G6PD, correspondendo a 4,59%.

Segundo a etnia, 62,96% foram não caucasóides, com 44,44% tendo origem afro-descendente. Avaliando a mutação A-202 (G>A) nas 27 amostras com deficiência de G6PD, foi confirmada a presença em 22 delas, o que

corresponde a 81,48% do grupo com deficiência de G6PD e a 4,04% da casuística de estudo. Destacamos ainda que, em uma amostra do gênero feminino, verificou-se a presença da mutação A-202 (G>A) para G6PD associada à Hb S e com Hb F aumentada, e em outra do gênero masculino, associação com Hb F acima da normalidade, ambas provenientes da Instituição de ensino.

Discussão

Nos resultados dos testes laboratoriais de diagnóstico para hemoglobinopatias, a alteração mais comum foi a talassemia beta heterozigota, na qual a maioria das mutações é de origem mediterrânea, seguida pelas Hb S e Hb C em heterozigose, mutações de origem africana.¹⁷ Vale destacar, que para a presença da Hb Hasharon, variante de origem européia, que migra na mesma posição da Hb S em eletroforese em pH alcalino, são necessários testes complementares, como a eletroforese em pH ácido, HPLC e análise molecular, para a confirmação da sua presença.¹⁸ As hemoglobinas anormais encontradas reforçam a importância do rastreamento das afecções hereditárias das globinas, e do diagnóstico adequado, principalmente para as Hb variantes com co-migração eletroforética, visando a orientação genética aos portadores, em grupos miscigenados.^{3,7}

Considerando que a maioria dos polimorfismos para a deficiência de G6PD é assintomática e a crise hemolítica é, geralmente, desencadeada por fatores externos, o rastreamento em indivíduos adultos, saudáveis, sem sinais ou sintomas de anemia hemolítica, é de grande importância, pois permite alertar os portadores sobre a susceptibilidade à crise hemolítica durante infecções, após a ingestão de certas drogas ou outros agentes oxidantes.^{19,20}

Nesse estudo, o rastreamento das amostras foi realizado pelo teste de Brewer, o qual é amplamente difundido em laboratórios de rotina para a triagem da deficiência enzimática, devido ao baixo custo dos reagentes e equipamentos, e sua simples execução. No entanto, a confirmação da alteração por meio de testes complementares é necessária, uma vez que o método de Brewer não é específico para a deficiência de G6PD.^{10,20} Amostras com resultado duvidoso no teste de

Brewer, mas com resultado normal na determinação enzimática, podem apresentar outra enzimopatia, ou o resultado pode ter sido influenciado por algum interferente externo. Nas amostras que apresentaram resultado positivo no teste de Brewer, a deficiência de G6PD foi confirmada em 100% delas. No entanto, para as amostras com resultado duvidoso, apenas 20% confirmou a alteração, demonstrando a necessidade da realização de metodologias complementares específicas, principalmente nas amostras com resultados duvidosos. Em trabalho realizado por Compri e colaboradores (2000) a porcentagem de resultados falsamente positivos foi de 6% ²¹, enquanto a nossa foi de 53%, com o uso da atividade enzimática.

A frequência da deficiência de G6PD de 3,86%, descrita neste trabalho, foi superior à de 2,38% para a região de Araraquara/SP.²² Em Rondônia, a frequência estimada, utilizando apenas o método de Brewer para o diagnóstico, foi de 3,3%.²³ Outro trabalho, utilizando metodologias específicas, mostrou para a região Sul, frequência igual a 1,4% para a deficiência total de G6PD e de 6,4% para a deficiência parcial.²⁴ Deve ser destacado ainda, que a frequência da deficiência enzimática entre doadores de sangue do gênero masculino foi maior que as descritas para a região de Araraquara/SP com 1,75%;¹⁵ Bragança Paulista/SP com 1,73% ⁶ e Bauru/SP com 3,65%.²⁵

A alteração para deficiência de G6PD mais freqüente no Brasil é a mutação de origem africana A-202 (G>A), que é uma variante clinicamente benigna. No entanto, a frequência de deficientes dessa enzima demonstra a necessidade de estratégias para a sua identificação, inclusive em doadores de sangue, em que a pesquisa é recomendada, visando a melhoria da qualidade do sangue a ser transfundido, bem como a orientação dos portadores para uma melhor qualidade de vida.²¹ A elevada proporção da mutação A-202 (G>A) reforça a contribuição dos imigrantes africanos, do sul da Itália, Espanha, Portugal e Península Arábica, em que a variante é freqüente, para a formação da população brasileira.^{6,26} Proporção semelhante à descrita neste trabalho foi encontrada na região de Campinas/SP com 97,3% desta mutação em doadores de sangue com deficiência de G6PD.²⁷ Outros estudos mostram também a presença de alterações

mais raras no Brasil, como as variantes Mediterrânea, A-(968T>C, 376>G), G6PD Seattle (844G>C), G6PD Santamaria (542A>T, 376A>G), G6PD Tokyo (1246G>A), além de outras.^{16,25,27} A associação entre a mutação A-202 (G>A) e a Hb S em uma das amostras pode ser explicada pela origem africana comum a essas alterações e demonstra a heterogeneidade molecular de defeitos hereditários do eritrócito na população brasileira.²⁸

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que os diferentes fenótipos de hemoglobinas anormais, bem como a alta frequência da deficiência de G6PD na população analisada, reforçam a importância da investigação dessas afecções hereditárias. Considerando a baixa especificidade dos testes de triagem e a característica miscigenada da população brasileira observa-se a necessidade da devida confirmação laboratorial, por meio do uso combinado de metodologias. A grande participação de vários grupos étnicos na formação da população pode ser confirmada por meio das afecções genéticas encontradas, cuja identificação possibilita uma melhor intervenção educacional e orientação aos portadores para o risco de hemólise pelo uso de medicamentos, ou contato com agentes oxidantes.

Referências

1. Bonini-Domingos CR. Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias. 1 ed. São José do Rio Preto: Editora HN; 2006.
2. Ramalho AS, Magna LA, Silva RBP. A Portaria MS nº 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. Rev Bras Hematol Hemoter. 2002;4:244-50.
3. Melo LMS, Siqueira FAM, Conte ACF, Bonini-Domingos CR. Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. Rev Bras Hematol Hemoter. 2008;30:12-7.
4. Sánchez TA, DP Núñez, Luengo MS. Anemia hemolítica por deficiência de G6PD y estrés oxidativo. Rev Cuba de Invest Bioméd. 2003;22:186-91.

5. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*. 2008;111:16-24.
6. Compri, MB, STO, Ramalho AS. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G6PD em uma comunidade brasileira. *Cad Saúde Pública*. 2000;16:335-42.
7. Chinelato-Fernandes AR, Bonini-Domingos CR. Contribuição do estudo molecular de hemoglobina S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005;27:208-12.
8. Marengo-Rowe AJ. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Path*. 1965;18:790-2.
9. Vella F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobin. *Am J Clin Path*. 1968;3:440-2.
10. Variante β -Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 2006.
11. Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS. Methaemoglobin reduction test. A new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. *Bull World Health Organ*. 1960;22:633-40.
12. Beutler E. *Red Cell Metabolism. A manual of Biochemical Methods*. 3 ed. London: Grune & Stratton, Inc; 1984.
13. Pena SDJ, Macedo AM, Gontijo NF, Medeiros AM, Ribeiro JCC. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis*. 1991;12:146-52.

14. Chinelato-Fernandes AR, Mendiburu CF, Bonini-Domingos CR. Utilization of different methodologies for the characterization of Hb Hasharon heterozygotes. *Genet Mol Res.* 2006;5:1-6.
15. Ferreira RIP. Polimorfismo genético da glicose-6-fosfato desidrogenase na população da região de Araraquara-S.P. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista; 2004.
16. Hamel AR, Cabral IR, Sales TS, Costa FF, Olalla Saad ST. Molecular Heterogeneity of G6PD Deficiency in an Amazonian Population and Description of Four New Variants. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28:399-406.
17. Huisman THJ, Carver MFH, Efremov GD. A Syllabus of Human Hemoglobin Variants (1996). The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, GA, USA. Disponível em: <<http://globin.cse.psu.edu/>> [capturado em 27/01/2009].
18. Bonini-Domingos CR, Ondei LS, Zamaro PJA . Hemoglobinas similares a S no Brasil - um guia prático de identificação. 1 ed. São José do Rio Preto: Editora HN; 2006.
19. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood.* 2007;21:267-83.
20. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet.* 2008;371:64-74.
21. Compri MB, Polimeno NC, Vieira MJA, Saad STO, Ramalho AS. Programa comunitário e deficiência de G-6-PD no Brasil. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2000;22:33-9.

22. Leite ERM, Lessi JHC, Mascarin DB, Leite AA. Pesquisa de deficientes em G6PD nos doadores de sangue da região de Araraquara. *Bol Soc Bras Hematol Hemot* 1996;18(supl):337.
23. KatsuragawaTH, Soares Gil LH, Stábile RG, Pires MG, Bonini-Domingos CR. Avaliação da incidência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) e perfil hematológico em indivíduos de uma região de Rondônia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26:268-73.
24. Castro S, Weber R, Dadalt V, Tavares V, Giugliani R. Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. *J Med Screen*. 2006;13:85-6.
25. Nicolielo DB, Ferreira RIP, Leite AA. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2006;28:135-38.
26. Glader BE, Lukens JN. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of hexose monophosphate shunt and glutathione metabolism. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 10 ed. Canada: Williams & Wilkins; 1998.
27. Saad STO, Salles TSI, Carvalho MHM, Costa, FF. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. *Hum Hered*. 1997;47:17-21.
28. Pereira MMM, Cabot A, González AM, Navarro ES, Cararach V, Sabrià J, et al. Cribado neonatal de hemoglobinopatías y déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en Cataluña. Estudio molecular de la anemia falciforme asociada a alfatalasemia y déficit de G6PD. *Med Clin (Barc)*. 2007;169:161-4.

Capítulo III

Este artigo será submetido à revista Free Radical Research.

Fator de impacto: 2,83.

Qualis: A2.

Peroxidação lipídica e capacidade antioxidante na talassemia beta heterozigota: influência das mutações CD39 e IVS-I-110

1. Luciana de Souza Ondei, 1. Isabeth da Fonseca Estevão, 1. Marina Ibelli Pereira Rocha, 2. Sandro Percário, 3. Dorotéia Rossi Silva Souza, 3. Marcela Augusta de Souza Pinhel, 1. Claudia Regina Bonini-Domingos

1. Unesp/Ibilce, Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
2. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas
3. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Biologia Molecular, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular

Resumo

A talassemia beta é um grupo de alterações em que a expressão da cadeia globínica beta pode estar diminuída (β^+) ou ausente (β^0). Na talassemia beta, o excesso de cadeias alfa livres, a alta concentração de Ferro não hemoglobínico e a menor concentração de hemoglobina total promovem danos oxidativos, levando a menor sobrevivência dos eritrócitos na circulação sanguínea. Neste trabalho, objetivamos avaliar os níveis de peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox de indivíduos com talassemia beta heterozigota, comparando-os com um grupo controle. Foram utilizadas 81 amostras para constituição do grupo controle e 46 para a formação do grupo com talassemia beta heterozigota. As amostras foram submetidas aos testes de triagem para hemoglobinopatias, PCR alelo específica para a confirmação das mutações para talassemia beta, bem como à análise de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinação da peroxidação lipídica, e verificação da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC). Foram avaliados também, os níveis de ferro sérico e ferritina sérica nos beta talassêmicos heterozigotos. Verificou-se que houve aumento dos níveis de TBARS e TEAC em talassêmicos heterozigotos comparados ao grupo controle. Também foi observada uma

tendência para aumento nos valores de TBARS para o grupo com a mutação beta⁰ CD39 comparados com a beta⁺ IVS-I-110, o que pode ser devido à maior quantidade de cadeias alfa livres nas beta⁰ talassemias. No entanto não foi encontrada diferença nos valores médios de TEAC entre os portadores das mutações CD39 e IVS-I-110, sendo maiores em ambos os grupos quando comparados ao controle. Não se verificou influência dos valores de ferro sérico e ferritina nos níveis de TBARS e TEAC. Os resultados do presente estudo confirmam maior estresse oxidativo em beta talassêmicos heterozigotos e mostram uma possível associação entre a presença da mutação CD39 e peroxidação lipídica aumentada.

Palavras-chave: talassemia beta, estresse oxidativo, TBARS, TEAC

1 Introdução

A talassemia beta é um grupo heterogêneo de alterações caracterizado pela síntese diminuída ou ausente de cadeia globínica beta (BANK, 2005; CUNNINGHAM, 2008). Vários defeitos moleculares, a maioria dos quais mutações pontuais, afetam a expressão do gene beta, que está localizado no braço curto do cromossomo 11, região 11p15.5 (BERTUZZO et al., 1997; HUISMAN, 2008). As alterações em que o gene está parcialmente ativo são chamadas de beta⁺, enquanto que os defeitos em que a expressão está totalmente ausente são chamadas de beta⁰ (CUNNINGHAM, 2008; HUISMAN, 2008).

Na talassemia beta, as cadeias globínicas não pareadas e a alta concentração celular de ferro não hemoglobínico podem promover danos oxidativos aos eritrócitos levando à diminuição da sua sobrevivência na circulação sanguínea, pois embora o ferro seja essencial para os processos metabólicos, seu excesso pode levar à produção de radicais livres (VIVES CORRONS et al., 1995; CIGHETTI et al., 2002; FERREIRA; MATSUBARA, 2007). Em indivíduos submetidos a transfusões sanguíneas periódicas, a sobrecarga de ferro está intimamente relacionada com aumento dos danos oxidativos aos tecidos, sendo a terapia quelante empregada para evitar os efeitos nocivos do excesso de ferro,

como por exemplo, cardiomiopatias (EMERIT et al., 2001; WALTER et al., 2008; SZUBER et al., 2009; KONTOGHIORGHES, 2009).

Para proteger-se dos agentes pró-oxidantes que são gerados no metabolismo celular e em decorrência de processos patológicos, as células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não enzimáticos. O estado oxidativo da célula é decorrente do equilíbrio entre a formação dos agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante, sendo o estresse oxidativo um agravante dos sintomas de diversas doenças, como as anemias hemolíticas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Segundo Bogdanska et al. (2003), as enzimas antioxidantes podem ser utilizadas como marcadores biológicos de algumas alterações, sendo sua determinação importante para avaliar a resposta do organismo frente aos agentes estressores.

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar o estado oxidante e antioxidante em talassêmicos (CIGHETTI et al., 2002; KASSAB-CHEKIR et al., 2003; CLASTER et al., 2009). No entanto, estão focados principalmente na forma grave e intermediária da doença e, para o perfil heterozigoto, poucos trabalhos têm sido realizados (SELEK et al., 2007). Além disso, o estado oxidante não é avaliado nas diferentes mutações para talassemia beta, o que é de fundamental importância devido à grande heterogeneidade genotípica e fenotípica observada para as diferentes populações (BEUTLER, 2001). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox de indivíduos com talassemia beta heterozigota, com duas mutações diferentes (CD39 e IVS-I-110), comparando-os com um grupo controle.

2 Material e Métodos

2.1 Amostragem

O grupo controle foi constituído por 81 amostras de sangue periférico, colhidas por punção venosa, após consentimento informado, de indivíduos da região Noroeste do Estado de São Paulo, com idade entre 18 e 62 anos, sendo 36 do gênero feminino e 45 do gênero masculino. Segundo a etnia, 60 foram

caucasóides e 21 não caucasóides. Para a formação do grupo com talassemia beta heterozigota, foram avaliadas 46 amostras de indivíduos com idade entre 18 e 79 anos, sendo 32 do gênero feminino e 14 do gênero masculino, todos caucasóides.

2.2 Metodologia

2.2.1 Testes de triagem para hemoglobinopatias

As amostras foram submetidas às eletroforeses de hemoglobina em pH 8,6 e pH 6,2 e à HPLC em Sistema automatizado VARIANT (Bio-Rad) com o kit “ β Thalassemia Short Program”. Valores de hemoglobina A₂ acima do valor de normalidade (2,5 a 3,5%) foram utilizados para o diagnóstico da talassemia beta heterozigota (MARENGO-ROWE, 1965; VELLA, 1968; Instruction Manual of BIO-RAD, 2006).

2.2.2 Análise molecular da talassemia beta

O DNA genômico das amostras com talassemia beta foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio, segundo Pena e colaboradores (1991). 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 (BERTHOLO; MOREIRA, 2006).

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.

2.2.3 Testes para determinação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total

A dosagem plasmática das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada para avaliação da peroxidação lipídica. 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. Valores até 440ng/mL são considerados normais (MIHARA; UCHIYAMA, 1978; PERCARIO et al., 2004).

A capacidade antioxidante das amostras (TEAC) foi determinada segundo a sua equivalência ao Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-carboxílico), um antioxidante análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. A técnica colorimétrica é baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínaácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio (K₂S₂O₈) que produz o radical cation ABTS^{•+}, cromóforo de coloração verde/azul. A adição de amostras contendo antioxidantes a este radical cátion pré-

formado o reduz novamente a ABTS e a descoloração é avaliada em 734nm (MILLER et al., 1993; RE et al., 1999). Os valores de normalidade estabelecidos no presente trabalho foram de 1,85 a 2,31mM/L, os quais correspondem ao valor médio obtido mais ou menos três vezes o seu desvio padrão. Esse intervalo corresponde, teoricamente, a 99,73% de um conjunto de dados com distribuição Gaussiana.

2.2.4 Dosagens de ferro sérico e 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.

Os valores de referência fornecidos pelo fabricante são de 37 a 170µg/dL para ferro sérico para homens e mulheres; 22 a 322ng/mL de ferritina para homens e 10 a 291ng/mL de ferritina para mulheres; 20 a 50% de saturação de transferrina para homens e mulheres.

2.3 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade pela inspeção gráfica dos resíduos e à homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Como as premissas para a utilização de testes paramétricos foram aceitas, foi empregado o *Teste t independente* para a comparação dos valores de TBARS e TEAC entre os grupos controle e com talassemia beta, e a Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, para comparar os valores de TBARS e TEAC entre os grupos controle, com a mutação CD39 e com a mutação IVS-I-110. A influência dos valores de ferro, ferritina e saturação de transferrina sobre os valores de TBARS, independente da mutação e do gênero, foi avaliada por meio da análise de regressão simples (ZAR, 1999). O software utilizado foi o Statistica 7 e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3 Resultados

As 81 amostras utilizadas como grupo controle apresentaram resultado normal nos testes de triagem para hemoglobinopatias. Os valores de TBARS e TEAC permaneceram dentro do intervalo de normalidade. Na Tabela 1 estão apresentados os valores de TBARS e TEAC para os grupos controle e com talassemia beta heterozigota.

Tabela 1: Valores de TBARS e TEAC do grupo controle e do grupo com talassemia beta heterozigota. (Média \pm Desvio Padrão e Mínimo-Máximo).

Parâmetros	Controle N=81	Talassemia Beta N=46	Teste <i>t</i> independente
TBARS (ng/mL)	260,86 \pm 92,40 74-428	488,26 \pm 112,70 314-848	p<0,01
TEAC (mM/L)	2,12 \pm 0,10 1,85-2,31	2,22 \pm 0,11 1,78-2,55	p<0,01

Na análise para verificação da peroxidação lipídica foi observado que em 30 (65%) amostras com talassemia beta heterozigota os valores de TBARS estavam acima dos valores de normalidade. O valor médio para esse grupo foi maior que o encontrado para o grupo controle, com diferença estatisticamente significativa (*Teste t independente*, p<0,01). Para os valores de TEAC, cinco amostras (11%) apresentaram valores fora do limite de normalidade, sendo uma com valor menor e quatro com valor maior que os estabelecidos neste estudo. Na comparação entre os grupos, talassêmico e controle, foi verificado valor médio de TEAC maior para os talassêmicos beta heterozigotos, com diferença estatisticamente significativa (*Teste t independente*, p<0,01).

Para avaliar o possível efeito das mutações para talassemias nos valores de TBARS e TEAC, as amostras foram subdivididas, segundo a mutação identificada. Das 46 amostras, 18 (39%) apresentaram a mutação CD39 em heterozigose; 22 (48%) confirmaram a mutação IVS-I-110 em heterozigose; uma

(2%) apresentou a mutação IVS-I-6 em heterozigose e cinco (11%) apresentaram resultado negativo para as três mutações analisadas. A amostra com a mutação IVS-I-6 e aquelas em que a mutação não foi identificada, não foram incluídas nessas análises devido ao número amostral reduzido. Os valores de TBARS e TEAC para as mutações CD39 e IVS-I110 estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de TBARS e TEAC do grupo controle e dos grupos com talassemia beta heterozigota, separados por mutação. (Média \pm Desvio Padrão e Mínimo-Máximo).

Parâmetros	Controle N=81	CD39 em heterozigose N=18	IVS-I-110 em heterozigose N=22
TBARS (ng/mL)	260,86 \pm 92,40 <i>A</i> 74-428	529,94 \pm 115,60 <i>B</i> 408-848	464,73 \pm 110,76 <i>B</i> 314-769
TEAC (mM/L)	2,12 \pm 0,10 <i>A</i> 1,85-2,31	2,20 \pm 0,08 <i>B</i> 2,03-2,35	2,22 \pm 0,13 <i>B</i> 1,78-2,37

**Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.*

Na dosagem de TBARS, 14 (78%) amostras com a mutação CD39 em heterozigose, apresentaram valores acima da normalidade, enquanto que para o grupo com IVS-I-110, 12 (54%) apresentaram valores maiores que os normais. Os valores de TBARS do grupo com a mutação CD39 e do grupo com IVS-I-110 foram maiores que o controle (ANOVA complementada por TuKey; $p < 0,01$). O grupo com a mutação CD 39 apresentou valor médio de TBARS maior que o grupo com IVS-I-110, mas a diferença entre eles não foi estatisticamente significativa (ANOVA complementada por TuKey; $p = 0,10$). Na análise da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox, os valores de TEAC dos dois grupos com talassemia beta heterozigota também foram maiores que os do grupo controle (ANOVA complementada por TuKey; $p = 0,02$), no entanto, não deferiram entre si (ANOVA complementada por TuKey; $p = 0,72$).

Os valores de ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina para o grupo com talassemia beta heterozigota estão apresentados na Tabela 3. Verificou-se que não houve influência dos níveis de ferro ($r^2 < 0,09$, $p > 0,05$), saturação de transferrina ($r^2 < 0,06$, $p > 0,09$), bem como da ferritina ($r^2 < 0,10$, $p > 0,05$) sobre os valores de TBARS e TEAC.

Tabela 3: Valores de ferro sérico, ferritina e saturação de transferrina no grupo com talassemia beta heterozigota (Média \pm Desvio Padrão e Mínimo-Máximo).

Parâmetros	Talassemia beta N=46
Ferro sérico ($\mu\text{g/dL}$)	100,15 \pm 26,66 43-151
Ferritina (ng/mL)	165,04 \pm 158,32 10-709
Saturação de transferrina (%)	31,53 \pm 9,83 13,3-51,3

4 Discussão

Nos eritrócitos talassêmicos, o excesso de cadeias alfa livres, a auto-oxidação e liberação do grupo heme podem resultar em estresse oxidativo, uma vez que a auto-oxidação leva à formação de radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a liberação intra-eritrocitária de grupo heme inicia uma via de oxidação da hemoglobina, resultando em danos aos eritrócitos talassêmicos (SCOTT, 2006). Embora a talassemia beta heterozigota não seja caracterizada por aumento de ferro, como observado para as formas grave e intermediária, o heme/ferro livre pode inibir várias enzimas citoplasmáticas, alterando a homeostase celular (CICCOLI et al., 1999; EMERIT et al., 2001). Associada ao estresse oxidativo dentro da célula, também ocorre significativa degradação de proteínas e peroxidação de lipídios, ambos da membrana celular (FREIKMAN et al., 2008). Dessa forma, a dosagem de TBARS é um bom indicador de estímulos pró-oxidantes (VIVES CORRONS et al., 1995; CIGHETTI et al., 2002).

Os níveis aumentados de TBARS nos talassêmicos heterozigotos, comparados ao grupo controle, são concordantes com os resultados de Seleke e colaboradores (2007) que encontraram aumento do estresse oxidativo e diminuição da enzima Paraoxonase 1 (PON1), uma glicoproteína expressa no fígado e que é encontrada no sangue, associada com partículas lipoprotéicas de alta densidade (HDL). A diminuição de PON1 está relacionada a susceptibilidade à oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (VIVES CORRONS et al., 2006; SELEK et al., 2007). Considerando a mutação no gene beta, pode-se observar uma tendência ao aumento da peroxidação lipídica nos indivíduos com a alteração beta⁰ CD39, comparado à beta⁺ IVS-I-110, o que era esperado devido à maior quantidade de cadeias alfa livres nas beta⁰ talassemias (BERTUZZO et al., 1997).

Nas análises dos níveis de TEAC também foi verificado aumento no valor médio para o grupo com talassemia beta heterozigota, quando comparado ao grupo controle, o que pode ser uma resposta ao estresse oxidativo aumentado. Estudos realizados com talassêmicos homozigotos mostraram diminuição da capacidade antioxidante, indicando uma redução da capacidade de neutralizar os efeitos adversos das espécies oxidativas. Já para a talassemia intermediária, foram encontrados valores maiores que os da talassemia homozigota e do grupo controle (CIGHETTI et al., 2002; KASSAB-CHEKIR et al., 2003). Na comparação entre as duas mutações, CD39 e IVS-I-110, os valores de TEAC não diferiram, sendo maiores em ambos os grupos, quando comparados aos do grupo controle. Quanto às enzimas de detoxificação, têm sido demonstrados níveis aumentados de superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em talassêmicos heterozigotos, um possível mecanismo contra o estresse oxidativo (GERLI et al., 1980; YENCHITSOMANUS; WASI, 1983).

Na talassemia beta, o excesso de ferro pode levar a complicações em diversos órgãos, como fígado, coração, além de disfunção endócrina (ORIGA et al., 2007). Os métodos comumente utilizados para avaliar os níveis de ferro incluem a sua quantificação sérica, avaliação da ferritina e da saturação de transferrina (LIEU et al., 2001). No nosso trabalho não houve relação entre esses parâmetros com os valores de TBARS e TEAC. No entanto, estudos recentes

mostram a importância de outros marcadores, como o ferro não ligado a transferrina (NTBI) e o ferro lábil plasmático (LPI), para detectar o excesso de ferro em talassêmicos, por apresentarem uma relação direta com a formação de radicais livres (POOTRAKUL, et al., 2004; TAHER et al., 2009).

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que os níveis de peroxidação lipídica e TEAC em talassêmicos heterozigotos são aumentados, sendo que mutações beta⁰ podem estar associadas a maior peroxidação lipídica do que mutações beta⁺, possivelmente pela maior quantidade de cadeias alfa livres.

5 Referências

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.

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, n. 2, p. 319-321, 1997.

BEUTLER, E. Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. *Blood*, v. 98, p. 2597-2602, 2001.

BOGDANSKA, J. J. et al. Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 104, n. 3, p. 108-114, 2003.

CICCOLI L. et al. Iron release in erythrocytes from patients with beta-thalassemia. *Free Radical Research*, v. 30, n. 5, p. 407-413, 1999.

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

CLASTER, S. et al. Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with hemoglobinopathies. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 6, p. 344-348, 2009.

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

EMERIT J. et al. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 55, n. 6, p. 333-339, 2001.

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, n. 1, p. 61-68, 1997.

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

FREIKMAN, I. et al., Oxidative stress causes membrane phospholipid rearrangement and shedding from RBC membranes—An NMR study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 2388–2394, 2008.

GERLI, G. C. et al. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in beta-thalassaemia (major and minor). **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 25, n. 1, p. 87-92, 1980.

HUISMAN H. J. et al. HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA

and McMaster University in Canadá, 1996. Disponível em: <<http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 01 de agosto de 2008.

INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante β -Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 2006.

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

KONTOGHIORGHES, G. J. Prospects for introducing deferiprone as potent pharmaceutical antioxidant. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 1, p. 161-178, 2009.

LIEU, P. T. et al. The roles of iron in health and disease, **Molecular Aspects of Medicine**, v. 200, p. 1-87, 2007.

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

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

MILLER, N. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

ORIGA, R. et al., Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. **Haematologica**, v. 92, n. 5, p. 583-588, 2007.

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.

POOTRAKUL, P. et al., Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overloaded beta-thalassemia/HbE patients treated with an oral chelator. **Blood**, v. 104, p. 1504-1510, 2004.

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

SCOTT, M. D. et al. Decreased catalase activity is the underlying mechanism of oxidant susceptibility in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1181, n. 2, p. 163-168, 1993.

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

SZUBER, N. et al. Alternative treatment paradigm for thalassemia using iron chelators. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 7, p. 773-785, 2008.

TAHER, A. et al., Levels of non-transferrin-bound iron as an index of iron overload in patients with thalassaemia intermedia. **British Journal of Haematology**, Epub ahead of print, 2009.

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

VIVES CORRONS, J. L. et al. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. *European Journal of Haematology*, v. 55, p. 327-331, 1995.

WALTER, P. B. et al. Inflammation and oxidant-stress in beta-thalassemia patients treated with iron chelators deferasirox (ICL670) or deferoxamine: an ancillary study of the Novartis CICL670A0107 trial. **Haematologica**, v. 93, n. 6, p. 817-825, 2008.

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.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.

Capítulo IV

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

Fator de impacto: 0,68.

Qualis: B3.

Lipid peroxidation and antioxidant capacity in G6PD-deficient individuals with A-(202G> A) mutation

L. S. Ondeí¹, L. M. Silveira¹, A. A. Leite², D. R. S. Souza³, M. A. S. Pinhel³, S. Percário⁴, O. Ricci-Júnior⁵, C. R. Bonini-Domingos¹

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

²Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.

³Departamento de Biologia Molecular, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

⁵Hemocentro, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Luciana de Souza Ondeí

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: luondei@yahoo.com.br

ABSTRACT

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is an enzymopathy in which concentrations of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) cannot be maintained, resulting in oxidative damage. In this work, we evaluated G6PD activity, oxidative stress levels and Trolox equivalent antioxidant capacity in individuals with the A-(202G>A) mutation for G6PD deficiency. A total of 544 peripheral blood samples were collected and analyzed. Tests were carried out aimed at the screening and confirmation of G6PD deficiency, as well as the analysis of lipid peroxidation products measured as thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). The determination of G6PD activity showed that men with the A-(202G>A) mutation had a lower enzymatic activity when compared to women with the same mutation. Individuals with the A-(202G>A) mutation also differed in mean TEAC values but not for TBARS values. These findings show that the A-(202G>A) mutation is associated with reduced G6PD activity and increased Trolox equivalent antioxidant capacity in Brazilian individuals.

Key words: G6PD deficiency; TBARS; TEAC; Oxidative stress

INTRODUCTION

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), a vital enzyme in all cells, catalyzes the first reaction of the pentose phosphate pathway allowing the conversion of glucose-6-phosphate (G6P) to 6-phosphogluconolactone (6PG). In this reaction, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) is reduced to NADPH which is also used in the protective process against physiologically high levels of oxidative damage (Bilmen et al., 2001). In red blood cells, this is the only source of NADPH, making them more vulnerable than other cells to destruction by oxidative stress (Mason et al., 2007). NADPH is a key hydrogen donor for the reduction of oxidized glutathione (GSSG) to a tripeptide known as reduced glutathione (GSH). This tripeptide is used as a reducing agent by glutathione peroxidase which is involved in the detoxification of hydrogen peroxide. In this process GSH is converted to GSSG leading to a decrease in GSH. The regeneration of GSH occurs by the action of glutathione reductase which catalyzes the reduction of GSSG to GSH in the presence of NADPH (Njålsson and Norgren, 2005). Since there are no other sources of NADPH in red blood cells, G6PD is essential in protecting hemoglobin sulfhydryl groups and preventing red blood cell membrane oxidation (Pandolfi et al., 1995).

G6PD deficiency is the most common red blood cell enzyme disorder in humans, affecting more than 400 million people worldwide (Mason et al., 2007; Beutler, 1994). It is characterized by a hemolytic crisis after ingestion of oxidizing agents such as antimalarial drugs, sulfanilamide, acetanilide and some sulfones (Beutler, 2008). This change is caused by mutations in the gene coding for G6PD, located in the telomeric region of the X-chromosome long arm, Xq28 (Martini et al. 1986). Most of the mutations show a marked reduction in enzyme stability due to changes in protein folding. The regions affected are usually sites of contact between the protein subunits or regions that interact with the NADP molecule (Mason et al., 2007). Phenotypic expression of G6PD deficiency affects men more than women according to the pattern of sex-linked recessive inheritance. The illness is completely expressed in men, while in heterozygous women G6PD

enzyme activity may be normal, moderately low or very deficient, depending on the cell population distribution (Cappellini and Fiorelli, 2008).

In G6PD deficiency, normal NADPH concentrations cannot be maintained and GSH levels decrease, resulting in red blood cell oxidative damage due to endogenous and exogenous agents and leading to a hemolytic crisis (Frank, 2005; Mason et al., 2007). Thus, in view of the possibility of oxidative stress and hemolysis in individuals with G6PD deficiency, this study aimed to determine the levels of lipid peroxidation and Trolox equivalent antioxidant capacity in red blood cells from individuals without hemolytic crisis and a specific G6PD mutation.

MATERIAL AND METHODS

Population

A total of 544 peripheral blood samples were drawn and analyzed, after consent, from individuals of the northwestern region of Sao Paulo State. Three hundred and forty-six (63.60%) were males and 198 (36.40%) were females, with age ranging from 16 to 85 years. From this sample 382 (70.22%) were Caucasians, 74 (13.60%) African descendants and 88 (16.18%) from different ethnic origins. The total group was composed of 426 healthy blood donors from the Blood Bank of Sao Jose do Rio Preto – Sao Paulo State – Brazil (HEMOCENTRO), and 118 individuals from an educational institute.

G6PD deficiency tests

Positive samples for G6PD deficiency were screened using the Brewer qualitative method, based on methemoglobin (Fe^{+3}) formation by the action of nitrite on hemoglobin (Fe^{+2}). Methylene blue stimulates the phosphate pentose pathway resulting in the production of NADPH which reconverts the oxidized hemoglobin to the reduced form. The rate of reduction is proportional to erythrocyte G6PD activity (Brewer et al., 1960).

Confirmation of G6PD deficiency was carried out by assaying for G6PD activity using the method recommended by Beutler (1984). The diagnosis is made by adding a measured amount of hemolysate to an assay mixture containing substrate (glucose-6-phosphate) and cofactor (NADP). The test measures the reduction of NADP to NADPH which is proportional to the increase in absorbance at 340 nm. Enzyme activity is expressed in IU/gHb/min at 37 °C and pH 8.0, where one enzyme unit (IU) is defined as the amount of enzyme that reduces 1 μ mol of NADP⁺ per minute at 37° C (Beutler, 1984).

DNA from G6PD-deficient blood samples was isolated by the phenol/chloroform method (Pena et al., 1991). The A-(202G>A) G6PD gene mutation was confirmed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis (PCR/RFLP) (Saiki, 1988; Hamel et al., 2002). The forward primer used was 5' CAG CCA CTT CTA ACC AC 3' and the reverse primer was 5' AAC CAG GCT GGG GGA G 3'. PCR amplification was performed using a preheating step at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 50 s, with final extension at 72°C for 5 min. The PCR fragment produced was 314 bp in length. Samples were digested with *Nla III* enzyme (New England BioLabs) in order to detect the normal allele fragment (314 bp) and the mutant allele fragments (218 and 96 bp).

Oxidative stress and antioxidant status determination

Oxidative stress was evaluated by determining the level of plasma thiobarbituric acid reactive species (TBARS), which are end products of lipid peroxidation. In red blood cells, lipid peroxidation causes disorganization of the lipid moiety of cell membranes resulting in lethal damage to the cell. TBARS quantification is based on the reaction of malondialdehyde and other aldehydes with thiobarbituric acid (TBA) at low pH and high temperature to form a complex where absorbance can be read at 535 nm. Normal values were considered up to 440 ng/mL (Mihara and Uchiyama, 1978; Percario et al., 2004).

The antioxidant capacity of the samples was determined according to their equivalence to the antioxidant activity of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), a vitamin E synthetic analogue used as an antioxidant standard. Plasma Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was determined using a technique based on the colorimetric reaction between the ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt and potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) which produces the green/blue colored $ABTS^{+}$ radical. In the reaction, the addition of the sample containing antioxidant molecules, reduces the $ABTS^{+}$ radical thus causing a discoloration that can be determined at 734 nm (Miller et al.; 1993; Re et al., 1999).

Statistical Analysis

Data were tested for normal distribution by graphic inspection of the residues and for homogeneity of variances using Levene's test. Thus, the two-way ANOVA test followed by multiple comparison using Tukey's test was employed to assess the effects of gender (male and female) and group (control and G6PD deficient) on enzyme activity, TBARS and TEAC values (Zar, 1999). Statistical analysis was carried using the software Statistica 7 (Statsoft Inc.), and the level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

The screening test for G6PD deficiency suggested a possible alteration in enzyme activity in 57 samples (10.48%). Among these, 27 (4.96%) displayed G6PD deficiency confirmed by assaying enzyme activity, and none of them showed hemolytic crisis. With the PCR/RFLP test for identifying the A-(202G>A) mutation, 22 samples were positive, which represented 81.14% of the G6PD deficiency group, and 4.04% of the total group studied, comprising nine (40.91%) African descendants, six (27.27%) Caucasians and seven (31.82%) of different ethnic origins. The test group used in assessing enzyme activity was

composed of samples with positive results in all three G6PD deficiency tests. The control group was formed by 45 samples, randomly allocated, with normal G6PD activity.

The results of G6PD enzyme activity separated by gender are shown in Table 1. For the control group, G6PD activity ranged from 8.03 to 14.80 IU/gHb/min at 37 ° and was set as a reference for the deficiency group. The group with G6PD deficiency showed lower values, with a significant difference in relation to the control group ($F_{(1,63)}=319.15$, $P<0.01$). Moreover, an effect of gender was found on the G6PD activity values ($F_{(1,63)}=11.26$, $P<0.01$) for the G6PD-deficient group. Men with G6PD deficiency showed lower enzyme activity than did women (Tukey's test, $P<0.01$), while there was no difference between men and women in the control group (Tukey's test, $P=0.86$).

TABLE 1

The normal values for the TEAC method was established under local analysis condition in 81 samples with normal TBARS values, randomly selected. The established mean level for TEAC was 2.12 ± 0.10 mM, ranging from 1.85 to 2.31 mM. The values corresponded to the average obtained from the group more or less three times the standard deviation. This interval corresponds theoretically to 99.73% of the all data with Gaussian distribution.

As the G6PD activity value was lower in men compared to women in the G6PD deficiency group, we also evaluated the effects of gender on TBARS and Trolox equivalent antioxidant capacity assays. However, no gender differences were noted in the TBARS ($F_{(1,94)}=0.14$, $P=0.70$) and TEAC ($F_{(1,94)}=0.01$, $P=0.93$) results.

Comparison between the control and the G6PD deficiency groups, regardless of gender, indicated that there was no significant difference for TBARS ($F_{(1,94)}=0.01$, $P=0.96$). In the G6PD deficiency group, only one sample showed TBARS value above the normal range. However, all the values of TEAC were within the normal range, as previously mentioned, and a higher average value in

the G6PD deficiency group was found in relation to the control group, showing a significant difference ($F_{(1,94)}=14.02$, $P<0.01$). The means, standard deviation, and maximum and minimum values for TBARS and TEAC in both control and G6PD deficiency groups, are presented in Table 2.

TABLE 2

DISCUSSION

In the present study, we found a moderate frequency of G6PD deficiency (4.96%). Previous reports have shown a prevalence between 1% and 10% in Brazil. The frequency of the A-202 (G> A) mutation confirms previous studies showing that it is the most common variant in the country, mainly in the Southeast region and reinforces the important contribution of people from Africa, Southern Italy, Spain, Portugal and Arabian Peninsula, where this mutation is frequent (Saad et al., 1997; Compri et al., 2000; Hamel, 2002; Castro et al., 2006).

In this study, there was no difference in G6PD activity between genders in the control group. However, for the G6PD deficiency group, hemizygous men had a lower G6PD average than women. Since the heterozygous women are genetic mosaics resulting from random X-chromosome inactivation, the phenotype may be asymptomatic or moderate or show severe acute hemolytic anemia. Thus, hemizygous men have deficient G6PD activity and women have an enzyme activity that may vary from normal to severely deficient levels (Beutler, 2008; Brandt et al., 2008; Cappellini and Fiorelli, 2008).

As G6PD activity was lower in men than in women with G6PD deficiency, a greater oxidative damage and/or a higher antioxidant capacity was expected. However, males and females did not differ in lipid peroxidation pattern, a marker of cellular oxidative damage, as observed in the comparison between genders in the control group. Only the Trolox equivalent antioxidant capacity was higher in the G6PD deficiency group, which may be a response to oxidative stress.

Previous “in vitro” studies demonstrated the importance of NADPH in maintaining antioxidant enzymes, such as catalase (Scott et al., 1993). Gaetani et al. (1996) reported a decrease in catalase levels and reduced glutathione in red blood cells with G6PD deficiency during hemolytic crises. Therefore, it was expected that erythrocyte with G6PD deficiency would show a greater susceptibility to damage caused by reactive oxygen species, since there would be less maintenance of NADPH-dependent enzymes, such as catalase and glutathione reductase in G6PD-deficient individuals without hemolytic crisis. However, as observed in other studies, differences were not found in TBARS values between men and women with G6PD deficiency, as well as in the control group (Gerli et al., 1982; Bilmen et al., 2001). Despite this finding, it is possible that other oxidative stress markers may provide additional information that was not detected in this study, since there is controversy about the choice of convenient marker (Del Rio et al., 2005).

According to the literature, there are not many studies that have examined oxidative stress in G6PD deficiency due to a specific mutation. Our results show that people with G6PD deficiency due to the A-(202G>A) mutation, may differ in G6PD activity and TEAC values but not in relation to lipid peroxidation, when compared to individuals without G6PD deficiency.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Programa de Demanda Social da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

Beutler E (1984). Red Cell Metabolism. A manual of Biochemical Methods, 3rd edn. Grune & Stratton Inc, London.

Beutler E (1994). G6PD deficiency. *Blood*. 84: 3613-3636.

Beutler E (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*. 111: 16-24.

Bilmen S, Aksu TA, Gümüşlü S, Korgun DC (2001). Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clin Chim Acta*. 303: 83-86.

Brandt O, Rieger A, Geusau A, Stingl G (2008). Peas, beans, and the Pythagorean theorem - the relevance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges*. 6: 534-539.

Brewer GJ, Tarlov AR, Alving AS (1960). Methaemoglobin reduction test. A new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. *Bull World Health Organ*. 22: 633-640.

Cappellini MD and Fiorelli G (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 371: 64-74.

Castro S, Weber R, Dadalt V, Tavares V et al. (2006). Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. *J Med Screen*. 13: 85-86.

Compri MB, Saad STO, Ramalho AS (2000). Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G6PD em uma comunidade brasileira. *Cad Saúde Pública*. 16: 335-342.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 15: 316-328.

Frank JE (2005). Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *Am Fam Physician*. 72: 1277-1282.

Gaetani GF, Rolfo M, Arena S, Mangerini R, et al. (1996). Active involvement of catalase during hemolytic crises of favism. *Blood*. 88: 1084-1088.

Gerli GC, Beretta L, Bianchi M, Agostoni A, et al. (1982). Erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Scand J Haematol*. 29: 135-140.

Hamel AR, Cabral IR, Sales TS, Costa FF, et al. (2002). Molecular heterogeneity of G6PD deficiency in an Amazonian population and description of four new variants. *Blood Cells Mol Dis*. 28: 399-406.

Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto, L. et al (1986). Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Embo J*. 5:1849-1855.

Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F (2007). G6PD deficiency: genotype-phenotype association. *Blood Rev*. 21: 267-283.

Mihara M and Uchiyama M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 86: 271-278.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. 84: 407-412.

Njålsson R and Norgren S (2005). Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. *Acta Paediatr*. 94: 132-137.

Pandolfi PP, Sonati F, Rivi R, Mason P, Grosveld F, Luzzatto L (1995). Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate

dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *EMBO J.* 14: 5209-5215.

Pena SD, Macedo AM, Gontijo NF, Medeiros AM, Ribeiro JC (1991). DNA bioprints: simple nonisotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis.* 12: 146-152.

Percario S, Vital ACC, Jablonka F (2004). Dosagem do malondialdeído (TBARS). *NewsLab.* 6: 46-50.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26: 1231-1237.

Saad STO, Salles TSI, Carvalho MHM, Costa FF (1997). Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. *Hum Hered.* 47: 17-21.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239: 487-491.

Scott MD, Wagner TC, Chiu DT (1993). Decreased catalase activity is the underlying mechanism of oxidant susceptibility in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1181: 163-168.

Zar JH (1999). *Biostatistical Analysis.* 4th edn. Prentice Hall, New Jersey.

Table 1: Erythrocyte G6PD activity of control and G6PD-deficient groups, separated by gender (mean \pm SD and min-max).

Parameter	Control		G6PD-deficient	
	Males N=29	Females N=16	Males N=14	Females N=8
G6PD (IU/gHb/min at 37 °C)	9.87 \pm 1.35 8.03-13.34	10.24 \pm 1.79 8.06-14.80	1.48 \pm 1.22 0.0-4.77	3.88 \pm 1.97 1.77-7.26
Test significance	NS		P<0.01	

N = number of samples

NS= Not significant

Table 2: TBARS and TEAC values in serum of control and G6PD-deficient groups (mean \pm SD and min-max).

Parameter	Control N=81	G6PD-deficient N=17
TBARS (ng/mL)	260.86 \pm 92.40 74-428	259.94 \pm 117.07 97-480
Test significance	NS	
TEAC (mM)	2.12 \pm 0.10 1.85-2.31	2.22 \pm 0.06 2.12-2.31
Test significance	P<0.01	

N = number of samples

NS= Not significant

Capítulo V

Este artigo será submetido à revista Free Radical Biology and Medicine.

Fator de impacto: 5,4.

Qualis: A1.

Frequência dos polimorfismos da glutathione *S*-transferase na talassemia beta heterozigota e na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase

1. Luciana de Souza Ondei, 1. Isabeth da Fonseca Estevão, 2. Dorotéia Rossi Silva Souza, 2. Marcela Augusta de Souza Pinhel, 1. Claudia Regina Bonini-Domingos

1. Unesp/Ibilce, Departamento de Biologia, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas

2. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Biologia Molecular, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular

Resumo

A talassemia beta heterozigota e a deficiência de G6PD são afecções hereditárias com alto potencial de danos oxidativos que podem resultar em hemólise. A glutathione *S*-transferase (GST) é uma família de enzimas que atua na metabolização de compostos tóxicos à célula, e seus polimorfismos genéticos têm sido associados a diversos tipos de doenças. Nos eritrócitos, as GSTs podem atuar intracelularmente para prevenir a hemólise. Nesse trabalho, nós avaliamos a frequência dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1*, por meio de PCR multiplex, e de *GSTP1*, por PCR/RFLP, em 81 amostras controle, 46 portadores de talassemia beta heterozigota e 27 indivíduos com deficiência de G6PD. As frequências obtidas para *GSTM1*- e *GSTT1*- foram de 73% e 47% para o grupo controle; 54% e 38% para o grupo com talassemia beta heterozigota e de 41% e 22% para o grupo com deficiência de G6PD. A frequência do genótipo nulo de *GSTM1* no grupo controle foi maior que os descritos pela literatura para a população brasileira, assim como as frequências do genótipo nulo de *GSTT1* do grupo controle e com talassemia beta heterozigota. Para o polimorfismo do gene *GSTP1*, apenas o grupo com deficiência de G6PD apresentou valores diferentes dos previamente descritos, com frequência menor do alelo selvagem *I* e maior do alelo mutante *V*, bem como frequência menor de homozigotos selvagens e maior de homozigotos mutantes. No presente trabalho, nós estabelecemos as frequências

dos polimorfismos de *GSTMI*, *GSTT1* e *GSTP1* em beta talassêmicos e em deficientes de G6PD e verificamos diferenças nas frequências dos polimorfismos com dados previamente descritos na literatura.

Palavras-chave: talassemia beta, deficiência de G6PD, polimorfismos, *GSTMI*, *GSTT1*, *GSTP1*

Introdução

A talassemia beta heterozigota e a deficiência de G6PD são afecções hereditárias, geneticamente bem caracterizadas, com alto potencial de danos oxidativos resultando, frequentemente, em hemólise (CHAN, et al., 1999; DHALIWAL et al., 2004). Na talassemia beta, o acúmulo de cadeias alfa livres levam à hemólise prematura dos eritrócitos com liberação do ferro e do grupo heme, principalmente nas formas graves, promovendo aumento dos danos oxidativos (KASSABI-CHEKIR et al., 2003; CHENG et al., 2004). Na deficiência de G6PD a redução na produção de NADPH compromete as vias de proteção contra os danos celulares, e os eritrócitos tornam-se mais vulneráveis à hemólise pelo efeito de agentes oxidantes endógenos e exógenos (CHAN, et al., 1999; FRANK, 2005; MASON et al., 2007). Nos eritrócitos, a glutathione *S*-transferase (GST) pode atuar intracelularmente para prevenir a hemólise, sendo sua atividade um indicador de estresse oxidativo em vários tipos de anemias (WHEI-LING et al., 2007).

As GSTs são uma família de enzimas de fase II que catalisam a conjugação de compostos tóxicos de origem endógena e exógena com o tripeptídeo glutathione (GSH). Elas também atuam na proteção de lipídios e ácidos nucleicos e participam da metabolização de alguns esteróides e leucotrienos (MO et al, 2009). As GSTs são encontradas principalmente no citosol, sendo a GST π também encontrada no núcleo e na mitocôndria com importante papel protetor contra o estresse oxidativo mitocondrial (CHIANG et al., 2007; GOTO et al., 2009).

Polimorfismos genéticos têm sido descritos em todas as classes das GSTs, e por estarem envolvidos na biotransformação de carcinógenos, têm sido associados a diversos tipos de câncer como pulmão, próstata, colo-retal e outros (KUMAR et al., 2009; MO et al., 2009; MATAKOVA et al., 2009). Os principais polimorfismos são os do gene *GSTMI* (1p13.3), que apresenta um alelo com atividade nula devido a uma grande deleção e outros dois funcionais *GSTMIa* e *GSTMIb*; do gene *GSTT1* (22q11.23) que também pode apresentar um genótipo nulo por deleção e do gene *GSTP1* (11q13), em que a variante associada com menor atividade catalítica é resultante da transição de A→G levando a troca do aminoácido isoleucina por valina no códon 105 (MO et al., 2009). Indivíduos com a deleção nos genes *GSTMI* e *GSTT1*, em homozigose, apresentam perda total da atividade enzimática, sendo necessária a presença de pelo menos um alelo funcional para a expressão da enzima (ARAND et al., 1996).

Diante da escassez de trabalhos sobre os polimorfismos das GSTs nas anemias hemolíticas, nós objetivamos avaliar a frequência dos polimorfismos de *GSTP1*, *GSTT1* e *GSTP1* em portadores de talassemia beta heterozigota e em indivíduos com deficiência de G6PD.

Material e Métodos

No estudo, foram colhidas amostras de sangue periférico, com EDTA como anticoagulante, por punção venosa, após consentimento informado. O grupo controle foi constituído por 81 amostras de indivíduos com idade entre 18 e 62 anos ($30,66 \pm 10,41$ anos), sendo 50 (62%) doadores de sangue e 31 (38%) indivíduos de uma instituição de ensino. Segundo o gênero, foram 45 (56%) homens e 36 (46%) mulheres e, segundo a etnia, foram 60 (74%) caucasóides e 21 (26%) não caucasóides incluindo negros, pardos e orientais. Os critérios de inclusão utilizados para compor o grupo controle foram apresentar resultados normais nos testes de triagem para hemoglobinopatias e deficiência de G6PD, e não ter nenhuma doença. O grupo com talassemia beta foi composto por 46 amostras de indivíduos com idade entre 18 e 79 anos ($41,82 \pm 17,44$ anos), 14 (30%) homens e 32 (70%) mulheres, todos caucasóides. O grupo com deficiência

de G6PD compreendeu 27 indivíduos com idade entre 15 e 72 anos ($36,29 \pm 13,97$ anos), 16 (59%) homens e 11 (41%) mulheres, sendo 10 (37%) caucasóides e 17 (63%) não caucasóides.

O DNA genômico das amostras foi extraído pelo método do fenol/clorofórmio, segundo Pena e colaboradores (1991). Os polimorfismos para *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 os genes *GSTM1* e *GSTT1* foram identificados pela ausência dos fragmentos de amplificação de 218 pb e 459 pb, respectivamente (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. 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 (ISHII et al., 1999; PINHEL et al., 2008).

O teste do qui-quadrado (χ^2) foi empregado para a comparação das frequências genóticas e alélicas para *GSTMI*, *GSTTI* e *GSTPI* entre os grupos. Nos casos em que as premissas para a realização do teste foram violadas, utilizou-se a estimativa por máxima verossimilhança. O nível de significância adotado foi 5% ($p < 0,05$) e o software utilizado nas análises foi o Statistica 7.

Resultados

Nas análises das frequências dos polimorfismos das GSTs do grupo controle, separado por etnia em caucasóide e não caucasóide, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa para os genótipos individuais de *GSTMI* ($p=0,69$; $\chi^2=0,16$) e *GSTTI* ($p=0,27$; $\chi^2=1,19$), bem como para os genótipos combinados *GSTMI/GSTTI* positivos, *GSTMI/GSTTI* nulos, *GSTMI* positivo/*GSTTI* nulo e *GSTMI* nulo/*GSTTI* positivo ($p=0,64$; $\chi^2=1,69$). Os grupos caucasóide e não caucasóide também não diferiram nas frequências alélica ($p=0,94$; $\chi^2=0,01$) e genotípica ($p=0,94$; $\chi^2=0,12$) do polimorfismo do gene *GSTPI*. Desta forma, nas comparações entre os grupos, as amostras não foram separadas segundo a etnia.

As frequências dos polimorfismos de *GTMI* e *GSTTI* para o grupo controle e o grupo com talassemia beta heterozigota estão apresentadas na Tabela 1. Na comparação dos polimorfismos entre os grupos, verificou-se frequência maior do genótipo *GSTMI*+ no grupo com talassemia beta, comparado ao grupo controle, com diferença significativa ($p=0,02$; $\chi^2=5,53$). Não houve diferença na presença [+] ou ausência [-] do gene *GSTTI*, nem na combinação dos genótipos *GSTMI/GSTTI*, conforme demonstrado na Tabela 1. Para o polimorfismo de *GSTPI*, os grupos controle e talassemia beta heterozigota não diferiram na frequência alélica ($p=0,62$; $\chi^2=0,25$) e genotípica ($p=0,86$; $\chi^2=0,30$), conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 1: Frequências genótípicas para *GSTMI* e *GSTTI* nos grupos controle e com talassemia beta heterozigota.

Genótipos*	Controle (N=81)	Talassemia Beta (N=46)	Teste de significância
Individuais	N (%)	N (%)	
<i>GSTMI</i>			
[+]	22 (27%)	22 (52%)	p=0,02; $\chi^2=5,53$
[-]	59 (73%)	24 (48%)	
<i>GSTTI</i>			
[+]	43 (53%)	28 (61%)	p=0,40; $\chi^2=0,72$
[-]	38 (47%)	18 (39%)	
Combinados			
<i>GSTMI/GSTTI</i>			
[+] / [+]	17 (21%)	15 (33%)	p=0,08; $\chi^2=6,65$
[-] / [-]	33 (41%)	11 (24%)	
[+] / [-]	5 (6%)	7 (15%)	
[-] / [+]	26 (32%)	13 (28%)	

* Genótipos selvagem [+] e nulo [-]

Tabela 2: Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo P1 da glutathione S-transferase nos grupos controle e com talassemia beta heterozigota.

<i>GSTP1</i>	Controle (N=81)	Talassemia Beta (N=46)	Teste de significância
Alelos	N (Frequência)	N (Frequência)	
<i>I</i>	115 (0,71)	68 (0,74)	$p=0,62; \chi^2=0,25$
<i>V</i>	47 (0,29)	24 (0,26)	
N total	162 (1,0)	92 (1,0)	
Genótipos	N (%)	N (%)	
<i>II</i>	39 (48%)	24 (52%)	$p=0,86; \chi^2=0,30$
<i>IV</i>	37 (46%)	20 (44%)	
<i>VV</i>	5 (6%)	2 (4%)	
N total	81 (100%)	46 (100%)	

Na análise dos polimorfismos de *GSTMI* e *GSTTI* verificou-se que o grupo com deficiência de G6PD, demonstrado na Tabela 3, apresentou frequência maior dos genótipos individuais *GSTMI+* ($p<0,01; \chi^2=9,15$) e *GSTTI+* ($p=0,02; \chi^2=5,11$) comparado com o grupo controle. As frequências dos genótipos combinados também diferiram entre os dois grupos ($p=0,01; \chi^2=10,99$). No grupo com deficiência de G6PD o genótipo combinado que apresentou maior frequência foi o *GSTMI+/GSTTI+*, diferindo do grupo controle ($p<0,01; \chi^2=9,43$). Para o polimorfismo do gene *GSTP1*, os grupos controle e com deficiência de G6PD não diferiram na frequência alélica ($p=0,06; \chi^2 3,41; GL=1$) e genotípica ($p=0,06; \chi^2 5,78$), conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 3: Frequências genótípicas para *GSTMI* e *GSTTI* nos grupos controle e com deficiência de G6PD.

Genótipos*	Controle (N=81)	Deficiência de G6PD (N=27)	Teste de significância
Individuais	N (%)	N (%)	
<i>GSTMI</i>			
[+]	22 (27%)	16 (59%)	p<0,01; $\chi^2=9,15$
[-]	59 (73%)	11 (41%)	
<i>GSTTI</i>			
[+]	43 (53%)	21 (78%)	p=0,02; $\chi^2=5,11$
[-]	38 (47%)	6 (22%)	
Combinados			p=0,01; $\chi^2=10,99$
<i>GSTMI/GSTTI</i>			
[+] / [+]	17 (21%)	14 (52%)	p<0,01; $\chi^2=9,43$
[-] / [-]	33 (41%)	4 (15%)	p=0,01; $\chi^2=6,04$
[+] / [-]	5 (6%)	2 (7%)	p=0,82; $\chi^2=0,51$
[-] / [+]	26 (32%)	7 (26%)	p=0,54; $\chi^2=0,36$

* Genótipos selvagem [+] e nulo [-]

Tabela 4: Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo P1 da glutathione S-transferase nos grupos controle e com deficiência de G6PD.

<i>GSTP1</i>	Controle (N=81)	Deficiência de G6PD (N=27)	Teste de significância
Alelos	N (Frequência)	N (Frequência)	
<i>I</i>	115 (0,71)	31 (0,57)	p=0,06; $\chi^2=3,41$
<i>V</i>	47 (0,29)	23 (0,43)	
N total	162 (1,0)	54 (1,0)	
Genótipos	N (%)	N (%)	p=0,06; $\chi^2=5,78$
<i>I/I</i>	39 (48%)	10 (37%)	
<i>I/V</i>	37 (46%)	11 (41%)	
<i>V/V</i>	5 (6%)	6 (22%)	
N total	81 (100%)	27 (100%)	

Discussão

Os polimorfismos das GSTs podem estar associados a um menor efeito de detoxificação, contribuindo para a existência de diferenças interindividuais na resposta contra agentes xenobióticos. Desta forma, a associação dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* com diversas doenças, como câncer e doenças inflamatórias, e com respostas no metabolismo, eficácia e toxicidade de certas drogas têm sido amplamente investigada (HIRVONEN, 1995; ZHONG et al., 2006).

Estudos têm demonstrado que as frequências dos polimorfismos não diferem entre os gêneros da mesma população, mas pode existir variação significativa entre diferentes grupos étnicos (ROSSINI et al., 2002; ZHONG et al., 2006; MAGNO et al., 2009). No presente trabalho, nós não encontramos diferença estatisticamente significativa entre indivíduos caucasóides e não caucasóides para os três polimorfismos avaliados e, dessa forma, não usamos a separação de etnias nas análises realizadas. Magno e colaboradores (2009) também não encontraram diferenças significantes nas frequências dos genótipos de *GSTM1*, *GSTT1* e

GSTP1, entre indivíduos caucasóides e afro-descendentes na região Nordeste do Brasil. No entanto, eles verificaram que os ameríndios apresentaram diferenças quando comparados aos demais grupos (MAGNO et al., 2009).

Em nosso trabalho, o grupo controle apresentou frequências maiores que as descritas na literatura tanto para o genótipo *GSTMI*- quanto para *GSTTI*-, que pode ter sido decorrente da seleção das amostras do grupo controle, composto por pessoas jovens e saudáveis, o que não descarta uma possível doença de caráter tardio associada à presença dos polimorfismos nulos avaliados. Na população brasileira, considerando diferentes grupos étnicos, têm sido demonstradas frequências de 33,2 a 58,0% para o genótipo *GSTMI*- e de 17,8 a 30,2% para o genótipo *GSTTI*- (ROSSINI et al., 2002; GATTÁS et al. 2004; GOLONIBERTOLLO et al., 2006; 2008; MAGNO et al., 2009).

Encontramos ainda frequência igual a 48% do genótipo *GSTMI*- em beta talassêmicos, o qual deve ser avaliado com precaução, uma vez que foi demonstrada associação do genótipo *GSTMI*- com depósito de ferro cardíaco em beta talassêmicos homozigotos, o que pode ajudar a explicar a sobrecarga de ferro em pacientes tratados adequadamente com terapias quelantes de ferro, logo nos seus primeiros anos de vida (WU et al., 2006; ORIGA et al., 2008). Em um trabalho realizado por Chiang e colaboradores (2007) foram encontrados níveis diminuídos da enzima GST μ em casos de anemia aplástica, anemia por deficiência de ferro e nas talassemias. A frequência que encontramos para o genótipo *GSTTI*- no grupo com talassemia beta foi maior que a descrita na literatura. Wu e colaboradores (2006) verificaram que não há associação dos genótipos nulos de *GSTMI* e *GSTTI* com disfunções endócrinas como diabetes, hipogonadismo, hipotireoidismo e deficiência do hormônio de crescimento na talassemia beta maior. Para o grupo com deficiência de G6PD foram encontradas frequências de *GSTMI*- e *GSTTI*- menores que as do grupo controle, as quais estão de acordo com os valores descritos pela literatura.

A avaliação de genótipos combinados é de grande importância na investigação da atividade catalítica e na variabilidade de resposta a diferentes substratos, uma vez mutações nulas combinadas resultam em significativa redução

da atividade das GSTs (ZHONG et al., 2006). No presente trabalho, deve ser destacada a alta frequência do genótipo *GSTMI/GSTT1* nulos nos grupos controle e com talassemia beta heterozigota. O grupo com deficiência de G6PD apresentou frequência maior do genótipo combinado *GSTMI+/GSTT1+*, comparado aos outros grupos, porém, semelhante à de Souza e colaboradores (2008). Os polimorfismos *GSTMI+/GSTT1+* podem ser considerados um fator protetor, devido à presença das respectivas enzimas atuando de forma benéfica sobre o sistema hematopoético (ANSARI-LARI et al., 2003). Souza et al. (2008) encontraram frequências de 54,2% para o genótipo *GSTMI/GSTT1* positivos; 4,6% para *GSTMI/GSTT1* nulos; 8,2% para *GSTMI* positivo/*GSTT1* nulo e de 28,3% para *GSTMI* nulo/*GSTT1* em indivíduos da região Nordeste do Brasil.

As frequências alélicas e genotípicas para o gene *GSTP1* nos grupos controle e com talassemia beta heterozigota estão de acordo com as frequências descritas na literatura para a população brasileira. Para o polimorfismo do gene *GSTP1*, são descritas frequências alélicas de 0,65 a 0,81 para o alelo *I* e de 0,19 a 0,35 para o alelo *V* e frequências genotípicas variando de 40 a 63% para o genótipo selvagem *I/I*; 37 a 46% para o genótipo heterozigoto *I/V* e de 0 a 13% para o genótipo mutante *V/V* (ROSSINI et al., 2002; PINHEL et al., 2008; MAGNO et al., 2009). Embora o grupo com deficiência de G6PD não tenha apresentado diferença quando comparado ao grupo controle, foi verificada frequência menor do alelo *I* e maior do alelo *V*, do que as apresentadas em trabalhos realizados na população brasileira. As frequências genotípicas também diferiram, com frequência menor de homozigotos selvagens e maior de homozigotos mutantes, o que pode ser considerado um fator de risco, uma vez que a mutação promove diminuição da atividade enzimática com consequente redução do potencial efetivo da capacidade de detoxificação e nos eritrócitos, a principal GST corresponde à forma π (ZHONG et al., 2006; CHIANG et al., 2007).

No presente trabalho, nós estabelecemos as frequências dos polimorfismos de *GSTMI*, *GSTT1* e *GSTP1* em beta talassêmicos e em deficientes de G6PD e verificamos diferenças nas frequências dos polimorfismos com dados previamente descritos.

Referências

ANSARI-LARI, M.; SAADAT, M.; HADI, N. Modulation of hematology changes by polymorphism of glutathione S-transferase M1 and T1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, p. 299-232, 2003.

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.

CHAN, A. C.; CHOW, C. K.;, CHIU D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 222, p. 274-282, 1999.

CHENG, M. L. et al. Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of α -thalassaemia. **British Journal of Haematology**, v. 128, p. 119-127, 2004.

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

DHALIWAL, G. et al. Hemolytic anemia. **American Family Physician**, v. 69, n. 11, p. 2599-2606, 2004.

FRANK, J. E. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. **American Family Physician**, v. 72, n. 7, p. 1277-1282, 2005.

GATTÁS G. J. F. et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 451-458, 2004.

GOLONI-BERTHOLLO, E. M. et al. Avaliação da influência dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 365-368, 2006.

GOTO, S. et al. Glutathione S-transferase pi localizes in mitochondria and protects against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 1392-1403, 2009.

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

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

KUMAR, M.; AGARWAL, S. K. GOEL, S. K. Lung cancer risk in north Indian population: role of genetic polymorphisms and smoking. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 322, p. 73-79, 2008.

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

MASON, P. J.; BAUTISTA, J. M.; GILSANZ, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. **Blood**, v. 21, p. 267-283, 2007.

MATAKOVA, T. et al. Polymorphisms of biotransforming enzymes (GSTs) and their association with colorectal cancer in the Slovak population. **Neoplasma**, v. 56, p. 422-427, 2009.

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.

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

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

PINHEL, M. A. S. 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.

ROSSINI, A. et al. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**, v.1, n.3, p. 233-240, 2002.

SOUZA, C. L. et al. Polymorphisms in the glutathione S-transferase theta and mu genes and susceptibility to myeloid leukemia in Brazilian patients. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 39-41, 2008.

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.

ZHONG, S. L. et al. Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 77-85, 2006.

Capítulo VI

5 Discussão geral

A talassemia beta heterozigota e a deficiência de G6PD são afecções genéticas com alta incidência na população brasileira (SAAD et al., 1997; BONINI-DOMINGOS, 2004). Ambas apresentam grande potencial de danos oxidativos podendo resultar, frequentemente, em processos hemolíticos (CHAN, et al., 1999; DHALIWAL et al., 2004). Os métodos de triagem utilizados para o diagnóstico da talassemia beta incluindo a análise da morfologia eritrocitária, resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36%, eletroforese de Hb em pH alcalino e HPLC mostraram-se adequados. A confirmação das mutações por PCR alelo específica é indicada devido ao baixo custo e rapidez para a realização da técnica. Para a deficiência de G6PD, o principal método de triagem utilizado na rotina da maioria dos laboratórios é o teste de Brewer. No entanto, como demonstrado no presente estudo, é essencial a realização de métodos complementares específicos, como a quantificação enzimática e a confirmação da mutação por análise molecular, devido à quantidade elevada de resultados falsos positivos, que no presente estudo foi de 53%.

Na população brasileira, as mutações mais frequentes para a talassemia beta são as β^0 CD39 e IVS-I-1 e as alterações β^+ IVS-I-6 e IVS-I-110 para a nossa região (MARTINS et al., 1993; BERTUZZO et al., 1997). Para a deficiência de G6PD, predomina a mutação A-202 (G>A), de origem africana, além de outras alterações mais raras, como as variantes Mediterrânea, A-(968T>C, 376>G), G6PD Seattle (844G>C), G6PD Santamaria (542A>T, 376A>G), G6PD Tokyo (1246G>A) (SAAD et. al, 1997; COMPRI et al., 2000a; HAMEL, 2002). As mutações encontradas foram concordantes com a literatura.

Após o rastreamento das amostras foi possível estabelecer os grupos para as análises de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante. Como a talassemia beta e a deficiência de G6PD podem levar à hemólise prematura dos eritrócitos, esperava-se alterações nos índices de TBARS e TEAC. Para a talassemia beta heterozigota foi verificado aumento em ambos os índices. Na avaliação da peroxidação lipídica, considerando a mutação no gene β , pode-se observar uma tendência a valores aumentados nos indivíduos com a alteração β^0 CD39,

quando comparados à beta⁺ IVS-I-110 que pode ser devido à maior quantidade de cadeias alfa livres nas beta⁰ talassemias (BERTUZZO et al., 1997).

Para a deficiência de G6PD, não houve diferença nos valores de TBARS, assim como encontrado em outros trabalhos (GERLI et al, 1982). É possível que o método utilizado não tenha sido suficiente para detectar as possíveis alterações nesses indivíduos, uma vez que a escolha do melhor marcador é questionada devido principalmente a problemas de sensibilidade e especificidade. No entanto, verificou-se aumento nos valores da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox, o que pode ser um mecanismo de resposta frente ao estresse oxidativo aumentado. Dessa forma, como os eritrócitos de deficientes de G6PD são incapazes de reduzir NADP⁺ a NADPH em velocidade normal, apresentam baixo potencial redutor e os indivíduos podem apresentar crises hemolíticas quando expostos a algum agente oxidante.

A análise dos polimorfismos das GSTs mostrou alta frequência de *GSTM1*- no grupo com talassemia beta heterozigota. Embora os níveis de ferro, segundo a metodologia de diagnóstico utilizada, estivessem normais, a presença de *GSTM1*- deve ser considerada, uma vez que foi demonstrada associação do genótipo *GSTM1*- com depósito de ferro cardíaco em beta talassêmicos homozigotos (WU et al., 2006; ORIGA et al., 2008). No nosso trabalho, a ausência de *GSTM1* não influenciou nos valores de TBARS e TEAC.

Para o grupo com deficiência de G6PD foram encontradas frequências de *GSTM1*- e *GSTT1*- de acordo com os valores descritos pela literatura para a população em geral (ROSSINI et al., 2002; MAGNO et al., 2009). Na avaliação dos genótipos combinados *GSTM1/GSTT1* não houve diferença entre o grupo controle e com talassemia beta heterozigota. Já o grupo com deficiência de G6PD apresentou alta frequência do genótipo combinado *GSTM1+/GSTT1+*, que pode ser um fator protetor pela presença das respectivas enzimas atuando de forma benéfica sobre o sistema hematopoético (ANSARI-LARI et al., 2003). No entanto, a presença de *GSTM1+/GSTT1+* não influenciou nos valores de TBARS e TEAC em nenhum dos grupos.

As frequências alélicas e genotípicas para o gene *GSTP1* nos grupos controle e com talassemia beta heterozigota estavam de acordo com as frequências descritas na literatura. Para o grupo com deficiência de G6PD, foi verificada frequência menor do alelo selvagem *I* e maior do alelo mutante *V*, do que as apresentadas em trabalhos realizados na população brasileira (ROSSINI et al., 2002; PINHEL et al., 2008; MAGNO et al., 2009). As frequências genotípicas também diferiram, com valores menores de homozigotos selvagens e maiores de homozigotos mutantes, o que pode ser considerado um fator de risco, uma vez que a mutação promove diminuição da atividade enzimática com conseqüente redução do potencial efetivo da capacidade de detoxificação e nos eritrócitos, a principal GST corresponde à forma π (ZHONG et al., 2006; CHIANG et al., 2007). No entanto, nos índices avaliados no presente trabalho, TBARS e TEAC, não encontramos diferença entre os homozigotos selvagens, heterozigotos e homozigotos mutantes.

6 Conclusões

A partir dos resultados obtidos concluímos que:

- O rastreamento dos portadores de talassemia beta e de deficiência de G6PD com a identificação das mutações foi fundamental para a composição dos grupos de estudo, para estabelecer o perfil das mutações na região avaliada e para avaliar as metodologias de diagnóstico disponíveis, as quais são adequadas para a identificação dessas afecções genéticas, desde que associadas.

- As análises da peroxidação lipídica e da capacidade antioxidante na talassemia beta heterozigota confirmam o estado oxidante aumentado em talassêmicos heterozigotos, o qual é dependente do tipo de alteração molecular, uma vez que mutações beta⁰ estão associadas a maior peroxidação lipídica do que as mutações beta⁺.

- A deficiência de G6PD, na ausência de crise hemolítica, não é suficiente para alterar os índices de TBARS, mas verifica-se aumento da capacidade antioxidante.

- As frequências dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* na talassemia beta heterozigota e na deficiência de G6PD mostraram diferenças com as descritas pela literatura para a população brasileira.

Concluímos assim, que a expressão fenotípica observada em beta talassêmicos e em deficientes de G6PD pode estar relacionada com os mecanismos envolvidos na detoxificação celular.

7 Referências gerais

ANSARI-LARI, M. SAADAT, M.; HAIDI, N. Modulation of hematology changes by polymorphism of glutathione S-transferase M1 and T1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, p. 299-232, 2003.

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, n. 2, p. 319-321, 1997.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism** A manual of Biochemical Methods. 3. ed. London: Grune & Stratton, Inc, 1984, 188 p.

BEUTLER, E. G6PD deficiency. **Blood**, v. 84, p. 3613-3636, 1994.

BEUTLER, E. Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. **Blood**, v. 98, p. 2597-2602, 2001.

BEUTLER E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 16-24, 2008.

BEUTLER, E.; VULLIAMY, T. J. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, v. 28, n. 2, p. 93-103, 2002.

BILMEN, S. et al. Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 303, p. 83-86, 2001.

BOGDANSKA, J. J. et al. Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 104, n. 3, p. 108-114, 2003.

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.

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

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.; ONDEI, L. S.; ZAMARO, P. J. A. **Hemoglobinas similares a S no Brasil - um guia prático de identificação**. 1 ed. São José do Rio Preto: Editora HN; 2006.

BRANDT O. et al. Peas, beans, and the Pythagorean theorem - the relevance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in dermatology. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 6, p. 534-539, 2008.

BREWER, G. J. et al. Methaemoglobin reduction test. A new, simple, in vitro test for identifying primaquine-sensitivity. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 22, p. 633-640, 1960.

CAPPELLINI, M. D.; FIORELLI, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Lancet**, v. 371, p. 64-74, 2008.

CASTRO, S. et al., Prevalence of G6PD deficiency in newborns in the south of Brazil. **Journal of Medical Screening**, v. 13, n. 2, p. 85-86, 2006.

CHAN, A. C.; CHOW, C. K.;, CHIU D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 222, p. 274-282, 1999.

CHENG, M. L. et al. Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of α -thalassaemia. **British Journal of Haematology**, v. 128, p. 119-127, 2004.

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

CHINELATO-FERNANDES, A.R.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Contribuição do estudo molecular de hemoglobina S-like para o conhecimento da diversidade genética da população brasileira. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, p. 208-212, 2005.

CHINELATO-FERNANDES, A. R. et al. Utilization of different methodologies for the characterization of Hb Hasharon heterozygotes. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 1-6. 2006

CICCOLI L. et al. Iron release in erythrocytes from patients with beta-thalassemia. **Free Radical Research**, v. 30, n. 5, p. 407-413, 1999.

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

CLASTER, S. et al. Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with hemoglobinopathies. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 6, p. 344-348, 2009.

COHEN, A., SCHUWARTZ, E. Iron chelation therapy in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v.7, n.1, p.69-76, 1979.

COMPRI, M. B. et al. Programa comunitário e deficiência de G-6-PD no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, p. 33-9, 2000.

COMPRI, M. B. et al. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G6PD em uma comunidade brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 16, n. 2, p. 335-342, 2000a.

COYER, S. M. Anemia: Diagnosis and Management. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 19, n. 2, p. 380-385, 2005.

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

DEL RIO, D.. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v.15, p. 316-328, 2005.

DHALIWAL, G. et al. Hemolytic anemia. **American Family Physician**, v. 69, n. 11, p. 2599-2606, 2004.

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.

EMERIT J. et al. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 55, n. 6, p. 333-339, 2001.

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, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, R. I. P.; Polimorfismo genético da glicose-6-fosfato desidrogenase na população da região de Araraquara-S.P. Araraquara, 2004. 112f. Tese (Mestranda em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista.

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

FRANK, J. E. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. **American Family Physician**, v. 72, n. 7, p. 1277-1282, 2005.

FREIKMAN, I. et al., Oxidative stress causes membrane phospholipid rearrangement and shedding from RBC membranes—An NMR study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 2388–2394, 2008.

GAETANI, G. F. et al. Active involvement of catalase during hemolytic crises of favism. **Blood**, v. 88, p. 1084-1088, 1996.

GATTÁS G. J. F. et al. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 451-458, 2004.

GERLI, G. C. et al. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in beta-thalassaemia (major and minor). **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 25, n. 1, p. 87-92, 1980.

GOLONI-BERTHOLLO, E. M. et al. Avaliação da influência dos genótipos GSTT1 e GSTM1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 365-368, 2006.

GOTO, S. et al. Glutathione S-transferase pi localizes in mitochondria and protects against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 1392-1403, 2009.

HAMEL, A. R. et al. Molecular Heterogeneity of G6PD Deficiency in an Amazonian Population and Description of Four New Variants. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 28, n. 3, p. 399-406, 2002.

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

HUISMAN H. J. et al. HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Summaries of mutation categories. Pennsylvania University USA and McMaster University in Canadá, 1996. Disponível em: <<http://globin.cse.psu.edu/>>. Acesso em 01 de agosto de 2008.

INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante β -Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 2006.

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

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

KATSURAGAWA, T. H. et al. Avaliação da incidência da deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) e perfil hematológico em indivíduos de uma região de Rondônia. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 26, n. 4, p. 268-273, 2004.

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.

KONTOGHIORGHES, G. J. Prospects for introducing deferiprone as potent pharmaceutical antioxidant. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 1, p. 161-178, 2009.

KUMAR, M.; AGARWAL, S. K. GOEL, S. K. Lung cancer risk in north Indian population: role of genetic polymorphisms and smoking. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 322, p. 73-79, 2008.

LEE, G. R. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed. v. 1. Pennsylvania: Sastache, 1998, 2719 p.

LEITE, E. R. M. et al. Pesquisa de deficientes em G6PD nos doadores de sangue da região de Araraquara. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 18, supl. 337, 1996.

LIEU, P. T. et al. The roles of iron in health and disease, **Molecular Aspects of Medicine**, v. 200, p. 1-87, 2007.

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

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

MARTINI, G. et al. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. **The EMBO Journal**, v. 5, p. 1849-1855, 1986.

MARTINS, C. S. B. et al. Molecular characterisation of β thalassaemia heterozygotes in Brazil. **Journal of Medical Genetics**, v. 30, n. 9, p. 797-798, 1993.

MASON, P. J.; BAUTISTA, J. M.; GILSANZ, F. G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. **Blood**, v. 21, p. 267-283, 2007.

MATAKOVA, T. et al. Polymorphisms of biotransforming enzymes (GSTs) and their association with colorectal cancer in the Slovak population. **Neoplasma**, v. 56, p. 422-427, 2009.

MELO, L. M. S. et al. Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnóstico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 12-17, 2008.

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

MILLER, N. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

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.

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

NICOLIELO, D. B. et al. Atividade da 6-fosfogliconato desidrogenase em deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 135-138, 2006.

NJÁLSSON, R.; NORGREN, S. Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. **Acta Paediatrica**, v. 94, p. 132-137, 2005.

ORIGA, R. et al., Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. **Haematologica**, v. 92, n. 5, p. 583-588, 2007.

PANDOLFI, P. P. et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. **The EMBO Journal**, v. 14, p. 5209-5215, 1995.

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

PERCARIO, S. et al. Dosagem do malondialdeído (TBARS). **NewsLab**, v. 6, p. 46-50, p. 2004.

PEREIRA, M. M. M. et al. Cribado neonatal de hemoglobinopatías y déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en Cataluña. Estudio molecular de la anemia falciforme asociada a alfa-talasemia y déficit de G6PD. **Medicina Clínica (Barcelona)**, v. 169, p. 161-164, 2007.

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.

POOTRAKUL, P. et al., Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overloaded beta-thalassemia/HbE patients treated with an oral chelator. **Blood**, v. 104, p. 1504-1510, 2004.

PRCHAL, J. T.; GREGG, X. T. Red Cell Enzymes. **Hematology (American Society of Hematology Education Program)**, p. 19-23, 2005.

RAHMAN, Q. et al. Glutathione redox system in oxidative lung injury. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, n. 6, p. 543-568, 1999.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; SILVA, R.B.P. A Portaria MS nº 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 4, p. 244-50, 2002.

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

ROSSINI, A. et al. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**, v.1, n.3, p. 233-240, 2002.

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

SAAD, S. T. O. et al. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Brazil. **Human Heredity**, v. 47, p. 17-21, 1997.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SÁNCHEZ, T. A. et al. Anemia hemolítica por deficiência de G6PD y estrés oxidativo. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 22, n. 3, p. 186-191, 2003.

SCOTT, M. D. et al. Decreased catalase activity is the underlying mechanism of oxidant susceptibility in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1181, n. 2, p. 163-168, 1993.

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

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

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

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

SOUZA, C. L. et al. Polymorphisms in the glutathione S-transferase theta and mu genes and susceptibility to myeloid leukemia in Brazilian patients. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 39-41, 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.

SZUBER, N. et al. Alternative treatment paradigm for thalassemia using iron chelators. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 7, p. 773-785, 2008.

TAHER, A. et al., Levels of non-transferrin-bound iron as an index of iron overload in patients with thalassaemia intermedia. **British Journal of Haematology**, Epub ahead of print, 2009.

THEIN, S. L. Genetic modifiers of β -thalassemia. **Haematologica**, v. 90, n. 5, p. 649-660, 2005.

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

VIVES CORRONS, J. L. et al. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. **European Journal of Haematology**, v. 55, p. 327-331, 1995.

VOET, D. et al. **Fundamentos de Bioquímica**. Rio Grande do Sul: Artmed Editora, 2002, 1059 p.

WALTER, P. B. et al. Inflammation and oxidant-stress in beta-thalassemia patients treated with iron chelators deferasirox (ICL670) or deferoxamine: an ancillary study of the Novartis CICL670A0107 trial. **Haematologica**, v. 93, n. 6, p. 817-825, 2008.

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.

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

ZAGO, M.A. et al. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004, 1081 p.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 663p.

ZHONG, S. L. et al. Relationship between genotype and enzyme activity of glutathione S-transferases M1 and P1 in Chinese. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 77-85, 2006.

Anexo I
Métodos

1 Metodologias clássicas para o diagnóstico de talassemia beta

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

Princípio:

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

Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

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

Solução de trabalho:

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

Procedimento:

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

Interpretação:

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

aumentada à hemólise do eritrócito torna a amostra opaca. Em amostras com resistência normal à hemólise visualizaram-se facilmente as linhas através da solução.

1.2 Análise a fresco da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)

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

alterações discretas: (+)

alterações moderadas: (++)

alterações acentuadas: (+++)

células normais: (N)

1.3 Preparação de hemolisados (NAOUM, 1990)

Para que as amostras fossem submetidas à eletroforese em pH alcalino, as células foram lisadas para a obtenção da solução de hemoglobina utilizando uma duas metodologias:

Hemolisado Rápido - com saponina

Solução de hemoglobina - com clorofórmio

1.3.1 Hemolisado Rápido com saponina

Reativo hemolisante:

Saponina	1g
Água destilada	100mL

Procedimento:

Em placa de Kline foi colocado um volume de sangue com um volume de reativo hemolisante, com posterior homogeneização até a hemólise completa da mistura;

O hemolisado pode ser utilizado após cinco minutos e, no máximo, até quatro horas depois da sua preparação.

1.3.2 Solução de Hemoglobina com Clorofórmio

Procedimento:

Para lavar os eritrócitos, centrifugou-se 1mL de sangue colhido com anticoagulante com solução salina a 0,85%, a 1.500 rpm, durante cinco minutos, desprezando o sobrenadante. O processo foi realizado três vezes, no mínimo.

Ao volume de eritrócitos lavados, adicionou-se outro de água destilada, homogeneizando a solução. A seguir, adicionou-se um volume de clorofórmio idêntico ao do hemolisado formado. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000 rpm, por 20 minutos.

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

1.4 Eletroforese em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965)

Princípio:

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

Reagentes:

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

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

Corante:

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

Solução descorante:

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

Procedimento:

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

Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multiuso).

A solução de hemoglobina foi aplicada a 1cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.

Passaram-se 300 volts por 30 minutos.

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

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

Princípio:

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD Laboratories) com Kit de análise para Beta Talassemia Heterozigota. A HPLC neste equipamento

consiste da cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados passam pela coluna, detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes. 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 5 μ L 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 de triagem para a deficiência de G6PD

2.1 Método de Brewer Modificado (BREWER et al., 1960)

A metaemoglobina (Fe^{+3}) se forma por ação oxidativa do nitrito sobre a hemoglobina (Fe^{+2}) presente nas hemácias. Na presença de azul de metileno, ocorre estimulação da via da pentose fosfato com produção de NADPH, reconvertendo a hemoglobina oxidada a sua forma reduzida. A velocidade de redução é proporcional à atividade de G6PD eritrocitária.

Reagentes:

Solução 1: Nitrito de Sódio 0,18 M e Glicose 0,28 M

Glicose	0,5g
Nitrito de Sódio	0,125g
Água destilada q.s.p.	10mL

Solução 2: Azul de Metileno 0,0004 M

Cloreto de Azul de Metileno	0,0375g
Água destilada q.s.p.	250mL

Procedimento:

Foram marcados três tubos de ensaio como controle positivo, controle negativo e teste, procedendo segundo o esquema a seguir:

	Controle positivo	Controle Negativo	Teste
Solução 1	5 μL	-	5 μL
Solução 2	-	5 μL	5 μL
Sangue Total	40 μL	40 μL	40 μL

Os tubos foram incubados a 37°C por 3 horas e adicionaram-se 3mL de água destilada, efetuando-se a leitura entre 5 e 10 minutos. Os tubos com resultados

negativos (normais) permaneceram de cor vermelho vivo, enquanto que os tubos com resultados positivos (deficientes) apresentaram cor castanha.

2.2 Determinação da Atividade Enzimática da G6PD (BEUTLER, 1984)

O teste mede a taxa de redução de NADP a NADPH quando o hemolisado é incubado com glicose-6-fosfato. A atividade enzimática é expressa em $\text{UI.gHb}^{-1}.\text{min}^{-1}$ a 37°C em pH 8,0 sendo que uma unidade de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima que reduz $1\mu\text{mol}$ de NADP^{+} por minuto a 37°C . A variação da densidade óptica por minuto é aplicada na fórmula:

$$AE = \Delta DO.Vc.100 / \varepsilon.Vh.Hb, \text{ onde:}$$

AE = Atividade enzimática em Unidades Internacionais por grama de hemoglobina por minuto a 37°C em pH 8,0;

ΔDO = Variação da densidade óptica por minuto a 37°C obtida em 340nm;

Vc = Volume da cubeta (1mL);

ε = Coeficiente de extinção molar da coenzima NADP^{+} (6,22);

Vh = Volume do hemolisado em mL utilizado na reação;

Hb = Concentração de hemoglobina no hemolisado em g/100mL de sangue;

Valores de referência da atividade enzimática da G6PD para eritrócitos humanos, estabelecidos nesse trabalho: $8 \leq AE \leq 14$ em $\text{UI.g de Hb}^{-1}.\text{min}^{-1}$ a 37°C .

Reagentes:

Solução Hemolisante:

2-mercaptoetanol 7mM	0,5mL
NADP 2mM	5,0mL
EDTA 0,27M (neutralizado)	10,0mL
Água bi-destilada q.s.p.	1000mL

Reagentes adicionados à cubeta para a leitura espectrofotométrica:

Tris-HCl 1 M/ EDTA 5mM, pH 8,0	100µL
MgCl ₂	100µL
NADP 2mM	100µL
Hemolisado 1:20	20µL
Incubar a 37°C por 10 minutos.	
G6P 6mM	100µL

Procedimento:

Em tubos de hemólise, o sedimento eritrocitário das amostras foi submetido a 3 lavagens sucessivas com solução salina fisiológica a 4°C e centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos, tomando-se o cuidado de retirar, em cada lavagem, o máximo possível da camada leucocitária.

Foram preparados hemolisados, adicionando-se às hemácias solução hemolisante na proporção 1:20. Após a homogeneização do material, as amostras foram submetidas a choque térmico, com subsequente hemólise por congelamento, aquecimento e destromatização a 3500 rpm por 15 minutos a 4°C. Mediu-se a quantidade de hemoglobina presente no hemolisado pelo método da cianometahemoglobina, utilizando reativo de Drabkin.

A variação de absorbância por minuto foi decorrente da redução de NADP⁺ em NADPH monitorada por absorção da luz a 340nm.

3 Análises da peroxidação lipídica e da capacidade antioxidante

3.1 Dosagem de TBARS (PERCÁRIO et al., 2004)

Princípio:

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 (KH_2PO_4) – 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 de 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 absorvância 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 poderá se observar 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:

$$A \text{ média} = (A1+A2)/2$$

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

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

$$F = 4406,1 / A \text{ padrão MDA}$$

3.2 Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC) modificado (MILLER et al., 1993; RE et al., 1999).

O potencial antioxidante das amostras foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), produzindo diretamente o radical cation $ABTS^{\bullet+}$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de amostras contendo antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS e a descoloração é avaliada em 734nm. Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro (mM/L).

Reagentes:

PBS pH7.2

Solução Salina Isotônica com pH 7.2 foi usada como solvente no preparo de reagentes e diluição de amostras.

Na_2HPO_4	1,48g
NaH_2PO_4	0,43g
NaCl	7g
H ₂ O destilada q.s.p	1000mL

Ajustar em pHmêtro para pH 7.2, acrescentar mais Na_2HPO_4 ou ácido acético se necessário. Volume final: 1000mL.

Solução de estoque $ABTS^{\bullet+}$:

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

A solução de estoque $ABTS^{\bullet+}$ foi preparada de 12 a 16h antes das dosagens.

Deverá ser misturada uma solução do sal diamônio ABTS a 7mM com uma solução de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$ – Sigma-Aldrich P5592) cuja concentração final será de 2,45mM.

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

$$140mM \times 352\mu L = C \times 20.000\mu L$$

$$C \approx 2,45mM$$

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

(B) $K_2S_2O_8$ 140mM: 0,7560g ----- 20mL de PBS

Retirar com pipeta automática 352 μ L da solução (A) e misturar a esta 352 μ L da solução (B):

19,648mL de (A) + 352 μ L* de (B) **

* pipetar 176 μ L + 176 μ L

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

Foram preparados 20mL da solução de estoque ABTS^{•+}.

A mesma deve permanecer no escuro, em temperatura ambiente (em bancada) durante 12-16h para formar o radical cátion ABTS^{•+}

O radical é estável por cerca de dois dias estocado desta forma, no escuro, a temperatura ambiente.

Solução de trabalho de ABTS^{•+}:

Misturar a solução de estoque ABTS a PBS até que a absorbância a 734nm seja de $0,7 \pm 0,02$ (concentração de ABTS $\pm 47\mu$ M), equilibrada a 30°C.

A expectativa é diluir 2289 μ L da solução de estoque ABTS em 200mL de PBS.

Calibrar espectrofotômetro na leitura de 734nm, zerando com PBS.

Preparar Erlenmeyer com 200mL de PBS.

Começar com 1800 μ l da solução de estoque ABTS, misturar ao PBS, homogenizar e ler o espectro. Subir ou diluir até atingir valor de leitura de $0,7 \pm 0,02$ a 30°C, ou seja, de 0,68 a 0,72.

Atingido esse valor está pronta a solução de trabalho ABTS^{•+}.

Solução estoque de trolox (2.5mM):

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

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

Logo, para 200mL – 0,1294g de Trolox

para 100mL – 0,0647g de Trolox

Atenção:

Material de difícil dissolução.

Medir o volume desejado em PBS.

Colocar apenas uma parte deste volume em placa agitadora magnética, turbilhonar com leve aquecimento.

Acrescentar todo o soluto (trolox), despejando-o diretamente no solvente (PBS) sem diluir antes – retirar o material que ficará retido lavando o becker com PBS.

Esperar diluir por completo.

Esta solução é estável por uma semana quando estocada a 4°C ou 6 meses se estocada a -20°C.

Preparo das amostras:

Plasma:

Colher o sangue usando anticoagulante (heparina).

Centrifugar a 1500 rpm durante 20 minutos.

Pipetar a camada superficial amarela (correspondente ao plasma) cuidadosamente.

Estocar em freezer a -20°C ou em gelo caso seja prontamente analisado.

As amostras de soro podem ser por pelo menos 6 meses a -20°C.

Rotina de dosagem:

Adequamos o método para leitura em espectrofotômetro em temperatura ambiente: 25°C.

O volume final de cada amostragem para leitura será de 3mL (3000µL).

Se a capacidade antioxidante da amostra que se pretende estudar não é conhecida ou se espera que ela seja superior a escala estabelecida na curva padrão (0 a 2,5mM), é prudente realizar as dosagens da mesma sob diversas diluições.

Convém que sejam feitas amostragens para leitura em duplicatas (A1 e A2) para termos maior certeza dos resultados, nesse caso aceitar diferenças de até 10% entre a média das leituras A1 e A2. Para a realização da curva padrão, convém que sejam feitas triplicatas.

A leitura deve ser feita em espectrofotômetro, a 734nm.

Realizando as leituras:

Em uma cubeta colocar com pipeta automática 2970µL da solução de trabalho ABTS⁺ outrora preparada. Realizar leitura da absorbância a 734nm e anotar o valor (corresponderá a T0).

Retirar a cubeta e imediatamente acrescentar 30µL da solução a ser analisada. Homogenizar a mistura manualmente por 20 segundos e re-iniciar leitura (734nm) anotando o valor decorridos exatos 5 minutos (corresponderá a T5).

Fazer triplicatas e aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorbâncias de 5minutos (T5) e os valores individuais.

Fazer um controle branco (com 30µL de PBS) e um padrão (com 30µL de Trolox 1mM/L).

Cálculo dos resultados:

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

Calcule a Atividade Anti-oxidante Total (TAA) de cada amostra usando a seguinte fórmula:

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

Calcule o valor corrigido da atividade antioxidante total de cada amostra (TAAc) de cada amostra subtraindo o valor de TAA das amostras biológicas e do Padrão do valor de TAA encontrado para o Branco:

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

4 Metodologias moleculares

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

Princípio:

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

Reagentes:

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

Sacarose 0,32M	10,95g
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 450 μ L de solução de lise 2; 25 μ L de SDS à 10% e 5 μ L 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 500 μ L de fenol, o material foi homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Após centrifugação, a fase superior foi transferida para outro microtubo e adicionados 500 μ L da solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1.

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

O material foi novamente centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm e o sobrenadante desprezado. O DNA no fundo do tubo foi lavado com 200 μ L 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.

4.2 Preparo de Géis

4.2.1 Gel de Agarose

Agarose ultrapura

TEB 1x

Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

4.2.2 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 2µL de tampão de carregamento e 4µL de amostra de DNA.

4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Princípio:

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**4.3.1 Identificação das mutações para a talassemia beta por PCR alelo específica (BERTHOLO; MOREIRA, 2006)***Princípio:*

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.

4.3.2 Identificação do genótipo A-202(G>A) para a deficiência de G6PD por PCR/RFLP (HAMEL et al., 2002; FERREIRA, 2004)

Para a amplificação do segmento em que está contida a mutação que codifica a variante A⁻ 202 utilizou-se *primers*:

G6PDA-1: 5' CAG CCA CTT CTA ACC AC 3' (*sense*)

G6PDA-2: 5' AAC CAG GCT GGG GGA G 3' (*antisense*)

Os ciclos de reação consistiram de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, acrescida de 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 50 segundos a 72°C e um ciclo final de a 72°C por 5 minutos.

Realizou-se a digestão do produto amplificado por meio da enzima de restrição *Nla III* (10.000U/mL) da New England BioLabs.

O produto de digestão permaneceu em banho-maria a 37° C, temperatura ótima para a catálise, por 16 horas. Posteriormente, o produto da digestão enzimática foi aplicado em gel de agarose 2,5% e submetido a 80 volts por 30 minutos, para a separação eletroforética dos fragmentos de restrição os quais foram evidenciados com brometo de etídio sob luz UV.

Após a digestão, o alelo normal gerou um fragmento de 314 pb e o alelo mutante dois fragmentos, um de 218 pb e outro de 96 pb.

4.3.3 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.

4.3.4 Avaliação do polimorfismo *GSTP1* por PCR/RFLP

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 adição da enzima é colocado em banho Maria à 37° C, por 4 horas, para clivagem das seqüências 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.

Anexo II

Resumo da monografia apresentada pela aluna Lara Maria Silveira para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

SILVEIRA, L. M. **Frequência da Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase na Região Noroeste do Estado de São Paulo.** São José do Rio Preto, 2006. 40 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos. Co-orientadora: Me. Luciana de Souza Ondeí.

As anemias hemolíticas podem ser causadas por defeitos afetando a molécula de hemoglobina, a via glicolítica, o metabolismo da glutathione ou a membrana do eritrócito. A causa mais freqüente de anemia hemolítica eritroenzimopática é a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), estimando-se cerca de 400 milhões de pessoas afetadas em todo o mundo. A G6PD catalisa a primeira etapa da via metabólica do ciclo das pentoses, utilizada pelas células para obter energia. O déficit enzimático pode levar à anemia hemolítica, quando os portadores são expostos a fatores desencadeantes como drogas e infecções. A alteração é causada por mutações no gene codificante para G6PD, localizado na região telomérica do braço longo do cromossomo X. Aproximadamente 400 variantes de G6PD foram descritas, segundo as características bioquímicas da enzima deficiente. Devido a possibilidade dos portadores de deficiência de G6PD desenvolverem anemia hemolítica, avaliou-se a frequência desta deficiência e os polimorfismos moleculares em indivíduos da região noroeste do estado de São Paulo, com vistas ao estabelecimento da frequência dos polimorfismos. Foram analisadas 546 amostras de sangue, de indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos. O rastreamento da enzimopatia foi realizado pelo método de Brewer e confirmado pela determinação da atividade enzimática.

Do total de amostras rastreadas, 19 (3,48%) positivaram no teste de triagem para deficiência enzimática, e 37 (6,78%) apresentaram resultado duvidoso. Essas 56 amostras tiveram a atividade da enzima determinada, confirmando a deficiência de G6PD nas 19 positivas e em sete das duvidosas, sendo os valores obtidos entre 0 e 8 UI.g de Hb-1.min-1. Em 80,77% dos deficientes foi observada a ocorrência

da variante A⁻ com a mutação 202 (G>A), condizente com estudos anteriores para o estado de São Paulo.

Palavras-chave: anemias hemolíticas, deficiência de G6PD, polimorfismos genéticos.

Resumo

Resumo

Na talassemia beta, o acúmulo das cadeias alfa livres, bem como a liberação do grupo heme e do ferro durante o processo hemolítico, ocasionam aumento de danos oxidativos que podem resultar em lipoperoxidação de membranas celulares, desnaturação de proteínas e oxidação da hemoglobina. Na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), esse aumento é decorrente da diminuição da produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) que pode resultar em hemólise intravascular. Diante da possibilidade de estresse oxidativo nos portadores de beta talassemia heterozigota e nos indivíduos com deficiência de G6PD, neste trabalho avaliou-se a expressão fenotípica das afecções genéticas por meio da identificação das mutações e análise de marcadores para estresse oxidativo. Para o estabelecimento dos grupos controle e com deficiência de G6PD foram avaliadas 544 amostras de sangue periférico de indivíduos da região Noroeste do Estado de São Paulo, sendo 426 doadores de sangue e 118 indivíduos de uma instituição de ensino superior. Para a composição do grupo com talassemia beta heterozigota foram avaliadas 46 amostras de sangue de indivíduos com diagnóstico clínico de talassemia beta da cidade de São Carlos/SP. Foram realizados métodos de triagem e confirmatórios para a identificação da talassemia beta heterozigota e da deficiência de G6PD, e dosagens bioquímicas para quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizado como marcador de estresse oxidativo, e para a determinação da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC). Os polimorfismos da glutational *S*-transferase (GST) *GSTM1* e *GSTT1* foram avaliados por PCR multiplex o de *GSTP1* por PCR/RFLP. No grupo com talassemia beta heterozigota foram encontradas 18 (39%) amostras com a mutação CD39; 22 (48%) com a mutação IVS-I-110 e uma (2%) com a mutação IVS-I-6. Para a deficiência de G6PD foram encontradas 27 amostras com a deficiência enzimática, correspondendo à frequência de 4,96% na amostragem avaliada. Retirando deste grupo seis indivíduos aparentados, a frequência obtida foi igual a 3,86%. Na avaliação do grupo com talassemia beta verificou-se aumento de TBARS e TEAC, quando comparado ao grupo controle. Também foi observada

uma tendência a maior peroxidação lipídica no grupo com a mutação beta⁰ CD39 quando comparado com os portadores da mutação beta⁺ IVS I-110, que pode ser devido à maior quantidade de cadeias alfa livres nas beta⁰ talassemias. Na análise do grupo com deficiência de G6PD, verificou-se que os homens apresentaram valores de G6PD menores que as mulheres, mas não houve interferência do gênero nas dosagens de TBARS e TEAC. Os valores de TBARS não diferiram entre os grupos controle e com deficiência de G6PD. No entanto, o grupo com deficiência de G6PD apresentou valor médio de TEAC maior que o grupo controle, o que pode ser um mecanismo de resposta contra o estresse oxidativo. Na avaliação dos polimorfismos das GSTs, as frequências obtidas para *GSTM1*- e *GSTT1*- foram de 73% e 47% para o grupo controle; 54% e 38% para o grupo com talassemia beta heterozigota e de 41% e 22% para o grupo com deficiência de G6PD. A frequência do genótipo nulo de *GSTM1* no grupo controle foi maior que os descritos pela literatura para a população brasileira, assim como as frequências do genótipo nulo de *GSTT1* do grupo controle e com talassemia beta heterozigota. Para o polimorfismo do gene *GSTP1*, apenas o grupo com deficiência de G6PD apresentou valores diferentes dos previamente descritos, com frequência menor do alelo selvagem *I* e maior do alelo mutante *V*, bem como frequência menor de homozigotos selvagens e maior de homozigotos mutantes. Assim, conclui-se que em talassêmicos heterozigotos há maior peroxidação lipídica a qual é dependente do tipo de alteração molecular. Já na deficiência de G6PD não existe alteração dos índices de TBARS, mas verifica-se aumento da capacidade antioxidante. Na avaliação dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* foram encontradas diferenças em relação às frequências descritas pela literatura para a população brasileira. De forma geral, a expressão fenotípica observada em beta talassêmicos heterozigotos e em deficientes de G6PD pode estar relacionada com os mecanismos envolvidos na detoxificação celular.

Palavras-chave: talassemia beta, deficiência de G6PD, TBARS, TEAC, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*

Abstract

Abstract

In beta thalassemia, the excess of unpaired alpha chains, as well as the heme group and iron released during the hemolytic process increase the oxidative damage. In G6PD deficiency, this increase is caused by a reduced production of NADPH that results in an intravascular hemolysis. Thus, facing the oxidative stress possibility in beta thalassemia carriers and G6PD deficiency individuals, it was aimed to evaluate the phenotypic expression of these genetic disorders through the mutation identification, as well as the oxidative stress marker analysis. We used 544 peripheral blood samples of individuals from São Paulo's northwestern control group and to G6PD deficiency group establishment. For beta thalassemia heterozygote group were evaluated 48 blood samples of São Carlos/SP city. Tests were carried out aiming the screening and confirmation of beta thalassemia and G6PD deficiency, as well as the analysis of lipid peroxidation products measured as thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). We determined the frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms. The analysis with beta thalassemia carriers allowed to establish in the study group a frequency of 39% for CD39 mutation, 48% for IVS-I-110 mutation and 2% for IVS-I-6 mutation. For G6PD deficiency was founded a frequency of 3.86%. The beta thalassemic group evaluation showed an increase of TBARS and TEAC values, when compared to the control group. There was a tendency to increase lipid peroxidation in beta⁰ CD39 mutants compared to beta⁺ IVS-I-110 mutants, because there is more free chains amount in beta⁰ thalassemia than beta⁺ thalassemia. In the G6PD deficiency analysis was found a lower G6PD activity in men than in women, but there was no interference of gender in the TBARS and TEAC assays results. The comparison between the control group and the G6PD deficiency group, regardless of gender, indicated that there was no significant difference between TBARS. However, a higher TEAC average value was founded in the G6PD deficiency group, which may be a response against oxidative stress. In the GSTs polymorphisms evaluation, the frequencies obtained for *GSTM1* and *GSTT1* were 73% and 47% for control group, 54% and 38% for beta thalassemia

group and 41% and 22% for G6PD deficiency group. The *GSTMI* null genotype frequency in control group was higher than those described in the literature for the Brazilian population, as well as the *GSTT1* null genotype frequencies for control group and beta thalassemia group. For the *GSTP1* gene polymorphism, only G6PD deficiency group showed different values of the previously described, with a lower frequency of wild type *I* allele and higher of mutant type *V* allele, as well as lower frequency of homozygous *I/I* and higher of *V/V*. Thus, was concluded that beta thalassemia heterozygote had a greater lipid peroxidation than normal individuals. To G6PD deficiency, didn't show any difference in TBARS analysis compared to normal individuals, but showed an increase in the antioxidant capacity. The *GSTMI*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms frequencies showed differences compared to literature for the Brazilian population. In general, was concluded that phenotypic expression in beta thalassemia and G6PD deficient are related to the cellular detoxification mechanisms.

Key-words: beta thalassemia, G6PD deficiency, TBARS, TEAC, *GSTMI*, *GSTT1*, *GSTP1*

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 28/08/2009

Luciana de Souza Ondeí