

Patrícia Caetano de Souza

**Avaliação dos Produtos de Degradação
Oxidativa da Hemoglobina S em
Eritrócitos de Doentes Falcêmicos**



1910000906



PATRÍCIA CAETANO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO
OXIDATIVA DA HEMOGLOBINA S EM
ERITRÓCITOS DE DOENTES FALCÊMICOS**

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

São José do Rio Preto - SP

1999

PATRÍCIA CAETANO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO
OXIDATIVA DA HEMOGLOBINA S EM ERITRÓCITOS DE
DOENTES FALCÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José
do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em
Biologia - Área de Concentração em Genética



Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum

São José do Rio Preto

1999

616.155

5729a

Hemoglobinopatias

Assunto CAPES:

4.01.01.05-3 Hematologia

Souza, Patrícia Caetano de

Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da hemoglobina S em eritrócitos de doentes falcêmicos. / Patrícia Caetano de Souza. - São José do Rio Preto : [s.n.], 1999. 108f. + anexos.

Orientador: Paulo Cesar Naoum

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto.

1. Hemoglobina S - metaemoglobina.
2. Hemoglobina S - Hemoglobina Fetal.
3. Hemoglobina S - corpos de Heinz.

CDU 616.155



DEDICATÓRIA

"Ao meu avô, Adéllo, que mesmo ausente
quanto presença tua nos envolve..."

"Aos meus pais, Sílvio e Helde, que sempre
fizeram o máximo pela educação dos
filhos e por não mostrarem
que o melhor caminho a ser seguido
é o da pesquisa"

**Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia,
do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio
Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com
auxílio financeiro da CAPES.**

irmãos, Rogério e Henrique,
para que consigam transpor os obstáculos nos
caminhos da vida, da mesma forma que
consegui"

"Ao Paulo Maurício, pelas nossas
vidas eternas,
por todo o carinho e respeito por mim"

DEDICATÓRIA

“Ao meu avô, **Adélio**, que mesmo ausente
quanta presença tua nos envolve...”

“Aos meus pais, **Sílvio e Heide**, que sempre
fizeram o máximo pela educação dos
filhos e por me mostrarem
que o melhor caminho a ser seguido
é o da pesquisa”

“Aos meus irmãos, **Rogério e Henrique**,
para que consigam transpor os obstáculos nos
caminhos da vida, da mesma forma que
consegui”

“Ao **Paulo Maurício**, pelas nossas
vidas eternas,
por todo o carinho e respeito por mim”

(John Wooden)

AGRADECIMENTOS

Neste momento, venho agradecer a todos que colaboraram para que esta dissertação se concretizasse. Estas pessoas, tornaram menos árdua, a difícil arte de fazer Ciência.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cesar Nogueira, pela brilhante orientação e exemplo de profissionalismo, que torna, seus orientados, orgulhosos de tudo como Mestre.

A Prof.ª Dr.ª Cláudia Regina Bonini Domingos, que sempre esteve ao meu lado durante as fases mais difíceis do curso, fazendo com que eu não me abatesse e desistisse do ideal da pesquisa. Por ter me iniciado no "Universo das Hemoglobinas" e pelas essenciais sugestões a dissertação, fundamentando melhor o conhecimento sobre meu próprio trabalho.

Ao Prof. Dr. Milton Artur Ruiz, pela análise da Pré-forma, pelas valiosas sugestões apresentadas e atenção que concedeu a minha pessoa.

A Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Genética, Prof.ª Dr.ª Ana Elizabete Silva, pela colaboração prestativa no decorrer deste trabalho e atenção nos problemas burocráticos.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação, que permitiram, conhecer.

**"Você não pode viver um dia perfeito sem
fazer alguma coisa por alguém, que nunca será
capaz de retribuir"**

Ao Serviço de Hematologia e Hematopatologia, pelo envio da grande maioria das amostras, especialmente ao hematologista, Dr. Cláudio Ricci Júnior; pela atenção e interesse demonstrado no trabalho não tendo sido realizado.

(John Wooden)

A Dr.ª Leila Borim, médica do Serviço de Hematologia do Hospital de Base, pela colaboração no envio de amostras.

AGRADECIMENTOS

Neste momento, venho agradecer a todos que colaboraram para que esta dissertação se concretizasse. Estas pessoas, tornaram menos árdua, a difícil arte de fazer Ciência.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cesar Naoum, pela brilhante orientação e exemplo de profissionalismo, que torna, seus orientados, orgulhosos de tê-lo como Mestre.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Bonini Domingos, que sempre esteve ao meu lado durante as fases mais difíceis do curso, fazendo com que eu não me abatesse e desistisse do ideal da pesquisa. Por ter me iniciado no "Universo das Hemoglobinas" e pelas essenciais sugestões à dissertação, fundamentando melhor o conhecimento sobre meu próprio trabalho.

Ao Prof. Dr. Milton Artur Ruiz, pela análise da Pró-forma, pelas valiosas sugestões apresentadas e atenção que concedeu a minha pessoa.

À Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Genética, Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva, pela colaboração prestativa no decorrer deste trabalho e atenção nos problemas burocráticos.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação, que permitiram, conhecimentos aprofundados em Genética, durante o tempo de Mestrado.

Ao Serviço de Hematologia e Hemocentro do Hospital de Base, pelo envio da grande maioria das amostras, especialmente ao hematologista, Dr. Otávio Ricci Júnior, pela atenção e interesse demonstrados, sem o qual, este trabalho não teria sido realizado.

À Dr^a. Leila Borim, médica do Serviço de Hematologia do Hospital de Base, pela colaboração no envio de amostras.



Ao Instituto de Hematologia de Fernandópolis, especialmente à Dr^a. Brígida C. A. Botelho Prudêncio, pelo envio de amostras.

Ao Laboratório Tajara, especialmente à Prof^a. Dr^a. Eloíza Helena Tajara, que intercedeu junto a este Laboratório, na obtenção de amostras.

À Prof^a. Dr^a. Adriana Barbosa, docente do Departamento de Computação e Estatística, pelo assessoria prestada na formulação da Análise Estatística.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - de São José do Rio Preto, pela disposição das condições materiais.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Às enfermeiras Maria Aparecida do Carmo Costa e Kikue Kamoi, pelo auxílio na coleta de sangue.

A todos os funcionários da Biblioteca, pela gentileza sempre demonstrada, especialmente à Maria do Carmo Junqueira, pela correção das referências bibliográficas e à Maria Luíza F. J. Froner, pela construção da Ficha Catalográfica.

A todos os professores do Departamento de Biologia, especialmente ao Prof. Dr. Wladimir João Tadei, de quem recebi os primeiros conceitos sobre genética e também estímulo para ingressar na Pós-graduação.

A todos os estagiários do Laboratório de Hemoglobinas, que colaboraram de alguma forma, para o sucesso desta pesquisa.

A minha grande amiga, Fátima Adriana Mendes Siqueira, "futura grande pesquisadora", por ter tirado muitas dúvidas sobre anemia falciforme, pela nossa amizade e pelo seu apoio que foi fundamental.

A minha "irmã", Magaly da Silva Moraes, que sempre desejou o melhor para mim, me auxiliando em todos os momentos difíceis e decisivos da minha vida. Que Deus lhe dê em dobro.



Ao meu amigo eterno, Marcos Roberto Higino Estécio, que me socorreu nas diversas fases deste trabalho, com quem sei que sempre poderei contar.

À Rosa, Paula, Juliana e Luciana, amigas de turma da Pós-graduação, pela companhia agradável e pelas nossas trocas de informações.

Ao Paulo Marcelo Mazaferro, que sempre me apoiou e pelas nossas "tardes de risadas e loucuras" no Laboratório de Hemoglobinas.

Às secretárias do Departamento de Biologia, da Seção de Pós-graduação e aos demais funcionários deste Instituto, pela presteza e eficiência com que sempre me atenderam.

A todos os doentes falcêmicos, que cederam seu sangue para este trabalho, que tenham forças em lutar pela vida e serem felizes. Que Deus os abençoe.

A todas as pessoas normais que também cederam seu sangue, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Aos demais colegas do curso de Pós-Graduação, pela nossa amizade e solidariedade.

Aos meus pais, Sílvio e Heide, que foram os responsáveis por eu ter chegado até aqui.

Aos meus irmãos, Rogério e Henrique, para que também lutem pelo seu ideal, tendo sucesso em suas carreiras.

Ao Paulo Maurício, companheiro maravilhoso, que sempre me auxiliou nos relatórios e de quem recebi apoio em todos os momentos da minha vida.

A Deus, por tudo.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Al- alumínio	04
Be- berílio	05
Ca- cálcio	
CO ₂ - gás carbônico	20
Cu- cobre	
2,3 DPG- 2,3difosfoglicerato	24
Fe- ferro	25
Ga- gálio	42
G6PD- glicose-6-fosfato-desidrogenase	43
GSH-Px- glutatão peroxidase	45
GR- glutatão redutase	
HO ₂ - oxigênio centrado	
HO•- hidroxil	47
H ₂ O ₂ - peróxido de hidrogênio	
Hb- hemoglobina	
Hb F- hemoglobina Fetal	48
4-HNE- 4-hidroxinonenal	
In- índio	50
K- potássio	51
La- lantânio	54
Mn- manganês	
Meta-Hb- metaemoglobina	57
MDA- malonaldeído	57
Na- sódio	
O ₂ •- íon superóxido	59
oxi-Hb- oxiemoglobina	
Pb- chumbo	61
Se-selênio	
Sc-escândio	61
SOD- superóxido dismutase	61
Tal.- talassemia	
Zn- zinco	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Grupos de radicais livres classificados conforme suas estruturas químicas.....	04
Tabela 02:	Enzimas e compostos antioxidantes relacionados com suas origens.....	05
Tabela 03:	Características laboratoriais nos diversos genótipos que se agrupam como doença falciforme.....	20
Tabela 04:	Morfologia eritrocitária nos diferentes genótipos das síndromes falcêmicas.....	24
Tabela 05:	Alterações laboratoriais específicas na anemia falciforme.....	25
Tabela 06:	Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de Hb Fetal para os genótipos: AA, AS, SS e S β	42
Tabela 07:	Porcentagem de indivíduos com Hb Fetal normal e alterada de acordo com o genótipo.....	43
Tabela 08:	Distribuição porcentual de Hb Fetal segundo o genótipo.....	45
Tabela 09:	Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de eritrócitos com corpos de Heinz para os genótipos: AA, AS, SS e S β	47
Tabela 10:	Porcentagem de indivíduos com valores quantitativos de eritrócitos com corpos de Heinz normal e alterado de acordo com o genótipo.....	48
Tabela 11:	Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de meta-Hb para os genótipos: AA, AS, SS e S β	50
Tabela 12:	Porcentagem de indivíduos com concentrações de meta-Hb normal e alterada de acordo com o genótipo.....	51
Tabela 13:	Distribuição porcentual de meta-Hb segundo o genótipo.....	54
Tabela 14:	Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de Hb Fetal para os grupos: A, B, C e D.....	57
Tabela 15:	Porcentagem de indivíduos com Hb Fetal normal e alterada de acordo com a concentração de Hb S.....	57
Tabela 16:	Distribuição porcentual de Hb Fetal de acordo com a concentração de Hb S.....	59
Tabela 17:	Relação entre concentração de Hb Fetal e meta-Hb em pessoas com genes de Hb S independente da sua concentração de Hb S e do seu genótipo.....	61
Tabela 18:	Relação entre concentração de Hb Fetal e corpos de Heinz em pessoas com genes de Hb S independente da sua concentração de Hb S e do seu genótipo.....	61
Tabela 19:	Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de eritrócitos com corpos de Heinz para os grupos: A, B, C e D.....	62
Tabela 20:	Porcentagem de indivíduos com valores quantitativos de eritrócitos com corpos de Heinz normal e alterado de acordo com a concentração de Hb S.....	63
Tabela 21:	Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de meta-Hb para os grupos: A, B, C D.....	65

Tabela 22:	Porcentagem de indivíduos com concentrações de meta-Hb normal e alterada de acordo com a concentração da Hb S.....	66
Tabela 23:	Distribuição porcentual de meta-Hb de acordo com a concentração de Hb S.....	68
Tabela 24:	Análise descritiva para meta-Hb de acordo com o período (24, 48, 72 e 168 horas) para o genótipo AA.....	70
Tabela 25:	Análise descritiva para meta-Hb de acordo com o período (24, 48, 72 e 168 horas) para o genótipo AS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Fig. 01	Oxidação eritrocitária e geração de radicais livres.....	09
Fig. 02	Mecanismo da degradação peroxidativa em eritrócitos irreversivelmente falcizados sob estresse oxidativo.....	12
Fig. 03	Porcentagem de indivíduos com Hb Fetal normal e alterada de acordo com o genótipo: AA, AS, SS e SB (S/Tal. Beta).....	44
Fig. 04	Distribuição porcentual de Hb Fetal segundo o genótipo: AA, AS, SS e SB (S/Tal. Beta).....	46
Fig. 05	Porcentagem de indivíduos com valores quantitativos de eritrócitos com corpos de Heinz normal e alterado de acordo com o genótipo AA, AS, SS e SB (S/Tal. Beta).....	49
Fig. 06	Porcentagem de indivíduos com meta-Hb normal e alterada de acordo com o genótipo: AA, AS, SS e SB (S/Tal. Beta).....	52
Fig. 07	Distribuição porcentual de meta-Hb segundo o genótipo: AA, AS, SS e S/Tal. Beta	55
Fig. 08	Porcentagem de indivíduos com Hb Fetal normal e alterada de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).....	58
Fig. 09	Distribuição porcentual de Hb Fetal de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).....	60
Fig. 10	Porcentagem de indivíduos com valores quantitativos de eritrócitos com corpos de Heinz normal e alterado de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).....	64
Fig. 11	Porcentagem de indivíduos com meta-Hb normal e alterada de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).....	67
Fig. 12	Distribuição porcentual de meta-Hb de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).....	69
Fig. 13	Concentração de meta-Hb de acordo com o período (24, 48, 72 e 168 horas).....	72
Fig. 14	Representação esquemática dos efeitos deletérios da polimerização da Hb S.....	73

SUMÁRIO

I- INTRODUÇÃO.....	01
1.1- Radicais livres como produtos de oxidação.....	01
1.2- Oxidação em eritrócitos.....	07
1.3- Defesas antioxidantes nos eritrócitos.....	14
1.4- Doença falciforme.....	17
1.5- Diagnóstico laboratorial das síndromes falcêmicas.....	23
II- OBJETIVOS.....	26
III- MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1- Seleção dos pacientes.....	27
3.2- Sequência Operacional.....	27
3.3- Esquema sequencial das análises.....	28
3.4- Material.....	29
3.5- Métodos.....	29
3.6- Análise estatística.....	39
IV- RESULTADOS.....	40
4.1- Análise descritiva de acordo com o genótipo.....	41
4.1.1- Análise da Hb Fetal.....	41
4.1.2- Análise da presença de eritrócitos com corpos de Heinz.....	47
4.1.3- Análise da concentração de meta-Hb.....	50
4.2- Análise descritiva de acordo com a concentração de Hb S.....	56
4.2.1- Análise da Hb Fetal.....	56

4.2.2- Análise da presença de eritrócitos com corpos de Heinz.....	62
4.2.3- Análise da concentração de meta-Hb.....	65
4.2.4- Análise da meta-Hb medida de acordo com o tempo de estocagem.....	70

V- DISCUSSÃO.....	73
-------------------	----

VI- CONCLUSÕES.....	95
---------------------	----

VII- RESUMO.....	97
------------------	----

VIII- ABSTRAT.....	98
--------------------	----

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
-------------------------------------	----

X- ANEXO 1	
------------	--

XI- ANEXO 2	
-------------	--

I- INTRODUÇÃO

1.1- Radicais Livres como Produto de Oxidação

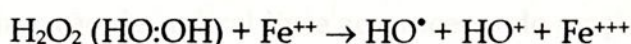
Radical livre é definido como qualquer agente químico (íon, átomo ou molécula) que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, circulando sozinho em sua órbita. Os elétrons podem ser aniônicos, catiônicos ou neutros. A estrutura do átomo se caracteriza por um núcleo formado por igual número de prótons e nêutrons de massas semelhantes, circundado por elétrons que se agrupam aos pares em órbitas peri-nucleares. Assim, quando dois radicais livres se encontram, seus elétrons desemparelhados formam par e ambos radicais se consomem (Das & Essman, 1990; Ounchard & Kelly, 1996). Entretanto, alguns radicais livres buscam o seu equilíbrio tomando elétrons de agentes químicos estabilizados (radical não-livre), e ao se estabilizarem eletricamente formam outros radicais livres, causando reações em cadeia. Essas ações são ultra rápidas com duração na ordem de 10^{-14} segundos. As reações em cadeia podem ser interrompidas, ou pela ação de enzimas antioxidantes ou redutoras, ou pela combinação de dois radicais idênticos que se unem novamente, equilibrando seus elétrons (Das & Essman, 1990; Minetti *et al*, 1996; Ounchard & Kelly, 1996).

Os radicais livres são formados por rupturas de agentes químicos cuja origem pode ser física ou química, esta última envolvendo reações de oxidação e redução, conhecidas por redox. Fisicamente, os radicais livres são gerados por fotólise (luz ultravioleta e luz visível), radiólise (raio-X) e termólise (aquecimento). Outras fontes capazes de produzirem a geração de radicais livres incluem as próprias células com destaque para: citoplasma, mitocôndrias, núcleo e retículo endoplasmático. Dessas fontes celulares sobressaem a fosforilação oxidativa mitocondrial, as



oxidações químicas e enzimáticas por liberação de radicais livres, a quimio e bioluminescência com produção de CO_2 e luz, e a fotoxidação celular que resulta na geração de peróxidos (George *et al*, 1996; Loureiro *et al*, 1996; Medeiros *et al*, 1983).

A geração de radicais livres por redox se deve à transferência de elétrons como ocorre na reação de Fenton, onde o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apesar de não ter elétrons desemparelhados sofre uma reação em presença de ferro (Fe^{++}), decompondo-se em radicais livres ($\text{HO}^\bullet$) e íon estável (HO^+), conforme mostra a seguinte reação:



O radical $\text{HO}^\bullet$ é uma espécie oxigenada extremamente reativa, capaz de atacar estruturas orgânicas estáveis e provocar danos ao DNA, bem como processos mutagênicos.

Os radicais livres podem ser agrupados em oxi-radicais, espécies excitadas, e radicais variados, conforme mostra a tabela 1, e causam ampla variedade de reações químicas que incluem ligações duplas, remoção de hidrogênio, fragmentação, dismutação e polimerização. "In vivo", seus alvos preferidos são os ácidos graxos polinsaturados das camadas fosfolipídicas das membranas, vários aminoácidos que contêm enxofre ou nitrogênio (tirosina, histidina, metionina, cisteína, lisina e triptofano), cadeias carbônicas de unidades de carboidratos (ribose, ácidos nucleicos, proteoglicanos e ácido hialurônico), purina e pirimidina. Os efeitos deletérios desses radicais incluem lesões ao DNA, processos mutagênicos, destruição celular precoce, e nos eritrócitos desencadeiam ações contra a hemoglobina (Das & Essman, 1990; Franck, Bevers & Lubin, 1985; Minetti *et al*, 1996; Ounchard & Kelly, 1996; Winterbourn, 1990). A reação orgânica para evitar a elevação de radicais livres se dá por meio de mecanismos celulares

de defesa, envolvendo enzimas antioxidantes sintetizadas nas mitocôndrias, citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático e peroxissomos (tabela 2). As enzimas antioxidantes atuam em três níveis: primário, secundário e manutenção. No nível primário ocorrem três reações: (a) reações enzimáticas com participação da superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatíon peroxidase (GSH-Px); (b) eliminação dos refugos de radicais livres, efetuada pela ação da glutatíon peroxidase e compostos orgânicos (vitaminas C e E); (c) eliminação de radicais livres com a participação de beta-carotenos. No nível secundário são executados duas atividades, uma das quais realizadas pela glutatíon-transferase e NADPH-quinona óxido-redutase, que atuam nos sistemas de conjugação do radical livre ao processo de reação enzimática, e a outra que se efetua por meio de quelação de metal com participação da ferritina e cobre. No nível da manutenção do equilíbrio, ocorrem reações específicas de enzimas e proteínas, suplementação de dietas com vitaminas C e E, e beta carotenos, e a excreção biliar da glutatíon conjugado (Aliakbar *et al*, 1993; Cohen & Hochstein, 1963; Das & Essman, 1990; Ounchard & Kelly, 1996; Stratton *et al*, 1988; Waugh & Low, 1985).

A GSH-Px contém selênio (Se) como selenocisteína em seu sítio ativo, e a deficiência de Se resulta em decréscimo na atividade da enzima. Variações no conteúdo de Se e deficiência da GSH-Px, podem ocorrer como polimorfismo genético em populações judaicas e mediterrâneas e são assintomáticos (Fujii & Kaneko, 1992).

O Se é um elemento essencial para o funcionamento da GSH-Px, catalisando a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos e prevenindo danos oxidativos às células, sua deficiência provoca anormalidades bioquímicas e funcionais nos eritrócitos. Além do Se, sistemas antioxidantes como vitamina E, vitamina C e carotenóides foram observadas em baixas concentrações em pacientes com anemia falciforme quando comparadas ao grupo controle. O zinco (Zn), também foi observado



estar em baixas concentrações em falcêmicos. Os danos oxidativos provocados por uma defesa antioxidante insuficiente pode ter um papel na diminuição da vida média do eritrócito falcizado (Natta, Chen & Chow, 1990).

Tabela 1: Grupos de radicais livres classificados conforme suas estruturas químicas.

Grupo	Espécie Químico	Sinônimo
Oxi-radicais	$O_2^\bullet$	Íon superóxido
	$RO^\bullet$	Alcoxil
	HO_2	Oxigênio centrado
	$HO^\bullet$	Hidroxil
	$ROO^\bullet$	Radical peroxil
Peróxido	H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
	$ROOH$	Hidroperóxido
	$ROOR$	Radical peróxido
Espécies excitadas	O^1_2	Oxigênio único
	$R_2C=O_3$	Oxigênio triplo
Radicais variados	$NO^\bullet$	Óxido nítrico
	$ClO^\bullet$	Hipoclorito
	O_3	Ozônio
	GS	Glutationil

Tabela 2: Enzimas e compostos antioxidantes relacionados com suas origens.

Antioxidantes	Origem
Superóxido dismutase (SOD)	Mitocôndria Citoplasma Retículo endoplasmático Núcleo
Glutatião peroxidase (GSH-Px)	Mitocôndria Citoplasma Retículo endoplasmático Núcleo
Catalase	Peroxisomo
Vitamina E	Membrana
Beta caroteno	Membrana
Vitamina C	Citoplasma

As substâncias não enzimáticas são: tocoferóis, carotenóides, vitaminas C e D, esteróides, ubiquinonas, tióis, ácido úrico, bilirrubina, inosina, taurina, piruvato. O uso de substâncias antioxidantes pode eliminar alguns sintomas patológicos que ocorrem quando há deficiência de vitaminas. Em experimentos com animais e humanos, observou-se que um decréscimo na concentração antioxidante pode provocar uma reação de resposta no organismo que é expresso pelo aumento ou decréscimo de outra substância antioxidante. Por exemplo: deficiência de vitamina A pode provocar aumento da glutatião e ubiquinona. Deficiência de vitamina C pode diminuir a vitamina A no plasma sanguíneo. O suplemento de uma substância antioxidante pode efetuar um aumento ou deficiência de outra; o suplemento de vitamina E, aumenta a glutatião e vitamina A; a administração de vitamina A ou β -caroteno diminui a vitamina E que é o antioxidante mais significativo na fase dos lipídios. A vitamina C é o

antioxidante mais importante da fase aquosa sendo o ácido úrico o protetor da vitamina C contra a oxidação (Levin & Popov, 1994).

Os metais não apresentam comportamento redox em sistema biológicos, mas podem promover reações mediadas por espécies reativas de oxigênio *in vivo* e *in vitro*. Há evidências experimentais de que o efeito pro-oxidante dos elementos Al, Sc, Ga, In, Y, Be, La, e Pb pode ser devido às suas interações com a membrana, levando a alterações na propriedade física facilitando a iniciação ou propagação da peroxidação lipídica. Consequentemente, a liberação de produtos de lipoperoxidação para o meio poderia causar modificações oxidativas em proteínas e DNA (Oteiza *et al*, 1995).

Dentre os precursores de um grande número de agentes oxidantes reativos, incluindo radicais oxidantes, como o oxigênio único, peroxinitrito, e halógenos oxidados como o HOCl, é muito provável que o $O_2^{\bullet}$ tem o poder de danificar sistemas biológicos (Babior, 1997). Danos aos DNA, lipídios e proteínas foram documentados como consequências de exposição ao $O_2^{\bullet}$ e de suas espécies ativadas. Danos ao DNA pode levar à produção de bases anormais ou quebras de fita (Babior, 1997). Segundo Stadman (1992), os radicais livres são responsáveis por dez mil modificações de base no DNA por dia. Em proteínas, resíduos susceptíveis tais como cisteína e histidina são oxidados. Resíduos de ácidos graxos polinsaturados de fosfolipídios e triglicerídeos sofrem peroxidação para formar hidroperóxidos alquil tóxicos e aldeídos como o MDA (Babior, 1997).

A deficiência de Zn, *in vivo*, produz danos oxidativos a lipídios, proteínas e DNA. Os metais de transição, especialmente Fe e Cu, participam de reações de transferência de elétrons que desempenham funções importantes tanto na geração de espécies reativas de oxigênio, quanto na conversão de espécies pouco reativas em espécies altamente reativas (Oteiza *et al*, 1995).



Um importante antioxidante nuclear parece ser a metalotioneína com função de proteção ao DNA. Um balanço da enzima superóxido dismutase (SOD) é fundamental, uma vez que o excesso desta enzima pode diminuir a síntese de proteínas antioxidantes, tornando as células mais vulneráveis ao ataque de oxidantes. O Fe ligado ao DNA pode reagir com H_2O_2 produzindo radical OH *in situ*, levando a modificações no DNA, inclusive com potencial mutagênico (Meneghini, 1995).

1.2- Oxidação em Eritrócitos

Radicais livres derivados do oxigênio causam profundas lesões em eritrócitos, diminuindo seu período de vida útil, em especial nos doentes portadores de anemia falciforme e talassemias. Situações semelhantes ocorrem também na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), bem como em oxidações adquiridas por ingestão de drogas oxidantes e inalação de poluentes oxidantes (Medeiros *et al*, 1983; Naoum, 1997).

A destruição de eritrócitos do sangue por mecanismos oxidativos é o resultado final de dois processos, caracterizados por desnaturação da hemoglobina e oxidação da membrana do eritrócito. A desnaturação da hemoglobina poderia iniciar danos oxidativos aos componentes adjacentes à membrana. O heme, outro produto de desnaturação da Hb, é danoso à membrana do eritrócito induzindo a perda de potássio, diminuindo a fragilidade osmótica, promovendo a turgidez do eritrócito levando finalmente à lise. O heme inibe um certo número de enzimas do eritrócito e media a dissociação de proteínas do esqueleto da membrana, através da alteração da conformação das proteínas (Chiu *et al*, 1996).

A suscetibilidade da hemoglobina oxigenada (Oxi-Hb) em se autooxidar está relacionada à capacidade de um elétron do ferro ligado ao

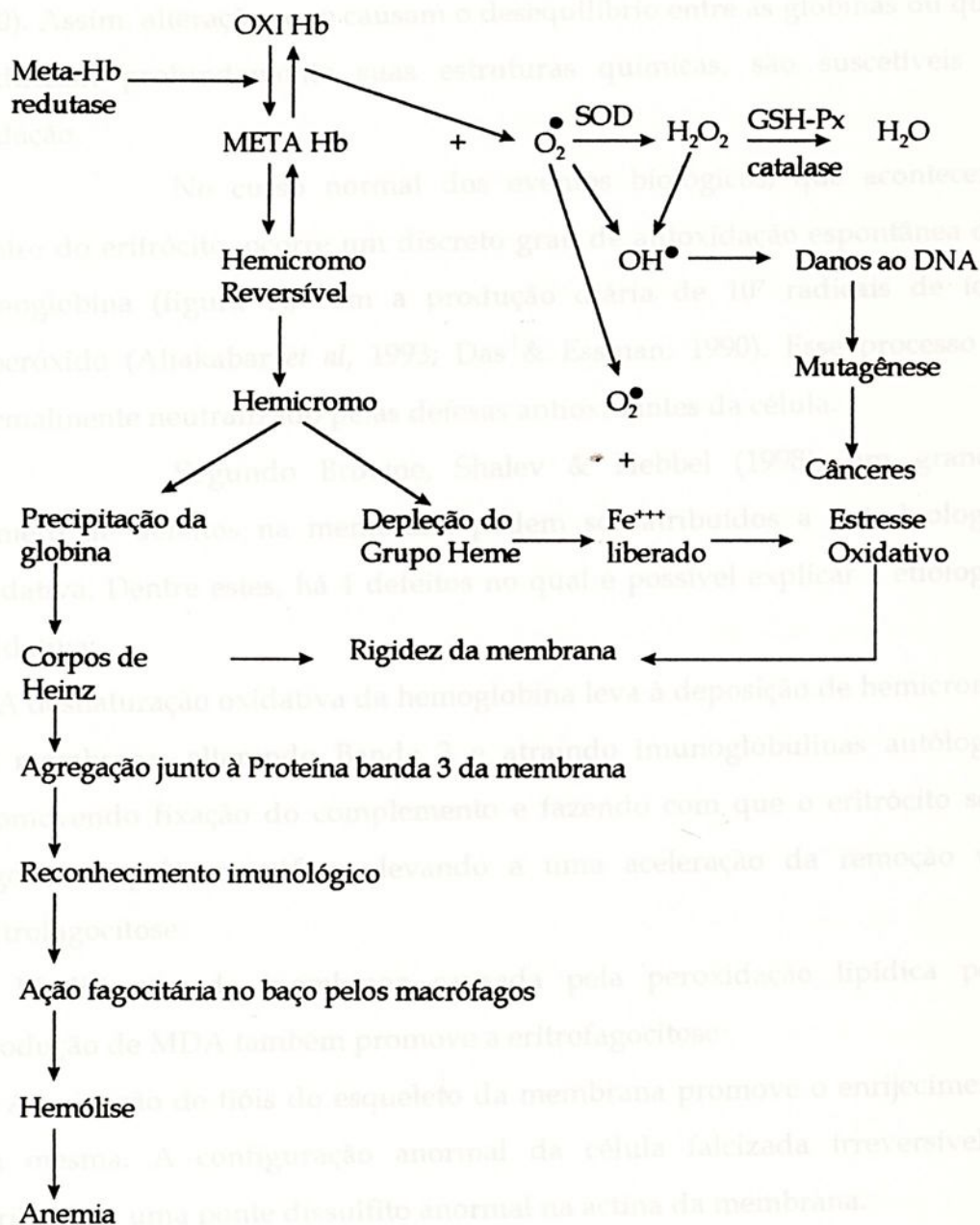


grupo heme tornar-se despolarizado. A molécula de hemoglobina, em especial a região não polar que contém o grupo heme, tem a necessidade de manter o ferro no estado ferroso (Fe^{++}) para que o mesmo exerça o transporte reversível de oxigênio. Qualquer modificação neste pacote químico que protege o grupo heme pode permitir o acesso de pequenos ânions ou moléculas de água, com deslocamento de elétrons do grupo heme, e consequentemente, dar origem à formação de radicais livres de íon superóxido ($\text{O}_2^{\bullet}$), desencadeando o processo da oxidação da hemoglobina (figura 1).

Quando o eritrócito está sob estresse oxidativo, seja por origem induzida, ou por deficiência de enzimas e compostos antioxidantes, ou por anormalidades químicas da hemoglobina, as hemólises são de diferentes intensidades, e dependem do local em que a célula sofreu a agressão (Waugh & Low, 1985; Waugh, Walder & Low, 1987; Winterbourn, 1990). Um decréscimo na atividade da GSH-Px, pode ser responsável pela acelerada peroxidação resultando em anemia hemolítica (Fujii & Kaneko, 1992). Assim, as lesões eritrocitárias podem ser devidas a : (a) oxidação da hemoglobina em metaemoglobina, desencadeando a formação de hemicromos; (b) ataque de radicais livres aos ácidos graxos polinsaturados das membranas lipídicas, (c) ataque de radicais livres sobre aminoácidos específicos, com redução dos grupos das proteínas de membrana. A oxidação da hemoglobina apresentada na figura 1 destaca que os hemicromos representam a fase em que a oxidação altera o complexo formado pela porfirina e ferro (grupo heme). Inicialmente são formados hemicromos reversíveis que, sob ação redutora transforma-se em hemoglobina funcional (oxiemoglobina). Entretanto, quando o grupo heme se rompe, a oxidação passa à fase irreversível, caracterizada pela desnaturação da hemoglobina, precipitação da globina, e dissolução do

grupo heme (Waugh & Low, 1985; Waugh, Walder & Low, 1987; Winterbourn, 1990).

Figura 1: Oxidação eritrocitária e geração de radicais livres



Destaca-se que o equilíbrio entre as globinas dos tipos α e β (na formação de tetrâmeros: α - β ; α - δ ; α - γ) atua como mecanismo protetor contra os ataques oxidantes aos eritrócitos, especialmente aqueles provenientes do íon superóxido e peróxido de hidrogênio (Winterbourn, 1990). Assim, alterações que causam o desequilíbrio entre as globinas ou que modificam profundamente suas estruturas químicas, são suscetíveis à oxidação.

No curso normal dos eventos biológicos, que acontecem dentro do eritrócito, ocorre um discreto grau de autooxidação espontânea da hemoglobina (figura 1), com a produção diária de 10^7 radicais de íon superóxido (Aliakabar *et al*, 1993; Das & Essman, 1990). Esse processo é normalmente neutralizado pelas defesas antioxidantes da célula.

Segundo Browne, Shalev & Hebbel (1998), um grande número de defeitos na membrana podem ser atribuídos a pato-biologia oxidativa. Dentre estes, há 4 defeitos no qual é possível explicar a etiologia oxidativa:

- 1- A desnaturação oxidativa da hemoglobina leva à deposição de hemicromo na membrana, alterando Banda 3 e atraindo imunoglobulinas autólogas promovendo fixação do complemento e fazendo com que o eritrócito seja fagocitado pelo macrófago, levando a uma aceleração da remoção via eritrofagocitose.
- 2- Modificação da membrana causada pela peroxidação lipídica pela produção de MDA também promove a eritrofagocitose
- 3- A oxidação de tióis do esqueleto da membrana promove o enrijecimento da mesma. A configuração anormal da célula falcizada irreversível é atribuída a uma ponte dissulfeto anormal na actina da membrana.
- 4- A presença de hidroperóxidos lipídicos provoca sensibilidade mecânica anormal, levando a deformação celular devido a perda de cátion.

Peroxidação lipídica é a deteriorização de ácidos graxos polinsaturados e é um mecanismo amplamente aceito de lesão e morte celular. O primeiro mecanismo de lesão celular foi observado através da radiação ionizante, desde então, tem sido associada com várias substâncias tóxicas como drogas, solventes, pesticidas, álcool e certos metais de transição. Foi observada em várias doenças como convulsões, infarto agudo do miocárdio, artrite reumatóide, diabetes e câncer. Além disso, a susceptibilidade de autooxidação do eritrócito foi verificada em várias anemias hemolíticas incluindo talassemia maior, deficiência de G6PD e anemia hemolítica autoimune. O aumento da peroxidação lipídica provoca o envelhecimento do eritrócito (Knight, 1992).

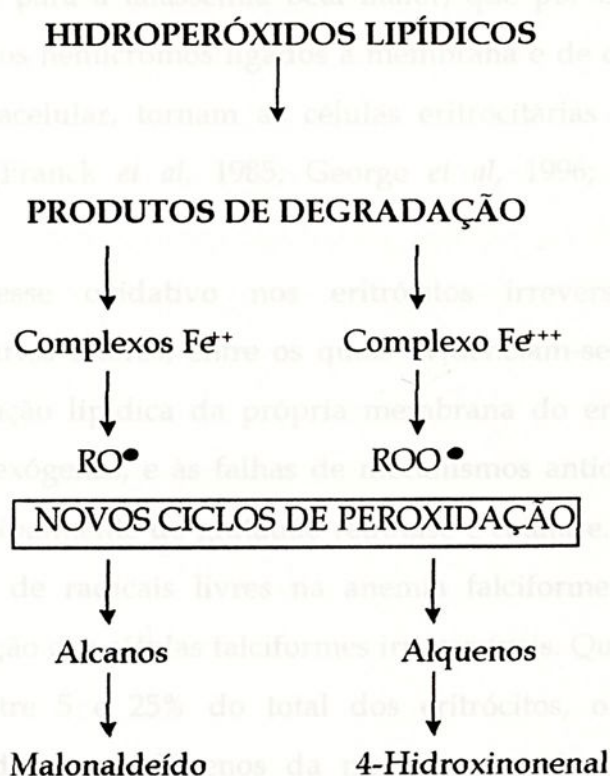
A peroxidação dos ácidos graxos polinsaturados da membrana lipídica dos eritrócitos é consequência de muitos tipos de lesões celulares causadas por radicais livres intermediários, como é o caso do radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$). A peroxidação lipídica se difunde pela estrutura da membrana afetando sua integridade, bem como a fluidez lipídica e as interações físico-químicas com os componentes vizinhos. Entre os radicais livres mais potentes, com capacidade para retirar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno pertencente a um ácido graxo polinsaturado, sobressaem principalmente os radicais hidroxil ($\text{HO}^\bullet$), alcoxil ($\text{RO}^\bullet$) e peroxil ($\text{ROO}^\bullet$). Os radicais alcoxil e peroxil podem iniciar a peroxidação lipídica propagando-a em forma de reação em cadeia. A ruptura da ligação entre dois átomos de carbono durante essa reação peroxidativa resulta na formação de alcanos similares a malonaldeídos, ou de alquenos sob forma de 4-hidroxinonenal, figura 2, ambos biologicamente muito ativos e com capacidade de inibir a agregação plaquetária (Das & Essman, 1990; Ounchard & Kelly, 1996; Waugh & Low, 1985).

Os efeitos da ação de radicais livres em proteínas eritrocitárias se devem inicialmente à disposição de alguns aminoácidos se



oxidarem com relativa facilidade, como são os casos de: metionina, triptofano, histidina, cisteína, lisina e tirosina. Entretanto, pelo fato do estresse oxidativo atingir todos os compartimentos celulares, destaca-se que no caso dos eritrócitos a peroxidação lipídica com formação de malonaldeído e 4-hidroxinonenal tem efeito concomitante sobre o aminoácido lisina. Em consequência, esses processos podem alterar as atividades enzimáticas da célula e as funções celulares, incluindo aqui a permeabilidade da membrana e o funcionamento da bomba de sódio, potássio e cálcio, entre outros (George *et al*, 1996; Loureiro *et al*, 1996; Shinar & Rachmilewitz, 1990; Stratton *et al*, 1988).

Figura 2: Mecanismo da degradação peroxidativa em eritrócitos irreversivelmente falcizados sob estresse oxidativo.



Fonte: NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. Ed. Sarvier, São Paulo, 1997.

Produtos de oxidação lipídica são capazes de danificar proteínas funcionais, inibir a síntese de DNA e proteínas, bem como causar lise celular e perda da integridade reprodutiva da célula. Alterações químicas e danos ao DNA podem ser produzidos durante o processo de peroxidação lipídica, com a agravante de que os radicais lipídicos formados durante a propagação podem reagir com o DNA (Medeiros *et al*, 1995).

Qualquer situação patológica que estimule o processo oxidativo da hemoglobina, ou que desequilibre as defesas antioxidantes, aumentará a geração de radicais livres no eritrócito (Medeiros *et al*, 1983; Winterbourn, 1990). Entre estas situações que serão tratadas a seguir, destacam-se a anemia falciforme, cuja suscetibilidade oxidativa se localiza nos hidroperóxidos lipídicos da membrana das células falciformes, e as talassemias com ênfase para a talassemia beta maior, que por excesso de ferro circulante, além dos hemicromos ligados à membrana e de complexos residuais de ferro intracelular, tornam as células eritrocitárias altamente sensíveis à oxidação (Franck *et al*, 1985; George *et al*, 1996; Shinar & Rachmiletz, 1990).

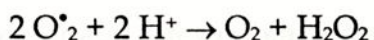
O estresse oxidativo nos eritrócitos irreversivelmente falcizados se deve a vários fatores, entre os quais evidenciam-se produtos endógenos de peroxidação lipídica da própria membrana do eritrócito, a exposição a oxidações exógenas, e às falhas de mecanismos antioxidativos, devido à redução principalmente de glutatão redutase e catalase. As lesões causadas pela geração de radicais livres na anemia falciforme estão na dependência da proporção das células falciformes irreversíveis. Quando essa proporção se situa entre 5 e 25% do total dos eritrócitos, o nível de desencadeamentos oxidativos endógenos da membrana está aumentado, resultando em modificações muito pronunciadas. Quando a proporção de células falciformes irreversíveis é menor que 5% o estresse oxidativo é baixíssimo, com poucas consequências lesivas aos eritrócitos Hb S (Das &

Essman, 1990; Franck *et al*, 1985; Naoum, 1996; Waugh, Walder & Low, 1987).

1.3- Defesas Antioxidantes nos Eritrócitos

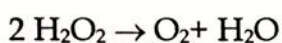
Os eritrócitos são células que possuem sistemas enzimáticos bastante específicos, capazes de diminuir e neutralizar a reatividade dos radicais livres. Alguns desses sistemas são localizados na membrana celular e no citoplasma eritrocitário, bem como extracelularmente (tabela 2).

A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet}$ ao convertê-lo em O_2 e H_2O_2 (Andersen *et al*, 1997; Babior, 1997):



Há duas formas de SOD: a Cu^{+2}/Zn^{+2} SOD e a Mn^{+2} SOD. A forma Cu^{+2}/Zn^{+2} SOD forma um dímero de 32 Kda e é encontrada no citosol, enquanto que a forma Mn^{+2} SOD é um tetrâmero de 80 Kda localizado na mitocôndria e encontrada também em bactérias como uma terceira forma de SOD contendo Fe^{+2} como seu elemento redox. Mutantes da enzima Cu^{+2}/Zn^{+2} SOD parece explicar a forma familiar de uma doença neurológica fatal conhecida como esclerose lateral amiotrófica ou doença do neurônio motor. Os neurônios motores do córtex cerebral e medula espinhal degeneram em poucos anos levando ao enfraquecimento e paralisia causando a morte por pneumonia devido a incapacidade dos pacientes em expectorar as secreções respiratórias (Babior, 1997).

O H_2O_2 produzido pela dismutação do $O_2^{\bullet}$ é degradada por meio de duas reações promovidas pela catalase e por um sistema antioxidante dependente de glutatíon que reduz o H_2O_2 a H_2O com consumo de NADPH. A catalase é uma enzima tetramérica de 240 Kda que catalisa a dismutação do H_2O_2 a O_2 e H_2O , conforme a representação abaixo:



Metade do H_2O_2 produzido na célula é destruído pela catalase. Tem sido verificada a deficiência de catalase, mas seus portadores são assintomáticos, apesar disso há relatos que em japoneses a deficiência de catalase está associada a úlceras da cavidade oral (Babior, 1997).

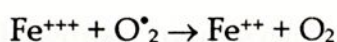
O sistema dependente de glutatão é constituído por duas enzimas: glutatão peroxidase (GSH-Px) e glutatão redutase (GR). Ambas têm 22 Kda e o elemento redox da GSH-Px é a selenocisteína. Pessoas com deficiência de GSH-Px e GR manifestam discreto a moderado graus de anemia que são agravados por infecções e drogas oxidantes como a nitrofurantoína e certas sulfonamidas. A deficiência de Se leva à cardiomiopatia que em parte, representa dano oxidativo devido à deficiência de GSH-Px (Babior, 1997).

Conforme exemplifica a figura 1, na autooxidação da hemoglobina, a enzima NADH-dependente da metaemoglobina redutase reconverte a metaemoglobina para deoxiemoglobina, e esta por sua vez retorna ao estado inicial de oxiemoglobina. O íon superóxido ($O_2^{\cdot -}$) formado no desencadeamento da oxidação da hemoglobina para metaemoglobina, sofre a ação enzimática da superóxido dismutase (SOD), dismutando-o para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que tem limitada reatividade. Sua detoxificação (ou redução) para H_2O é realizada por um ciclo contínuo mediado pela catalase e glutatão peroxidase (Aliakabar *et al*, 1993; Cohen & Hochstein, 1963; Winterbourn, 1990).

A manutenção dos níveis elevados de glutatão peroxidase (GSH-Px) é essencial para proteger e manter no estado reduzido os grupos constituídos por compostos organo sulfurados (grupo tiol) das enzimas celulares, bem como das proteínas intermembranas e do citoesqueleto. A enzima catalase também tem atuação importante na transformação de H_2O_2 em H_2O . Destaca-se também, que o tocoferol (vitamina E) é um dos mais importantes antioxidantes localizados na membrana eritrocitária, com a

função de interromper o processo oxidativo e evitar a propagação da geração de radicais livres (Franck *et al*, 1985; George *et al*, 1996; Waugh, Walder & Low, 1987). Extracelularmente, o ácido ascórbico destaca-se entre os mais eficientes mecanismos biológicos com capacidade antioxidativa, atuando sinergicamente com o tocoferol, transferrina e ceruloplasmina, esta última agindo como ferroxidase. As defesas antioxidantes do eritrócito estão, portanto, relacionadas com o potencial oxidativo que atinge a célula, e normalmente suas ações consistem em neutralizar a geração de radicais livres e restaurar as lesões de causas químicas.

Pela análise da figura 1 observa-se que o íon superóxido ($O_2^{\bullet -}$), gerado no processo de transformação de deoxiemoglobina para metaemoglobina, ao se ligar com o Fe^{+++} proveniente da depleção do grupo heme promove uma reação com liberação de Fe^{++} :



O Fe^{++} , por sua vez, ao se combinar com a H_2O_2 derivada da dismutação do $O_2^{\bullet -}$ desencadeia a reação de Fenton, com liberação do radical hidroxil ($HO^{\bullet}$):



Nesse processo, o Fe^{+++} participa de contínuas reações com o íon superóxido, causando o estresse oxidativo e contribuindo para aumentar a rigidez da membrana eritrocitária, cujo potencial antioxidante depende principalmente da vitamina E e beta caroteno (Franck *et al*, 1985; Shinar *et al*, 1987).

Diante disso, as situações que desequilibram as ações antioxidantes do eritrócito podem ser devidas a um excesso proveniente do

meio externo como poluição ambiental e drogas, ambas com potencial oxidante, ou por causas constitucionais devido às deficiências de enzimas antioxidantes: SOD, GSH-Px e catalase. Além dessas alterações hereditárias bastante específicas, outras situações que envolvem um descontrole na síntese de metaemoglobina com aumento da sua concentração, são capazes de causarem constantes estresses oxidativos, como são os casos das hemoglobinas instáveis, metaemoglobinopatias por Hb M, e por deficiência das enzimas que compõem o sistema de metaemoglobina redutase (Das & Essman, 1990; George *et al*, 1996; Loureiro *et al*, 1996; Medeiros *et al*, 1983; Minetti *et al*, 1996).

1.4- Doença Falciforme

Doença falciforme é um termo genérico usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizado pelo predomínio de Hb S. É uma patologia hereditária que se caracteriza notadamente por um quadro de anemia hemolítica. A causa básica dessa alteração se deve à presença de moléculas de hemoglobinas anormais conhecidas por hemoglobina S (Hb S), em concentrações superiores a 50 % do conteúdo total de hemoglobina nos eritrócitos. A Hb S é uma variante da hemoglobina normal (Hb A) derivada de mutação ocorrida no gene que sintetiza a globina beta. Esse gene localizado no cromossomo 11 sofreu a troca de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG, resultando a inserção do aminoácido valina no lugar do ácido glutâmico da posição 6 da globina beta. Essa troca abala estruturalmente a molécula de Hb S quando submetida à desoxigenação, pois a presença de valina mutante favorece a polimerização, cujas moléculas agregadas de Hb S geram a formação de longos polímeros, alterando a morfologia eritrocitária tornando-as falcizadas, com reflexos fisiológicos no funcionamento da bomba de sódio e potássio, principalmente. Com essas anormalidades, os eritrócitos com Hb S perdem potássio e água,

se tornam mais densos, e diminui a maleabilidade, fatos que favorecem a contínua formação de polímeros e determinam a sua falcização irreversível (Beutler, 1990; Naoum, 1996; Naoum, 1997). Todas essas alterações dependem da tensão de oxigênio, pH, da concentração intraeritrocitária da Hb S e da combinação com outras variantes de hemoglobinas (ex: Hb SC, Hb SD) ou com talassemia alfa e beta. O processo é contínuo, assim, a contínua alteração da morfologia do eritrócito com Hb S, provoca lesões crônicas da membrana celular tornando-a irreversivelmente falcizada (Das & Essman, 1990; Franck *et al*, 1985).

As doenças falciformes são encontradas com maior frequência em habitantes da África, Mediterrâneo e Índia. Nos Estados Unidos, são mais prevalentes em negros e hispânicos oriundos do Caribe, da América Central e parte da América do Sul (W.H.O., 1982).

O gene Hb S apresenta alta prevalência em várias regiões da África e em outras partes do mundo, onde a malária por *Plasmodium falciparum* é endêmica, ou onde existam grupos de imigrantes portadores do gene S. A alta prevalência de Hb S nessas áreas pode ser explicada por dois mecanismos: 1- seleção de heterozigotos em áreas altamente malarígenas; e 2- imigração espontânea ou forçada dos portadores do gene alterado (Naoum, 1997; Naoum & Domingos, 1997).

Outras síndromes genéticas, que associam a Hb S às diferentes hemoglobinas variantes, produzem um quadro clínico que varia de moderado a acentuado, semelhante ao desenvolvido por anemia falciforme. Dentre as doenças falciformes com quadro clínico mais grave destacam-se as resultantes de dupla heterozigose (Hb S/Hb C; Hb S/Hb D), onde a formação de cristais é facilitada pela presença das hemoglobinas variantes, promovendo a transformação do eritrócito (Murayama & Nalbadian, 1973). A frequência de acidentes vasculares cerebrais, comuns na

anemia falciforme, está diminuída nos duplos heterozigotos (Fabron Jr., 1997).

A associação da Hb S com talassemia melhora o quadro clínico do seu portador, quando comparada com a anemia falciforme, devido ao fato de que a concentração de Hb S nessas associações é menor do que no estado homozigoto (Hb SS). O indivíduo com Hb S/talassemia beta zero apresenta hemoglobinas S, Fetal e A₂, e no tipo Hb S/ talassemia Beta mais verificaram-se as presenças de hemoglobinas A, S, Fetal e A₂. Assim, a diminuição da concentração de Hb S minimiza o curso clínico da doença com episódios de crises mais espaçados (Fabron Jr., 1997).

Doenças falciformes são melhor classificadas pelo genótipo, conforme ilustra a Tabela 3.

Homozigotos para o gene S associados à talassemia alfa (Hb SS/talassemia α), apresentam curso clínico benigno, com expectativa de vida aumentada; o mesmo sendo verificado naqueles portadores de doenças falciformes, com a presença significativa de hemoglobina Fetal. A herança da talassemia α com a Hb S diminui a tendência de polimerização desta hemoglobina, contribuindo para melhora da sobrevida e do curso clínico do paciente. Especialmente no caso de talassemia α associada à Hb S existem provavelmente compensações para o paciente pelo fato de ocorrer aumento dos níveis de hemoglobina, hematócrito e diminuição de quantidade de reticulócitos, sugerindo que o grau de hemólise está reduzido pela presença da talassemia α (Naoum, 1997).

De acordo com Marcus *et al* (1997), a porcentagem de Hb Fetal talvez seja o parâmetro laboratorial mais importante que influencia a severidade clínica na doença falciforme. Pacientes com doença falciforme têm níveis de Hb Fetal variando de 1 a 20% e aqueles com PHHF têm níveis de 30 a 40% do total de hemoglobina. Vários estudos demonstraram que um aumento da Hb Fetal está associado a uma diminuição da gravidade clínica

na doença falciforme. Em pessoas normais o nível de Hb F é baixo - de 1 a 2% - e em mulheres é suavemente mais elevado (El-Hazmi *et al*, 1994).

Tabela 3: Características laboratoriais nos diversos genótipos que se agrupam como doença falciforme.

Doença	%	%	%			
Falciforme	Hb S	Hb F	Hb A	Hb A ₂	VCM	Hb (g/dl)
Hb SS	90-100	2-10	0	N	N	7-9
Hb S/ β^0 tal.	70-90	5-20	0	↑	↓	7-10
Hb S/ β^+ tal.	50-80	5-10	10-40	↑	↓	9-11
Hb SS/ α tal.*	80-90	10-20	0	N	↓	9-11
Hb SC	40-50	0	0	N	N	9-13
Hb SD	40-50	0	0	N	N	9-13
•Hb S/PHHF**	60-80	15-30	0	N	N	12-14
•Hb AS	30-40	0	60-70	N	N	12-16

* Pode ser detectada a Hb H (concentração: 2 a 5%), ou agregados intraeritrocitários de Hb H.

** PHHF: Persistência hereditária de Hb Fetal

•Hb S/PHHF e AS: não são doentes

0= ausência, N= normal, ↑= aumentado, ↓= diminuído

Fonte: NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. Ed. Sarvier, São Paulo, 1997, p.43.

Tais observações incentivaram estudos aprofundados nos genes responsáveis pela hemoglobina Fetal - gama alanina ($A\gamma$) e gama glicina ($G\gamma$) - sendo que sua presença altera o processo de polimerização da Hb S, e pode também afetar a expressão do gene S. Deste fato, algumas

pesquisas tem sido realizadas na tentativa de ativar os genes γ , pouco funcionantes, em indivíduos com idade acima de seis meses. Essa ativação tem o objetivo de aumentar a produção de Hb Fetal e assim, minimizar as consequências clínicas das alterações ligada à Hb S (Naoum, 1997).

Há duas características fisiopatológicas importantes nas doenças falciformes: anemia hemolítica crônica e vaso-oclusão, resultando em danos teciduais. Anemia hemolítica é causada por anormalidade do eritrócito e destruição precoce dessas células. A lesão tecidual é principalmente produzida por hipóxia resultante da obstrução dos vasos sanguíneos por acúmulo de eritrócitos falcizados (Fabron Jr., 1997, Kim Shapiro *et al*, 1998). Os sintomas da hipóxia também podem ser agudos com crises dolorosas. Os efeitos dos danos teciduais agudos ou crônicos podem resultar na falência do órgão, principalmente em pacientes com idade avançada.

Um problema adicional e menos reconhecido nos pacientes falciformes é sua vida sob condições de estresse psicossocial. Esses pacientes, além de possuírem o estresse vindo da doença crônica, convivem também com o problema da natureza de sua doença, cuja repetição das crises afeta sua atuação na escola e no trabalho, reduzindo a auto estima (Fabron Jr., 1997, Rodgers, 1997).

A detecção efetiva de diversas formas de síndromes falcêmicas requer diagnóstico laboratorial preciso, baseado principalmente em técnicas eletroforéticas, hemograma e dosagem de Hb Fetal. Nos casos de Hb SC, a associação de eletroforeses alcalina e ácida é decisiva para o correto diagnóstico. Entretanto, há casos em que o padrão eletroforético da anemia falciforme é similar ao de associações entre Hb S/Talassemia Beta, Hb S/Talassemia Delta-Beta e Hb S/PHHF. Nessas situações, as análises laboratoriais devem ser muito específicas, já que o quadro clínico do paciente difere em cada uma delas. Por exemplo, os sintomas com Hb S/Talassemia

Beta zero são parecidos com os dos pacientes com Hb SS, enquanto aqueles que apresentam Hb S/Talassemia Delta-Beta possuem poucos sintomas e os portadores de Hb S/PHHF são assintomáticos, apesar da similaridade no padrão eletroforético de todos eles (Charache *et al*, 1991).

Quantificações de Hb A₂ e Hb Fetal podem ajudar a distinguir essas alterações. Em geral, a Hb A₂ está aumentada, acima de 3,5% nos casos de associações com Talassemia Beta zero e baixa em pacientes com Hb S/talassemia Delta-Beta e Hb S/PHHF. A Hb Fetal está mais elevada em portadores de Hb S/talassemia Delta do que em pacientes com Hb SS. Nos casos em que se suspeita de Hb S/PHHF, a pesquisa da distribuição intra-eritrocitária de Hb Fetal nos pais deverá ser realizada (Honig & Adams, 1986).

Outro fator que pode influenciar a gravidade da doença falciforme são os haplótipos. Segundo Steinberg *et al* (1995), os haplótipos do agrupamento de genes da globina beta humana, podem ser utilizados como marcadores genéticos de heterogeneidade fenotípica entre pacientes com anemia falciforme. Três diferentes haplótipos são conhecidos na maioria dos pacientes africanos-americanos com genótipo SS: Benin, Bantu e Senegal. Um haplótipo pouco frequente é o Camarão restrito à África. Os haplótipos Senegal e Arábia-Índia são associados com altos níveis de Hb Fetal - principalmente em haplótipos homozigotos, e há uma considerável variância entre os indivíduos.

O haplótipo do gene β^S mais amplamente difundido é o Benin. Sua origem foi na Costa Ocidental da África. O haplótipo Bantu foi verificado na República Centro Africana. No Brasil, há predomínio do haplótipo Bantu sobre o do tipo Benin (Zago, 1993).

O haplótipo Senegal e o Asiático produzem elevações maiores de Hb F e de células F no sangue e são associados com evolução clínica benigna. Há evidências de que a elevação de Hb F seja resultante da



substituição C→T na posição 158 do gene γ na região controladora da atividade gênica. Essa mutação, impedindo a ligação de fatores reguladores, levaria à liberação da atividade do gene γ .

1.5- Diagnóstico Laboratorial das Síndromes Falcêmicas

Os diferentes genótipos de Hb S, são detectados e diferenciados por meio dos seguintes procedimentos técnicos.

- A) Eletroforeses alcalinas (pH 8 a 9) em acetato de celulose, agarose, ágar-amido, ou amido. A eletroforese alcalina em acetato de celulose distingue com boa sensibilidade a presença de Hb S, e muitas outras variantes, permitindo inclusive, avaliá-las quantitativamente por eluição das frações, ou por densitometria. Já a migração das Hb S e D são semelhantes e a eletroforese de focalização constitui-se no meio mais avançado de tecnologia básica, capaz de diferenciar as mobilidades entre Hb S e Hb D que são semelhantes nas eletroforeses alcalinas.
- B) Eletroforese ácida em ágar e agarose com tampão citrato pH 5 a 6, ou tampão fosfato pH 6,2, é utilizada para diferenciar Hb S da Hb D e da Hb E. Além disso, possibilita avaliar semi quantitativamente a presença de Hb Fetal.
- C) Teste de falcização e solubilidade. Ambos, com pouca sensibilidade e reprodutibilidade, só acusam a presença de Hb S.
- D) Dosagem de Hb Fetal: é um teste sensível que avalia a presença de Hb Fetal, por meio da sua resistência alcalina. É muito útil nas doenças falciformes, especialmente na Hb SS, Hb S/ Talassemia Beta, Hb SS/Talassemia Alfa e Hb S/PHHF.

A realização do hemograma, com especial atenção à morfologia eritrocitária (tabela 4) contribui para se chegar a um resultado seguro. Outro teste específico é a pesquisa intraeritrocitária de Hb H, por meio de incubação a 37°C do sangue do paciente com o corante azul de cresil

brilhante. Este teste é fundamental para identificar a interação de Hb SS/Talassemia Alfa. A tabela 5 mostra algumas alterações laboratoriais específica para anemia falciforme (Naoum & Domingos, 1997).

Tabela 4: Morfologia eritrocitária nos diferentes genótipos das síndromes falcêmicas.

Genótipo	Morfologia eritrocitária
AS	Normocitose, normocromia
SS	Células falcizadas e em alvo. Hipocromia e policromasia. Eritroblastos, corpos de Howel-Jolly
S/tal.β	Anisocitose, microcitose, poiquilocitose, células em alvo, células falcizadas, dacriócitos. Hipocromia, policromasia.
S/tal. α	Anisocitose, microcitose, células falcizadas. Hipocromia e policromasia
SC	Aniso-poiquilocitose. Hipocromia. Células em alvo
SD	Células falcizadas e em alvo. Policromasia
S/PHHF	Discreta anisocitose, ou normocitose e normocromia

Fonte: NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. Ed. Sarvier, São Paulo, 1997, p.46.

Tabela 5: Alterações laboratoriais específicas na anemia falciforme (Hb SS)

Concentração da Hb S	90 a 100%
Dosagem de Hb Fetal	2 a 10%
Tipo de anemia	grave - células falcizadas
Dosagem de Hb g/dl	7 a 9
Reticulócitos	5 a 30%
Leucócitos	Mais de 10 mil durante as crises. Pode ocorrer desvio à esquerda
Plaquetas	Plaquetose, com formas anormais
Fragilidade osmótica	Diminuída
Fragilidade térmico e mecânica	Aumentada
Hematúria	Frequente
Ácido úrico sérico	Pode estar elevado
Ferro sérico	Normal ou elevado

Fonte: NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. Ed. Sarvier, São Paulo, 1997, p.46.

Observação: as concentrações acima apresentadas representam o que ocorre na maioria dos pacientes com anemia falciforme. Entretanto, pode ocorrer valores discrepantes ao apresentado em alguns casos.

II- OBJETIVOS

Os produtos de degradação oxidativa da hemoglobina (Hb) são caracterizados laboratorialmente pelo aumento das concentrações de metaemoglobina e sulfaemoglobina e pela precipitação eritrocitária de corpos de Heinz. Para evitar que o processo oxidativo provoque lesões fisiológicas e metabólicas, os eritrócitos produzem enzimas específicas com atividades antioxidantes, caracterizadas principalmente pela superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatíon peroxidase (GSH-Px).

Nas doenças falciformes, ocorre ineficiência das atividades antioxidantes devido à diminuição dos níveis eritrocitários de GSH-Px e catalase em eritrócitos irreversivelmente falcizados. Entretanto algumas indagações, precisam ser esclarecidas especialmente a relação entre as concentrações da Hb S e dos produtos de degradação oxidativa desta hemoglobina.

Os objetivos do presente trabalho foram os seguintes:

- 1- Avaliar os produtos provenientes da degradação oxidativa da hemoglobina em eritrócitos de doentes falcêmicos de acordo com o genótipo e concentrações diferenciadas de Hb S.
- 2- Relacionar a intensidade dos produtos da degradação oxidativa da Hb S, por meio da avaliação das concentrações de metaemoglobina e da presença de corpos de Heinz intraeritrocitários, com relação ao genótipo e concentrações diferenciadas de Hb S.
- 3- Avaliar outras associações que possam interferir no processo oxidativo da hemoglobina como a Hb Fetal e a doença da Hb SC.

III- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Seleção dos pacientes

As amostras de sangue de pessoas saudáveis e dos pacientes com doença falciforme (*) e portadores de Hb S foram provenientes do Serviço de Hematologia do Hospital de Base, do Hemocentro do Hospital de Base, do Laboratório de Análises Clínicas Tajara e do Instituto de Hematologia de Fernandópolis. O total de amostras de sangue selecionadas para o presente trabalho foram obtidas de 136 pessoas separadas em grupos:

a) De acordo com o genótipo: SS, S/Tal. Beta, AS e AA

b) De acordo com a concentração de Hb S:

Grupo A: grupo controle - 96 a 98% de Hb A

Grupo B: abaixo de 50% de Hb S

Grupo C: de 51 a 80% de Hb S

Grupo D: de 81 a 100% de Hb S

Todas as amostras foram submetidas à sequência operacional descrita a seguir.

3.2- Sequência Operacional

Foram realizadas execuções técnicas de qualificação das hemoglobinas (A, A₂ e S) por meio de eletroforese em acetato de celulose em tampão alcalino (pH 8,5). Para confirmação de alguns diagnósticos, utilizou-se a eletroforese de ágar-fosfato em tampão ácido (pH 6,2).

A quantificação de Hb S foi efetuada por meio de eluição em água após fracionamento por eletroforese quantitativa com tampão alcalino.

A avaliação da Hb Fetal foi determinada pelo método de resistência alcalina. A determinação de metaemoglobina foi realizada por meio da diferença entre meta-Hb (medida em 630 nm) induzida a cianometa



Hb (630 nm), e confrontada com a oxi-Hb (medida em 630 nm). Avaliamos a quantidade de metaemoglobina formada no sangue, 24 horas, 48 horas, 72 horas e 1 semana após a coleta do sangue, comparando os indivíduos heterozigotos para Hb S (AS) e indivíduos normais (AA).

As pesquisas de corpos de Hb H para identificar a associação de Hb S com talassemia alfa, e de corpos de Heinz, foram realizadas com corante redox de azul crezil brilhante, em eritrócitos incubados a 37°C.

Para análise dos resultados, foi aplicada a estatística descritiva (análise descritiva) dos grupos na qual os pacientes foram qualificados.

3.3- Esquema Sequencial das Análises

- 1- Avaliação dos prontuários
- 2- Amostras de sangue provenientes de doentes falcêmicos que não tenham recebido transfusões de sangue por período mínimo de uma semana
- 3- Avaliação laboratorial dos componentes de hemoglobina: A, S, A₂, Fetal, C e H, por meio de técnicas específicas.
- 4- Agrupamento de acordo com o genótipo: AA, AS, SS, SC, S/Tal. Beta, S/Tal. Alfa, S/PHHF
- 5- Agrupamento conforme a concentração de Hb S e genótipos
- 6- Grupo controle ou grupo A: de 96 a 98% de Hb A
- 7- Avaliação laboratorial dos produtos de degradação oxidativa em todos os grupos de Hb S e no grupo controle
- 8- Análise comparativa e tratamento estatístico

3.4- Material

O material utilizado para a realização do trabalho foi sangue venoso coletado com anticoagulante EDTA sódico, com volume total de 5 ml e submetido às preparações no mesmo dia da coleta.

3.5- Métodos

Preparação da solução de hemoglobina (Naoum, 1997)

- Centrifugar 1 ml de sangue com anticoagulante a 1500 rpm, durante 5 minutos; remover o plasma e lavar os eritrócitos por três vezes com solução salina a 0,85%. Centrifugar outra vez nas mesmas condições e desprezar o sobrenadante.
- Ao volume de eritrócitos lavados, adicionar outro de água destilada. Homogeneizar e a seguir adicionar um volume de clorofórmio, idêntico ao do hemolisado formado. Agitar vigorosamente e centrifugar a 2000 rpm, por 15 minutos.
- A solução de Hb sobrenadante, ou hemolisado, é retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um frasco limpo. A concentração do hemolisado, preparado conforme metodologia apresentada, geralmente é variável entre 10 e 15 g/dl.

Eletroforese em acetato de celulose de pH alcalino (Marengo-Rowe, 1965)

É uma técnica utilizada para qualificação e quantificação de hemoglobinas normais e anormais. As diferentes mobilidades eletroforéticas das hemoglobinas anormais são originadas por alteração de carga elétrica, causada por substituições de aminoácidos de diferentes cargas elétricas nas cadeias formadoras das moléculas. As hemoglobinas anormais que se originam de mutações onde não ocorre mudança de carga elétrica, migram na posição da hemoglobina A.



Reagentes:

- Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,5:

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

Corantes:

- Negro de Amido:

Negro de amido 10 B	0,5 g
Álcool metílico	45,0 ml
Ácido acético glacial	5,0 ml
Água destilada q.s.p	45,0 ml

- Ponceau:

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

- Solução descorante de ácido acético:

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

Procedimento:

- Embeber as fitas de acetato de celulose na solução tampão, previamente colocada em um recipiente, por 15 minutos no mínimo, em tampão TEB pH 8,5;

- Enxugar as fitas entre duas folhas de papel absorvente e colocá-las na cuba de eletroforese, conectando-a com os compartimentos eletrolíticos através de tiras de papel absorvente;
- Aplicar cerca de 3 a 4 μ l das amostras de hemoglobinas a 1 cm da extremidade da fita que está em contato com o pólo negativo;
- Passar 300 volts por 40 minutos;
- Analisar as frações sem coloração e posteriormente corar com Ponceau ou Negro de Amido, embebendo as fitas no corante por 15 minutos, e posteriormente em solução descorante por 30 minutos, com agitação da vasilha, até a total visualização das frações de hemoglobina.

Eletroforese Quantitativa em Acetato de Celulose, pH 8,5 (Marengo-Rowe, 1965)

Dosagens de Hemoglobinas A, A₂ e S

Princípio:

O aumento de hemoglobina A₂ geralmente está associado às talassemias beta heterozigotas. Porém, em algumas condições de origem adquirida (por ex: doença de Chagas), os níveis dessa hemoglobina, estão acima do normal. A dosagem de Hb S, por sua vez, é importante nas interações com talassemias alfa e beta, e no controle pré e pós transfusional.

Reagentes:

São os mesmos utilizados na eletroforese em acetato de celulose pH 8,5 para análise qualitativa de hemoglobinas.

Procedimento:

- Aplicar 20 μ l de solução de hemoglobinas com concentração entre 8 e 12 g%, em fitas de acetato de celulose com 5,7 cm de largura;



- Passar 300 volts por 40 minutos;
- Após a separação das frações de hemoglobina A₂ e A, recortá-las com tesoura e eluí-las em tubos de ensaio contendo 3 ml de água destilada para hemoglobina A₂, 15 ml de água destilada para hemoglobina A e 15 ml para Hb S;
- Deixar eluir de duas a seis horas, com agitação periódica;
- Ler as densidades ópticas (D.O) em 415 nm, usando água destilada como branco.

Cálculo:

$$\% \text{ Hb A}_2 = \frac{\text{D.O Hb A}_2 \times 100}{\text{D.O A}_2 + 5(\text{D.O Hb A} + \text{Hb S})}$$

$$\% \text{ Hb A} = \frac{\% \text{ Hb A}_2 \times 5 \times \text{D.O Hb A}}{\text{D.O Hb A}_2}$$

$$\% \text{ Hb S} = 100 - (\% \text{ Hb A} + \% \text{ Hb A}_2)$$

Valor normal da Hb A₂: 2,00 a 3,50%

Eletroforese de Diferenciação em Ágar-fosfato, pH 6,2 (Método de Vella, 1968)

Princípio:

A eletroforese em gel de ágar-fosfato pH 6,2 é específica para diferenciar alguns tipos de hemoglobinas mais lentas que a hemoglobina A como por exemplo: Hb S e Hb D; Hb C e Hb E que em eletroforese alcalina migram em posições semelhantes, dificultando sua correta caracterização. Por este método, as hemoglobinas S e C se separam da hemoglobina A, enquanto as hemoglobinas D e E migram na mesma posição da hemoglobina



A. Esse método permite também a caracterização semi-quantitativa de hemoglobina Fetal.

Reagentes:

- Tampão fosfato pH 6,2:

Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel.

Na_2HPO_4 2,02 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7,66 g

Água destilada q.s.p. 1000 ml

- Gel de Ágar-fosfato:

Ágar-Ágar (Merk) 200 mg

Tampão fosfato pH 6,2 20 ml

Procedimento:

- Em um erlenmeyer de 250 ml, aquecer os componentes do gel de ágar-fosfato até completa dissolução;
- Pipetar 3,5 ml do gel em lâminas de microscópio. Deixar gelificar à temperatura ambiente;
- Aplicar as amostras próximo à porção mediana da lâmina;
- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos, usar folha dupla de papel de filtro;
- Passar 100 volts por 20 minutos;
- Analisar inicialmente sem corar;
- Para melhor interpretação das frações, corar com Ponceau e descorar com ácido acético a 10%.

Dosagem de Hemoglobina Fetal (Método de Betke *et al*, 1959)

Princípio:

A hemoglobina Fetal é álcali-resistente, enquanto que as hemoglobinas A, A₂ e os tipos anormais são facilmente desnaturáveis por soluções alcalinas. Esse método é sensível para detectar pequenas quantidades de hemoglobina Fetal. Concentração acima de 2% refletem aumento de hemoglobina Fetal. Em sangue de cordão umbilical, a quantidade de hemoglobina Fetal é aproximadamente 70 a 90%. Em indivíduos com talassemia beta homozigotas a taxa desta hemoglobina oscila entre 20 a 98%; na interação Hb S/ Tal. Beta, o valor varia entre 2 a 20%. Na talassemia beta heterozigota, a hemoglobina Fetal pode estar normal ou discretamente aumentada.

Reagentes:

- Solução de ferricianeto de potássio (Drabkin):

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

- Solução de hidróxido de sódio 1,2 N:

Hidróxido de sódio	4,8g
Água destilada q.s.p.	100 ml

- Solução saturada de sulfato de amônio:

Sulfato de amônio	200 g
Água destilada q.s.p.	200 ml



Procedimento:

- Diluir 0,6 ml da solução de hemoglobina em um tubo contendo 10 ml da solução de Drabkin. Homogenizar por inversão;
- Colocar 5,6 ml da solução de hemoglobina diluída em um tubo rotulado "Hb F". Adicionar 0,4 ml da solução de hidróxido de sódio 1,2N e acionar o cronômetro. Agitar cuidadosamente por 10 segundos;
- Ao final de 2 minutos exatos, adicionar 4 ml da solução de sulfato de amônio. Homogenizar por inversão e deixar em repouso por 5 a 10 minutos, no máximo;
- Filtrar o conteúdo do tubo "Hb F" em duplo papel de filtro;
- Preparar a solução padrão, colocando em um tubo de ensaio 1,4 ml da solução de hemoglobina diluída, 0,6 ml de água destilada e 2 ml da solução saturada de sulfato de amônio;
- Transferir 1 ml desta solução para outro tubo e juntar 9 ml de solução de Drabkin. A solução de hemoglobina total é 10 vezes mais diluída que a solução de hemoglobina álcali-resistente;
- Ler a densidade óptica dos tubos padrão e "Hb F" em 540 nm, usando solução de Drabkin como branco.

Cálculo:

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

Valor normal: 0,00 a 2,00%



Pesquisa de Corpos de Heinz e Agregados de Hemoglobina H (Método de Papayannopoulos & Stamatayannopoulos, 1974)

Princípio:

Os corpos de inclusão de hemoglobina H são formados por cadeias β , oriundas da desnaturação do tetrâmero. Após a coloração esses corpúsculos apresentam-se dispostos homogeneamente no interior dos eritrócitos, como pequenos pontos azulados. Os corpos de Heinz, por sua vez, são produtos de degradação da Hb, induzidos por processos oxidativos, que afeta as hemoglobinas normais e variantes, e em especial as variantes instáveis (hemoglobinas instáveis). As globinas precipitadas devido à degradação da molécula de hemoglobina são visíveis sob formas de corpúsculos esféricos de dimensões diferentes, denominados por corpos de Heinz.

Reagentes:

- Solução salina:

Cloreto de sódio	0,9 g
Água destilada q.s.p	100 ml

- Solução citrato:

Citrato de sódio	2,2 g
Água destilada q.s.p	100 ml

- Solução de azul cresil brilhante:

Azul cresil brilhante	1,0 g
Solução salina	100 ml
Solução citrato	25 ml



Procedimento:

- Colocar 50 µl de sangue total em tubo de ensaio pequeno e adicionar 100 µl de solução de azul cresil brilhante. Agitar o tubo suavemente;
- Incubar o material a 37°C por 30 minutos;
- Fazer esfregaços finos e examinar ao microscópio em objetiva de imersão (aumento de 100 X).

Interpretação:

A presença de hemoglobina H nos eritrócitos aparece como fina granulação distribuída homogeneamente, enquanto que os corpos de Heinz são maiores e esféricos geralmente ligados à membrana do eritrócito.

Dosagem de Metaemoglobina (Gerald, 1966)

A elevação do nível de metaemoglobina e sulfoemoglobina pode ser decorrente de vários fatores: deficiência de metaemoglobina redutase, anormalidade da globina, e oxidação da Hb. No presente trabalho, a avaliação da metaemoglobina tem o objetivo de relacioná-la como produto de degradação proveniente da oxidação da Hb S.

Reagentes:

- solução tampão fosfato M/15, pH 6,8 (solução estoque)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 9,0g

KH_2PO_4 5,7g

água destilada q.s.p 1000 ml

- solução tampão fosfato M/60, pH 6,8 (solução trabalho): diluir 250 ml da solução estoque para 1 litro de água destilada (q.s.p).



- solução de ferricianeto de potássio a 5% (preparada no dia): diluir 50 mg de ferricianeto em 1 ml de água destilada.
- solução de cianeto de potássio a 5%: diluir 50 mg de cianeto de potássio em 1 ml de água destilada.

Procedimento:

- em um tubo contendo 200 μ l de solução de hemoglobina, adicionar 5 ml de tampão fosfato M/60 pH 6,8;
- dividir igualmente a solução preparada em dois tubos identificados por A e B
- ao tubo A:
 - 1- fazer a leitura da densidade óptica (DO) da solução em 630 nm e anotar o valor como DO-1. Essa leitura estima a absorção da metaemoglobina existente no sangue;
 - 2- adicionar, a seguir, 50 μ l de ferricianeto de potássio a 5%, misturar com leve agitação, e após 30 segundos ler a solução em 630 nm e anotar o valor de DO-2. Essa leitura estima a absorção de cianometaemoglobina;
- ao tubo B:
 - 1- adicionar 50 μ l de ferricianeto de potássio a 5%, misturar com agitação leve, e após 30 segundos fazer a leitura em 620 nm, anotando o valor como DO-3. Essa leitura estima a capacidade de transformação de oxiemoglobina para metaemoglobina;
 - 2- após a leitura, adicionar 50 μ l de cianeto de potássio a 5%, misturar levemente a solução, e após 30 segundos fazer a leitura em 630 nm, anotando o valor como DO-4. Essa leitura estima a capacidade de reversão da metaemoglobina para cianometaemoglobina;
- branco: todas as medidas são realizadas contra o branco contendo 2,5 ml de tampão fosfato M/60.



Cálculo:

$$\% \text{ meta Hb} = \frac{(\text{DO-1}) - (\text{DO-2})}{(\text{DO-3}) - (\text{DO-4})} \times 100$$

Valor normal: 0,00a 2,00%

3.6- Análise Estatística

A análise estatística foi dividida em 2 conjuntos:

- a) De acordo com o genótipo
- b) De acordo com a concentração de Hb S

Para ambos os conjuntos foi utilizada a análise estatística descritiva. As variáveis analisadas para os 2 conjuntos foram a Hb Fetal, número de eritrócitos com corpos de Heinz e meta-Hb, determinando-se para cada variável a média, mediana, valor mínimo, valor máximo, desvio padrão e erro padrão além da distribuição porcentual.

A assessoria estatística foi prestada pela Prof^a. Dr^a. Adriana Barbosa, professora do Departamento de Ciências da Computação e Estatística, da UNESP de São José do Rio Preto.

4.1- De acordo com o genótipo:

Do total de 136 amostras de sangue, consideramos para análise de genótipo 130 delas, que correspondem aos genótipos: AA, AS, SS e S/Tal. Beta. As amostras com os genótipos SS/Tal. Alfa, SC e AS/Tal. Alfa, não foram



IV- RESULTADOS

Foram analisadas amostras de sangue de 136 pessoas das quais 78 tinham hemoglobinas normais - Hb AA - e que constituíram o grupo A; e 58 portadoras de Hb S classificadas por seus genótipos (AS, SS, S-Talassemia Beta, AS-Talassemia Alfa, SS-Talassemia Alfa e SC) e que constituíram os grupos B, C e D diferenciados pelas concentrações de Hb S (grupo B: até 50% de Hb S, grupo C: de 51 a 80% de Hb S, grupo D: de 81 a 100% de Hb S).

(*) Incluem-se como pacientes com doença falciforme:

- anemia falciforme, ou Hb SS ($\beta^s\beta^s$);
- Hb S/talassemia Beta;
- Hb S/talassemia Alfa;
- S/Persistência Hereditária de Hb Fetal (PHHF) e
- Hb SC.

A relação individual de todas as pessoas analisadas, caracterizadas por seus genótipos e respectivos grupos, bem como dos resultados da avaliação quantitativa de corpos de Heinz, Hb Fetal, meta-Hb e concentração de Hb S, estão expostas no anexo 1.

Para que fossem efetuadas as análises descritivas dos resultados, as 136 pessoas analisadas foram agrupadas em dois conjuntos, a saber:

4.1- De acordo com o genótipo:

Do total de 136 amostras de sangue, consideramos para análise de genótipo 130 delas, que correspondem aos genótipos: AA, AS, SS e S/Tal. Beta. As amostras com os genótipos SS/Tal. Alfa, SC e AS/Tal. Alfa, não foram



considerados, uma vez que os mesmos não foram representativos, resultando os seguintes números de amostras por genótipos: AA: 78, AS: 19, SS: 17, S/Tal. Beta: 16.

4.2- De acordo com a concentração de Hb S:

Todas as 136 amostras de sangue foram consideradas neste conjunto para as análises descritivas.

Para se efetuar as análises descritivas dos resultados que compõe os dois conjuntos acima especificados foram consideradas três variáveis: presença de eritrócitos com corpos de Heinz por 1000 eritrócitos avaliados, concentrações de Hb Fetal, meta-Hb e Hb S.

4.1- Análise Descritiva de acordo com o genótipo

4.1.1- Análise da Hb Fetal

De acordo com a avaliação estatística estabelecida para análise da concentração de Hb Fetal relacionada com os genótipos de hemoglobinas AA, AS, SS e S/Tal. Beta, observou-se que a maior média obtida foi no genótipo S/Tal. Beta com a concentração de 14,11% (tabela 6), este valor é 2,8 vezes maior que o encontrado no genótipo SS em que a concentração de Hb Fetal foi de 4,94%. A concentração média de Hb Fetal no genótipo AS foi de 1,43% e no genótipo AA de 0,98%. Analisando a tabela 6, nota-se que a mediana revelou valores semelhantes ao da média, permanecendo o S/Tal. Beta com o maior valor (13,4%), SS (4,4%), AS (1,0%) e AA (0,9%). O maior valor mínimo observado foi para o grupo S/Tal. Beta (6,25%), seguido pelos demais genótipos SS (2,3%), AA (0,24%) e AS (0,0%) e o maior valor máximo observado foi



também para o genótipo S/Tal. Beta (25%), seguido dos demais: SS (8,3%), AS (3,6%) e AA (3,5%). É importante destacar que os resultados obtidos revelaram semelhanças entre os genótipos AS e AA, uma vez que os mesmos apresentaram valores médios dentro do padrão normal. O desvio padrão foi mais elevado no grupo S/Tal. Beta (5,79%), seguido dos genótipos SS (1,78%), AS (0,99%) e AA (0,47%). O erro padrão também foi maior para o genótipo S/Tal. Beta (1,45%), seguido pelos genótipos SS (0,43%), AS (0,23%) e AA (0,05%). A partir destes resultados, o genótipo S/Tal. Beta foi o mais heterogêneo individualmente para a variável Hb Fetal.

Tabela 6: Análise Descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de Hb Fetal para os genótipos AA, AS, SS e S β .

	N	média	mediana	mínimo	máximo	desvio padrão	erro padrão
AA	78	0,98	0,90	0,24	3,50	0,47	0,05
AS	19	1,43	1,00	0,00	3,60	0,99	0,23
SS	17	4,94	4,40	2,30	8,30	1,78	0,43
S β	16	14,11	13,40	6,25	25,00	5,79	1,45

A partir dos dados obtidos, foi feita a distribuição porcentual para a Hb Fetal. Na tabela 7 e figura 3, as amostras foram classificadas pelo genótipo e divididos em coluna de valores normal e alterado.

De acordo com a tabela 7, os genótipos S/Tal. Beta e SS apresentaram 100% de alterações quantitativas da Hb Fetal. O grupo AS, apresentou 26,32% de indivíduos alterados, enquanto que o genótipo AA apresentou 98,72% de suas amostras analisadas dentro do padrão e apenas 1,28% estavam alteradas, que pode ser devido a idade.

Tabela 7: Porcentagem de indivíduos com Hb Fetal normal e alterada de acordo com o genótipo.

genótipo	normal	alterado	total
AA	77 (98,72%)	1 (1,28%)	78
AS	14 (73,68%)	5 (26,32%)	19
SS	0 (0,00%)	17 (100,00%)	17
S β	0 (0,00%)	16 (100,00%)	16
TOTAL	91	39	130

Valor normal: 0-2%

Com relação à distribuição porcentual da Hb Fetal, foi observado que o genótipo com maior concentração de Hb Fetal foi o S/Tal. Beta com 75,00% das amostras avaliadas pertencentes a uma faixa de concentração acima de 10,00% e os 25,00% restantes distribuídos em uma concentração variando de 5,00 a 10,00%. No genótipo SS; 35,29% deles estavam distribuídos em uma faixa de concentração de 5,00 a 10,00% enquanto que os 64,70% das amostras SS restantes apresentaram concentração variando de 2,00 a 5,00%. O genótipo AS apresentou 73,68% de suas amostras dentro dos valores normais de 0,00 a 2,00% e 26,32% estavam inseridos em um percentual de 2,00 a 5,00%. No genótipo AA; 98,71% apresentaram concentrações dentro dos padrões normais de 0,00 a 2,00% e apenas 1,28% apresentou concentração de Hb Fetal variando de 2,00 a 5,00%. Essas avaliações podem ser apreciadas na tabela 8 e figura 4.

% de indivíduos

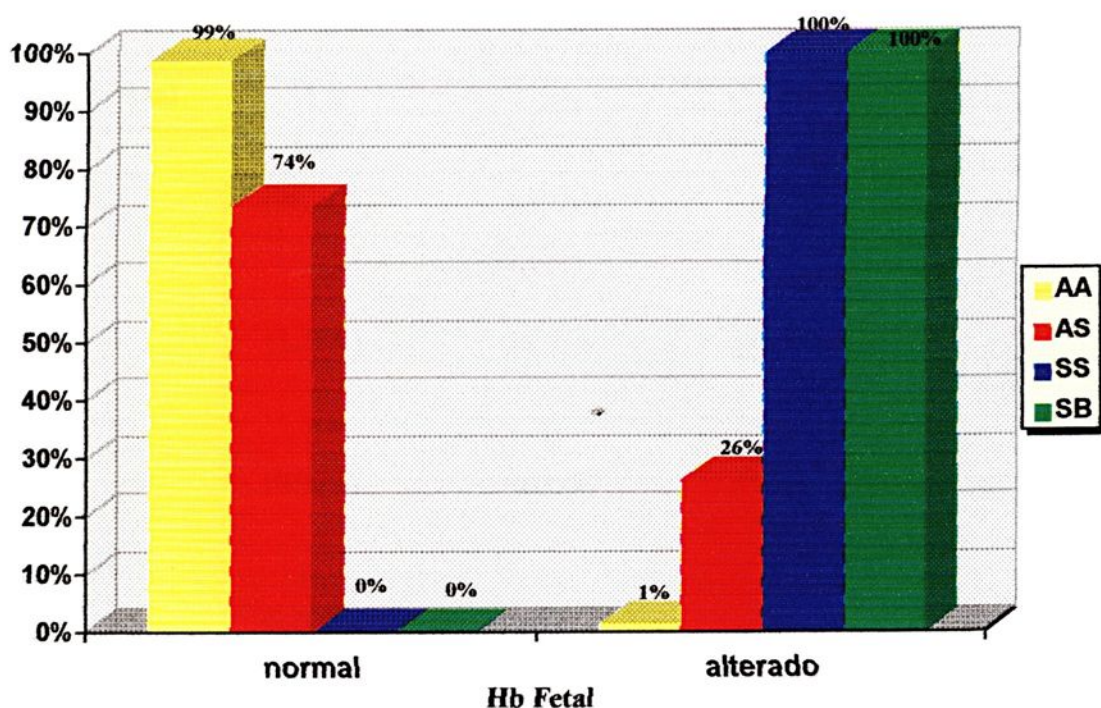


Figura 3: Porcentagem de indivíduos com Hb Fetal normal e alterada de acordo com o genótipo: AA, AS, SS, SB (S/Tal. Beta)

Tabela 8: Distribuição porcentual de Hb Fetal segundo o genótipo.

% de Hb Fetal	GENÓTIPO			
	AA	AS	SS	Sβ
[0-2]	77 (98,71%)	15 (73,68%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
(2-5]	1 (1,28%)	5 (26,32%)	11 (64,70%)	0 (0,00%)
(5-10]	0 (0,00%)	0 (0,00%)	6 (35,30%)	4 (25,00%)
acima de 10	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	12 (75,00%)
TOTAL	78	19	17	16

* valores normais: 0 a 2%

% de indivíduos

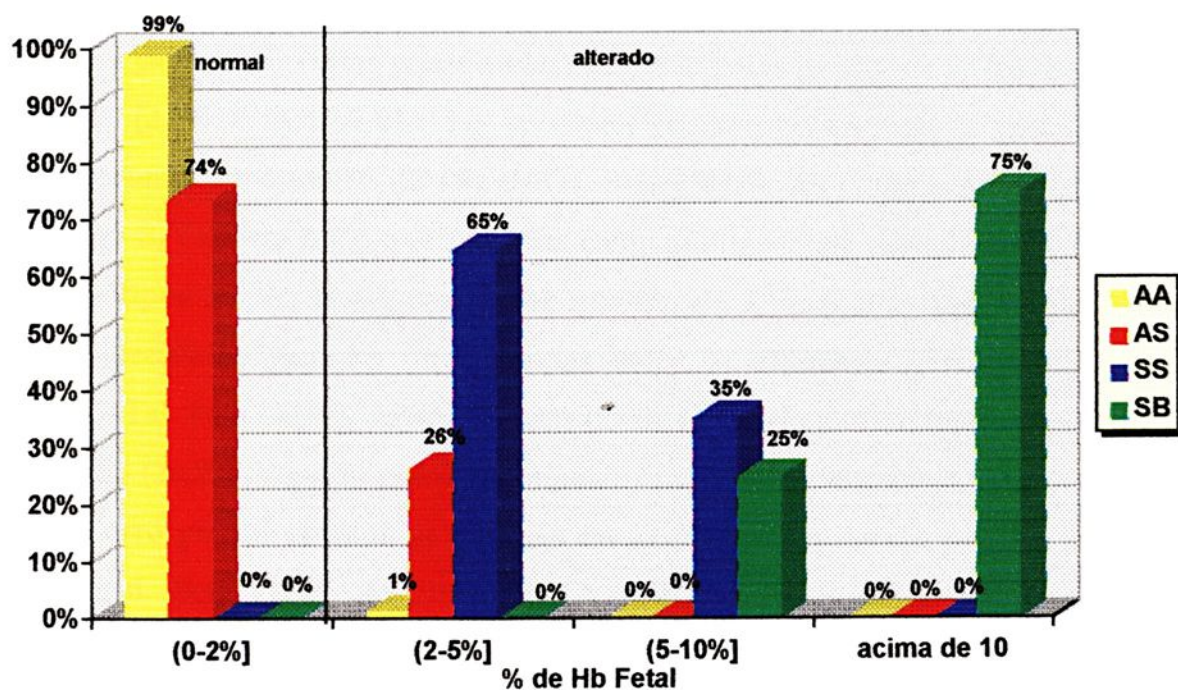


Figura 4: Distribuição porcentual de Hb Fetal segundo o genótipo : AA, AS, SS, SB (S/Beta tal).

4.1.2- Análise da presença de eritrócitos com corpos de Heinz

Os resultados obtidos através de análise descritiva para eritrócitos com corpos de Heinz estão representados na tabela 9 e são referentes a 1000 células pesquisadas. Estes resultados revelaram que os genótipos S/Tal. Beta, AS, SS e AA mostram diferenças relevantes entre si. A média de eritrócitos com corpos de Heinz foi maior no genótipo SS (25,95 eritrócitos com corpos de Heinz para cada 1000 células pesquisadas), seguido pelos genótipos S/Tal. Beta (9,75), AS (2,39) e AA (1,01). Na mediana também observa-se o mesmo comportamento, genótipo SS (20,00), S/Tal. Beta (10,00), AS (2,00) e AA (1,00). O genótipo S/Tal. Beta foi o que mostrou valor mínimo mais elevado seguido pelos genótipos SS, AS e AA com valor mínimo de 1, enquanto que o valor máximo apresentou grandes discrepâncias entre os diferentes genótipos SS (100,00), S/Tal. Beta (20,00), AS (5,00) e AA (2,00). O desvio padrão foi maior no genótipo SS (29,29), seguido pelos genótipos S/Tal. Beta (5,98), AS (1,38) e AA (0,11) e o erro padrão revelou as mesmas características do desvio padrão, SS (7,10), S/Tal. Beta (1,49), AS (0,32) e AA (0,01), destacando-se a grande heterogeneidade entre os indivíduos do genótipo SS.

Tabela 9: Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de eritrócitos com corpos de Heinz para os genótipos AA, AS, SS e S β .

	N	<i>média</i>	<i>mediana</i>	<i>mínimo</i>	<i>máximo</i>	<i>desvio padrão</i>	<i>erro padrão</i>
AA	78	1,01	1,00	1,00	2,00	0,11	0,01
AS	19	2,39	2,00	1,00	5,00	1,38	0,32
SS	17	25,95	20,00	1,00	100,00	29,29	7,10
S β	16	9,75	10,00	2,00	20,00	5,98	1,49

valores para cada 1000 células analisadas

A distribuição porcentual da presença de eritrócitos com corpos de Heinz pode ser observada na tabela 10 e figura 5. Os genótipos AS, S/Tal. Beta, SS e AA tiveram seus valores classificados como normal e alterado. O genótipo S/Tal. Beta apresentou 100,00% dos indivíduos alterados, seguido pelos genótipos SS (88,24%), AS (73,68%) e AA com apenas 1,28% dos indivíduos alterados.

Tabela 10: Porcentagem de indivíduos com valores quantitativos de eritrócitos com corpos de Heinz normal e alterado de acordo com o genótipo.

genótipo	normal (*)	alterado	total
AA	77 (98,72%)	1 (1,28%)	78
AS	5 (26,32%)	14 (73,68%)	19
SS	2 (11,76%)	15 (88,24%)	17
S β	0 (0,00%)	16 (100,00%)	16
TOTAL	84	46	130

*valores normais: 1:1000

% de indivíduos

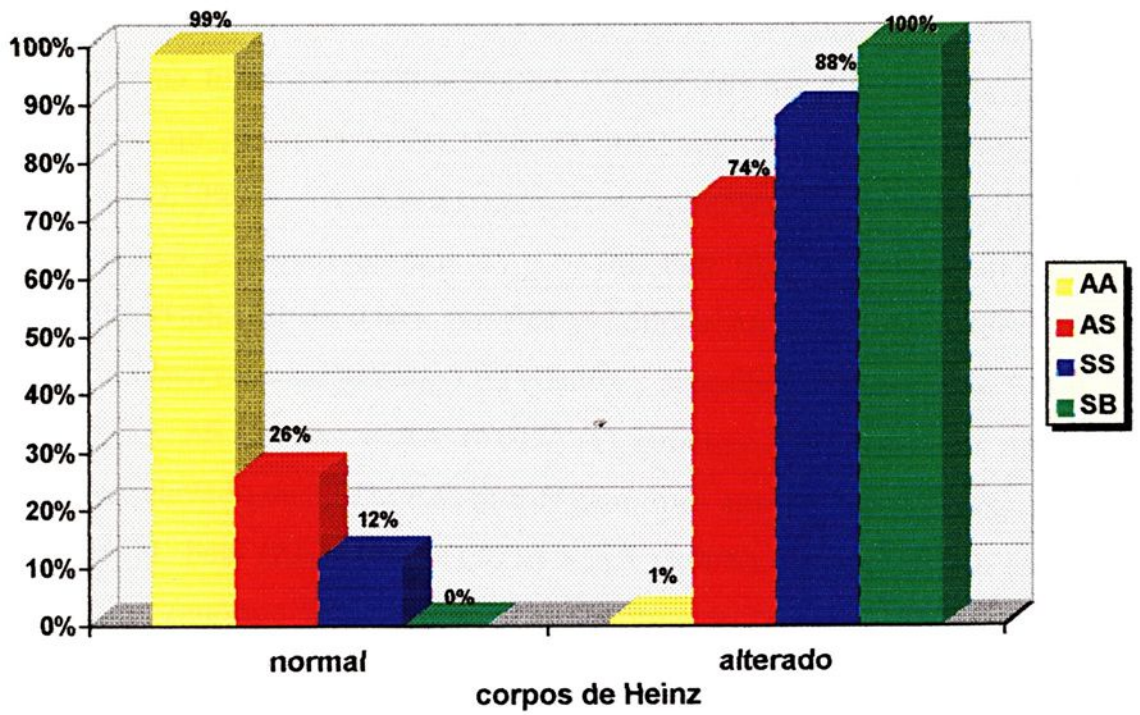


Figura 5: Porcentagem de indivíduos com valores quantitativos de eritrócitos com corpos de Heinz normal e alterado de acordo com o genótipo: AA, AS, SS, SB (S/Beta tal).

4.1.3- Análise da concentração de meta-Hb

Os resultados obtidos através de análise descritiva para a concentração de meta-Hb estão representados na tabela 11. A partir destes dados observa-se que: a maior média de meta-Hb observada foi no genótipo SS (3,97%), seguido pelos genótipos S/Tal. Beta (3,32%), AS (1,97%) e AA (0,71%). Os genótipos AS e AA tiveram suas médias dentro da faixa de normalidade estabelecida na literatura (0,00 a 2,00%). A mediana foi diferente da média sendo maior no genótipo S/Tal. Beta (3,20%), seguido pelos genótipos SS (2,50%), AS (2,10%) e AA (0,39%). Os valores mínimos mais elevados foram observados nos genótipos SS (0,80%) e S/Tal. Beta (0,60%) e o menor valor mínimo observado foi de 0,00% para os genótipos AS e AA. O maior valor máximo foi observado no genótipo SS (12,50%), seguido pelos genótipo S/Tal. Beta (10,50%), AS (3,70%) e AA (3,60%). O genótipo SS apresentou desvio padrão mais elevado de 3,59%, e os outros genótipos apresentaram os seguintes valores: S/Tal. Beta (2,67%), AS (1,07%) e AA (0,90%). O erro padrão foi de 0,87% para o genótipo SS; 0,67% para o genótipo S/Tal. Beta; 0,24% para o genótipo AS e 0,10% para o genótipo AA, revelando o genótipo SS como o mais heterogêneo.

Tabela 11: Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de meta-Hb para os genótipos AA, AS, SS e S β .

	N	<i>média</i>	<i>mediana</i>	<i>mínimo</i>	<i>máximo</i>	<i>desvio padrão</i>	<i>erro padrão</i>
AA	78	0,71	0,39	0,00	3,60	0,90	0,10
AS	19	1,97	2,10	0,00	3,70	1,07	0,24
SS	17	3,97	2,50	0,80	12,50	3,59	0,87
S β	16	3,32	3,20	0,60	10,50	2,67	0,67

A distribuição porcentual para a meta-Hb está representada na tabela 12 e figura 6, os indivíduos foram classificados pelo genótipo e divididos em coluna de valores normal e alterado. Os diferentes genótipos nos indivíduos portadores de Hb S apresentaram semelhança com relação a porcentagem quando enquadrados nas colunas de normal e alterado para meta-Hb. Foram considerados valores normais os que compreenderam de 0 a 2%. O genótipo que apresentou maior número de alterados para a meta-Hb foi o S/Tal. Beta com 56,25%. O genótipo SS apresentou 52,94% de alterados, seguido pelo genótipo AS com 52,63% de alterados e por último o genótipo AA, com 10,26% de alterados. No geral, os genótipos AS, S/Tal. Beta e SS apresentaram quase mesma porcentagem de indivíduos com meta-Hb aumentada, diferenciando-se claramente do genótipo AA, o que já era esperado.

Tabela 12: Porcentagens de indivíduos com concentrações de meta-Hb normal e alterada de acordo com o genótipo.

genótipo	normal	alterado	total
AA	70 (89,74%)	8 (10,26%)	78
AS	9 (47,37%)	10 (52,63%)	19
SS	8 (47,06%)	9 (52,94%)	17
S β	7 (43,75%)	9 (56,25%)	16
TOTAL	94	36	130

Valor normal: 0 a 2%

% de indivíduos

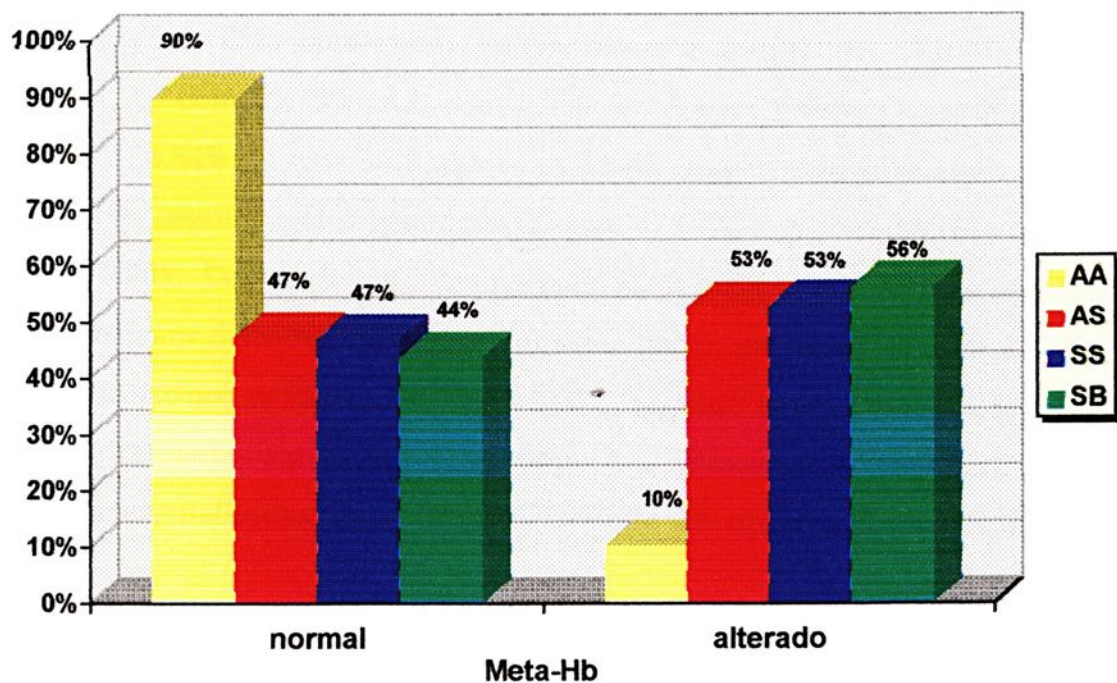


Figura 6: Porcentagem de indivíduos com meta-Hb normal e alterada de acordo com o genótipo: AA, AS, SS, SB (S/Beta tal).

Na distribuição percentual da meta-Hb, o genótipo com maior concentração de meta-Hb foi o SS com 35,29% de seus indivíduos com concentração de meta-Hb maior de 5,00% de meta-Hb, em seguida o genótipo S/Tal. Beta com 12,50% com concentração acima de 5,00%. Os genótipos AS e AA, não apresentaram indivíduos com concentração de meta-Hb acima de 4,00%. Dentro do percentual de 3,00 a 4,00% de meta-Hb, o genótipo S/Tal. Beta apresentou 31,25% de seus indivíduos, seguido pelos genótipos AS com 15,78%, AA com 2,56% e SS com 0,00%. O genótipo AS apresentou 36,84% de seus indivíduos dentro de um percentual de 2,00 a 3,00% de meta-Hb, seguido pelos genótipos SS com 17,64%, AA com 7,69% e S/Tal. Beta com 0,00%. Dentro dos padrões normais (0,00-2,00%), os genótipos com Hb S, apresentaram distribuição percentual semelhante, genótipo AS com 47,36% de seus indivíduos variando de 0,00 a 2,00%, seguido pelos genótipos SS com 47,05%, S/Tal. Beta com 43,75%. O genótipo AA, se mostrou normal em 89,74% das amostras analisadas. Esta distribuição pode ser observada na tabela 13 e figura 7.

Tabela 13: Distribuição porcentual de meta-Hb segundo o genótipo.

% <i>meta-Hb</i>	GENÓTIPO			
	AA	AS	SS	Sβ
[0-2]	70 (89,74%)	9 (47,36%)	8 (47,05%)	7 (43,75%)
(2-3]	6 (7,69%)	7 (36,84%)	3 (17,64%)	0 (0,00%)
(3-4]	2 (2,56%)	3 (15,78%)	0 (0,00%)	5 (31,25%)
(4-5]	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (12,50%)
acima de 5	0 (0,00%)	0 (0,00%)	6 (35,29%)	2 (12,50%)
TOTAL	78	19	17	16

*valores normais: 0 a 2%

% de indivíduos

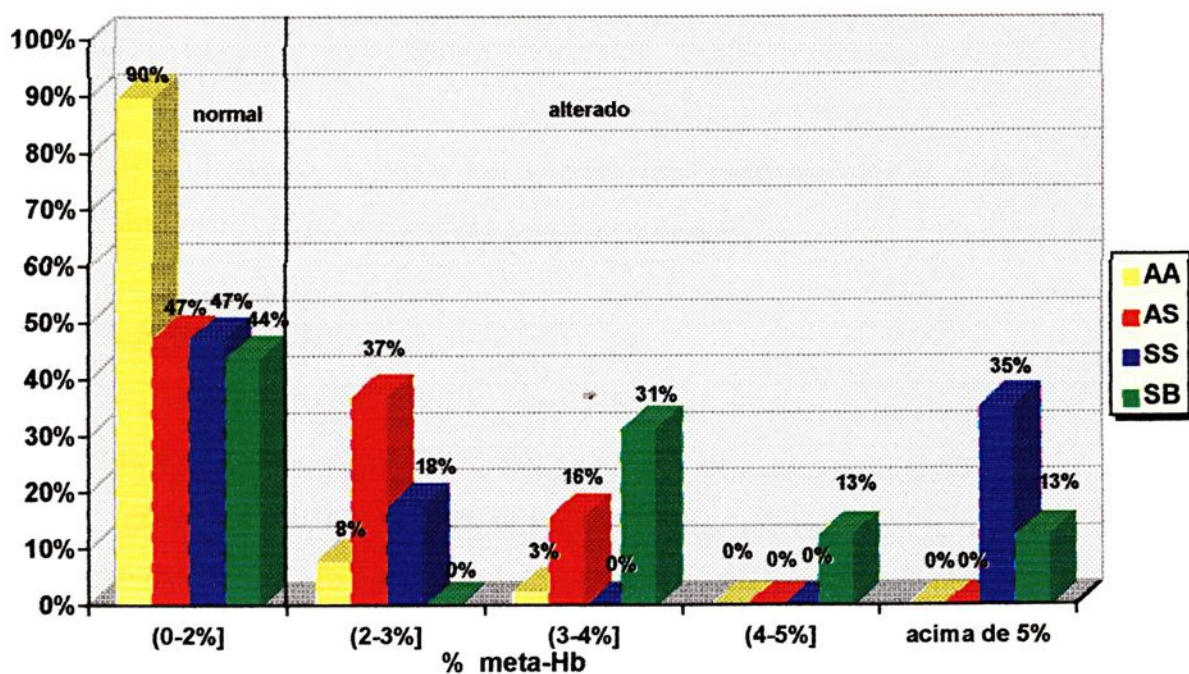


Figura 7: Distribuição percentual de meta-Hb segundo o genótipo: AA, AS, SS, SB (S/Beta tal).

4.2- Análise descritiva de acordo com a concentração da Hb S

A concentração de Hb S que determinou a constituição dos grupos B (concentração de Hb S abaixo de 50%), C (Hb S com concentração entre 51 e 80%) e o grupo D (Hb S com concentração de 81 a 100%). No grupo B, a menor concentração de Hb S foi de 13,90% e a maior 48,40%. O grupo C apresentou como menor concentração o valor de 62,50% e 78,10% o maior valor. O grupo D teve como menor valor 85,00% e o maior valor foi de 97,50%.

O grupo A, visto na análise por genótipo, foi o mesmo utilizado como controle para a análise por concentração.

4.2.1- Análise da Hb Fetal

Os resultados obtidos para Hb Fetal revelaram que a maior média obtida foi para o grupo D (10,43%) seguido dos grupos C (5,35%), B (3,40%) e grupo A (0,98%), caracterizando uma relação direta entre concentração de Hb S e Hb Fetal. Os valores para mediana revelaram-se, no geral, bem diferentes da média, mas seguindo o mesmo padrão de distribuição com relação à concentração da Hb Fetal. O grupo D, foi o grupo com maior mediana (7,85%), seguido pelos demais grupos C (4,66), B (1,42%) e A (0,90). O maior valor mínimo observado foi para o grupo D (3,30%), em seguida os grupos C (1,00%), A (0,24%) e B (0,00%), razão pela qual repetimos o grupo A e o maior valor máximo observado foi para o grupo D (25,00%), seguido pelos grupos B (18,80%), C (16,60%) e A (3,50%). O desvio padrão foi mais elevado no grupo D (6,55%), os grupos B (4,54%) e C (4,18%) foram semelhantes entre si, enquanto que o menor desvio padrão foi para o grupo A (0,47%). O erro padrão também foi maior para o grupo D (1,46%), e os demais grupos C (1,26%), B (0,87%) e A (0,05%). Estes valores podem ser observados na tabela 14.

Tabela 14: Análise Descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de Hb Fetal para os grupos A, B, C e D.

	N	<i>média</i>	<i>mediana</i>	<i>mínimo</i>	<i>máximo</i>	<i>desvio padrão</i>	<i>erro padrão</i>
A	78	0,98	0,90	0,24	3,50	0,47	0,05
B	27	3,40	1,42	0,00	18,80	4,54	0,87
C	11	5,35	4,66	1,00	16,60	4,18	1,26
D	20	10,43	7,85	3,30	25,00	6,55	1,46

A partir dos dados obtidos, foi feita a distribuição porcentual para a Hb Fetal. Na tabela 15 e figura 8, os indivíduos foram separados por grupos (A, B, C e D), de acordo com a concentração de Hb S e tiveram seus valores classificados como normal e alterado. De acordo com a tabela 15, o grupo D apresentou 100,00% dos seus indivíduos alterados, seguido pelos grupos C (90,90%) e B (44,44%). O grupo A apresentou 98,72% de seus indivíduos dentro do padrão normal para Hb Fetal (0,00-2,00%), enquanto que apenas 1 indivíduo (1,28%) estava com a concentração de Hb Fetal ligeiramente elevada.

Tabela 15: Porcentagem de indivíduos com Hb Fetal normal e alterada de acordo com a concentração de Hb S.

grupo	normal	alterado	total
A	77 (98,72%)	1 (1,28%)	78
B	15 (55,56%)	12 (44,44%)	27
C	1 (9,09%)	10 (90,90%)	11
D	0 (0,00%)	20 (100,00%)	16
TOTAL	93	43	136

Valor normal: 0-2%

% de indivíduos

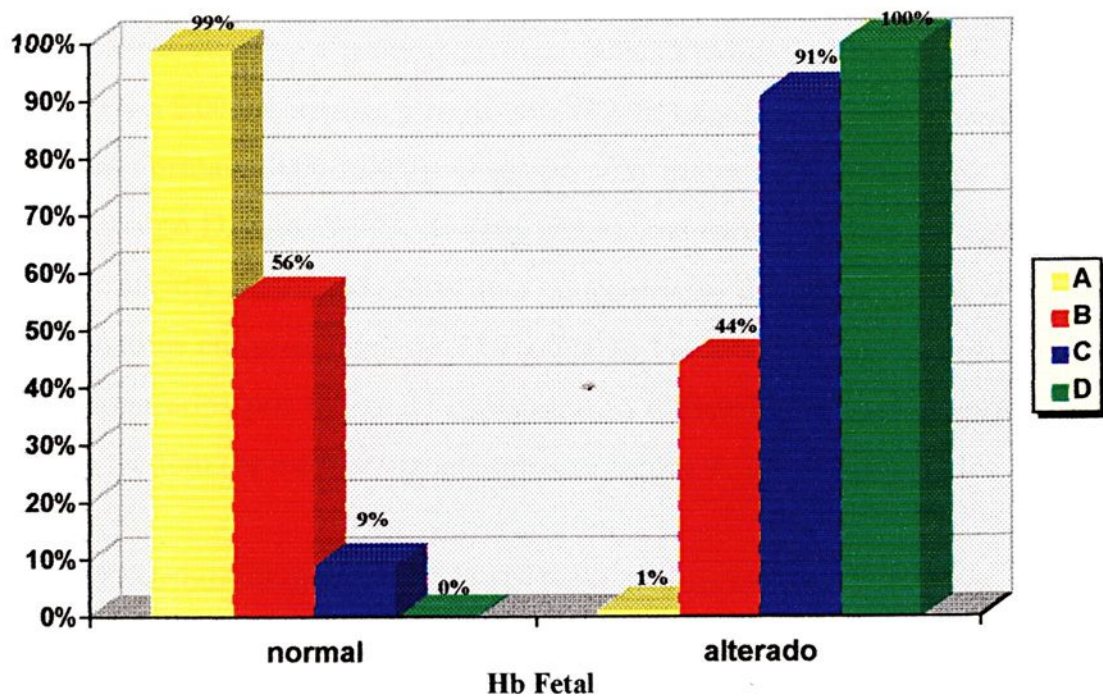


Figura 8: Porcentagem de indivíduos com Hb Fetal normal e alterada de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).

O grupo B, 11,11% dos indivíduos tinham concentração de Hb Fetal acima de 10,00%, 7,40% estavam em uma faixa de concentração de 5,00 a 10,00%, 25,92% estavam inseridos em um percentual de 2,00 a 5,00% e a maioria (55,55%), estavam com seus valores dentro do padrão de normalidade (0,00-2,00%). No grupo C, apenas 1 indivíduo (9,09%) estava com a concentração de Hb Fetal acima de 10,00%, 18,18% estavam dentro da faixa de 5,00 a 10,00%, a grande maioria (63,63%) distribuídos dentro da faixa de 2,00 a 5,00% e apenas 1 indivíduo (9,09%) teve sua Hb Fetal dentro dos valores normais (0,00-2,00%). O grupo com maior concentração de Hb Fetal foi o grupo D, com 40,00% de seus indivíduos com concentração acima de 10,00%; 40,00% distribuídos em uma concentração de 5,00 a 10,00% e os 20,00% restantes em uma faixa de 2,00 a 5,00%. Na tabela 16, os valores de Hb Fetal separados por faixas de concentração e distribuídos pelos grupos estudados, podem ser melhor visualizados. A figura 9, ilustra esses dados.

Tabela 16: Distribuição percentual de Hb Fetal de acordo com a concentração de Hb S.

GRUPO				
% de Hb Fetal	A	B	C	D
[0-2]	77 (98,71%)	15 (55,55%)	1 (9,09%)	0 (0,00%)
(2-5]	1 (1,28%)	7 (25,92%)	7 (63,63%)	4 (20,00%)
(5-10]	0 (0,00%)	2 (7,40%)	2 (18,18%)	8 (40,00%)
acima de 10	0 (0,00%)	3 (11,11%)	1 (9,09%)	8 (40,00%)
TOTAL	78	27	11	20

valores normais: 0 a 2%

% de indivíduos

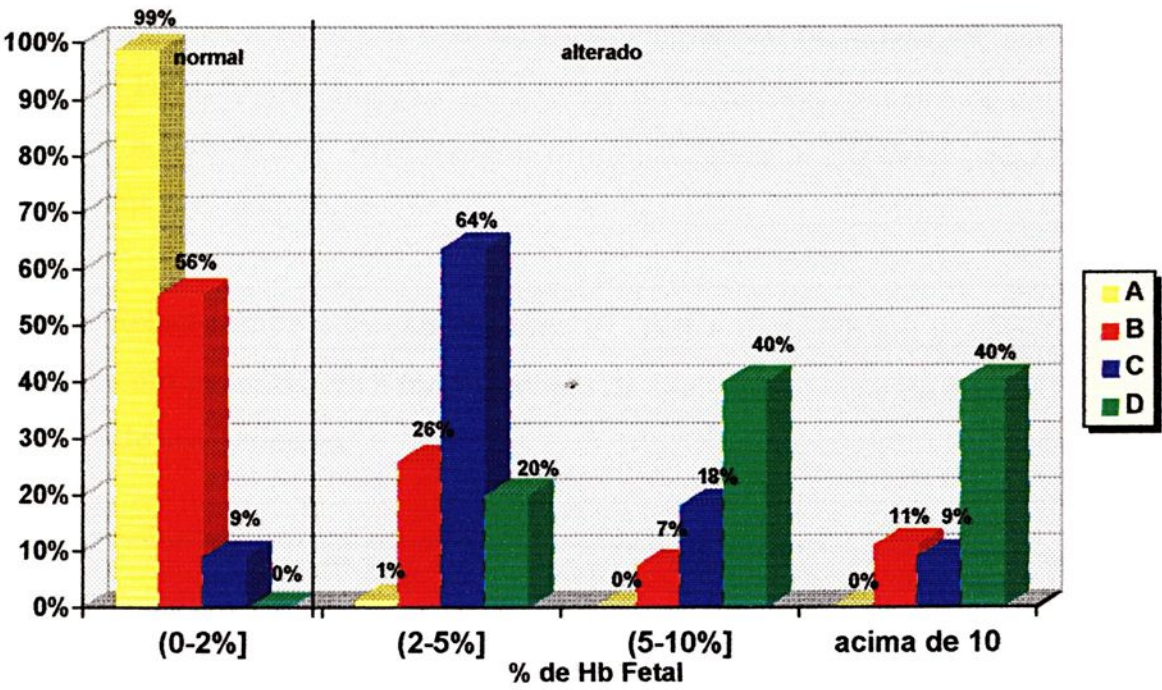


Figura 9: Distribuição porcentual de Hb Fetal de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).

Os valores que apresentamos a seguir, relacionam concentração de Hb Fetal e média de metaemoglobina (tabela 17), extraídas de uma avaliação global de toda a amostra. Os valores de Hb Fetal relacionados com presença de corpos de Heinz (tabela 18), também foram extraídos de uma avaliação global.

Na tabela 17, observa-se que, quanto maior a concentração de Hb Fetal, maior é a concentração de metaemoglobina. Na tabela 18, até 10% de Hb Fetal, há um aumento do número de eritrócitos com corpos de Heinz, mas acima de 10% esse número diminui. Talvez a Hb Fetal possa exercer efeitos pró-oxidativos.

Tabela 17: Relação entre concentração de Hb Fetal e meta-Hb em pessoas com genes de Hb S independente da sua concentração de Hb S e do seu genótipo.

Hb Fetal:	(0-2%]	(2-5%]	(5-10%]	acima de 10%
concentração média de meta-Hb (%)	2,1	2,4	3,6	3,6

Tabela 18: Relação entre concentração de Hb Fetal e corpos de Heinz em pessoas com genes de Hb S independente da sua concentração de Hb S e do seu genótipo.

Hb Fetal:	(0-2%]	(2-5%]	(5-10%]	acima de 10%
concentração média de corpos de Heinz (‰)	2,5	14,3	27,0	9,7

4.2.2- Análise da presença de eritrócitos com corpos de Heinz

Os resultados obtidos através de análise descritiva para eritrócitos com corpos de Heinz estão representados na tabela 19. Estes resultados revelaram que os grupos A, B, C e D mostraram grandes diferenças entre si. O grupo D, foi o que apresentou maior média de eritrócitos com corpos de Heinz para cada 1000 células analisadas (22,61), seguido pelos grupos C (13,93), B (4,47) e A (1,01). Com relação à mediana, os grupos D (12,50) e C (10,00), e B (1,32) e A (1,00) apresentaram-se semelhantes, também foram parecidos. O grupo C, foi o que mostrou maior valor mínimo (10,00), seguido pelos grupos D (4,00) e os grupos B e A com os mesmos valores (1), nota-se também a grande divergência com relação aos valores máximos apresentados por cada grupo, sendo o grupo D, com maior valor máximo (100,00), seguido pelos grupos B (40,00) e C (33,30), sendo apenas o grupo A com o valor máximo de 2,00. O desvio padrão foi maior para o grupo D (27,39) seguido pelos grupos B (7,97) e C (7,56) que tiveram seus valores semelhantes. O grupo A apresentou um desvio padrão de 0,11. O maior erro padrão foi para o grupo D (6,12), seguido pelos grupos B (1,52), C (1,28) e A (0,01). Os grupos B e C também apresentaram valores semelhantes para o erro padrão.

Tabela 19: Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de eritrócitos com corpos de Heinz para os grupos A, B, C e D.

	N	<i>média</i>	<i>mediana</i>	<i>mínimo</i>	<i>máximo</i>	<i>desvio padrão</i>	<i>erro padrão</i>
A	78	1,01	1,00	1,00	2,00	0,11	0,01
B	27	4,47	1,32	1,00	40,00	7,97	1,53
C	11	13,93	10,00	10,00	33,30	7,56	1,28
D	20	22,61	12,50	4,00	100,00	27,39	6,12

valores para cada 1000 células analisadas

A distribuição percentual para eritrócitos com corpos de Heinz nos grupos A, B, C e D pode ser observada na tabela 20 e figura 10 e seus valores foram classificados como normal e alterado, sendo o normal 1:1000.

Os grupos D e C apresentaram 100,00% dos seus indivíduos alterados, seguido pelos grupos B (74,07%) e A com apenas 1,28% dos indivíduos alterados.

Tabela 20: Porcentagem de indivíduos com valores quantitativos de eritrócitos com corpos de Heinz normal e alterado de acordo com a concentração de Hb S.

<i>grupo</i>	<i>normal</i>	<i>alterado</i>	<i>total</i>
A	77 (98,72%)	1 (1,28%)	78
B	7 (25,93%)	20 (74,07%)	27
C	0 (0,00%)	11 (100,00%)	11
D	0 (0,0%)	20 (100%)	20
TOTAL	84	52	136

valores normais: 1:1000



% de indivíduos

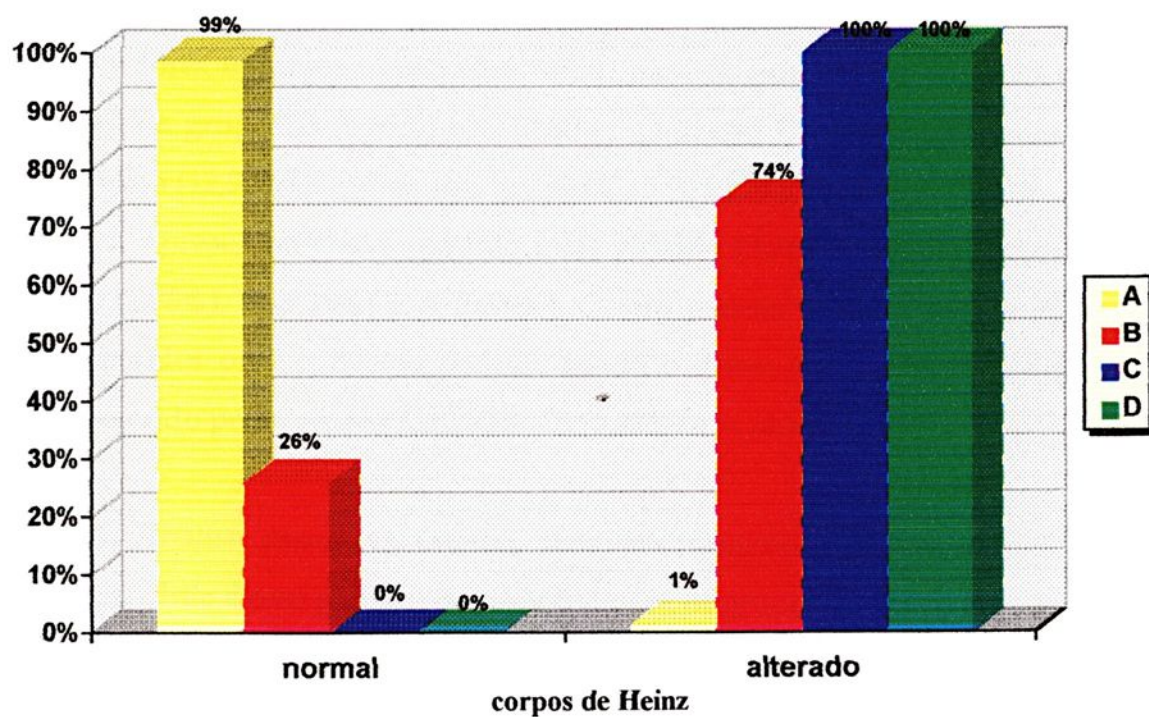


Figura 10: Porcentagem de indivíduos com valores quantitativos de eritrócitos com corpos de Heinz normal e alterado de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).

4.2.3- Análise da concentração de meta-Hb

Os resultados obtidos através de análise descritiva para meta-Hb estão representados na tabela 21. A maior média para meta-Hb foi para o grupo D (4,19%), seguida pelos grupos C (3,00%), B (2,15%) e A (0,71%). Para a mediana, foi observado que o grupo C foi o que obteve maior valor (3,30%), seguido pelos grupos D (2,50%), B (2,30%) e A (0,39%). Os menores valores mínimos observados foram para os grupos A e B (0,00%) seguido pelos grupos D (0,60%) e C (0,80%). O grupo D apresentou maior valor máximo (12,50%), seguido dos grupos C (5,90%), B (5,00%) e A (3,60%). O grupo D apresentou desvio padrão mais elevado (3,76%), seguido pelos grupos C (1,75%), B (1,19%) e A (0,90%). O erro padrão também seguiu os mesmos moldes para o desvio padrão, sendo o grupo D o mais elevado (0,84%), seguido pelos grupos C (0,52%), B (0,23%) e A (0,10%).

Tabela 21: Análise descritiva (média, mediana, mínimo, máximo, desvio padrão e erro padrão) de meta-Hb para os grupos A, B, C e D.

	N	média	mediana	mínimo	máximo	desvio padrão	erro padrão
A	78	0,71	0,39	0,00	3,60	0,90	0,10
B	27	2,15	2,30	0,00	5,00	1,19	0,23
C	11	3,00	3,30	0,80	5,90	1,75	0,52
D	20	4,19	2,50	0,60	12,50	3,76	0,84

A distribuição percentual para meta-Hb está representada na tabela 22 e figura 11, onde os indivíduos classificados por grupos (A, B, C e D), tiveram seus valores classificados como normal e alterado. O grupo que apresentou maior número de indivíduos alterados para meta-Hb foi o grupo C (63,64%), seguido pelos grupos B (55,56%), D (50,00%) e A (10,26%). No

geral, os grupos B, C e D apresentaram expressiva porcentagem de indivíduos com meta-Hb aumentada.

Tabela 22: Porcentagem de indivíduos com concentrações de meta-Hb normal e alterada de acordo com a concentração de Hb S.

grupo	normal	alterado	total
A	70 (89,74%)	8 (10,26%)	78
B	12 (44,44%)	15 (55,56%)	27
C	4 (36,36%)	7 (63,64%)	11
D	10 (50,00%)	10 (50,00%)	20
TOTAL	96	40	136

Valor normal: 0-2%

No caso da distribuição percentual da meta-Hb, o grupo com maior concentração foi o D com 30,00% de seus indivíduos inseridos dentro de valores acima de 5,00%, seguido pelo grupo C com 18,18% de seus indivíduos com concentração de meta-Hb acima de 5,00%. Os grupo A e B, não apresentaram indivíduos com concentração acima de 5,00%. O índice de indivíduos enquadrados dentro do percentual de 4,00 a 5,00% foi baixo, todos os três grupos de falcêmicos apresentaram apenas 1 indivíduo dentro deste percentual que foi: grupo C (9,09%), D (5,00%), B (3,70%) e A (0,00%). O grupo C apresentou (27,27%) de indivíduos enquadrados no percentual de 3,00 a 4,00%, seguido pelos grupos B (22,22%), D (10,00%) e A (2,56%). O grupo B apresentou 29,62% de seus indivíduos dentro do percentual de 2 a

% de indivíduos

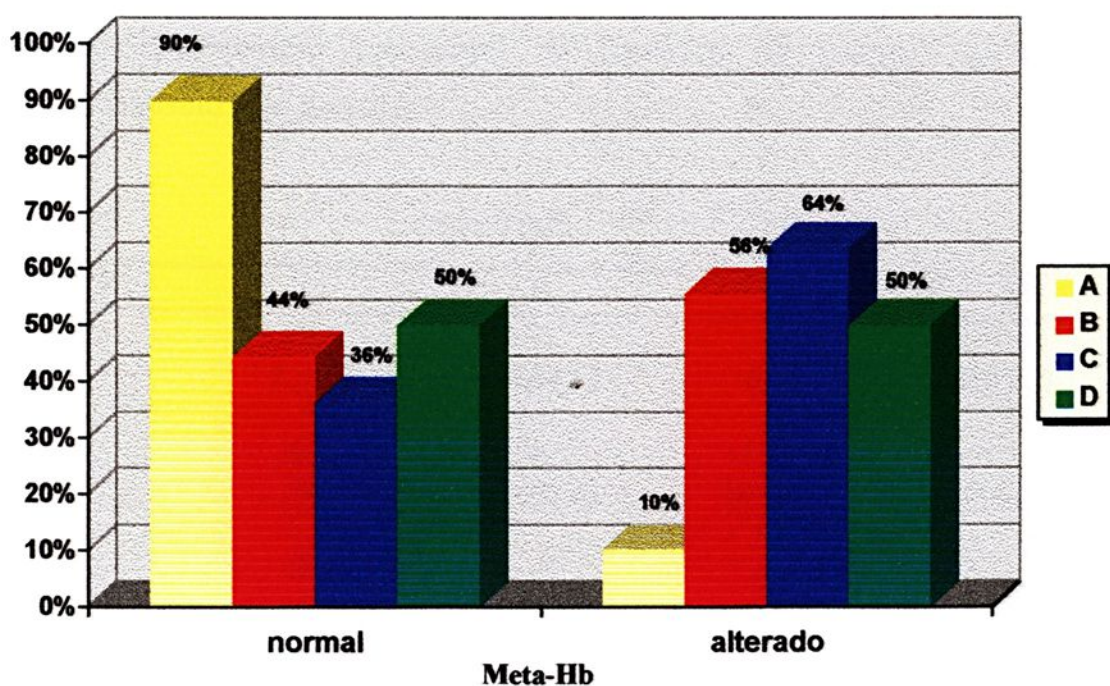


Figura 11: Porcentagem de indivíduos com meta-Hb normal e alterada de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).

3%, seguido pelos grupos C (9,09%), A (7,69%) e D (5,00%). Considerando-se os padrões de normalidade, o grupo D apresentou 50% de seus indivíduos dentro do percentual de 0,00 a 2,00%, seguido pelos grupos B (44,44%), C (36,36%) e A (89,74%). Os resultados podem ser observados na tabela 23 e figura 12.

Tabela 23: Distribuição porcentual de meta-Hb de acordo com a concentração de Hb S.

% meta-HB	GENÓTIPO			
	A	B	C	D
[0-2]	70 (89,74%)	12 (44,44%)	4 (36,36%)	10 (50,00%)
(2-3]	6 (7,69%)	8 (29,62%)	1 (9,09%)	1 (5,00%)
(3-4]	2 (2,56%)	6 (22,22%)	3 (27,27%)	2 (10,00%)
(4-5]	0 (0,00%)	1 (3,70%)	1 (9,09%)	1 (5,00%)
acima de 5	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (18,18%)	6 (30,00%)
TOTAL	78	27	11	20

*valores normais: 0 a 2%

% de indivíduos

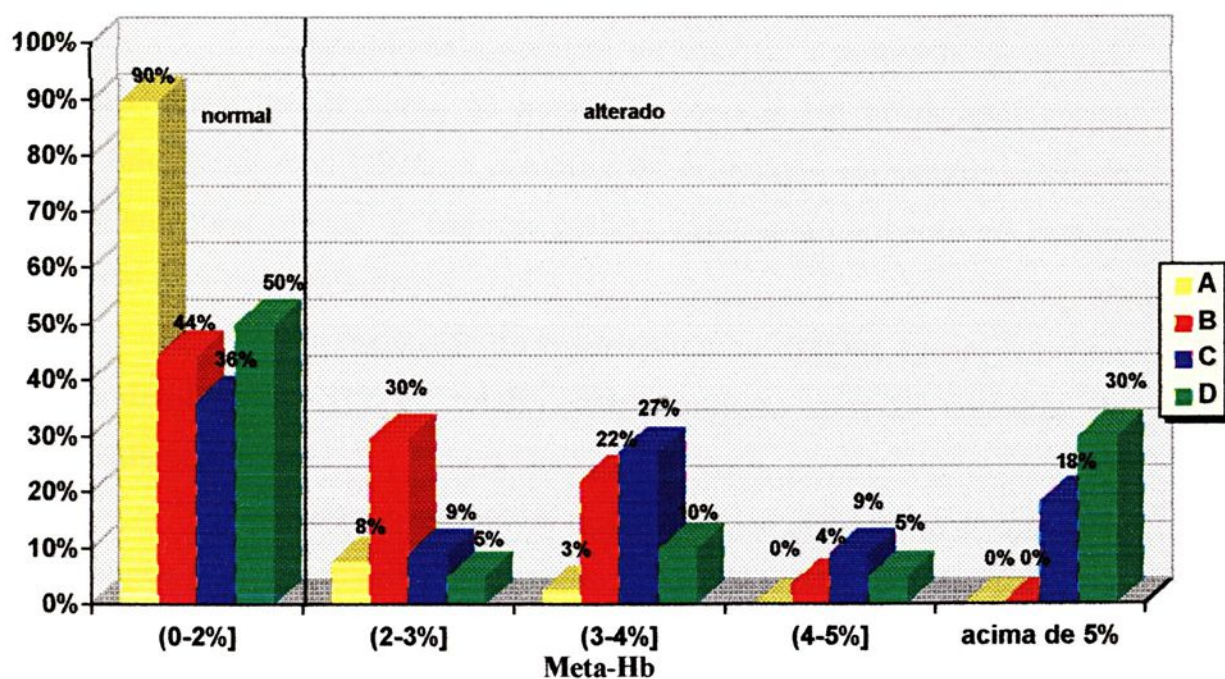


Figura 12: Distribuição porcentual de meta-Hb de acordo com a concentração de Hb S: B (até 50% de Hb S), C (51 a 80% de Hb S) e D (81 a 100% de Hb S).

4.2.4- Análise da meta-Hb medida de acordo com o tempo de estocagem

Com o intuito de verificar a ocorrência de modificações na quantidade de meta-Hb, realizou-se um estudo na qual, a dosagem da mesma foi relacionada com o tempo de estocagem.

Coletando-se a amostra de sangue, a meta-Hb foi medida quatro vezes: até 24 horas, 48 horas, 72 horas e 168 horas após coleta. Segundo Racek *et al* (1997), a hemólise de eritrócitos em sangue estocado pode aumentar o nível de ferro no plasma, catalisando a reação de Fenton, na qual gera radicais hidroxil.

Para realização do experimento, utilizamos apenas amostras de indivíduos AS (12 no total), confrontando-as com 28 amostras de indivíduos AA.

A relação individual dos resultados obtidos em 40 amostras de sangue pode ser observada no anexo 2. As tabelas 24 e 25 demonstram os valores médios e intervalos de confiança para amostras AA e AS, respectivamente.

Tabela 24: Análise descritiva para meta-Hb de acordo com o período (24, 48, 72 e 168 horas) para o genótipo AA.

Genótipo	Período (h)	Média	IC (95%)
AA	24	0,60	(0,27-0,92)
	48	2,38	(1,86-2,90)
	72	2,92	(2,10-3,74)
	168	5,95	(5,16-6,75)

IC: intervalo de confiança

Tabela 25: Análise descritiva para meta-Hb de acordo com o período (24, 48, 72 e 168 horas) para o genótipo AS.

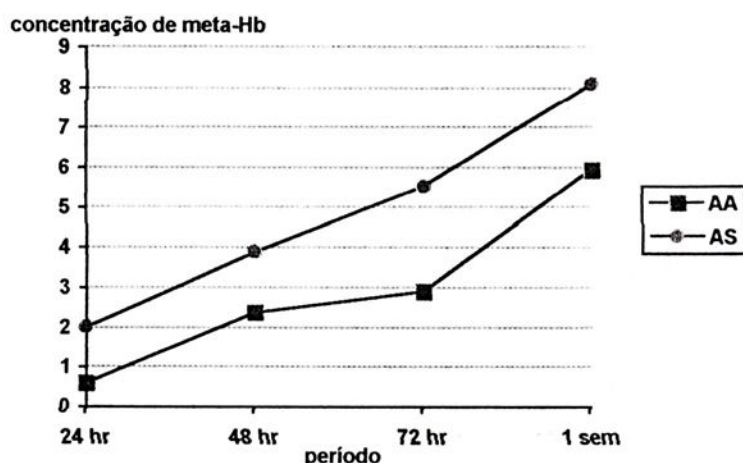
Genótipo	Período (h)	Média	IC (95%)
AS	24	2,02	(0,93-3,11)
	48	3,88	(2,78-4,99)
	72	5,54	(3,77-7,32)
	168	8,11	(6,62-9,60)

IC: intervalo de confiança

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que, no genótipo AA a média de meta-Hb foi de 0,6% , ou seja, dentro dos padrões de normalidade (0-2%) com intervalo de confiança (IC) de 0,27-0,92. Após 48 horas, a média foi de 2,38% com IC de 1,86-2,90. Nas 72 horas seguintes, a média foi de 2,92% com IC de 2,10-3,74. Após 1 semana (168 horas), a média foi de 5,95% com IC de 5,16-6,75.

Para o genótipo AS, a média nas primeiras 24 horas foi de 2,02%, praticamente dentro da faixa de normalidade, mas maior que no grupo AA, com IC de 0,93-3,11. Após 48 horas a média foi de 3,88% com IC de 2,78-4,99. Após 72 horas, a média foi de 5,54% com IC de 3,77-7,32 e após 1 semana (168 horas) a média foi de 8,11% com IC de 6,62-9,60.

Figura 13: Concentração de meta-Hb de acordo com o período (24h, 48h, 72h, 168h)



De acordo com a figura 13, os indivíduos AS apresentam concentração de meta-Hb maior que indivíduos AA em todos os períodos de análise.

Pela análise figura 13, a média de variação da concentração de meta-Hb de indivíduos AA é menor que em indivíduos AS. Nas primeiras 24 horas existe um aumento progressivo nas pessoas normais e AS. No período de 48 a 72 horas, a média de meta-Hb em AA tem aumento pouco expressivo comparado ao AS que continua aumentando progressivamente. Após 168 horas, em amostras AA, observa-se um aumento brusco e em AS, esse aumento é semelhante ao que foi observado em todos os períodos

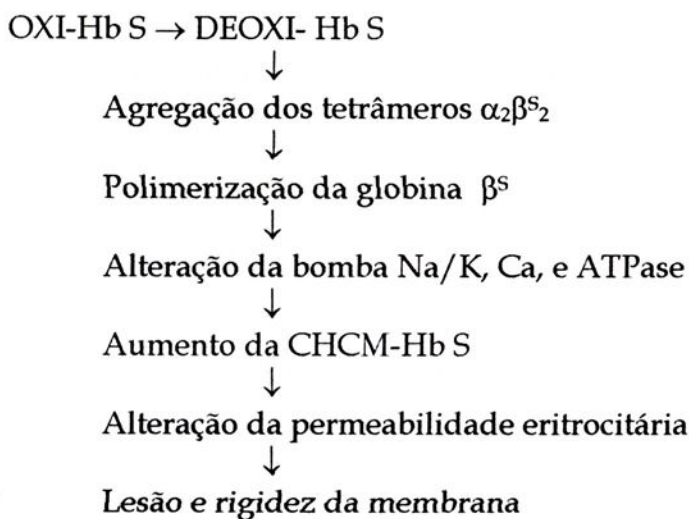
Na figura 13, para os indivíduos AS, o gráfico apresenta-se como uma reta em que houve um aumento constante sem estabilização em momento algum da análises. Para os indivíduos AA, houve esta pequena estabilização - no período de 48 a 72 horas - com aumento brusco na última análise (168 horas).

V- DISCUSSÃO

A importância de se conhecer os vários fatores que interagem com a Hb S no processo de falcização é um estímulo constante que colabora com novas descobertas científicas. Está bem estabelecido que o processo de falcização dos eritrócitos com Hb S é desencadeado pela desoxigenação desta hemoglobina que se agrega molecularmente por meio de formação de polímeros da Hb S. Esses polímeros se devem à mutação sofrida pela hemoglobina onde o aminoácido valina que substituiu o ácido glutâmico na posição 6 da globina beta interage com o aminoácido fenilalanina e com a leucina, quando a Hb S está desoxigenada (Schechter & Noguchi, 1994).

A polimerização da Hb S desorganiza os principais processos fisiológicos dos eritrócitos, como se fosse um "efeito cascata", iniciando-se pela alteração da bomba de sódio e potássio, cálcio e ATPase, aumento da concentração da Hb S corpuscular média (CHCM), alteração da permeabilidade eritrócitária, provocando lesão e rigidez da membrana do eritrócito (figura 14).

Figura 14: Representação esquemática dos efeitos deletérios da polimerização da Hb S.



A polimerização da Hb S em solução está na dependência da temperatura, pH, 2-3DPG e oxigênio (Poillon *et al*, 1993). Murayama & Nalbadian (1973), demonstraram que a Hb Fetal, metaemoglobina e outras hemoglobinas variantes, quando associadas à Hb S, não participam da polimerização dessa Hb, mas podem interferir neste processo. Segundo Rodgers (1997), a Hb S é muito menos solúvel quando desoxigenada que a Hb A, levando ao processo de falcização. De acordo com Poillon *et al* (1993), hemoglobinas normais (Hb A, Hb A₂, Hb F) e anormais (Hb SC) podem estar presentes junto com a Hb S elevando sua solubilidade sob condições de parcial ou total desnaturação. Para a Hb F e Hb A₂, esta solubilização pode ser descrita como um modelo que assume exclusão de seu homotetrâmero ($\alpha_2\gamma_2$ e $\alpha_2\delta_2$) para o heterotetrâmero híbrido ($\alpha\beta\gamma$ ou $\alpha_2\beta\gamma$).

Atualmente se sabe que a Hb S totalmente oxigenada não se polimeriza, enquanto que se a Hb S estiver parcialmente ou totalmente desoxigenada ela se polimeriza. Se a Hb Fetal está interagindo com a Hb S num mesmo eritrócito, nem o tetrâmero de Hb Fetal ($\alpha_2\gamma_2$) nem o tetrâmero híbrido ($\alpha_2\beta^S\gamma$) se polimerizam. Entretanto, o tetrâmero $\alpha_2\beta^S\beta^A$ (Hb AS) tem probabilidade de se polimerizar (Poillon *et al*, 1993).

Por essa razão, tem sido sugerido que níveis elevados de Hb Fetal pode modificar a expressão clínica das doenças falciformes, minimizando o processo fisiopatológico da polimerização (Fabron Jr., 1997). Por outro lado, os eritrócitos estão sob constante estresse oxidativo, seja por origem induzida, ou por deficiências das enzimas e compostos antioxidantes conforme já mencionado na figura 1.

No desequilíbrio das ações antioxidantes em eritrócitos falcêmicos ocorre a metaemoglobinização da Hb S. Este fato associado à desoxigenação e/ou ao desequilíbrio das ações antioxidantes das enzimas GSH-Px, catalase e SOD, direcionam os efeitos deletérios para lesão da



membrana eritrocitária, determinando a propagação dos efeitos fisiopatológicos da Hb S (Das & Essman, 1990; Ounchard & Kelly, 1996; Waugh & Low, 1985). Torna-se necessário, então, conhecer as consequências dos resultados provenientes da degradação oxidativa da Hb S.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os produtos de degradação da Hb S, avaliados pela quantificação de metaemoglobina e presença de corpos de Heinz em eritrócitos podem estar relacionados com o genótipo, com a concentração de Hb S, e com a concentração de Hb Fetal, fatos que serão discutidos posteriormente.

A presença de Hb S nos eritrócitos, independente do genótipo analisado (AS, SS e S/Tal. Beta), causou a elevação de metaemoglobina em pelo menos 50% dos portadores do gene S (tabela 12). Resultados semelhantes foram verificados na análise relacionada entre concentração de Hb S e elevação de metaemoglobina conforme pode ser verificado na tabela 22. Através dessas duas evidências, foi possível concluir que a simples presença de Hb S independente do seu genótipo e da sua concentração é suficiente para produzir a metaemoglobinização isto porque, de acordo com a figura 1, quando a hemoglobina oxigenada sofre oxidação, o resultado é a formação de metaemoglobina. Portadores de Hb S, no presente caso, é mais susceptível à oxidação que indivíduos normais.

Pessoas normais podem ter aumento da concentração de metaemoglobina e aumento do número de eritrócitos com corpos de Heinz, isto porque, fatores exógenos e genéticos estão associados com a oxidação da hemoglobina e também alterações da metaemoglobina redutase e outras enzimas antioxidantes contribuem para o desencadeamento do processo oxidativo - o que é considerado como fator genético. Nesse trabalho, observamos que oito indivíduos AA apresentaram metaemoglobina fora dos padrões normais (tabela 12) e apenas um apresentou contagem alterada de

corpos de Heinz (tabela 10). Não sabemos que fator estaria interferindo na anormalidade dessas variáveis.

Um exemplo em que pode ocorrer oxidação da hemoglobina por fatores exógenos é a fenilhidrazina, que inclui uma ampla variedade de drogas que reagem com a oxihemoglobina (oxi-Hb) transformando-a em metaemoglobina e a droga é oxidada a um radical livre. Indivíduos com deficiência de G6PD são susceptíveis a indução de anemia hemolítica pelas drogas. Na presença de oxi-Hb ou metaemoglobina, a fenilhidrazina é oxidada a espécies capazes de reduzir o oxigênio molecular a superóxido (SPATZ & BLOOM, 1992). Existem diversos derivados da hidrazina com atividade farmacológica, todos apresentando propriedades carcinogênicas em animais experimentais. Os resultados obtidos por Leite & Gamberini (1996), estabelecem a indução de citotoxicidade, proliferação e transformação em fibroblastos de camundongos em cultura por sistemas em que radicais alquila são formados no metabolismo de hidrazinas.

O processo de metaemoglobinização, conforme ilustrado na figura 1, desencadeia como produtos intermediários da degradação da hemoglobina, substâncias compostas por globinas desagregadas que se precipitam nos eritrócitos e são conhecidas por corpos de Heinz. Hemicromos são espécies moleculares comuns, intermediárias da via de desnaturação da hemoglobina (Harrington *et al*, 1993). Hemoglobinas anormais autooxidam-se e dão origem à meta-Hb e hemicromos que levam à formação de corpos de Heinz que ligam-se preferencialmente à membrana afetando a maleabilidade dos eritrócitos (Atamna & Ginsburg, 1995; Sonaye *et al*, 1995). A formação dos corpos de Heinz é causada pela instabilidade da Hb S, liberando espécies reativas de O₂ de ferro do grupo heme (Liu *et al*, 1996).



Os resultados obtidos no presente trabalho para eritrócitos com corpos de Heinz com relação ao genótipo, indicaram que os radicais livres, especialmente o íon $O_2^{\bullet}$, são os responsáveis pela formação dos hemicromos que evoluem para corpos de Heinz, desestabilizando sistemas biológicos, levando à hemólise. Nossa afirmação está de acordo com Das e Essman (1990), que afirmam que os radicais livres derivados do oxigênio estão associados com a diminuição da vida média do eritrócito em vários estados hemolíticos, devido a defeitos congênitos ou adquiridos como hemólises induzidas por drogas oxidantes e talassemias maior, bem como no envelhecimento do eritrócito. Tal fato já é conhecido desde 1985 por Franck *et al* (1985) e Shinar *et al* (1987), que demonstraram que o íon $O_2^{\bullet}$ é gerado no processo de transformação da deoxi-Hb para meta-Hb desencadeando a reação de Fenton.

Nos pacientes falcêmicos, o íon $O_2^{\bullet}$ leva uma situação de estresse. Assim, seria de se esperar uma relação direta entre elevação de metaemoglobina e presença de corpos de Heinz. Este fato, entretanto, não foi verificado como demonstra os valores expostos na tabela 10 que relaciona genótipo de Hb S com elevação no número de corpos de Heinz. Ao comparar os valores da tabela 10 com os da tabela 12 (que relaciona os genótipos com metaemoglobina alterada) observa-se que a presença de corpos de Heinz é muito mais acentuada nos tais grupos estudados com Hb S (AS, SS e S/Tal. Beta).

Esses resultados podem ser explicados pelo fato da meta-Hb desaparecer pela ação da enzima metaemoglobina redutase, que a transforma em oxi-Hb. Entretanto, é possível que na Hb S a metaemoglobinizacão exceda sua capacidade de reversibilidade, desencadeando-se assim o processo de degradação com formação de hemicromos (irreversíveis) e formação de precipitados insolúveis de

globinas desnaturadas - os corpos de Heinz. Como estes corpos de Heinz passam a formar parte integrante da célula, seu desaparecimento dependerá da sobrevivência do eritrócito, motivo pelo qual sua presença é mais acentuada entre os genótipos com Hb S, quando comparada com a presença de metaemoglobina nesses mesmos genótipos.

Se o aumento da concentração de Hb S leva a um aumento da falcização e dos corpos de Heinz, seria de se esperar uma destruição mais acentuada e precoce dessas células, mas há possibilidade de quando foi colhida a amostra o paciente estar com esses corpos de Heinz em número acentuado e nesse momento não ter ocorrido ainda a retirada dessas células através dos macrófagos.

Vários fatores endógenos e exógenos interferem no que se poderia imaginar num processo de relação causa e efeito. Assim, fatores endógenos como ação de enzimas redutoras como meta-Hb redutase, GSH-Px, SOD e catalase variam entre pessoas e o grau de eficiência do sistema imune está na dependência de pelo menos dois fatores, que são a proteína banda 3 do eritrócito falcizado e a capacidade de reconhecimento e fagocitose dos macrófagos do sistema retículo endotelial. Entre os fatores exógenos estão as condições físicas, sociais e culturais de cada doente falcêmico e as oxidações medicamentosas e nutricionais.

Pela análise desses resultados é possível deduzir que independente do genótipo analisado, a presença de Hb S é determinante para o processo de degradação da hemoglobina. Entretanto, ao analisarmos os valores de Hb Fetal relacionando-os com os três genótipos e com concentração de Hb S é muito provável que a elevação da Hb Fetal também exerça influência no processo de degradação da Hb S que culmina com sua metaemoglobinização e formação de corpos de Heinz, conforme pode ser

verificado por meio de análise comparativa entre os resultados expostos nas tabelas 7 e 15.

É importante destacar que a Hb Fetal nos genótipos AS e SS pode estar elevada como processo da PHHF (Persistência Hereditária da Hb Fetal), fato que não foi pesquisado nesse trabalho, sendo que no genótipo SS os diferentes haplótipos podem estar influenciando. De acordo com as tabelas 17 e 18, talvez a Hb Fetal exerça efeitos pró-oxidativos o que não foi totalmente concluído em nosso estudo, mas está de acordo com um trabalho feito por Valenzuela *et al* (1986), em que a Hb F foi convertida à meta-Hb e observou-se um efeito pró-oxidante que pode ser resultado da liberação de H_2O_2 e $O_2^{\bullet}$.

Para doentes falcêmicos a Hb F torna-se um fator importante pelo fato desta ter uma afinidade pelo O_2 maior que Hb A. Valenzuela *et al* (1986), observaram que a afinidade pelo O_2 das hemoglobinas A ($\alpha_2 \beta_2$) e F ($\alpha_2 \gamma_2$) é muito diferente, uma vez que a Hb F tem um aumento da capacidade de saturação quando comparado à Hb A a baixas tensões de O_2 .

Um aumento da Hb F, como já foi visto anteriormente, promove melhora do quadro clínico, por outro lado, pode exercer efeito oxidante, ou seja, a Hb F desempenharia ações vantajosas e desvantajosas. Nas tabelas 17 e 18, isto pode ser comprovado, verificando-se o provável efeito oxidativo da Hb F. Existem muitos outros fatores interferindo neste caso, como os diferentes haplótipos de Hb S, indivíduos que sofreram transfusão, polimorfismo de enzimas antioxidantes, mas observando as tabelas, parece haver uma relação entre aumento de Hb F e aumento de meta-Hb e corpos de Heinz.

Na tabela 18, observa-se uma contradição em que indivíduos com concentração de Hb F acima de 10% possuem menor concentração média de corpos de Heinz quando comparados a indivíduos com



concentrações de Hb F variando entre 2 a 10%, portanto, neste trabalho, não há certeza absoluta do efeito oxidativo da Hb F, por outro lado, não podemos desconsiderá-lo, já que isso apenas tenha ocorrido em indivíduos com concentração de Hb F acima de 10%.

Entre os doze indivíduos analisados com concentração de Hb F acima de 10%, observamos que quatro deles haviam sofrido transfusão quando cederam o sangue para as análises. Assim, é importante considerar que há possibilidades de interferências exógenas nos resultados, mas seria de indagar se Hb F acima de determinado nível estimularia maior síntese de enzimas antioxidantes.

Os resultados observados para análise de Hb Fetal de acordo com o genótipo (tabela 6), concluíram que a associação S/Tal. Beta, foi o genótipo onde a concentração de Hb Fetal teve valor médio mais elevado e também foi o genótipo mais heterogêneo. A associação S/Tal. Beta induz a produção de Hb Fetal (Naoum, 1997). Essa heterogeneidade pode ser devida a haplótipos de Hb S nas quais o gene γ pode estar mais atuante ou não e também no caso do genótipo ser do tipo S/Tal. β^0 ou do tipo S/Tal. β^+ .

Três fatores genéticos são importantes determinantes da gravidade clínica em doença falciforme: a concentração de Hb F, o haplótipo associado ao gene β^s e a presença de alfa talassemia que indica menor gravidade e maior sobrevida. Esses fatores reduzem a concentração de Hb S no interior dos eritrócitos (Zago, 1993).

Segundo Yarboro (1992), a anemia falciforme é uma doença multifacetada que continua a confundir a ciência médica. O quadro clínico é imprevisível e varia para cada paciente com uma intensidade que vai de suave a severa. A variabilidade da doença falciforme depende em primeiro lugar de determinantes ambientais - fatores sócio-econômicos como acesso a assistência médica, qualidade da alimentação, higiene, habitação e



prevenção de doenças infecto-contagiosas (Zago, 1987). No presente trabalho não sabemos os fatores ambientais que estão influenciando, mas a heterogeneidade reflete a característica clínica e laboratorial de cada paciente com relação à doença.

É apenas através de testes moleculares que se determina os haplótipos do gene beta. Os haplótipos Senegal e Asiático produzem elevações maiores do nível de Hb F e células F no sangue e são associados com evolução clínica benigna. Já o haplótipo Bantu está associado com mal prognóstico (Zago, 1987; Chang *et al*, 1995). Haplótipos como Senegal e Asiático produzem um efeito inibitório no processo de falcização (Sale & Hillen, 1997). É interessante o trabalho feito por Figueiredo *et al* (1996), onde após analisar 85 doentes falcêmicos brasileiros, não diagnosticou em nenhum deles o haplótipo Senegal e 36% desses falcêmicos eram portadores do haplótipo Bantu. No presente trabalho, devido a grande variação que existe da Hb Fetal, podemos ter pacientes de vários haplótipos, no qual não podemos identificar, mas também não sabemos se o paciente é usuário de hidroxiuréia que provoca aumento da Hb F pela perturbação da medula óssea, emergindo precursores eritróides que possuem capacidade de sintetizar grandes quantidades de cadeias gama (STEINBERG, 1996).

As associações de Hb S com as talassemias são um fator importante para a melhora do paciente. Determinadas associações entre Hb S e outras hemoglobinas variantes não aumentam o nível de Hb Fetal. Marcus *et al* (1997), observaram que crianças com Hb S/PHHF tinham, em média, 31,7% de Hb Fetal, enquanto que crianças com Hb SC tinham apenas 3,3% de Hb Fetal.

O aumento de Hb Fetal dentro do eritrócito inibe o processo de falcização da célula, como consequência, formam-se poucos tetrâmeros de Hb S e menos hemoglobina polimerizada ocorre dentro do eritrócito. Grande

quantidade de Hb Fetal dentro da célula aumenta a probabilidade da inclusão de cadeias γ dentro dos tetrâmeros de hemoglobina. Esses tetrâmeros de Hb híbrida impede a polimerização da Hb S (Marcus *et al*, 1997). Apesar da presença da Hb Fetal ter um aspecto vantajoso para o eritrócito com moléculas de Hb S, verificou-se no presente trabalho que a intensidade de corpos de Heinz no eritrócito falciforme independe da concentração de Hb Fetal, conforme tabela 18.

Os resultados observados para análise da Hb Fetal relacionada com a concentração de Hb S revelaram como sendo o grupo D o que apresentou maior heterogeneidade (tabela 14) e maior média para Hb Fetal. Diferentes genótipos em um mesmo grupo (anexo 1) e os haplótipos de Hb S podem interferir na concentração da Hb Fetal como é confirmado por Steinberg *et al*, (1995).

De acordo com a tabela 15, parece existir uma relação entre concentração de Hb S e Hb Fetal, pois o grupo D apresentou 100% de indivíduos alterados seguido pelos grupos C e B, e o grupo D apresentava 40% dos indivíduos com concentração de Hb Fetal acima de 10% relacionando maior concentração de Hb S com maior concentração de Hb Fetal o que corrobora com El-Hazmi *et al* (1994), afirmando que heterozigotos para a Hb S têm níveis de Hb F mais elevados que pessoas AA e níveis baixos quando comparados a doentes falcêmicos. A associação S/Tal. Beta contribui para o aumento da Hb F e o grupo D apresenta 11 indivíduos com esse genótipo. Todos os pacientes com genótipo SS possuem Hb F alterada conforme já verificado na análise por genótipo, portanto, é de se imaginar uma possível associação entre maior concentração de Hb S com maior concentração de Hb F.

No presente trabalho observamos cinco indivíduos de genótipo AS e um indivíduo AA com níveis de Hb F alterados. Variações nos

níveis de Hb F são encontradas em diferentes populações, diferentes grupos étnicos, sexo e doenças genéticas (El-Hazmi *et al*, 1994). Dados recentes mostram influência do sexo e idade na expressão de Hb Fetal em pacientes SS e normais sugerindo que genes do cromossomo X ou fatores relacionados ao sexo e idade podem estar operando (Steinberg *et al*, 1995).

Em indivíduos normais, o nível de Hb F é baixo (1 a 2%), mas em mulheres foi observada uma concentração maior que é mais evidente em mulheres falcêmicas (El-Hazmi *et al*, 1994). A variação no número de células F em adultos normais e em SS pode estar ligado ao fator genético chamado locus FCP - que significa "produção de células F" - localizado no cromossomo Xp22.2-22.3. Segundo Zago (1987), a heterogeneidade dos níveis de Hb F em adultos é determinada geneticamente. Adultos normais podem ter níveis claramente elevados de Hb F (acima de 3%) e células F no sangue periférico e a mesma heterogeneidade é observada em pacientes falcêmicos, propiciando níveis bem elevados em alguns.

A expressão da Hb F parece ter um controle multifatorial segundo El-Hazmi *et al* (1994), o que explicaria os valores alterados de Hb F para os genótipos AA e AS já que a beta talassemia não estava associada, devido aos valores de Hb A₂ estarem normais. Além disso, o não conhecimento da idade do indivíduo leva-nos a pensar na possibilidade de uma criança com menos de 6 meses de vida ter feito parte da amostra, o que pouco provável.

Nos resultados obtidos neste trabalho, a Hb Fetal talvez possa exercer um efeito oxidativo que resultou no estresse observado nestes pacientes quando analisamos os eritrócitos com corpos de Heinz, principalmente para o grupo D. A Hb F protege no sentido de evitar a

polimerização, mas não é porque evita esse processo, que todos seus efeitos serão benéficos.

O eritrócito está exposto a pequenas quantidades de H_2O_2 durante sua vida média na circulação, e este H_2O_2 é gerado a partir de processos metabólicos normais, ou resultante de certas interações com drogas oxidantes e seus metabólitos com a oxi-Hb. O H_2O_2 intracelular pode causar peroxidação de lipídios da membrana com formação de radicais $O_2^{\bullet}$ e MDA, um produto de fragmentação secundário de peróxidos de ácidos graxos polinsaturados. A peroxidação de lipídios da membrana foi reconhecida como processo deletério levando ao dano celular em vários tecidos (Essien, 1994). O MDA reage com DNA, aminofosfolipídios e proteínas de membrana produzindo ligações cruzadas dos constituintes da membrana que levam a sua rigidez (Essien, 1994; Babior, 1997).

Essien (1994), obsevou que houve um aumento do nível de MDA quando células vermelhas intactas de pacientes falcêmicos foi exposta ao H_2O_2 . A formação de MDA, é um específico e sensível medidor da peroxidação lipídica. Tem sido observado que, eritrócitos β talassêmicos geram altas quantidades de MDA quando sob estresse oxidativo exógeno. O aumento da produção de MDA observada em eritrócitos falcizados é indicativo de um aumento de lipídios auto-oxidáveis, além do estresse oxidativo (Das & Nair, 1980). Foi observado também que, a susceptibilidade de peroxidação de eritrócitos intactos e lipídios isolados de eritrócitos intactos, está aumentado em falcêmicos comparado a indivíduos normais (Essien 1994).

As membranas dos eritrócitos falcizados contém níveis reduzidos de colesterol, fosfolipídios e ácidos graxos insaturados em comparação à membrana de eritrócitos normais, cerca de 50% a menos do foi observado em indivíduos AA. Eritrócitos falcizados têm potencial de

peroxidação e níveis de MDA endógeno mais altos que eritrócitos normais (Das & Nair, 1980).

O estado hemolítico dos pacientes deste trabalho pode ser devido à formação de MDA. Quando os eritrócitos de pessoas falcêmicas sofrem oxidação por um agente exógeno, são formados esses produtos de peroxidação secundária que contribuem para o processo de hemólise junto com os corpos de Heinz. O processo normal de oxidação da hemoglobina (figura 1) gerando mais radicais livres, contribui para a formação de MDA.

Uma região de lesão à membrana é o local de ataque de precipitados de Hb S desnaturada, os corpos de Heinz, na superfície interna da membrana do eritrócito (Liu *et al*, 1996; Browne, Shalev & Hebbel, 1998). Em falcêmicos, a membrana do eritrócito é mais vulnerável à peroxidação lipídica e este aumento na vulnerabilidade pode ser uma característica que contribui para o fácil colapso da membrana do eritrócito em falcêmicos. O aumento da vulnerabilidade pode ser devido à desorganização da molécula de hemoglobina. Das & Nair (1980), em estudo de microscopia eletrônica, observaram que a membrana de eritrócitos falcizados continham corpos de Heinz.

Nossos resultados sugerem que o genótipo SS é o mais susceptível ao ataque de radicais livres, especialmente ao íon $O_2^{\bullet-}$, que é poderosamente oxidante e que está envolvido na patogênese de doenças graves. O genótipo S/Tal. Beta possui susceptibilidade à oxidação inferior ao genótipo SS (tabela 9), uma vez que o genótipo S/ Tal. Beta possui apenas um β^s mutado, podendo ser responsável por uma melhora na qualidade de vida do paciente, o que não é observado em pacientes SS. Com relação ao genótipo AS, a oxidação não é um fator determinante na sobrevivência dos eritrócitos, isto porque a formação de corpos de Heinz nestes indivíduos é

baixa e a oxidação é pouco atuante, conferindo ao genótipo heterozigoto poucos danos oxidativos.

O genótipo SS (tabela 9) foi o mais heterogêneo entre todas as associações que fizeram parte deste trabalho, uma vez que incluía a Hb A proveniente de transfusão. Essa herogeneidade mostra que determinados indivíduos são mais susceptíveis à oxidação que outros, o que pode estar relacionado com os haplótipos para Hb S como foi discutido anteriormente. A Hb A proveniente da transfusão torna-se um problema para pesquisas sobre radicais livres, porque não podemos afirmar se o que foi encontrado é do paciente ou do doador.

Uma segunda hipótese para a heterogeneidade do genótipo SS são os polimorfismos das enzimas antioxidantes. Defeitos na produção de enzimas antioxidantes confere um maior grau de susceptibilidade a agentes oxidantes que são produzidos durante a conversão da oxi-Hb a meta-Hb. O sistema de defesa do eritrócito contra oxidantes é complexo e eficiente. Já o sistema de defesa contra os oxidantes na membrana é menos efetivo, uma vez que os mecanismos antioxidantes da célula são amplamente citoplasmáticos com exceção da vitamina E (Fung & Zhang, 1990).

Os resultados obtidos para eritrócitos com corpos de Heinz de acordo com a concentração de Hb S indicaram que o grupo D, com maior concentração de Hb S, foi o mais susceptível à ação dos radicais livres e também o mais heterogêneo.

A heterogeneidade presente nos grupos B, C e D pode ser devido a genótipos diferentes presentes em um mesmo grupo. Tomamos como exemplo o grupo B, o de menor concentração de Hb S, deveria sofrer menor estresse oxidativo, mas existem neste grupo indivíduos SS, SC e S/Tal.Beta, onde os radicais livres estão mais atuantes por serem genótipos na qual a defesa antioxidante provavelmente não foi suficiente para



neutralizá-los. Todos os indivíduos dos grupos C e D estavam alterados (tabela 20), sendo estes portanto, os que sofrem maior dano oxidativo.

Os danos oxidativos em eritrócitos foram inicialmente descritos nas hemoglobinas instáveis e em condições oxidativas onde ocorrem a produção de hemicromos que liberam seu grupo heme na membrana do eritrócito, com consequente peroxidação lipídica e lise celular. Mudanças estruturais na molécula da globina podem levar à graves modificações no pacote do heme, resultando na perda do heme e precipitação de globinas livres que são detectadas junto à membrana dos eritrócitos de pacientes com hemoglobinas instáveis e oxidadas, bem como em eritrócitos β talassêmicos e células falciformes. Os eritrócitos normais são dotados de mecanismos eficientes para destoxificar agentes oxidantes, mas eritrócitos variantes como células talassêmicas e falcizadas, são incapazes de “varrer” esses agentes, porque sua hemoglobina tem tendência a se autooxidar ou ser menos estável (Atamna & Ginsburg, 1995).

De acordo com Browne, Shalev & Hebbel (1998), o dano celular oxidativo pode ser devido à associação de ferro com a membrana. O complexo da membrana pode acumular complexos de Fe. A descompartimentalização do ferro foi sugerida por ser uma importante característica de eritrócitos anormais e uma importante causa de lise celular. Este ferro ligado à membrana pode desempenhar um importante papel nas doenças dos eritrócitos e pode ser um fator de causa do dano oxidativo à membrana (Atamna & Ginsburg, 1995) porque aumenta os produtos de peroxidação (Sertac *et al*, 1997).

Nos resultados obtidos para meta-Hb relacionada com o genótipo, observou-se que o SS possuiu maior concentração média e maior heterogeneidade para meta-Hb (tabela 11), confirmando ser este o genótipo que sofre maior dano oxidativo.



A meta-Hb está relacionada com a oxidação da hemoglobina o que é ocasionada principalmente pelo íon $O_2^{\bullet}$. De acordo Józwik *et al* (1997), os eritrócitos contêm alto conteúdo de lipídios não saturados, a concentração de O_2 é elevada e o ferro está presente em grandes quantidades. A hemólise progressiva está acompanhada por um aumento na concentração de MDA nos eritrócitos. A formação espontânea de meta-Hb está relacionada ao radical $O_2^{\bullet}$, e as hemoglobinas que têm discreta instabilidade térmica e mecânica como são os casos da Hb S, Hb H, Hb E e Hb F, são particularmente predispostas ao dano oxidativo. Em humanos, cerca de 2 a 3% da hemoglobina sofre autooxidação espontânea à meta-Hb, onde são gerados $O_2^{\bullet}$. A autooxidação e geração de $O_2^{\bullet}$ são altos quando a saturação da hemoglobina com o O_2 é de aproximadamente 50%. O $O_2^{\bullet}$ libera Fe^{+2} da hemoglobina e Fe^{+3} da meta-Hb resultando na reação de Fenton e Haber-Weiss (Józwik *et al*, 1997; Knight *et al*, 1992).

O H_2O_2 endógeno não pode ser removido eficientemente em eritrócitos falcizados e o excesso de H_2O_2 pode levar à formação de corpos de Heinz e peroxidar os lipídios insaturados da membrana do eritrócito. Tais processos podem contribuir para a presença de corpos de inclusões de hemoglobina e aumento de MDA nos eritrócitos. Além disso, foi observado uma redução nos níveis de colesterol nas membranas dos eritrócitos falcizados. Esta perda de colesterol da membrana pode aumentar sua susceptibilidade ao ataque dos radicais livres. Normalmente os lipídios insaturados são protegidos do ataque de radicais livres pela presença de colesterol nas biomembranas (Das & Nair, 1980; Knight *et al*, 1992).

Os resultados obtidos para meta-Hb de acordo com a concentração de Hb S mostrou que o grupo D, com maior concentração de Hb S, é o mais susceptível ao ataque de radicais livres, pois sua concentração média foi a maior observada entre todos os grupos (tabela 21).



Na tabela 22 observamos que a porcentagem de indivíduos com meta-Hb elevada foi igual ou superior a 50% nos grupos B, C e D e estes resultados são indicativos de que a presença de Hb S, independente da sua concentração, causa contínua oxidação desta hemoglobina.

A principal importância da meta-Hb é que ela está diretamente relacionada à formação de hemicromos e posteriormente aos corpos de Heinz. A membrana do eritrócito recebe assim, todos os efeitos tóxicos gerados pela oxidação da hemoglobina. Segundo Atamna & Ginsburg (1995), em algumas condições patológicas ou sob estresse oxidativo, o grupo heme pode ser liberado e ter efeitos nocivos. A meta-Hb forma hemicromos que tendem a se ligar à membrana e algumas vezes liberar o grupo heme, que desestabiliza rapidamente a estrutura da bicamada, aumentando sua permeabilidade a íons, levando à hemólise e induzindo a peroxidação da membrana lipídica. Sua ligação à proteínas de membrana diminui o conteúdo de tiol reduzido levando à ligação cruzada. A peroxidação lipídica e a oxidação de grupos tiol são características de doenças do eritrócito.

Sob estresse oxidativo, eritrócitos falcêmicos que contém anormalidades genéticas comuns entre a população negra, como são os casos de deficiência de G6PD e talassemia alfa, são mais susceptíveis à oxidação (Mansouri & Nandy, 1998). Segundo Zago (1993), há alta prevalência de talassemia alfa entre negros - 20% dos pacientes com anemia falciforme tem talassemia alfa - indicando menos gravidade clínica e maior sobrevida. Neste trabalho havia apenas três pacientes SS/Tal. alfa e um AS/Tal. alfa indicando uma prevalência de hemoglobina H neste grupo de 6,8%, mas talvez, não possamos considerar este valor porque a amostragem era pequena.

substâncias Alguns eritrócitos de falcêmicos depois de constantes desoxigenação e oxigenação se tornam células falcizadas irreversíveis. Estudos mostram que a hemoglobina em células falcizadas irreversíveis, apesar de estarem completamente oxigenadas, permanecem desagregadas na presença de O_2 e, conseqüentemente falha em sua função normal. Esta observação sugere que a membrana de células vermelhas e células falcizadas é um importante local de dano celular que aparentemente alcança seu máximo nas células falcizadas irreversíveis (Das & Nair, 1980). Eritrócitos frescos não contém quantidades detectáveis de MDA ou produtos de autoxidação. Foi sugerido que a peroxidação lipídica é bloqueada "in vivo" por um mecanismo protetor eficiente. As enzimas SOD, catalase e GSH-Px e a vitamina E agem eficientemente como sistemas saneadores de peróxidos dos eritrócitos. A oxidação da hemoglobina libera radicais $O_2^{\bullet}$ que continuamente são gerados, seguindo-se a oxidação de cadeias de hemoglobina separadas (Das & Nair, 1980).

estresse oxidativo A hemoglobina é constantemente oxidada à meta-Hb. Todavia, devido a alta capacidade dos eritrócitos humanos reduzirem a meta-Hb, seus níveis nas células de indivíduos normais permanece abaixo de 1,0%. Sob condições fisiológicas, o maior redutor de meta-Hb é a meta-Hb redutase dependente de NADH ou também chamada citocromo b_5 redutase (Mansouri & Nandy, 1998). No grupo controle observamos oito indivíduos com meta-Hb alterada. Isto pode acontecer quando ocorre exposição ao íon $O_2^{\bullet}$ principalmente, e também a outros agentes oxidantes. Defeitos na meta-Hb redutase e outras enzimas antioxidativas, torna a hemoglobina do indivíduo mais propensa à oxidação, aumentando o nível de meta-Hb.

demanda dos l A heterogeneidade existente para meta-Hb e corpos de Heinz pode ser devida, como já foi mencionada anteriormente, às enzimas antioxidantes. As enzimas antioxidantes têm a função de remover

substâncias pró-oxidantes, que são formadas dentro de certos compartimentos celulares sob condições patológicas e fisiológicas, antes deles atacarem a estrutura da célula. Já, as enzimas de reparo têm a função de eliminar o resultado, ou seja, reduzem as substâncias oxidadas e restauram a sua função como a meta-Hb redutase. Alguns autores consideram as enzimas proteolíticas e fosfolipase A₂ como sistema de defesa antioxidante secundário. As enzimas proteolíticas degradam proteínas tóxicas, e a fosfolipase A₂ lisa os peróxidos dos lipídios das membranas (Lewin & Popov, 1994). Doentes falcêmicos, que neste trabalho, tiveram valores normais de meta-Hb ou corpos de Heinz, pode ser indicativo de um bom sistema de defesa.

Não é conhecido se o aumento da atividade da SOD em células falcêmica é devido a um aumento da produção de radicais O₂[•]; todavia, a alta atividade da SOD em células falcêmicas quando comparada a células normais pode implicar que este é um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo no processo de reparo celular (Das & Nair, 1980).

Das & Nair (1980), observaram que, eritrócitos falcizados tinham aumento de SOD e redução de GSH-Px e catalase quando comparados a indivíduos normais, e este relato faz sentido, pois a enzima SOD se constitui na primeira barreira antioxidante da hemoglobina.

Quando eritrócitos de uma pessoa com traço falcêmico são transfundidos em pacientes de genótipo AA com cianose, eles são destruídos rapidamente. De acordo com o guia de transfusão de sangue da França, deve-se evitar a transfusão de sangue AS e AC por ser potencialmente prejudicial a quem recebe. Mas esses doadores são aceitos devido a alta demanda dos bancos de sangue (Ould-Amar *et al*, 1996).

Neste trabalho, não tivemos a pretensão de relacioná-lo à transfusão de sangue, mas os resultados obtidos indicam que há uma

oxidação maior em amostras de sangue AS comparadas a amostras AA e isso poderá ser útil para quem trabalha em bancos de sangue. O que queremos mostrar com a análise de estocagem de sangue, é a confirmação de que a Hb S é oxidada mais facilmente que a Hb A.

Eritrócitos estocados, geralmente têm uma diminuição de 2,3 DPG, ATP e pH. Eritrócitos sem 2,3 DPG possuem capacidade diminuída de entrega de oxigênio aos tecidos (Castro, 1980; Ould-Amar *et al*, 1996). A peroxidação lipídica espontânea é a principal causa do envelhecimento do eritrócito (Józwik *et al*, 1997, Knight, 1992).

O sangue está permanentemente exposto ao estresse oxidativo, consequentemente tem alta capacidade antioxidante. Em sangue estocado de doadores há uma demanda desta alta capacidade antioxidante, consequentemente danos aos eritrócitos podem ocorrer e se manifestar através da liberação de potássio dos eritrócitos para o plasma, seguido pela liberação de hemoglobina que são considerados indicadores de danos oxidativos às membranas dos eritrócitos (Racek *et al*, 1997).

Os resultados obtidos na análise da meta-Hb relacionada com o período de estocagem mostra que, o genótipo AS tem maior concentração média de meta-Hb que o genótipo AA. Isto pode ser comprovado através da análise dessas concentrações médias obtidas para cada genótipo nas tabelas 24 e 25.

Em todos os períodos há um aumento do intervalo de confiança devido à variação existente para cada indivíduo, evidenciando que uma pessoa tem a sua capacidade antioxidante individual que é diferente de outra. De acordo com Józwik *et al* (1997), o processo oxidativo em eritrócitos estocados é iniciado pelo O^*_2 . Durante a formação espontânea de meta-Hb, o O^*_2 reage com a oxi-Hb levando à geração de H_2O_2 e a reação do O^*_2 com H_2O_2 e Fe^{+2} é a origem dos radicais hidroxil; como em eritrócitos há uma alta

concentração de ferro, a geração de hidroxil é o mecanismo primário de lesões. Os queladores protegem os eritrócitos das reações de Fenton e Haber-Weiss. Durante reações catalisadas pela GSH-Px, o H_2O_2 é inativado à substâncias neutras como água e glutatão oxidado. Com disso, as reações oxidativas em eritrócitos estocados é originado através do mesmo processo dos eritrócitos circulantes na corrente sanguínea (figura 1).

Através da análise da figura 13, observa-se que em indivíduos AS há um aumento constante da meta-Hb em todos os períodos. No caso deste estudo há um fator relevante que são os doadores de sangue AS. O sangue desses indivíduos parece ser oxidado mais rapidamente que os de doadores AA, por possuírem uma maior concentração de meta-Hb e estarem mais propensos a ação de oxi-radicais, especialmente o íon $O^{\bullet}_2$.

Segundo Racek *et al* (1997), a administração de vitaminas e selênio aos doadores fornecem uma boa qualidade do sangue sob o ponto de vista de ações deletérias dos radicais livres. Uma diminuição das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px leva a um decréscimo da defesa dos eritrócitos contra os radicais livres. O uso de Desferoxamina misilato pode ser útil na diminuição do Fe que catalisa a reação de Fenton (Knight, 1992; Racek *et al*, 1997).

Jozwik *et al* (1997), observaram que a concentração de GSH-Px aumenta no começo do estoque do sangue, mas decresce a partir do décimo dia. A SOD decresce durante todo o período de estoque. O decréscimo da SOD em eritrócitos estocados pode ser considerado como resultado da desnaturação de proteínas e enzimas pelas espécies reativas de oxigênio ou como consequência do vazamento de proteínas através da membrana.

Um dos fatores que pode ter levado a um aumento da meta-Hb nas amostras AS é a diminuição da SOD devido à rapidez dos processos



oxidativos o que corrobora com Józwik *et al*, (1997) afirmando que em eritrócitos estocados, os processos peroxidativos ocorrem rapidamente e em grande quantidade para danificar esses eritrócitos levando à hemólise e que de acordo com Castro (1980), as células falcizadas irreversíveis aumentam após o estoque.

2- Pelos resultados A atividade antioxidante em sangue estocado diminui o conteúdo de tiol livre no eritrócito e diminui a atividade antioxidante no plasma, ou seja, durante o estoque, o sangue perde seu sistema de defesa antioxidante. O período limite para o estoque seria 12 dias (Józwik *et al*, 1997), ou seja, o eritrócito com Hb S está sofrendo maior oxidação que a Hb A, tanto quando ele está na circulação como também quando está estocado.

4- Ao analisarmos os valores de Hb Fetal relacionando-os com os três genótipos e com concentração de Hb S, é provável que a elevação da Hb Fetal exerça influência no processo de degradação da Hb S que culmina com sua metahemoglobinização e na formação de corpos de Heinz.

5- Apesar da presença da Hb fetal ter um aspecto vantajoso para o eritrócito com moléculas de Hb S, verificou-se no presente trabalho que a

VI- CONCLUSÕES

- 1- Em concordância com Murayama & Nalbadian (1973), esses resultados indicaram que a Hb Fetal e a meta-Hb embora não participem da polimerização, podem interferir na degradação oxidativa da Hb S.
- 2- Pelos resultados obtidos na análise dos genótipos de Hb S (AS, SS, S/Tal. Beta) e da concentração de Hb S, evidenciou-se que a simples presença de Hb S, independente do genótipo e de sua concentração, é suficiente para produzir a metaemoglobinização desta hemoglobina.
- 3- Não há uma relação direta entre concentração de meta-Hb , nos diferentes casos estudados e presença quantitativa de corpos de Heinz. Explica-se estes resultados pelo fato da meta-Hb desaparecer pela ação da enzima metaemoglobina redutase, que a transforma em oxi-Hb. Entretanto, é possível que na Hb S a metaemoglobinização exceda sua capacidade de reversibilidade, desencadeando-se assim o processo de degradação com formação de hemicromos (irreversíveis), e formação de precipitados insolúveis de globinas desnaturadas - os corpos de Heinz. Como estes corpos de Heinz passam a formar parte integrante da célula, seu desaparecimento dependerá da sobrevivência do eritrócito, motivo pelo qual sua presença não é quantitativamente proporcional à concentração de meta-Hb.
- 4- Ao analisarmos os valores de Hb Fetal relacionando-os com os três genótipos e com concentração de Hb S, é provável que a elevação da Hb Fetal exerça influência no processo de degradação da Hb S que culmina com sua metaemoglobinização e na formação de corpos de Heinz.
- 5- Apesar da presença da Hb Fetal ter um aspecto vantajoso para o eritrócito com moléculas de Hb S, verificou-se no presente trabalho que a



intensidade de corpos de Heinz no eritrócito falciforme parece independender da concentração de Hb Fetal.

- 6- Nossos resultados indicaram que o genótipo SS é mais susceptível ao ataque de radicais livres, especialmente ao íon $O_2^{\bullet}$, que é poderosamente oxidante e está envolvido na patogênese de doenças graves. O genótipo S/Tal. Beta possui susceptibilidade à oxidação inferior ao genótipo SS, uma vez que o genótipo S/ Tal. Beta possui apenas um β^s mutado, podendo ser responsável por uma melhora na qualidade de vida do paciente, o que não é observado em pacientes SS.
- 7- Os resultados mostraram que a elevação de meta-Hb nos genótipos com Hb AS, SS e S/Tal. Beta atingiram respectivamente 52,63%, 52,94% e 56,24% da população de cada grupo estudado. Entretanto, foi o genótipo SS que apresentou a maior concentração média de meta-Hb (3,97%), confirmando ser este o genótipo com maior dano oxidativo.
- 8- A metaemoglobulinização em sangue de pessoas com Hb AA e Hb AS, avaliada ao longo de 24 h, 48 h, 72 h e 168 h, mostrou maior intensidade oxidativa na Hb AS, em comparação com a Hb AA. É possível, assim, concluir que as amostras de doadores com Hb AS podem apresentar expressiva degradação de hemoglobina em comparação com os doadores com hemoglobinas normais.

VII- RESUMO

SOUZA, P. C. Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da Hb S em eritrócitos de doentes falcêmicos. São José do Rio Preto, 1999. 109p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

A análise dos produtos de degradação oxidativa da Hb S foi avaliada a partir da quantificação da metaemoglobina e contagem de eritrócitos com corpos de Heinz. Os radicais livres originados a partir do oxigênio provocam extensas lesões aos eritrócitos, diminuindo seu período de vida útil especialmente aos portadores de Hb S. O íon superóxido ($O_2^{\bullet}$) é o grande responsável pelo processo de oxidação da hemoglobina levando à formação de metaemoglobina e posteriormente formação de hemicromos que se ligam à membrana e evoluem para a forma de corpos de Heinz, destruindo a membrana e provocando hemólise do eritrócito. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o genótipo SS é o mais susceptível ao ataque dos radicais livres e o genótipo S/Tal. Beta possui susceptibilidade oxidativa inferior ao SS por possuir apenas um β^s mutado. Os resultados nos permitiram concluir que: a) a simples presença de Hb S, independente do seu genótipo e da sua concentração, é suficiente para produzir a metaemoglobinização desta hemoglobina; b) não há uma relação direta entre concentração de metaemoglobina e presença de corpos de Heinz; c) a intensidade de corpos de Heinz no eritrócito falcêmico parece ser independente da concentração de Hb Fetal; d) o genótipo SS é mais susceptível à oxidação da hemoglobina com liberação de produtos de degradação, e) a metaemoglobinização em sangue de pessoas com Hb AA e Hb AS, avaliada ao longo de 24 h, 48 h, 72 h e 168 h, mostrou maior intensidade oxidativa na Hb AS, em comparação com a Hb AA.

Palavras-chave: hemoglobina, oxidação, genótipo, eritrócito



SOUZA, P. C. *Valuation of the oxidative degradation products of Hb S in sickle cell disease*. São José do Rio Preto, 1999. 109p. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Câmpus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

VIII- ABSTRAT

Analysis of oxidative degradation products of Hb S was evaluated through methaemoglobin measurement and Heinz bodies demonstration. Free radicals source through of the oxygen to cause injury extents to erythrocytes, decreasing its survival especially to bearing of the Hb S. Superoxide ion ($O_2^{\bullet}$) is major responsible for oxidation process of Hb to take formation membrane-bound haemichromes and afterward to evolve to Heinz bodies, resultant damage to membrane and occurs erythrocytes hemolysis. The results from this work showed that the SS genotype is more susceptible at the free radicals action and the S/Tal. β genotype have oxidative susceptibility inferior at the SS to own only one β^S mutation. The results allowed to conclude that: a) simple presence of Hb S, independent of the its genotype and its concentration, is sufficient to produce methaemoglobin from this Hb, b) Don't have a direct relation between methaemoglobin concentration and Heinz bodies demonstration, c) Intensify of Heinz bodies in the sickled erythrocytes not depend of the Hb Fetal concentration, d) The genotype SS is more susceptible by oxidation Hb with release of degradation products, e) methaemoglobin formation in blood of persons with Hb AA and Hb AS, assessed along 24 h, 48h, 72h and 168h, showed major oxidative intensify in the Hb AS in comparison with Hb AA.

Key-words: hemoglobin, oxidation, genotype, erythrocyte



IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLIAKABAR, S., *et al.* Human erythrocyte superoxide dismutase in adult, neonates, and normal, hypoxaemic, anaemic, and chromosomally abnormal features. *Clin. Biochem.*, v. 26, p. 109-115, 1993.
- ANDERSEN, H. R., NIELSEN, J. B., NIELSEN, F., GRANDJEAN, P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.*, v. 43, n. 4, p. 562-568, 1997.
- ATAMNA, H., GINSBURG, H. Heme degradation in the presence of glutathione. *J. Biol. Chem.*, v. 270, n. 42, p. 24876-24883, 1995.
- BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 30, p. 141-155, 1997.
- BETKE, K., MARTI, N. R., SCHLICHT, I. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature*, v. 184, n. 1877, 1959.
- BEUTLER, E. The sickle cell diseases and related disorders. In: WILLIAN, W. J. *et al.* *Hematology*. 4.ed. New York: Mc Graw Hill, 1990, p. 613-643.
- BROWNE, P., SHALEV, O., HEBBEL, R. P. The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 24, n. 6, p. 1040-1048, 1998.
- CASTRO, O. Viability and function of stored sickled erythrocytes. *Transfusion*, v. 20, n. 6, p. 695-703, 1980.

- CHANG, Y. C., SMITH, K. D., MOORE, R. D., SERGEANT, G. R., DOVER, G. J. An analysis of Fetal hemoglobin variation en sickle cell disease: the relative contributions of the X-linked factor, β -globin haplotypes, α -globin gene number, gender, and age. *Blood*, v. 85, n. 4, p. 1111-1117, 1995.
- CHARACHE, S., LUBIN, B., REID, C. D. Management and therapy of sickle cell disease. *U. S. Depart. of health and hum. serv.* Washington: D. C., 1991.
- CHIU, D. T., *et al.* Correlation of membrane lipid peroxidation with oxidation of hemoglobin variants: possibly related to the rates of heme release. *Free Radical Biol. & Med.*, v. 21, n.1, p. 89-95, 1996.
- COHEN, G, HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*, v. 2, p. 1420-1428, 1963.
- DAS, D. K., ESSMAN, W. B. *Oxygen radicals: systemic events and disease processes.* Basel: Kargers , 1990. 196p.
- DAS, S. K., NAIR, R. C. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br. J. of Haematol.*, v. 44, p. 87-92, 1980.
- ESSIEN, E. U. Increased susceptibility of erythrocyte membrane lipids to peroxidation in sickle cell disease. *Cent. Afr. J. of Med.*, v. 40, n. 8, p. 217-220, 1994.



- FABRON JÚNIOR, A. Clínica e tratamento das doenças falciformes. In: NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo: Savier, 1997, cap. 9, p. 48-60.
- FIGUEIREDO, M. S., KERBAUY, J., GONÇALVES, M. S., ARRUDA, V. R., SAAD, S. T., SONATI, M. F., STOMING, T., COSTA, F. F. Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle cell anemia in Brazil. *Am. J. Hematol.*, v. 53, n. 2, p. 72-76, 1996.
- FRANK, P. F. H., et al. Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells. *J. Clin. Invest.*, v. 75, p. 183-190, 1985.
- FUJII, S., KANEKO, T. Selenium, glutathione peroxidase and oxidative hemolysis in sickle cell disease. *Acta Haematol.*, v. 87, p. 105-106, 1992.
- FUNG, L. W. M., ZHANG, Y. A method to evaluate the antioxidant system for radicals in erythrocyte membrane. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 9, p. 289-298, 1990.
- GEORGE, E., et al. Peripheral haemolysis, lipid peroxidation, iron status, and vitamin E in haemoglobin H syndromes in West Malaysia. *Singapore Med. J.*, v. 34, p. 241-244, 1996.
- GERALD, P. G. The methemoglobinemias. In: "Metabolic basis of inherited disease". STAMBURU, J. B., WYNGAARDEN, J. B., FREDICKSON, D. S. N.Y: Mc Graw Hill, 1966. p. 1069.

- LOUREIRO, A. P. M., et al. DNA damage by secondary lipid oxidation. In HARRINGTON, J. P., NEWTON, P., CRUMPTON, T., KEATON, L. Induced hemichrome formation of methemoglobins A, S and F by fatty acids, alkyl ureas and urea. *Int. J. Biochem.*, v. 25, n. 5, p. 665-670, 1993.
- MANSOURI, A., NANDY, L. NADH-methemoglobin reductase (cytochrome HONIG, G. R., ADAMS, J. G. *Human hemoglobin genetics*. N. Y: Springer Verlag/wien, 1986.
- KIM SHAPIRO, D. B., BRUCE KING, S., BONIFANT, C. L., KOLIBASH, C. P., BALLAS, S. K. Time resolved absorption study of the reaction of hydroxyurea with sickle cell hemoglobin. *Biochem. Bioph. Acta*, v. 1380, p. 64-74, 1998.
- JÓZWIK, M., JÓZWIK, M., JÓZWIK, M., SZCZYPKA, M., GAJEWSKA, J., KLITA-LASKOWSKA, T. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clin. Chim. Acta*, v. 267, p. 129-142, 1997.
- MENCIONI, R., et al. Iron metabolism and DNA oxidative damage. *Circ. KNIGHT, J. A., VOORHEES, R. P., MARTIN, L., ANSTALL, H. Lipid peroxidation in stored red cells. Transfusion*, v. 32, p. 354-357, 1992.
- MEDERAKS, M. G. G., et al. Oxygen toxicity of hemoglobinemia in subjects LEWIN, G. & POPOV, I. The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequences. *Med. Hypotheses*, v. 42, n. 4, p. 269-275, 1994.
- LIU, S. C., YI, S. J. MEHTA, J. R., NICHOLS, P. E., BALLAS, S. K., YACONO, P. W., GOLAN, D. E., PALEK, J. Red cell membrane remodeling in sickle cell anemia. *J. Clin. Invest.*, v. 97, n. 1, p. 29-36, 1996.
- oxidation. *Arch. Environ. Health*, v. 38, p. 233-244, 1996.

LOUREIRO, A. P. M., *et al.* DNA damage by secondary lipid oxidation. In: International Symposium on Orthomolecular Medicine, São Paulo, 1996, p.107, São Paulo.

MANSOURI, A., NANDY, I. NADH-methemoglobin reductase (cytochrome b₅ reductase) levels in two groups of american blacks and whites. *J. Invest. Med.*, v. 46, n. 2, p. 82-86, 1998.

MARCUS, S. J., KINNEY, T. R., SCHULTZ, W. H., O' BRANSKI, E. E., WARE, R. E. Quantitative analysis of erythrocytes containing fetal hemoglobin (F cells) in children with sickle cell disease. *Am. J. Hematol.*, v. 54, p. 40-46, 1997.

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. *J. Clin. Path.*, v. 18, p. 90-792, 1965.

MENEGHINI, R., *et al.* Iron metabolism and DNA oxidative damage. *Ciênc. e Cult.*, v. 47, p. 320-324, 1995.

MEDEIROS, M. G. G., *et al.* Oxygen toxicity of hemoglobinemia in subjects from a highly polluted town. *Arch. Env. Health*, v. 38, p. 11-16, 1983.

MEDEIROS, M., *et al.* DNA damage induced by secondary lipid oxidation products. *Ciênc. e Cult.*, v.47, p. 336-339, 1995.

MINETTI, M., *et al.* Role of oxygen end carbon radicals in hemoglobin oxidation. *Arch. Environ. Health*, v. 38, p. 233-244, 1996.



- MURAYAMA, M. & NALBADIAN, R. M. *Sickle cell hemoglobin: molecule to man*. Boston: Mass Little Brown, 1973.
- NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. *Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemot.*, v. 18, p. 75-81, 1996.
- NAOUM, P. C. *Hemoglobinopatias e talassemias*. São Paulo: Sarvier, 1997. 171p.
- NAOUM, P. C., DOMINGOS, C. R. B. Doença falciforme no Brasil: origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. *J. Bras. Patol. Clin.*, v. 33, p. 145-153, 1997.
- NATTA, C. L., CHEN, L. C., CHOW, C. K. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematol.*, v. 83, p. 130-132, 1990.
- OTEIZA, P. I., et al. Oxidative damage induced by metals without redox capacity in biological systems. *Ciênc. e Cult.*, v. 47, p. 330-335, 1995.
- OULD-AMAR, A. K., KÉROB-BAUCHET, B., ROBERT, P., LECONTE, C., MAIER, H., BERA, O., PLUMELLE, Y., HYRONIMUS, J. C., CÉSAIRE, R. Assessment of qualitative functional parameters of stored red blood cells from donors with sickle cell trait (AS) or with heterozygote (AC) status. *ICB*, v. 4, p. 225-233, 1996.
- OUNCHARD, N. A. & KELLY, F. J. *Free radicals: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1996. 310p.



PAPAYANNOPOULOS, R., STAMATAYANNOPOULOS, G. Stains for inclusions bodies. In: "Standardization of laboratory reagents and methods for detection of haemoglobinopathies". Atlanta (CDC): Hew Publications, 1974.

POILLON, W. N., KIM, B.C., RODGERS, G. P., NOGUCHI, C. T., SCHECHTER, A. N. Sparing effect of hemoglobin F and hemoglobin A₂ on the polymerization of hemoglobin S at physiologic ligand situation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 90, p. 5039-5043, 1993.

PROTEASA, E. A., IONESCU, I. Fatty-acid peroxidation in relation to trace elements in serum of patients with homozygous sickle-cell anemia and β -thalassemia: a gas chromatografic study. *Nutrition*, v.11, n. 5, p. 546-550, 1995.

RACEK, J., HERYNKOVÁ, R., HOLECEK, V., JERÁBEK, Z., SLÁMA, V. Influence of antioxidants on the quality of stored blood. *Vox Sang.*, v. 72, p. 16-19, 1997.

RODGERS, G. P. Overview of pathophysiology and rationale for treatment of sickle cell disease anemia. *Semin. Haematol.*, v. 34, n. 3, p. 2-7, 1997.

SALE, A. W., HILLEN, H. F. Pharmacological induction of foetal haemoglobin synthesis in sickle cell disease. *Neth. J. Med.*, v. 51, n. 5, p. 169-178, 1997.

SCHECHTER, A. N., NOGUCHI, C. T. Sickle hemoglobin polymer: structure - function correlates. In: EMBURY, S. H., HEBBEL, R. P., MOHANDAS, N., STEINBERG, M. H. *Sickle cell disease: basic principles and clinical practice*. New York: Raven, 1994. p. 33-51.

SERTAC, A., BINGOL, F., AYDIN, S., USLU, A. Peroxidative damage in sickle cell erythrocyte ghosts: protective effect of Allopurinol. *Genet. Pharmacol.*, v. 28, n. 3, p. 427-428, 1997.

SHINAR, E., et al. Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in severe beta thalassemia. *Blood*, v. 70, p. 158-164, 1987.

SHINAR, E. & RACHMILEXITZ, E. A. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin. Hematol.*, v. 27, p. 70-82, 1990.

SONAYE, B., NAIR, A. A., YADAV, S.D., CHADRABARTI, S. Protein cross-linking during oxidative denaturation of methaemoglobin. *Indian J. Med. Res.*, v. 101, p. 75-80, 1995.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. *Science*, v. 257, p. 1220-1224, 1992.

STEINBERG, M. H., HSU, H., NAGEL, R. L., MILNER, P. F., ADAMS, J.G., BENJAMIN, L., FRYDS, S., GILLETTE, P., GILMAN, J., JOSIFOVSKA, O., HELLMAN-ERLINGSSON, S., SAFAYA, S., HUEY, L., RIEDER, R. F. Gender and haplotype effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. *Am. J. Hematol.*, v. 48, p. 175-181, 1995.

STEINBERG, M. H. Sickle cell disease: present and future treatment. *Am. J. Med. Sci.*, v. 312, n. 4, p. 166-174, 1996.

STRATTON, L. P., RUDOLPH, A. S., KOLL, W. K., FARMOR, M. C. The reduction of methemoglobin levels by antioxidants. *Hemoglobin*, v. 12, p. 353-368, 1988.



VALENZUELA, A., GUERRA, R., LAZCANO, L., CAÑAS, P. Differential prooxidative effect of adult and fetal hemoglobin. *FEBS*, v. 196, n. 2, p. 353-356, 1986.

VAN DEN BERG, J. J., KUYPERS, F. A., LUBIN, B. H., ROELOFSEN, B., OP DEN KAMP, J. A. Direct and continuous measurement of hydroperoxide induced oxidative stress on the membrane of intact erythrocytes. *Free Radical. Biol. & Med.*, v. 11, n. 3, p. 255-261, 1991.

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

YARBORO, T. L. The natural history of homozygous S sickle cell anemia in two sisters. *J. Natl. Med. Assoc.*, v. 87, n. 5, p. 363-368, 1992.

W.H.O. World Health Organization Working Group. Hereditary anaemias: genetic basis, clinical features, diagnosis and treatment. *BULLETIN OF THE W.H.O.*, v. 60, n. 5, p. 643-661, 1982.

WAUGH, S. M., LOW, P. S. Hemichrome binding to band 3. Nucleation of Heinz bodies on the erythrocyte membrane. *Biochemistry*, v. 24, p. 34-39, 1985.

WAUGH, S., WALDER, J. A., LOW, P. S. Partial characterization of the copolymerization reaction of erythrocyte membrane band 3 with hemichromes. *Biochemistry*, v. 26, p. 1777-1783, 1987.

WINTERBOURN, C. C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias. The unstable hemoglobins. *Semin. Hematol.*, v. 27, p. 41-50, 1990.

ZAGO, M. A. Hemoglobinopathies: recent advances and collaboratives research. *Ciênc. e Cult.*, v. 39, n. 9, p. 829-833, 1987.

ZAGO, M. A. Origem e heterogeneidade da anemia falciforme. *Boletim*, v. VX, n. 162, p. 3-8, 1993.

Amostra	Hb (g/dl)	Hct (%)	HbA1c (%)	HbF (%)	HbS (%)	Grupo
1	AA	1	1,05	0,53	0,00	A
2	AA	1	1,00	0,37	0,00	A
3	AA	1	0,70	0,00	0,00	A
4	AA	1	0,73	1,00	0,00	A
5	AA	1	0,62	0,00	0,00	A
6	AA	1	0,85	0,61	0,00	A
7	AA	1	1,10	0,00	0,00	A
8	AA	1	0,40	0,30	0,00	A
9	AA	1	1,10	0,75	0,00	A
10	AA	1	2,00	0,50	0,00	A
11	AA	1	1,40	0,42	0,00	A
12	AA	1	1,20	0,27	0,00	A
13	AA	1	0,80	0,00	0,00	A
14	AA	1	0,50	1,20	0,00	A
15	AA	2	0,70	1,20	0,00	A
16	AA	1	0,75	1,30	0,00	A
17	AA	1	0,65	1,10	0,00	A
18	AA	1	0,46	0,00	0,00	A

X- ANEXO 1

Relação individual de 136 amostras de sangue. Classificação dos genótipos e respectivos grupos determinados pelas concentrações de Hb S. Exposição das avaliações quantitativas dos corpos de Heinz, Hb Fetal e meta-Hb.

Amostra	Genótipo	Heinz (a)	Fetal (b)	MetaHb (b)	Hb S (b)	Grupo
1	AA	1	1,05	0,53	0,00	A
2	AA	1	1,00	0,37	0,00	A
3	AA	1	0,70	0,00	0,00	A
4	AA	1	0,76	1,00	0,00	A
5	AA	1	0,62	0,00	0,00	A
6	AA	1	0,83	0,61	0,00	A
7	AA	1	1,10	0,00	0,00	A
8	AA	1	0,92	0,30	0,00	A
9	AA	1	1,10	0,75	0,00	A
10	AA	1	2,00	0,50	0,00	A
11	AA	1	1,40	0,42	0,00	A
12	AA	1	1,20	0,27	0,00	A
13	AA	1	0,80	0,00	0,00	A
14	AA	1	0,50	1,20	0,00	A
15	AA	1	0,70	1,20	0,00	A
16	AA	1	0,75	1,30	0,00	A
17	AA	1	0,65	1,10	0,00	A
18	AA	1	0,46	0,00	0,00	A

19	AA	1	1,20	1,10	0,00	A
20	AA	1	1,00	0,00	0,00	A
21	AA	1	1,30	1,10	0,00	A
22	AA	1	1,50	3,60	0,00	A
23	AA	1	1,03	2,50	0,00	A
24	AA	1	0,72	2,30	0,00	A
25	AA	1	0,73	2,80	0,00	A
26	AA	1	0,90	1,30	0,00	A
27	AA	1	0,97	0,00	0,00	A
28	AA	1	0,81	0,00	0,00	A
29	AA	1	0,66	0,00	0,00	A
30	AA	1	0,87	0,00	0,00	A
31	AA	1	0,48	0,00	0,00	A
32	AA	1	0,83	0,00	0,00	A
33	AA	1	1,00	0,00	0,00	A
34	AA	1	1,08	0,00	0,00	A
35	AA	1	0,24	1,00	0,00	A
36	AA	1	0,85	1,60	0,00	A
37	AA	1	1,50	0,00	0,00	A
38	AA	2	1,21	0,00	0,00	A
39	AA	1	1,00	0,90	0,00	A
40	AA	1	1,30	0,00	0,00	A
41	AA	1	0,62	0,00	0,00	A
42	AA	1	1,30	0,00	0,00	A
43	AA	1	0,90	2,80	0,00	A
44	AA	1	0,60	2,00	0,00	A

45	AA	1	1,10	1,00	0,00	A
46	AA	1	0,70	1,10	0,00	A
47	AA	1	0,50	3,00	0,00	A
48	AA	1	0,70	0,00	0,00	A
49	AA	1	0,90	1,10	0,00	A
50	AA	1	1,25	2,20	0,00	A
51	AA	1	0,83	3,20	0,00	A
52	AA	1	0,34	0,00	0,00	A
53	AA	1	1,40	0,00	0,00	A
54	AA	1	1,00	0,00	0,00	A
55	AA	1	1,25	1,20	0,00	A
56	AA	1	2,00	0,00	0,00	A
57	AA	1	1,50	0,00	0,00	A
58	AA	1	2,00	0,00	0,00	A
59	AA	1	2,00	0,00	0,00	A
60	AA	1	3,50	1,10	0,00	A
61	AA	1	1,00	0,00	0,00	A
62	AA	1	0,77	0,34	0,00	A
63	AA	1	0,57	0,57	0,00	A
64	AA	1	0,90	0,41	0,00	A
65	AA	1	0,90	0,00	0,00	A
66	AA	1	0,69	0,00	0,00	A
67	AA	1	1,40	0,00	0,00	A
68	AA	1	1,00	0,90	0,00	A
69	AA	1	0,51	0,80	0,00	A
70	AA	1	0,56	0,00	0,00	A

71	AA	1	1,06	0,58	0,00	A
72	AA	1	0,88	0,73	0,00	A
73	AA	1	0,68	0,64	0,00	A
74	AA	1	0,67	0,00	0,00	A
75	AA	1	0,91	0,00	0,00	A
76	AA	1	0,52	0,00	0,00	A
77	AA	1	0,81	1,70	0,00	A
78	AA	1	0,72	2,00	0,00	A
79	AS	2	0,00	3,00	45,50	B
80	AS	5	0,80	1,20	42,80	B
81	AS	5	2,00	2,00	41,70	B
82	AS	1	0,60	2,30	40,10	B
83	AS	1,6	0,60	0,00	39,60	B
84	AS	1,8	2,70	2,40	37,80	B
85	AS	2,2	2,50	2,10	37,70	B
86	AS	2,8	0,80	1,70	37,20	B
87	AS	2	3,60	2,70	37,20	B
88	AS	1	0,83	2,70	31,80	B
89	AS	5	1,40	3,70	30,00	B
90	AS	2	2,50	0,00	28,00	B
91	AS	1	0,40	1,10	26,30	B
92	AS	4	1,40	3,30	24,40	B
93	AS	2	1,00	1,00	23,40	B
94	AS	2,5	1,10	3,20	35,50	B
95	AS	1	1,00	2,60	29,70	B
96	AS	2,5	3,00	1,38	28,00	B

97	AS	1	1,00	1,00	23,40	B
98	ASH	4	1,42	1,00	13,90	B
99	Sß	5	18,80	5,00	40,20	B
100	Sß	2,5	6,25	3,10	37,40	B
101	Sß	20	11,20	1,00	24,40	B
102	Sß	2	14,00	3,30	38,70	B
103	SS	1	8,30	1,30	48,40	B
104	SS	1	3,30	2,50	48,40	B
105	SC	40	3,00	3,70	38,80	B
106	SC	10	1,00	4,30	62,80	C
107	Sß	10	16,60	3,30	68,90	C
108	SSH	10	5,00	4,00	77,20	C
109	SSH	10	8,33	3,30	72,40	C
110	SS	10	4,00	1,50	78,10	C
111	SS	33,3	2,80	5,20	72,60	C
112	SS	20	5,00	0,80	72,30	C
113	SS	20	4,66	1,20	70,30	C
114	SS	10	2,30	1,00	67,70	C
115	SS	10	3,75	2,50	64,50	C
116	SS	10	5,50	5,90	62,50	C
117	SS	12,5	5,80	2,00	90,90	D
118	SS	33,3	4,40	8,30	85,30	D
119	SS	20	3,30	10,00	97,40	D
120	SS	20	4,40	1,00	97,50	D
121	SS	20	7,14	12,50	96,80	D
122	SS	20	4,40	3,00	94,50	D

123	SS	100	8,00	1,60	91,00	D
124	SS	100	6,90	7,27	88,90	D
125	S β	20	7,70	4,00	92,00	D
126	S β	5	13,30	7,10	91,90	D
127	S β	5	10,80	2,00	90,90	D
128	S β	10	13,50	1,20	89,60	D
129	S β	10	25,00	0,70	89,60	D
130	S β	20	22,00	3,70	87,80	D
131	S β	10	19,00	5,00	85,40	D
132	S β	12,5	8,00	0,70	96,00	D
133	S β	10	20,90	0,60	89,30	D
134	S β	10	12,50	10,50	85,00	D
135	S β	4	6,25	2,00	88,80	D
136	SSH	10	5,45	0,70	85,00	D

(a) Os valores apresentados correspondem à relação de número de eritrócitos com corpos de Heinz para cada 1000 eritrócitos avaliados citologicamente.

(b) Os valores de Hb Fetal, Meta-Hb e Hb S são percentuais.

XI- ANEXO 2

Relação individual dos resultados obtidos para meta-Hb em 40 amostras de sangue de genótipos AA e AS de acordo com o período (24 horas, 48 horas, 72 horas e 168 horas: 1 semana)

	24 horas (%)	48 horas (%)	72 horas (%)	1 semana (%)	genótipo
1	0,0	0,5	0,0	5,0	AA
2	0,0	1,2	1,3	5,0	AA
3	0,0	1,2	0,0	3,7	AA
4	0,0	1,0	2,1	5,0	AA
5	0,0	0,6	0,0	2,9	AA
6	0,0	1,2	0,6	2,1	AA
7	0,0	2,8	8,3	9,4	AA
8	0,0	2,2	4,1	5,8	AA
9	0,0	3,4	6,6	9,3	AA
10	0,9	5,2	6,2	9,4	AA
11	2,0	5,7	5,7	6,6	AA
12	2,0	2,3	3,5	5,7	AA
13	1,0	3,1	3,3	5,7	AA
14	1,1	3,4	3,9	6,8	AA
15	2,0	4,1	4,7	7,2	AA
16	0,0	2,2	2,5	6,0	AA
17	1,1	1,2	2,0	6,0	AA
18	2,2	3,2	3,5	8,0	AA
19	2,2	3,7	5,4	9,0	AA
20	0,0	2,8	2,9	7,3	AA

23	1,2	2,3	2,2	5,8	AA
24	0,0	1,9	1,9	3,8	AA
25	0,0	0,9	0,9	2,8	AA
26	0,0	0,9	0,9	2,6	AA
27	0,0	1,2	1,5	7,2	AA
28	1,1	3,1	2,3	5,6	AA
29	3,7	6,4	10,0	11,5	AS
30	1,0	3,4	7,2	8,8	AS
31	6,1	6,3	11,0	11,7	AS
32	1,1	3,1	3,5	4,1	AS
33	2,3	6,25	6,25	8,5	AS
34	0,0	4,3	5,0	6,2	AS
35	1,2	3,4	3,4	9,5	AS
36	0,0	1,1	2,2	6,1	AS
37	1,7	1,7	2,4	10,2	AS
38	3,2	4,4	6,2	7,3	AS
39	2,6	3,6	5,4	6,0	AS
40	1,38	2,7	4,0	7,5	AS

