
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Nayara Alves Chaves

**Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de
eritrócitos falcêmicos**

Nayara Alves Chaves

Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de eritrócitos falcêmicos

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

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Orientador: Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

São José do Rio Preto - SP
2019

C512i

Chaves, Nayara Alves

Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de eritrócitos falcêmicos / Nayara Alves Chaves. -- São José do Rio Preto, 2019
99 f. : il., tabs.

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

Orientador: Danilo Grünig Humberto da Silva

Coorientadora: Claudia Regina Bonini Domingos

1. Bioquímica. 2. Genética humana. 3. Anemia falciforme. 4. Antioxidantes. 5. Bioenergética. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências
Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(s).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nayara Alves Chaves

Influência do desequilíbrio redox sobre o metabolismo energético de eritrócitos falcêmicos

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

Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

BANCA EXAMINADORA

Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – IBILCE

Profa. Dra. Rejane Maira Góes
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – IBILCE

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

São José do Rio Preto, 22 de fevereiro de 2019

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia (LHGDH), no Laboratório de Química Bio-Orgânica Ambiental (LQBOA) do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) de São José do Rio Preto e no Instituto de Química e Biociências da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais, Ricardo e Magda, por serem o meu ponto de referência, terem me orientado e apoiado em todas as decisões. Às minhas irmãs, Hellen e Carol, por serem as pessoas mais incríveis que eu conheço.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo fortalecimento e a oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos**, pela confiança, dedicação e paciência durante todos esses anos. Obrigada por ter me acolhido desde a iniciação científica e por todas as oportunidades que me proporcionou. Sou grata pelo conhecimento compartilhado e pelas responsabilidades que colocou a minha frente.*

*Ao meu orientador, **Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva**, por acreditar em mim, me incentivar e ser um dos meus maiores exemplos de pesquisador. Obrigada pela paciência, pela persistência e por me ensinar sobre dedicação, honestidade e disciplina na ciência.*

*Ao Prof. Dr. **Marcelo de Freitas Lima**, por permitir a minha presença em seu laboratório durante as análises. Sou grata também a todos os outros colaboradores, **Dra. Sayuri Miyamoto, Dr. Luis Eduardo Soares Netto e Me. Thiago Geronimo Pires Alegria**, que juntamente com o Danilo possibilitaram a realização desse trabalho.*

*À **Jéssika Okumura, Lidiane Torres e Patrícia Nascimento** que me receberam e desenvolveram os meus conhecimentos básicos sobre pesquisa, responsabilidade e disciplina. Tenho um carinho particular por cada uma de vocês.*

*Aos que passaram pelo **LHGDH** e contribuíram de alguma forma para que a rotina ficasse mais leve e prazerosa. Vocês estarão sempre presentes nas minhas lembranças. **Édis Belini, Gisele Carrocini, Jéssika Okumura, Larissa Venâncio, Luis Felipe, Mariana Salvarani, Nathalia Rossigalli, Patrícia Nascimento e Renan Garcia.***

*Às meninas da salinha, **Camila Zucchini, Gabi Martins, Letícia Orlandini, Letícia Sybuia e Jéssika Okumura**, pela amizade e pelos momentos compartilhados. Sou grata a Deus por nossos caminhos terem se cruzado.*

*Aos mais novos no **LHGDH** que, apesar do pouco tempo de convívio, são extremamente importantes. Sou grata pelas colaborações no laboratório e pelos momentos compartilhados. **Ana Clara Albertin, Caroline Mocci, Gabriela Castro, Flaviene Torres, Fernando Cornacini, Mariana Ishizava, Larissa Dias, Lucas Ramos, Pedro Arantes, Raphael Souza e Victoria Simões***

*Aos meus pais, **Ricardo e Magda** por comprarem os meus sonhos, acreditarem em mim e me encorajarem.*

*As minhas irmãs, **Hellen e Carol**, simplesmente por se importarem com minhas dores e por compartilharem as melhores risadas.*

*A meu namorado, **Dante**, por ser meu braço direito e meu melhor companheiro. Obrigada pela paciência, pelo incentivo e por torcer pelo meu sucesso.*

*As minhas amigas da graduação **Amanda Ravazzi, Camila Viol, Lucélia e Thainá Canalli**, pelos anos de amizade, dedicação e companheirismo.*

A todos os professores e amigos da graduação e pós-graduação, pelo convívio e aprendizado.

*À **Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de São José do Rio Preto (FAPERP)** pelo auxílio à pesquisa (118/2017).*

*O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001*

Hoje eu estou certo de que nós somos os senhores do nosso destino; de que a tarefa que foi colocada diante de nós não está acima das nossas forças; de que as dores e provações não estão acima da nossa resistência. Enquanto tivermos fé na nossa causa e um desejo indestrutível de vencer, a vitória não nos será negada. ”
Winston Churchill

RESUMO

Os eritrócitos humanos são células únicas, altamente abundantes e uma das mais especializadas no organismo humano. A principal função dessas células consiste no transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões aos tecidos e o transporte de gás carbônico (CO_2) dos tecidos aos pulmões por meio da molécula de hemoglobina (Hb). Apesar de relativamente estável, essa proteína pode se auto oxidar em metahemoglobina (MetHb) e gerar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual é um importante gatilho do processo oxidativo. Além de fontes endógenas, os eritrócitos são expostos a uma série de estressores ao longo da circulação. Apesar disso, a fim de prevenir ou atenuar o estresse oxidativo gerado, essas células são equipadas com um sistema antioxidante eficaz e autossustentável, intimamente relacionado com as vias da glicólise, das pentoses fosfato, da metahemoglobina redutase (MetHb redutase) e dos nucleotídeos, as quais contribuem para a manutenção do balanço redox e energético nos eritrócitos. Entretanto, algumas condições podem sobrecarregar esse mecanismo de defesa citado, como a anemia falciforme (AF). Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar biomarcadores do metabolismo redox, glicolítico, via das pentoses fosfato, via da metHb redutase e metabolismo de nucleotídeos, a fim de melhor compreender como as células falciformes lidam com a ruptura da homeostase metabólica, buscando marcadores de lesão oxidativa mais específicos para AF e novos e promissores antioxidantes para futuras investigações como terapia alternativa. Para isso, rigorosos critérios de exclusão foram adotados para obtenção dos grupos estudados, os quais foram compostos por 10 indivíduos sem hemoglobinopatias e 10 pacientes com AF. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram processadas para separação do plasma e preparação dos hemolisados específicos. Posteriormente, foram avaliados biomarcadores bioquímicos por métodos espectrofotométricos, cromatográficos e por imunomarcação. Diante disso, foi confirmado que os eritrócitos falciformes sobrecarregam o sistema de defesa antioxidante, levando a uma capacidade antioxidante deficiente que contribuiu significativamente para a hemólise. Dentre os antioxidantes avaliados, destaca-se a ergotioneína que apresentou redução de 2 vezes na AF, e correlações com os marcadores do metabolismo dos eritrócitos, configurando uma promissora alternativa terapêutica antioxidante para o tratamento da AF. Foi avaliado um marcador específico de oxidação de colesterol (ChAld) e, que também é um importante mediador de respostas inflamatórias, o qual apresentou níveis pelo menos duas vezes maiores nos pacientes. Finalmente, foi observado que as células falciformes parecem escapar ou de alguma forma alterar o mecanismo de deslocamento entre a glicólise e a via das pentoses fosfato bem descrita para eritrócitos saudáveis, mantendo ambas as vias reguladas positivamente.

Palavras-chave: metabolismo eritrocitário, hemoglobina S, capacidade antioxidante.

ABSTRACT

Red blood cells (RBCs) are unique, highly specialized and the most abundant cells in the human organism. Their primary function is transportation of the respiratory gases, oxygen (O₂) and carbon dioxide (CO₂) between lungs and tissues through the hemoglobin (Hb). Although relatively stable, this protein can auto oxidize in methahemoglobin (MetHb) and generate the superoxide radical (O₂ • -), which is an important trigger of the oxidative process. In addition to endogenous sources, erythrocytes are exposed to a number of stressors along the circulation. Despite this, in order to prevent or attenuate the oxidative stress generated, these cells are equipped with an effective and self-sustaining antioxidant system, closely related to the glycolysis, pentose phosphate pathway (PPP), metHb reductase pathway and nucleotide metabolism, which contribute to the maintenance of redox and energetic balance in erythrocytes. However, some conditions may overload this defense mechanism, such as sickle cell anemia (SCA). Thus, this study aimed to evaluate biomarkers of redox metabolism, glycolysis, PPP, metHb reductase pathway and nucleotide metabolism, in order to better understand how sickle cells deal with the rupture of metabolic homeostasis, seeking lesion markers more specific for SCA and promising antioxidants, for investigations as alternative therapy. For this, were adopted strict exclusion criteria to obtain the studied groups, which were composed of 10 individuals without hemoglobinopathies and 10 patients with SCA. Immediately after collection, the blood samples were processed for plasma separation and preparation of the specific hemolysates. Subsequently, biochemical biomarkers were evaluated by spectrophotometric, chromatographic and immunolabeling methods. In view of this, it was confirmed that sickle cells overloads the antioxidant defense system, leading to a deficient antioxidant capacity that contributed significantly to the hemolysis. Among the antioxidants evaluated, ergothionein showed a reduction of 2-fold in SCA, and correlations with markers of erythrocyte metabolism, forming a promising alternative antioxidant therapy for the treatment of SCA. A specific cholesterol oxidation marker (ChAld) was evaluated, which is also an important mediator of inflammatory responses, which presented at least two-fold higher levels in the patients. Finally, it has been observed that sickle cells appear to escape or otherwise alter the mechanism of displacement between glycolysis and the well described phosphate pentoses pathway for healthy erythrocytes, keeping both pathways up-regulated.

Keywords: erythrocyte metabolism, hemoglobin S, antioxidant capacity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de eritropoiese.....	21
Figura 2. Representação da estrutura de uma molécula de Hb adulta.....	22
Figura 3. Efluxo de ON das membranas eritrocitária.....	23
Figura 4. Oxidação do colesterol.....	24
Figura 5. Eventos oxidativos intracelulares e mecanismos de proteção.....	29
Figura 6. Estimava de nascimentos de indivíduos com AF.....	31
Figura 7. Complicações clínicas na AF.....	32
Figura 8. Alterações genéticas na Hb.....	34
Figura 9. Polímero da Hb S e deformação na membrana	34
Figura 10. Mecanismo de isquemia/reperfusão e nucleotídeos.....	39
Figura 11. Fluxograma das metodologias empregadas.....	51
Figura 12. Separação metabólica de eritrócitos falciformes e normais.....	54
Figura 13. Resistência osmótica, marcadores de hemólise e enzima de membrana eritrocitária alterada em AF.....	55
Figura 14. Marcadores de estresse oxidativo plasmáticos.....	56
Figura 15. Padrão de consumo de antioxidantes em células falciformes.....	57
Figura 16. Prx2 reduzida e oxidada em pacientes com AF.....	58
Figura 17. Padrão aumentado de marcadores metabólicos em pacientes com AF.....	59
Figura 18. Níveis de nucleotídeos e metabólitos de adenina.....	60
Figura 19. Relações entre os nucleotídeos da adenina.....	61
Figura 20. Efeitos da proteção antioxidante contra hemólise.....	62
Figura 21. Efeitos da proteção antioxidante contra o produto de oxidação.....	63
Figura 22. Interdependência do metabolismo dos eritrócitos.....	64
Figura 23. Interdependência de antioxidantes e metabólito de nucleotídeos.....	64
Figura 24. Interdependência do ChAld, metabolismo dos eritrócitos e marcador de hemólise.....	65
Figura 25. Conclusões sintetizadas.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização do grupo de estudo (AF)	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina difosfato
AEC	Carga energética de adenina
AF	Anemia Falciforme
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Ch	Colesterol
ChAld	3 β -hidroxi-5 β -hidroxi-B-norcholestano-6 β -carboxaldeído
CSec	Hidroxi-5-oxo-5,6-secocolestan-6-al
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5-5' ditiobis (2-nitrobenzoico)
desoxiHb	Hb desoxigenada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERT	Ergotioneína
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GLM	<i>General Linear Models</i> (Teste estatístico)
GPx	Glutational Peroxidase
GR	Glutational Redutase
GSH	Glutational Reduzida
GST	Glutational-S-transferase
GSSG	Glutational dissulfeto
G6P	Glicose 6-fosfato
G6PDH	Glicose 6-fosfodesidrogenase
Hb	Hemoglobina
Hb A	Hemoglobina adulta ou Hemoglobina A
HBB	Gene da beta globina

Hb Ferril	HbFe(IV)=O
Hb S	Hemoglobina S
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-ECD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector eletroquímico
HU	Hidroxiureia
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina-1 beta (proteína)
IL-6	Interleucina-6 (proteína)
IL-8	Interleucina-8 (proteína)
LCR	Região controladora do locus
LDH	Lactato desidrogenase
MDA	Malondialdeído
MetHb	Metahemoglobina
MTBE	Éter metil- <i>terc</i> -butílico
MPs	Micropartículas
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
OCTN1	Transportador intestinal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OxiFerrilHb	•HbFe(IV)=O
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Fosfatidiletanolamina
PFK-1	Fosfofrutocinase-1
pH	Potencial Hidrogênio
PS	Fosfatidilserina

Prx	Peroxirredoxina
REF	Grupo referência
RFLP	Restrição de polimorfismo de fragmento único
SM	Esfingomielina
SOD	Superóxido Dismutase
VIP	Projeção de variáveis importantes
VCAM 1	Molécula de adesão celular vascular-1
TAC	Capacidade antioxidante total
tBOOH	Hidroperóxido de <i>terc</i> -butil
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNB	5-tio-2-nitrobenzoico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - alfa (proteína)
TRx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Redutase
TrxS ₂	Tiorredoxin oxidada
Trx (SH) ₂	Tiorredoxina reduzida
UHPLC-PDA	Cromatografia líquida de ultra desempenho acoplada a um detector de fotodiodo
XD	Xantina Desidrogenase
XO	Xantina Oxidase
2,3-BFG	2,3-bifosfoglicerato
4- HNE	4-hidroxi-2-nonenal

SÍMBOLOS

ζ	Gene zeta
α	Gene alfa
ε	Gene épsilon
δ	Gene delta
β	Gene beta
<i>g</i>	Giros

LISTAS DE FÓRMULAS QUÍMICAS

CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ O	Molécula de água
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
NaOH	Hidróxido de sódio
ON	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ •-	Radical ânion Superóxido
¹ O ₂	Oxigênio molecular singlete
O ₃	Ozônio
•OH	Radical Hidroxila
Fe	Ferro

UNIDADES

cm	Centímetros
g	Gramas
g/dL	Gramas por decilitro
L	Litros
M	Molar
mg/mL	Miligramas por mililitros
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar

nm	Nanômetro
ng/μL	Nanogramas por microlitros
U	Unidade
U/L	Unidades por litro
U/mL	Unidades por mililitros
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Eritrócito Humano.....	21
1.1.1	Hemoglobina Humana.....	22
1.1.2	Membrana Eritrocitária Normal	22
1.1.3	Fontes Oxidativas nos Eritrócitos Normais	25
1.1.4	Proteção Antioxidante nos Eritrócitos Normais	26
1.1.5	Metabolismo Energético e vias associadas dos eritrócitos normais	30
1.2	Eritrócito Falciforme	31
1.2.1	Hemoglobina S (Hb S).....	32
1.2.2	Membrana Eritrocitária Falcêmica	35
1.2.3	Fontes Oxidativas nos Eritrócitos Falcêmicos	36
1.2.4	Proteção Antioxidante nos Eritrócitos Falcêmicos.....	37
1.2.5	Metabolismo Energético e vias associadas dos eritrócitos falcêmicos.....	38
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo Geral	41
2.2	Objetivos Específicos	41
3	MATERIAL E MÉTODO.....	43
3.1	Casuística	43
3.2	Metodologia	44
3.2.1	Casuística e preparo de hemolisados.....	44
3.2.2	Marcadores de hemólise e de integridade de membrana.....	46
3.2.3	Antioxidantes	47
3.2.4	Enzimas e subprodutos metabólicos e quantificação de proteínas	49
3.2.5	Marcadores de lesão oxidativa	49
3.3	Análises Estatísticas	52
4	RESULTADOS	54
4.1	Separação metabólica de células falciformes e normais	54
4.2	Grau de hemólise e enzima da membrana eritrocitária	54
4.3	Marcadores de estresse oxidativo.....	55
4.4	Enzimas e subprodutos metabólicos	58
4.5	Principais associações de biomarcadores relacionadas à homeostase metabólica	61
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÕES.....	74
7	REFERÊNCIAS	77
8	ANEXOS.....	92
8.1	ANEXO A - Técnicas citológicas, eletroforéticas e cromatográfica para identificação da Hb S e caracterização dos haplótipos β^S	92

8.2	Anexo B: Parecer consubstanciado do CEP.....	96
-----	--	----

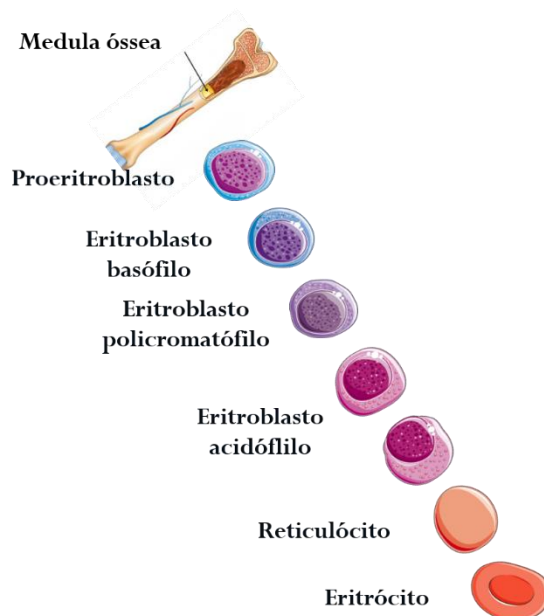
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Eritrócito Humano

Os eritrócitos humanos são células únicas, altamente especializadas e uma das mais abundantes no organismo humano (Pandey e Rizvi, 2011). Em indivíduos adultos saudáveis, o número destas na circulação excede $4 \times 10^{12}/L$, o que corresponde, aproximadamente, a um quarto do total de células presentes no corpo humano (Foller *et al.*, 2008). Sendo assim, em indivíduos com 5 L de sangue, mais de 10^{11} eritrócitos são produzidos e removidos a cada dia (Lang *et al.*, 2012). Essas células são produtos de um processo de maturação iniciado na medula óssea, onde as células-tronco hematopoiéticas originam proeritroblastos, os quais diferenciam-se em eritroblastos basófilos. Estes dão origem aos eritroblastos policromatófilos, os quais possuem alta atividade de atividade de síntese de hemoglobina (Hb) e ferro. Posteriormente, há transformação em eritroblastos acidófilos, nos quais há redução do núcleo e alta concentração de Hb. Em seguida, o núcleo é extrudido da célula dando origem aos reticulócitos, que possuem ainda resquícios de organelas como retículo endoplasmático, mitocôndrias e entre outros. Finalmente, os reticulócitos são lançados na circulação e maturados em eritrócitos maduros, os quais possuem alta concentração de Hb em seu interior. (Pandey e Rizvi, 2011) (Yawata, 2003). A figura 1 ilustra o processo de eritropoiese.

Figura 1. Representação esquemática do processo de eritropoiese.

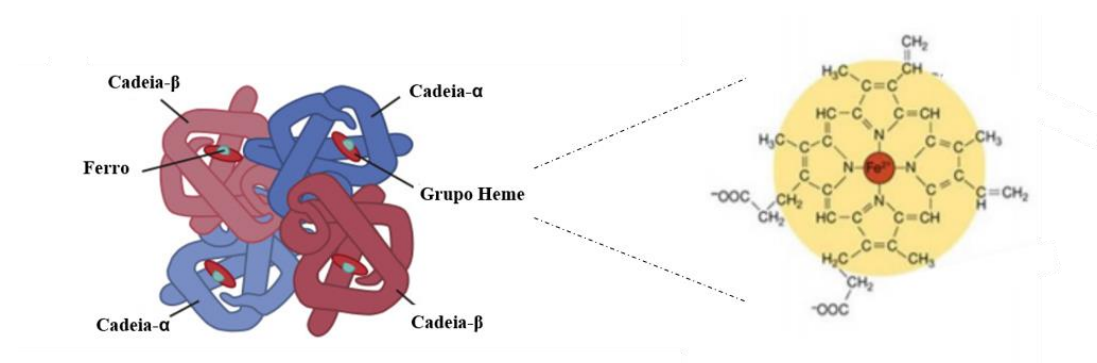


As células-tronco hematopoiéticas são diferenciadas em proeritroblastos, os quais sofrerão várias modificações que resultarão na formação do eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos e eritroblastos ortocromáticos/acidófilos, sucessivamente. Posteriormente, o núcleo é eliminado da célula originando os reticulócitos, os quais se tornam eritrócitos maduros e permanecem na circulação por aproximadamente 120 dias. (Figura: elaborada pelo autor).

1.1.1 Hemoglobina Humana

A principal função dos eritrócitos consiste no transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões aos tecidos e o transporte de gás carbônico (CO_2) dos tecidos aos pulmões, além de exercerem um papel importante na manutenção do equilíbrio ácido-base (Steinberg e Sebastiani, 2012). A proteína responsável por esse transporte é a Hb, a qual possui uma estrutura globular tetramérica com peso molecular de 64.458 Daltons e representa, aproximadamente, 90% do peso seco da célula vermelha (Aslan, 2000; Pandey e Rizvi, 2011). A estrutura desse tetrâmetro conta com quatro subunidades constituídas de duas frações: uma proteica e uma prostética, sendo a primeira composta por quatro cadeias globínicas, duas são do tipo alfa (α ou ζ) e duas do tipo beta (β , δ , G_γ , A_γ ou ϵ) (Sankaran e Weiss, 2015; Diepstraten e Hart, 2019). Enquanto que, o grupamento prostético é constituído pelo grupo heme, o qual possui o átomo de ferro (Fe) na forma bivalente (Fe^{2+}), que possui alta afinidade ao átomo de O_2 (Figura 2) (Manca e Masala, 2008; Schechter, 2008). Após ocorrer o acúmulo de Hb no eritrócito, ele adquire o formato de disco bicôncavo, o qual é mantido por uma eficiente organização estrutural da membrana (Yawata, 2003).

Figura 2. Representação estrutural da molécula de Hb adulta.



A Hb humana é um tetrâmero formado por duas cadeias globínicas do tipo α e duas do tipo β , associada a elas, tem-se o grupamento heme, o qual contém um átomo de ferro (Fe^{2+}) que se liga o O_2 e, permite seu transporte dos pulmões aos tecidos. Fonte: (Adaptado de DIEPSTRATEN, S. e HART, A., 2018).

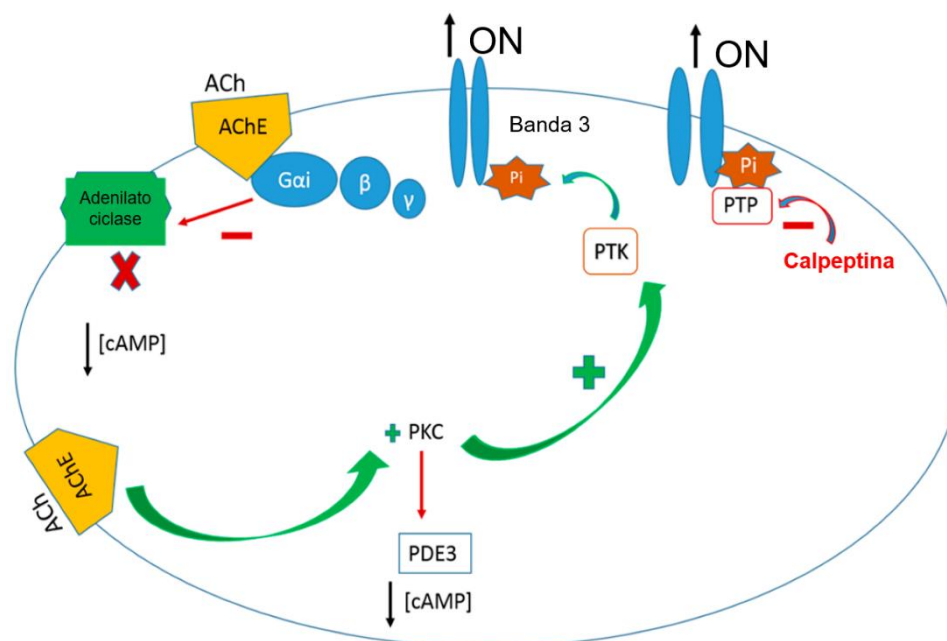
1.1.2 Membrana Eritrocitária Normal

A composição e organização estrutural da membrana do eritrócito permite que ele sofra grandes deformações reversíveis enquanto mantém sua integridade estrutural, durante seu tempo de vida, aproximadamente 120 dias (Mohandas e Gallagher, 2008) (Yawata, 2003). Essa membrana é constituída por uma mistura complexa de proteínas,

lipídios, água e carboidratos, sendo o primeiro, o principal componente (39,5%), seguido por lipídios (35,1%), água (19,5%) e, finalmente, carboidratos (5,8%) (Farag e Alagawany, 2018). As proteínas de membrana são altamente específicas e possuem certa heterogeneidade, dentre elas destaca-se as proteínas transportadoras, tais como: proteína da banda 3, aquaporina 1, Glut1, cotransportador de K-Cl, Canal de Gardos, dentre outras (Mohandas e Gallagher, 2008). Além disso, destaca-se uma importante enzima de membrana do eritrócito humano – acetilcolinesterase (AChE) (Wright e Plummer, 1973; Gupta, 2017).

Estudos têm evidenciado que a atividade desta enzima diminui com o envelhecimento do eritrócito, indicando aumento na disponibilidade de acetilcolina (ACh), o que influencia no metabolismo dos eritrócitos e o transporte de O₂ (Mesquita *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003). Além disso, muitos trabalhos atribuíram à ACh um papel significativo em eventos eritrocitários, relacionados ao metabolismo do óxido nítrico (ON) (Eluwa, 1990; Carvalho *et al.*, 2004). Saldanha e colaboradores (2017) relataram que o complexo enzimático ACh-AChE pode ativar a proteína cinase C (PKC), que fosforila a proteína tirosina-cinase (PTK), e esta, por sua vez, fosforila a proteína da banda 3 da membrana, que se torna capaz de receber ON em seu grupo tiol, permitindo o efluxo de ON dos eritrócitos, como ilustrado na figura 3 (Saldanha, 2016; 2017).

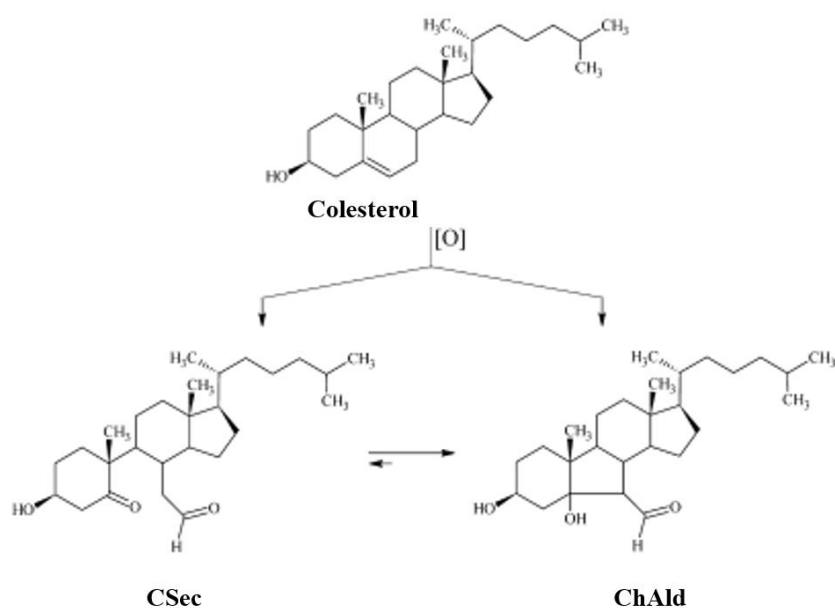
Figura 3. Efluxo de ON das membranas eritrocitárias.



O complexo enzimático ACh/AChE ativa a proteína cinase C, que fosforila a proteína tirosina-cinase e esta, por sua vez, fosforila a proteína da banda 3. Dessa forma, a proteína da banda 3 torna-se capaz de eliminar ON da célula. Fonte: (SALDANHA *et al.*, 2017).

Além de proteínas, a membrana conta ainda com um sistema lipídico eficiente e extremamente importante para manutenção da célula (Kulig *et al.*, 2016). Com relação a esses componentes, destaca-se o colesterol, o qual exerce um importante papel na fluidez e organização das biomembranas (Kucuk, 1992). Entretanto, as espécies reativas de oxigênio (ERO) podem promover a oxidação desse componente e gerar uma série de produtos oxidativos, como hidroperóxidos, epóxidos, cetonas e aldeídos (Kulig *et al.*, 2016; Pataj *et al.*, 2016). Nos últimos anos, tem-se evidenciado a formação de aldeídos de colesterol, como o hidroxi-5-oxo-5,6-secocolesterol-6-al (CSec) e o produto de sua reação aldólica: 3β-hidroxi-5β-hidroxi-B-norcholestan-6β-carboxaldeído (ChAld). Esses são formados, principalmente, durante a oxidação do colesterol mediada por ozônio (O_3) e oxigênio molecular singlete (1O_2) (Miyamoto, 2003). A figura 4 representa as estruturas químicas dos aldeídos de colesterol citados.

Figura 4. Oxidação do colesterol.



A oxidação não enzimática do colesterol, favorecida pela ação de ERO pode gerar o produto CSec e seu derivado por uma reação aldólica, ChAld. Fonte: (GENARO-MATOS et al, 2013).

Outros importantes componentes da membrana lipídica são os fosfolípidos, os quais são distribuídos assimetricamente ao longo da bicamada lipídica, com os fosfolípidos amino (fosfatidilserina [PS] e fosfatidiletanolamina [PE]) no interior e fosfolípidos contendo colina (fosfatidilcolina [PC] e esfingomiéline [SM]) externamente (Wood, 1996). Essa assimetria lipídica é uma propriedade disseminada das membranas eucarióticas e desempenha um papel crítico na interação normal da célula com seu ambiente externo (Yawata, 2003). Uma vez que essas interações propiciam elasticidade,

flexibilidade e deformidade, que são fundamentais para a manutenção da integridade estrutural e conferem ao eritrócito a capacidade de deformação durante a passagem por capilares pequenos, bem como a restauração da sua forma bicôncava normal, sem perda de integridade da membrana celular (Pandey e Rizvi, 2011; Farag e Alagawany, 2018). Entretanto, essa interação entre os componentes de membrana pode ser danificada, resultando em modificações na membrana e consequente diminuição na funcionalidade e sobrevivência dos eritrócitos (Mohandas e Gallagher, 2008).

As modificações na membrana dos eritrócitos podem ser ocasionadas por auto oxidação de Hb instáveis, as quais alteram a estrutura e função da membrana e podem gerar hemicromos – produtos da desnaturação oxidativa da Hb (Voskou *et al.*, 2015). Esses produtos possuem alta afinidade pelo domínio citoplasmático da banda 3 e medeiam a sua reticulação oxidativa através de ligações dissulfeto (Pantaleo *et al.*, 2008). Além disso, em condições de estresse oxidativo, após a oxidação da banda 3, as tirosinas cinases fosforilam o domínio citoplasmático da banda 3, o que resulta na dissociação das proteínas do citoesqueleto e formação de micropartículas (Pantaleo *et al.*, 2008).

Situações de estresse oxidativo podem ainda, alterar proteínas do citoesqueleto, como a espectrina – um dos principais alvos das ERO – sua oxidação ocasiona o rompimento na interação com outras proteínas do citoesqueleto, como a actina e a proteína 4.1 (Shinar, 1989). Diante disso, a estabilidade da membrana e sua interação com o citoesqueleto se torna prejudicada e acarreta o aumento da fragilidade na membrana da célula (Ney, 1990). Essas fontes oxidativas podem ainda prejudicar a homeostase catiônica, por meio de elevadas concentrações de Ca^{2+} , ativação do Canal de Gardos, eliminação de K^+ e consequente remoção de água (Mohandas e Gallagher, 2008). De maneira semelhante, espécies pró-oxidantes podem interferir na atividade do cotransportador K-Cl, acarretando a eliminação de K^+ , entrada de Cl^- e água, o que resulta na ruptura da membrana celular e hemólise (Ney, 1990; Mohandas e Gallagher, 2008). Além das ERO, uma série de outros componentes oxidantes podem interferir na homeostase eritrocitária (Yawata, 2003).

1.1.3 Fontes Oxidativas nos Eritrócitos Normais

Dentre as fontes oxidantes para o eritrócito normal, destaca-se o processo de desnaturação oxidativa da Hb, que embora a sua forma oxigenada [Hb(FeII)O_2] seja considerada relativamente estável, a mesma pode se auto oxidar em metahemoglobina (metHb) [Hb(FeIII)] e gerar radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o qual é um importante gatilho do

processo oxidativo (Aslan, 2000; Pandey e Rizvi, 2011; Voskou *et al.*, 2015; Carrell, 1975). Dessa forma, o processo de auto oxidação da Hb é quase inteiramente responsável pelas ERO dentro dos eritrócitos, além disso, a auto oxidação da glutathiona reduzida (GSH), juntamente com a da Hb são, provavelmente, as maiores fontes de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) endógenas (Benfeitas *et al.*, 2014) (Voskou *et al.*, 2015).

Além da Hb, o Fe e o heme são agentes altamente oxidantes na célula, uma vez que o Fe na forma livre ou ligado ao heme e Hb, pode atuar nas reações de Fenton e Haber-Weiss, gerando o radical hidroxila ($\bullet OH$) altamente reativo (Ferreira *et al.*, 2008). As reações de oxidação promovidas pelo heme ocorrem, principalmente, devido a sua capacidade de interagir com lipídios e proteínas de membrana (Belcher, 2010; Voskou *et al.*, 2015). Esse processo de peroxidação lipídica e oxidação proteica podem resultar em desorganização lipídica e deformidade celular, o que pode prejudicar a passagem dos eritrócitos pelos capilares e então resultar em um transporte de O_2 ineficiente aos tecidos (Pries, 1996). Além disso, a desorganização lipídica pode acarretar no rompimento da assimetria dos fosfolipídios e assim, a exposição de PS à membrana externa, sinalizando que elas podem ser removidas por macrófagos (Mohandas e Gallagher, 2008).

Além das fontes endógenas de espécies oxidantes, durante o período de vida dos eritrócitos, eles são expostos a diferentes estressores ao longo do sistema circulatório (Foller *et al.*, 2008). Em média, as células vermelhas do sangue percorrem a medula renal mais de uma vez por hora, onde sofrem choque osmótico; e são expostas a uma variedade de xenobióticos presentes na circulação (Lang, 2005; Pandey e Rizvi, 2011; Perrone *et al.*, 2012). A cada minuto, os eritrócitos passam pelos pulmões, onde podem sofrer com estresse oxidativo, acarretado pelo desequilíbrio entre fontes oxidantes e antioxidantes (Foller *et al.*, 2008). Ainda, os eritrócitos atravessam por microcapilares, muitas vezes menores que os mesmos, onde sua arquitetura é drasticamente alterada (Van Wijk e Van Solinge, 2005).

1.1.4 Proteção Antioxidante nos Eritrócitos Normais

A fim de prevenir ou atenuar o estresse oxidativo gerado na célula, os eritrócitos são equipados com um sistema antioxidante eficaz e autossustentável que os possibilita eliminar radicais livres, fornecendo proteção antioxidante, enzimática e não enzimática (Silva, D. G. *et al.*, 2013; Van Zwieten *et al.*, 2014). O sistema de defesa enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), que permite que o radical $O_2\bullet^-$ proveniente da auto oxidação da Hb seja dismutado em O_2 e H_2O_2 . Por sua vez, a catalase (CAT) neutraliza o

H₂O₂, transformando-o em H₂O e O₂ (Van Zwieten *et al.*, 2014). Outra enzima que contribui para a redução de lipo- e hidroperóxidos orgânicos é a glutathiona peroxidase (GPx), usando GSH como cofator (Mannervik, 1987). A GSH também atua como cofator das glutathiona-S-transferases (GST) na desintoxicação de xenobióticos (Van Zwieten *et al.*, 2014). Além disso, este tiol protege importantes proteínas da membrana contra a oxidação, como a espectrina (Carrell, 1975), favorecendo a manutenção da integridade e flexibilidade da membrana eritrocitária (Carrell, 1975). É também uma parte integrante do *pool* de grupo sulfidrila que mantém a Hb em seu estado reduzido (Aslan, 2000).

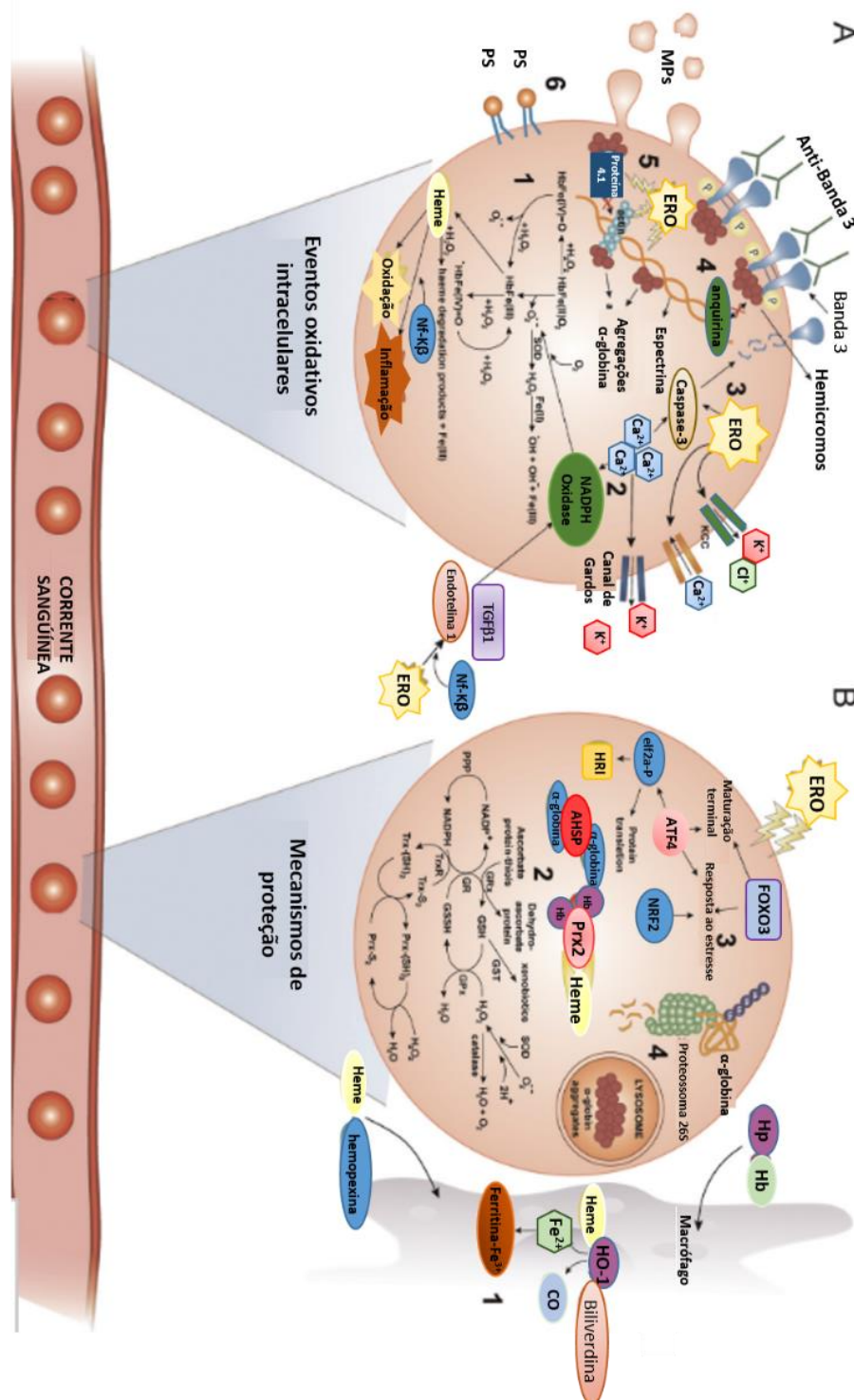
Sob condições associadas à geração excessiva de oxidantes, podem ser gerados altos níveis de dissulfeto de glutathiona (GSSG), passíveis de externalização para evitar possível citotoxicidade. Este mecanismo pode ser responsável pela diminuição dos níveis de GSH nos eritrócitos (Lang, 2005; Foller *et al.*, 2008). No entanto, o GSSG pode ser revertido para sua forma reduzida pela ação da glutathiona redutase (GR), a qual usa o NADPH, como agente redutor (Lang, 2005; Foller *et al.*, 2008; Perrone *et al.*, 2012). Da mesma forma, a tioredoxina redutase (TrxR) usa NADPH da via das pentoses fosfato para reduzir a tioredoxina oxidada (TrxS₂) à sua forma ditiol (Trx (SH)₂), sendo esta última responsável pela redução das peroxirredoxinas (Prxs) (Reiter *et al.*, 2002; Perrone *et al.*, 2012).

As Prxs caracterizam-se por serem antioxidantes capazes de reduzir H₂O₂, hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito, devido à presença de um resíduo de cisteína altamente reativo presente em seu sítio catalítico (Low *et al.*, 2008; Rhee, 2016). Nos mamíferos existem seis isoformas de Prxs, as quais podem ser encontradas no citosol (Prx 1-2 e 4-6), complexo de Golgi (Prx 1-4), mitocôndria (Prx 3 e Prx 5), peroxissomo (Prx 5) e no núcleo (Prx 1) (Wood Z, 2003). Destas, a Prx 2 é a terceira proteína mais abundante nos eritrócitos e um dos principais agentes citoprotetores eritrocitários contra o estresse oxidativo (Rhee, 2016). Em condições de altas concentrações de peróxido, as Prx 2 tornam-se superoxidadas, o que pode resultar na perda da função de peroxidase dessas enzimas, visto que, a TrxR não pode reduzir estes intermediários (Jang *et al.*, 2004). Sabe-se ainda que, a Prx2 pode transcolar-se para a membrana através da ligação ao domínio citoplasmático da banda 3, provavelmente, a fim de proteger a banda 3 e as proteínas associadas contra danos oxidativos (Matte *et al.*, 2013).

Outro antioxidante importante para os eritrócitos é a ergotioneína (ERT), a qual é o segundo tiol mais abundante nos eritrócitos, devido à presença de um transportador de membrana (OCTN1), que possibilita a entrada de ERT nos eritrócitos (Kobayashi *et al.*,

2004; Paul e Snyder, 2010; Kuypers, 2014). Esse aminoácido possui ação antioxidante na eliminação de radicais livres e outras atividades citoprotetoras (Paul e Snyder, 2010). Os mamíferos obtém a ERT exclusivamente por meio da dieta, sendo alguns fungos e bactérias os únicos organismos conhecidos por sintetiza-la (Cheah e Halliwell, 2012). A figura 5 ilustra os principais eventos oxidativos intracelulares, bem como os mecanismos de proteção nos eritrócitos.

Figura 5. Eventos oxidativos intracelulares e mecanismos de proteção.



A desnaturação oxidativa da Hb resulta na produção de ERO, heme livre e Fe, este age como um reagente na reação de Fenton e Habber-Weiss para geração de $\bullet\text{OH}$. Já o grupamento heme livre, promove reações de oxidação e possui um efeito pró-inflamatório. As ERO promovem ainda a oxidação da proteína 4.1, actina e espectrina, resultando em danos na interação de membrana, além disso pode ocorrer a exposição de PS, que acarreta ruptura na organização da membrana (A). Diante dos danos gerados pelas ERO e outras fontes oxidativas, a célula conta um eficiente sistema antioxidante (B). Fonte: (Adaptado de VOSKOU et al, 2015).

1.1.5 Metabolismo Energético e vias associadas dos eritrócitos normais

Além do sistema antioxidante, os eritrócitos contam com um sistema eficiente de geração de energia, o qual depende unicamente da degradação anaeróbica da glicose através da via glicolítica, gerando adenosina trifosfato (ATP), NADH e piruvato, este no caso dos eritrócitos será convertido em lactato pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Davidson Wd, 1972). O ATP obtido da glicólise pode ser utilizado por bombas de íons de membrana e na manutenção da integridade eritrocitária, enquanto que o NADH é utilizado para a redução da metHb, mantendo essa proteína no estado ferroso (Van Wijk e Van Solinge, 2005). Aproximadamente, de 70-90% dessa glicose é metabolizada pela via glicolítica para produzir ATP (Van Zwieten *et al.*, 2014). A glicose remanescente é direcionada para a via das pentoses fosfato, cuja função principal é a produção de potencial redox na forma de NADPH (Beutler, 1971), por sucessivas reações de oxidação catalisadas pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e pela fosforilgluconato desidrogenase (Beutler, 1971). A G6PDH catalisa a primeira etapa irreversível da via das pentoses fosfato, que produz a primeira molécula de NADPH. Por este motivo, ela tem um papel crucial no estresse oxidativo pela captura de ERO. Além disso, a atividade dessa enzima deve ser rigidamente controlada, uma vez que ela desloca diretamente a via oxidativa, regula a glicólise e o fluxo para a via das pentoses fosfato (Akram *et al.*, 2019).

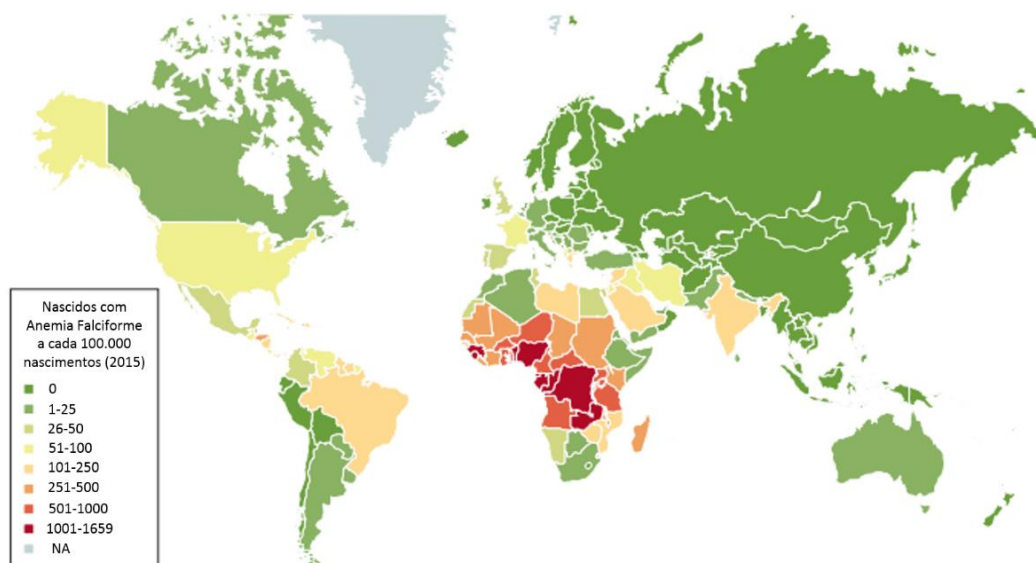
Os eritrócitos possuem ainda, um metabolismo de nucleotídeos que auxilia na manutenção do balanço energético nos eritrócitos, através do ciclo metabólico das purinas (Yeung *et al.*, 2018). Além da manutenção do balanço energético, o ATP pode ser utilizada pelos eritrócitos para manter a estabilidade osmótica e as proteínas da rede esquelética da membrana, possibilitando assim a manutenção do formato das membranas e o controle na deformação (Farag e Alagawany, 2018). Sabe-se que em condições fisiológicas normais, a adenina intracelular é proveniente da hidrólise da S-adenosil-homocisteína e do catabolismo do ATP à adenosina 5'-difosfato (ADP) e depois à adenosina 5'-monofosfato (AMP), que é posteriormente catalisado para produzir adenosina (Yeung *et al.*, 2018). Externamente, as concentrações de adenosina são mantidas muito baixas devido à rápida absorção pelos transportadores de nucleotídeos e também pelo catabolismo a outros metabólitos da oxipurina, como hipoxantina e ácido úrico (Farthing *et al.*, 2015). Internamente, em situações de hipóxia ou estresse celular pode ocorrer o acúmulo de hipoxantina e ácido úrico nas células (Castilhos *et al.*, 2017a).

1.2 Eritrócito Falciforme

Entretanto, várias condições clínicas podem sobrecarregar o metabolismo energético, nucleotídico e sistema de defesa antioxidante dos eritrócitos normais, como por exemplo: a anemia falciforme (AF). Essa doença, caracteriza-se por ser uma das hemoglobinopatias mais prevalentes no mundo (Kato *et al.*, 2018). A incidência de nascimentos com AF na África subsaariana foi estimada em, aproximadamente, 230.000 em 2010, o que corresponde a cerca de 75% dos nascimentos com AF em todo o mundo (Piel, F. B. *et al.*, 2013; Piel, Frédéric B. *et al.*, 2013). Enquanto que no Brasil, a incidência de recém-nascidos com AF varia entre os estados, refletindo a heterogeneidade da população brasileira. Em 2014, a incidência de AF foi de 1 em 650 recém-nascidos rastreados no estado da Bahia, 1 em 1.300 no estado do Rio de Janeiro e 1 em 13.500 no estado de Santa Catarina (Saúde, 2014). Em 2016, constatou-se que em todo o país, 1.071 recém-nascidos tinham AF e mais de 60.000 eram heterozigotos para o alelo β^S (Braga *et al.*, 2016). A Figura 6 ilustra as estimativas de nascimentos com AF no mundo.

Nessa afecção, devido a mudanças genéticas e bioquímicas o eritrócito normal é alterado à eritrócito falciforme, o qual é mais frágil, suscetível a danos oxidativos, e altamente instável, com uma vida útil reduzida em $\geq 75\%$, devido a presença da Hb S (Quinn *et al.*, 2016).

Figura 6. Estimava de nascimentos de indivíduos com AF no mundo.

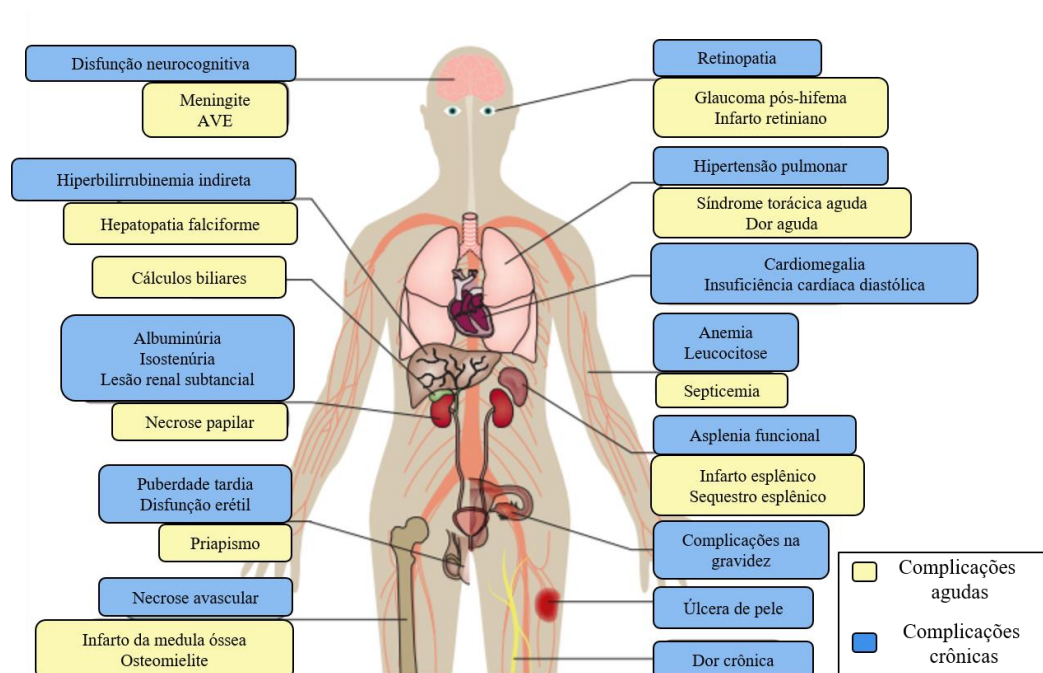


Números estimados de nascimentos com falciforme anemia por 100.000 nascimentos por país em 2015. As estimativas são derivadas de dados de prevalência publicados por (Piel, Frédéric B. *et al.*, 2013). Fonte: (Adaptado de KATO *et al.*, 2018).

1.2.1 Hemoglobina S (Hb S)

A hemoglobina S (Hb S) é causada por uma mutação pontual (*HBB*:c.20A>T; rs334) no gene da beta (β)-globina (*HBB*) (Ballas *et al.*, 2012). Essa mutação leva à troca do vigésimo nucleotídeo, adenina por timina ($GAG \rightarrow GTG$), o que resulta na substituição do ácido glutâmico (características hidrofílicas) por valina (características hidrofóbicas), na sexta posição da cadeia (*HBB*^{glu6val}), o que acarreta em características estruturais e bioquímicas diferentes da Hb normal (Ballas *et al.*, 2012; Steinberg e Sebastiani, 2012). Quando herdada em homozigose (Hb SS) há ocorrência da AF, a qual se caracteriza por ser uma anemia hemolítica hereditária autossômica recessiva (Kato *et al.*, 2018). A fisiopatologia dessa doença é complexa e multissistêmica caracterizada por complicações agudas e crônicas (Figura 7). Avanços e cuidados médicos gerais, diagnóstico precoce e tratamento levaram a melhorias substanciais na expectativa de vida de indivíduos com AF em países de alta renda. No entanto, mesmo com o melhor atendimento, a expectativa de vida desses indivíduos ainda é reduzida em cerca 30 anos (Anie, 2005; Weatherall, 2011).

Figura 7. Complicações clínicas na Anemia Falciforme.



Dentre as complicações agudas em indivíduos com AF, a crise de dor é a mais comum, e assim como as demais complicações agudas, pode ocasionar disfunção nos órgãos e morte precoce. Fonte: (Adaptado de KATO, 2018).

Devido às características estruturais e bioquímicas alteradas da Hb S, em condições de baixa oxigenação, acidose ou desidratação, essa Hb sofre mudanças

conformacionais (Kato *et al.*, 2018). Isso ocorre devido ao aminoácido valina tentar se estabilizar em meio hidrofílico, formando interações com resíduos hidrofóbicos de outra Hb S-desoxigenada dando origem a cristais e, com a agregação destes aos polímeros, há o rompimento do citoesqueleto e origem da célula falcizada (Steinberg e Sebastiani, 2012). Sendo assim, na presença de O₂ as células mantêm seu formato bicôncavo normal e em situações de baixa oxigenação, elas tendem a se polimerizar, gerando um ciclo de polimerização/despolimerização, o qual não é permanente, mas o momento e os motivos pelos quais ele é interrompido, não é bem descrito (Kato *et al.*, 2018) (Figura 8).

Esse processo de polimerização da Hb S pode ser desencadeado por diversos mecanismos, dentre eles, a afinidade reduzida da Hb S ao O₂ quando comparado à Hb A (Ballas *et al.*, 2012). Além disso, a afinidade ao O₂ pela Hb S é ainda mais reduzida pela ação do intermediário glicolítico presente em altas quantidades nos eritrócitos falciformes: 2,3 bifosfoglicerato (2,3-BFG), o qual por interação com subunidades de β -globina desoxigenadas, reduz a afinidade da Hb por O₂ (Rogers *et al.*, 2013). Sabe-se ainda que, eritrócitos falcêmicos possuem elevada atividade da esfingosina cinase, a qual eleva os níveis de esfingosina-1-fosfato, e este intermediário também diminui a afinidade da Hb S ao O₂ e desencadeia a polimerização (Zhang *et al.*, 2014). Ainda, devido à homeostase catiônica anormal dos eritrócitos falcêmicos, vários canais de membrana tornam-se disfuncionais, como o canal de Gardos e o cotransportador K-Cl, nos quais há perda de K⁺, desidratação, altos níveis de Hb S e consequente polimerização (Figura 9) (Mohandas e Gallagher, 2008).

1.2.2 Membrana Eritrocitária Falcêmica

Em decorrência dos ciclos recorrentes de polimerização/despolimerização, ocorre uma desregulação na assimetria dos fosfolípidos de membrana, o que afeta o citoesqueleto e propicia à exposição de epítomos protéicos e lipídicos como a PS e CD36, (Frenette e Atweh, 2007). Além disso, os polímeros e a oxidação da Hb S podem afetar proteínas de membrana com funções estruturais, especialmente o domínio citoplasmático da proteína banda 3, o qual pela presença de hemicromos pode ocasionar a dissociação de proteínas do citoesqueleto por ruptura de ligação à anquirina (Mannu, 1995). Pode ocorrer ainda, a oxidação da espectrina, actina e proteína 4.1 em uma taxa superior à que comumente ocorre em eritrócitos saudáveis (Mohandas e Gallagher, 2008).

Em razão do estresse oxidativo acentuado na AF, as membranas eritrocitárias são constantemente afetadas por ERO, as quais podem alterar e destruir os lipídios de membrana (Biswal *et al.*, 2018) levando a formação dos peróxidos lipídicos, como por exemplo o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) e o malondialdeído (MDA) (Lazzaretti *et al.*, 2008). As reações peroxidativas têm sido reconhecidas como potenciais fatores na contribuição de processos celulares degenerativos, acarretando danos oxidativos com alteração nas propriedades de membrana, o que ocasiona aumento na rigidez e diminuição da deformidade celular (Lazzaretti *et al.*, 2008). Estudos anteriores demonstraram que, em comparação com eritrócitos normais, os eritrócitos falciformes apresentaram um aumento considerável na extensão endógena de lipídios oxidados, bem como uma maior suscetibilidade para peroxidação lipídica (Biswal *et al.*, 2018).

Os níveis elevados de MDA na AF indicando peroxidação lipídica, são bem reportados na literatura (Hebbel, 1982; Akohoue *et al.*, 2007). O acúmulo de dessa molécula perturba a organização dos fosfolipídios na bicamada da membrana do eritrócito, o que pode contribuir para a fisiopatologia da AF devido a formação de células falciformes irreversíveis (Akohoue *et al.*, 2007). Além disso, a membrana eritrocitária falcêmica pode sofrer danos devido a formação de 4-HNE, o qual é produto final da peroxidação lipídica e considerado um biomarcador do estresse oxidativo, podendo mediar a inativação de antioxidantes, como a tiorredoxina redutase-1 (TrxR-1) e aumentar a produção de ERO nas células (Cohen *et al.*, 2013). Estudos têm evidenciado o aumento desse produto nas células falcêmicas, Lagoda e colaboradores (2014) confirmaram níveis elevados de 4-HNE em ratos com AF, o que pode ser explicado devido a atividade aumentada de NADPH oxidase e a produção de $O_2^{\bullet-}$ (Lagoda *et al.*, 2014).

1.2.3 Fontes Oxidativas nos Eritrócitos Falcêmicos

O processo de polimerização da Hb S é uma das principais fontes pró-oxidantes nos eritrócitos falcêmicos (Barabino *et al.*, 2010). Uma vez que a Hb S instável é auto oxidativa e aumenta a necessidade metabólica devido a ciclos recorrentes de polimerizações/despolimerização, causando assim maior geração de ERO (Van Zwieten *et al.*, 2014). Segundo Hebbel e colaboradores, a Hb S tem uma tendência a se auto oxidar 1,7 vezes mais rápido que a Hb A (Hebbel *et al.*, 2004). Dessa forma, estudos têm evidenciado que os eritrócitos falciformes geram maiores quantidades de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH e produtos da oxidação lipídica quando comparados com os eritrócitos contendo Hb A (Aslan, 2000). Além disso, o evento de polimerização/despolimerização pode levar a múltiplas fontes pró-oxidante com consequente estresse oxidativo, dentre elas: a adesão das células sanguíneas, hemólise, vaso-occlusão e lesão de isquemia-reperfusão (Chirico e Pialoux, 2012).

O H_2O_2 pode reagir com a Hb e com a metHb produzindo a Hb ferril [HbFe(IV)=O] e oxiferrilHb [$\bullet$ HbFe(IV)=O], respectivamente (Rifkind *et al.*, 2014). No entanto, a Hb, ao contrário das peroxidases clássicas (por exemplo, citocromo oxidase), é incapaz de aproveitar seus próprios radicais prejudiciais e, portanto, é classificada como uma pseudoperoxidase (Alayash, 1999). Em um estudo recente, Kassa e colaboradores (2015) descobriram que a Hb S exibe uma química oxidativa única, uma vez que quando essa Hb recicla o Fe férrico e o ferril na presença de H_2O_2 , ela tende a permanecer por mais tempo no estado ferril, ao contrário do que ocorre com a Hb A. Essa redução ocasiona uma maior concentração da forma ferril reativa que não apenas oxida subunidades dentro da proteína Hb, mas também atinge componentes celulares próximos (Kassa *et al.*, 2015).

Além disso, as fontes oxidativas podem ainda ativar células sanguíneas circulantes e acarretar a liberação de microvesículas de fosfolipídios derivados da membrana citoplasmática, denominadas micropartículas (MPs) (Romana *et al.*, 2018). Nas células falciformes, os repetidos episódios de polimerização/despolimerização induzem a uma maior liberação de MPs, devido ao desacoplamento entre o esqueleto da membrana e a bicamada lipídica (Liu, 2016). Sabe-se que em indivíduos com AF, a liberação de MPs, assim como a falcização do eritrócito são eventos chave na hemólise intravascular (Hierso *et al.*, 2017). Hierso e colaboradores (2017) realizaram um estudo com pacientes falciformes monitorados durante crises vaso-oclusivas e revelaram um estresse oxidativo

exacerbado e o acúmulo de MPs (Hierso *et al.*, 2017). Além disso, as MPs possuem capacidade de promover a coagulação, uma vez que a exposição de PS na superfície resulta em uma carga negativa, o que permite a ligação dos fatores de coagulação e geração de trombina. Assim, de acordo com essa propriedade pró-coagulante, estudos têm evidenciado elevados níveis de MPs em condições clínicas, como: incidência de trombose e doença cardiovascular (Mezzano *et al.*, 2017).

1.2.4 Proteção Antioxidante nos Eritrócitos Falcêmicos

Devido à constante e exacerbada geração de espécies pró-oxidantes na AF, há um consumo excessivo de antioxidantes e, portanto, um sistema antioxidante deficiente, caracterizando o estresse oxidativo crônico dessa doença (Chaves *et al.*, 2008). Dentre os antioxidantes estudados na AF, a atividade de SOD mostra-se aumentada alguns estudos (Das, 1980), relacionando-a um mecanismo de defesa em resposta ao estresse oxidativo, enquanto outros evidenciaram a diminuição na atividade da mesma, devido ao consumo (Schacter, 1988). De maneira semelhante, há discrepâncias entre os resultados da atividade de CAT na AF, alguns trabalhos evidenciam o aumento (Das, 1980) dessa enzima como um efeito protetor e outros trazem a diminuição na atividade, devido ao consumo (Dasgupta, 2006). A atividade de GPx, geralmente, também são reduzidas com uma relação direta ao aumento da gravidade da doença (Biswal *et al.*, 2018). De maneira semelhante, as concentrações de GSH – cofator para a redução do H_2O_2 – são significativamente reduzidas em pacientes com AF (Reid, 2001). Alguns estudos evidenciaram uma diminuição de 50% no níveis de GSH nas células falcêmicos quando comparadas às células saudáveis (Tatum, 1996). Nur e colaboradores (2011) evidenciaram níveis diminuídos de GSH nos indivíduos com AF, e provaram que essa diminuição é em decorrência de um maior efluxo de GSSG nas células falcêmicos. Uma vez que, os eritrócitos falcêmicos possuem níveis elevados de produção de ERO e um sistema antioxidante desfavorecido, o que acarreta na maior produção de GSSG e esse aumento impulsiona o seu efluxo, o que impede que este seja reciclado para GSH pela GR, levando a perda desse tiol nas células (Nur *et al.*, 2011). Isso é especialmente importante sob condições de estresse oxidativo elevado, como crise vaso-oclusiva, síndrome torácica aguda e hemólise acentuada (Aslan, 2000).

1.2.5 Metabolismo Energético e vias associadas dos eritrócitos falcêmicos

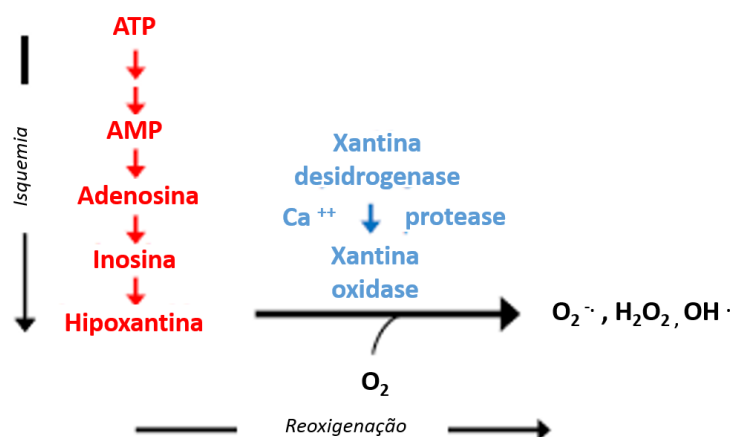
Além do metabolismo redox, devido à alta produção de ERO nas células falcêmicas, o metabolismo energético das células falciformes também é alterado (Van Zwieten *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2017). Sabe-se que quase todas as funções da vida dos eritrócitos são propiciadas por energia proveniente da glicólise, além disso, o balanço do fluxo de glicose entre a glicólise e a via das pentoses fosfato é extremamente importante para os eritrócitos (Sun *et al.*, 2017). Muitos estudos têm evidenciado uma reprogramação metabólica em eritrócitos normais sob condições de hipóxia, por meio da ligação da desoxiHb ao domínio da proteína da banda 3 e, conseqüentemente, o aumento da disponibilidade de enzimas glicolíticas citosólicas (Rogers *et al.*, 2013). Entretanto, no eritrócito falcêmico, o metabolismo da glicólise e a via das pentoses fosfato é constantemente alterado, levando ao excesso de produção de 2,3-BPG e à escassez da GSH (Sun *et al.*, 2017).

A via das pentoses fosfato está diretamente relacionada à glicólise, uma vez que a glicose 6-fosfato (G6P) é um intermediário em ambas as vias. Assim, qualquer condição que influencie a atividade glicolítica pode alterar potencialmente o fluxo de glicose através da via das pentoses fosfato, levando a uma mudança na quantidade de NADPH gerada (Lachant *et al.*, 1983). Sob condições oxidativas, como no caso da AF, o fluxo de G6P através da via das pentoses fosfato é acentuado, a fim de garantir níveis adequados de NADPH necessários para proteger os eritrócitos das lesões desencadeadas pelo oxidante (Castagnola *et al.*, 2010). Estudos recentes têm evidenciado que na AF, a deleção da esfingosina cinase-1, principal enzima na via do metabolismo de esfingolípido, pode reprogramar o metabolismo da glicólise, canalizando a glicose para a via das pentoses fosfato ao invés da glicólise, o que, por sua vez, ocasiona no aumento de NADPH e diminuição de 2,3-BPG, evidenciando o ambiente oxidativo das células falciformes e a necessidade de proteção antioxidante, promovida por meio do NADPH (Sun *et al.*, 2017).

Devido a condições de hipóxia ou estresse celular, os quais podem ser ocasionados por ciclos de isquemia/reperfusão, comuns na AF, o metabolismo nucleotídico dos eritrócitos falcêmicos também pode ser alterado (Barabino *et al.*, 2010). Isso ocorre devido a duas grandes mudanças em tecidos isquêmicos ou privados de O₂: primeiramente, as condições isquêmicas promovem a conversão da xantina desidrogenase (XD) à xantina oxidase (XO). Essa conversão envolve a oxidação do grupo sulfidril ou proteólise desencadeada pela ativação de uma protease citosólica como mecanismo adaptativo para transporte de cálcio em células com falta de energia (Kalyanaraman,

2013). Outra grande modificação nos tecidos isquêmicos é a depleção de ATP para AMP, o catabolismo de AMP e, eventualmente, o acúmulo de hipoxantina, um substrato de purina para a enzima XO (Figura 10). A atividade XO converte xantina em hipoxantina e esta em ácido úrico (Kalyanaraman, 2013). As condições isquêmicas também promovem a liberação de metais com atividade redox (por exemplo, Fe) que podem ativar oxidante mais potente (hidroxila radical através do mecanismo de Fenton) (Odeh, 1991; Kalyanaraman, 2013).

Figura 10. Mecanismo de isquemia e reperfusão na formação de ERO.



O ATP pode ser catalisado para AMP, este em adenosina, e esta em hipoxantina e ácido úrico, os quais podem estar acumulados nos eritrócitos falcêmicos (Adaptado de (Kalyanaraman, 2013).

Muitos estudos demonstraram, separadamente, o estado hiperoxidativo das células falciformes, enquanto outros evidenciaram alterações no metabolismo redox do eritrócito (Silva, D. G. H. *et al.*, 2013), mudanças nos níveis de nucleotídeos de piridina e metabólitos de purina (Zerez, 1990), nas atividades das enzimas das vias glicolíticas e da pentose fosfato, resultando em comprometimento dessas vias (Lachant *et al.*, 1983; Zerez, 1990). No entanto, ao conhecimento dos autores, não há nenhum trabalho abordando as implicações da presença de Hb S no rompimento da homeostase do metabolismo dos eritrócitos falcêmicos. Sendo, portanto, de extrema relevância o estudo da integração dessas vias e suas implicações, a fim de melhorar a compreensão do metabolismo do eritrócito falcêmico, favorecendo a descoberta de marcadores oxidativos mais específicos, bem como de possíveis agentes terapêuticos, como antioxidantes mais específicos e eficientes.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar biomarcadores do metabolismo redox, glicolítico, via das pentoses fosfato, via da metHb redutase e metabolismo de nucleotídeos, a fim de melhor compreender como as células falciformes lidam com a ruptura da homeostase metabólica.

2.2 Objetivos Específicos

- Confirmar o estado hiperoxidativo de células falcêmicas;
- Avaliar a influência do estado hiperoxidativo de células falcêmicas sobre marcadores metabolismo celular, de hemólise e de lesão oxidativa;
- Investigar possíveis marcadores de lesão oxidativa mais específicos para AF;
- Buscar novos e promissores antioxidantes para futuras investigações como terapia alternativa.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Casuística

O projeto contou com uma casuística total de 20 indivíduos independente do sexo e da etnia, dentro da faixa etária de 19 a 42 anos, provenientes da região sudeste do Brasil. A casuística foi dividida em 10 indivíduos sem hemoglobinopatias, compondo o grupo referência (REF) – média de idade 26,5 anos – e 10 pessoas com AF (grupo de estudo - AF) – média de idade: 28,9 anos – as quais estavam em acompanhamento clínico regular no Hemocentro de São José do Rio Preto (SP). Ambos os grupos foram constituídos por quatro homens e seis mulheres. Todos os indivíduos foram previamente diagnosticados no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) (Anexo A). As amostras de sangue de ambos os grupos foram coletadas após obtenção de assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B), conforme a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) Nº 466/12. O presente projeto foi registrado sob o nº 54648616.7.0000.5466 CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE).

Todos os indivíduos coletados foram avaliados por meio de questionário, quanto ao atendimento dos critérios de inclusão/exclusão do estudo. Mulheres grávidas, fumantes e pessoas que tinham ingerido álcool dentro de 24 horas anteriores à coleta das amostras biológicas foram excluídas do estudo. Dentro deste mesmo período, os indivíduos que estiveram sob uso de medicamentos, tais como ácido acetilsalicílico, antibióticos, vitaminas ou quelantes de ferro, conhecidos por afetarem os parâmetros avaliados, também foram excluídos do estudo. Aqueles pacientes que estavam em crise de dor ou hemolítica no dia da coleta; e que tiveram acidentes vasculares encefálicos ou que tivessem recebido transfusão sanguínea dentro do período de 120 dias anteriores a data da coleta, também foram excluídos do estudo. Histórico de episódios de crise algicas, necessidade de internação e diagnóstico de complicações agudas nos últimos 12 meses também foram abordados no questionário (Tabela 1). Essas informações foram confirmadas por meio de consulta aos prontuários médicos e aos bancos de dados do hemocentro envolvido; assim como a obtenção dos dados referentes ao uso de medicação específica e manifestações fenotípicas. Toda a consulta aos prontuários e banco de dados foi supervisionada pelos clínicos responsáveis pelos respectivos pacientes. Além disso,

os marcadores de acompanhamento clínico desses pacientes, tais como – hemograma completo, marcadores hemolíticos e de função hepática e renal – foram realizados sob a responsabilidade de laboratórios especializados no respectivo hemocentro.

Tabela 1. Caracterização do grupo de estudo (AF).

Marcadores	Grupo amostral (N=10)	Valores de referência
Idade [anos: $\bar{X}$ (IC 95%: inferior – superior)]	28.9 (19-42)	-
Gênero [N (%)]		-
Feminino	6 (60%)	
Masculino	4 (40%)	
Uso de medicamentos [N (%)]		-
HC+ (dose: 22 mg/ kg/dia)	3 (30%)	
HC-	7 (70%)	
Marcadores de rotina [$\pm$ (95% IC)]		
Eritrócitos (k/ μ L)	2.4 (2.1-2.7)	4.5-5.8
Níveis de Hb F (%)	10.8 (0-22.7)	0-1%
Hemoglobina (g/dL)	8.9 (7.1-11.8)	12-17
Hematócrito (%)	26.2 (21.6-33.9)	40-55
VCM (fL)	106.1 (87.2-129)	80-100
HCM (PG)	35.1 (28.6-45)	27-31
CHCM (G/DL)	34 (32.8-35.9)	32-36
RDW (%)	17.8 (14.5-22.2)	12-16
Leucócitos (k/ μ L)	9721.1 (5400-15600)	4.000-11.000
Linfócitos (k/ μ L)	35.5 (18.4-48.2)	15-46
Monócitos (k/ μ L)	5.7 (3.2-8.2)	1-10
Plaquetas (k/ μ L)	376.6 (196-563)	150-450
Reticulócitos (%)	8.2 (1.2-14.6)	0.8-2.0
LDH (U/L)	493.6 (342.0-771.0)	1-250
AST (U/L)	35.7 (18-57)	1-40
ALT (U/L)	20 (9-40)	1-41
BT (mg/dL)	3.5 (1.4-6.6)	0-1
BD (mg/dL)	1.0 (0.5-3.3)	0-0.2
BI (mg/dL)	2.8 (0.8-5.6)	0-0.08
Creatinina (mg/dL)	0.57 (0.5-0.9)	0.7-1.2
Ferritina (n/g/mL)	466.2 (88.1-860)	23-336
Sódio (mM)	121.8 (4.7-140)	136-145
Potássio (mM)	4.8 (4.3-5.3)	3,5-5,1
FA (U/mL)	60.1 (29-78)	40-130

$\bar{X}$: média; IC: intervalo de confiança; n: número de pessoas com anemia falciforme; HC⁺: paciente sob tratamento com hidroxycarbamida; HC⁻: pacientes não tratados com hidroxycarbamida.

[#]Todos os pacientes estavam em uso de ácido fólico (5 mg/dia).

Hb F: Hemoglobina fetal; VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; LDH: lactato desidrogenase; AST: aspartato aminotransaminase; ALT: alanina aminotransferase; BT: bilirrubina total; BD: bilirrubina direta; BI: bilirrubina indireta; FA: fosfatase alcalina.

3.2 Metodologia

3.2.1 Casuística e preparo de hemolisados

As amostras de sangue total, aproximadamente 8 mL, foram coletadas por punção venosa em tubos contendo EDTA, entre às 7:00h e às 9:00h. Em seguida, foram

centrifugadas à 3500 *g* por 15 minutos a 4° C para obtenção do plasma, o qual foi aliquoteado e armazenado a -80°C para análises bioquímicas posteriores. Enquanto que os eritrócitos foram cuidadosamente lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS - NaCl 136 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ / KH₂PO₄ 10 mM, pH 7,4) para remoção da camada de leucócitos. Utilizou-se os precipitados para o teste de fragilidade osmótica e para a preparação de hemolisados específicos, que foram aliquoteados e rapidamente armazenados a -80 °C para análises posteriores.

Na preparação dos hemolisados ricos em membrana celular foi adicionado uma fração de precipitado de eritrócitos em 20 volumes de água ultrapura gelada, posteriormente, essa solução foi vigorosamente homogeneizada. Para os hemolisados livres de membrana, adicionou-se outra fração de eritrócitos a 10 volumes de água ultrapura gelada, posteriormente, essa mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.000 *g* por 10 minutos a 4 °C e, finalmente, o sobrenadante (hemolisado isento de membrana celular) foi cuidadosamente aspirado (Ajdzanovic *et al.*, 2011).

Para medir os níveis de compostos de adenilato e metabólitos, GSH e ERT, os eritrócitos foram submetidos a protocolos de desproteinização, de acordo com (Aragon-Martinez *et al.*, 2014), (Tietze, 1969) e (Sotgia *et al.*, 2013), respectivamente. O procedimento para análise de compostos de adenilato e metabólitos, consistiu na adição de 1 mL de cada padrão à 1 mL de HClO₄ 8% gelado, essa mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13000 *g* por 10 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 60 µL de KOH 7M gelado, essa mistura foi novamente homogeneizada, centrifugada e o sobrenadante foi coletado (Aragon-Martinez *et al.*, 2014).

O preparo das amostras para a dosagem dos níveis de GSH consistiu da utilização de dois reagentes: PCA 0,5 M e KPi 0,1M, pH 7,0. Inicialmente, 100 µL de hemolisado foram adicionados em 400 µL de PCA gelado, essa mistura foi centrifugada a 15000 *g* por 5 min a 4°C. Após a centrifugação, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo contendo 200 µL de KPi gelado, essa nova mistura foi novamente homogeneizada, centrifugada, posteriormente filtrada e o sobrenadante foi injetado na coluna (Tietze, 1969).

Para medir os níveis de ERT, 100 µL de H₂O foram adicionadas em 100 µL de hemolisado, essa mistura foi vigorosamente homogeneizada no vortex, em seguida 400 µL de ACN foram adicionados à mistura e esta foi novamente homogeneizada por 5 min.

Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 17000 *g* por 10 min a 4°C e 2 µL do sobrenadante foi injetado na coluna (Sotgia *et al.*, 2013).

Além disso, os eritrócitos foram separadamente lisados pela adição de uma solução estabilizadora (Tris-HCl, pH 7,5; com 1 mM EDTA e 10 mM DTT) ou tampão fornecido pelo kit do fabricante, seguido por ciclos repetidos de congelamento e descongelamento e posterior centrifugação a 13.000 *g* durante 20 min a 4°C, para atividade de MetHb redutase (Kedar *et al.*, 2017), e quantificação de NADPH, respectivamente. Posteriormente, os hemolisados para análise de NADPH ainda foram desproteinizados, antes da utilização no ensaio, por filtração através do 10 kDal Molecular Weight Cut-Off (MWCO) Spin Filter.

Os hemolisados para análises de AChE, LDH e capacidade antioxidante total (TAC) foram preparados de acordo com os protocolos do fabricante. Para a análise de imunomarcação da Prx2, 10 µL de eritrócitos precipitados foram ressuspensos em 1 mL de PBS contendo 100 mM de *N*-etilmaleimida (NEM). Após 20 min de incubação à temperatura ambiente e no escuro, as células foram sedimentadas e lisadas em 100 µL de tampão de lise não redutor (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10,5% glicerol, 2,1% SDS, Azul de bromofenol a 0,053%) contendo 100 mM de NEM (Low *et al.*, 2007).

A extração lipídica foi realizada de acordo com o método éter metil-*terc*-butílico (MTBE) descrito por Matyash *et al.* (2008) (Matyash *et al.*, 2008) no plasma, após a adição de padrões internos (Griffiths *et al.*, 2016), estigmasterol e aldeído derivado de sitosterol (Sito-Ald), para aumentar a precisão da quantificação de colesterol e 3β-hidroxi-5β-hidroxi-β-norcolestano-6-carboxaldeído (ChAld), respectivamente.

3.2.2 Marcadores de hemólise e de integridade de membrana

A fragilidade osmótica de eritrócitos foi testada segundo (Ansari *et al.*, 2015). De forma resumida, uma alíquota com 50 µL de precipitado celular foi lavada três vezes e ressuspensa em PBS (136 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,4). Posteriormente, 50 µL desta suspensão celular foi adicionada a diferentes tubos contendo 5 mL de solução de NaCl variando de 0,2 a 0,7% e incubados por 30 minutos a 37°C. Outra alíquota da suspensão foi incubada por duas horas a 37°C em 5 mL de tampão de fosfato de sódio a 5 mM, pH 7,4, a qual representou o padrão 100% de hemólise (Ansari *et al.*, 2015). Após cada período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 850 *g* e 4°C e a absorbância dos sobrenadantes foi registrada a 540 nm.

Como marcador indireto de hemólise, comumente quantificado durante o acompanhamento procedimento clínico dos pacientes, foram realizados ensaios da atividade plasmática da LDH, a atividade dessa enzima foi determinada por meio da redução do NAD em NADH, sendo este, especificamente, detectado por método colorimétrico a 450 nm. A quantificação de LDH foi calculada e expressa em U/L de plasma (MAK066, Sigma-Aldrich). Como marcador específico da hemólise, os níveis plasmáticos de Hb foram quantificados (MAK115, Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo do fabricante, o qual se baseou no método Triton/NaOH e a Hb foi convertida a um produto colorimétrico medido a 400 nm. Os cálculos para determinar a concentração de Hb e os valores utilizados foram expressos em μM de plasma.

Como marcador de dano de membrana, avaliamos a atividade da enzima AChE (MAK119, Sigma-Aldrich) de acordo com o protocolo do fabricante, o qual é uma versão otimizada do método de *Ellman* no qual a tiocolina, produzida pela AChE, reage com 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) para formar um produto colorimétrico a 412 nm, proporcional à atividade da AChE. Os cálculos para determinar a concentração dessa enzima e os valores utilizados foram expressos em U/mL de plasma.

3.2.3 Antioxidantes

As atividades enzimáticas de CAT (Beutler, 1975), GPx (Sies H, 1979), GR (Beutler, 1969) e TrxR (CS0170, Sigma-Aldrich), bem como a TAC (MAK075, Sigma-Aldrich) foram determinadas espectrofotometricamente. Brevemente, a atividade da CAT foi quantificada por meio da velocidade de decomposição do H_2O_2 pela enzima, o que foi observado pelo decréscimo de absorbância em 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da GPx foi determinada por meio detoxificação do hidroperóxido de *tert*-butilo (tBOOH) e consequente oxidação da GSH, acoplada a sua regeneração pela GR e consequente consumo de NADPH, fornecidos no meio de reação. Assim, a atividade da GPx foi avaliada, indiretamente, pelo decréscimo da absorbância a 340 nm promovido pela degradação de NADPH (Sies H, 1979). A atividade da GR também foi avaliada de acordo com o consumo de NADPH oriundo da conversão de GSSG para sua forma reduzida, acompanhado em 340 nm (Beutler, 1969). As atividades das enzimas supramencionadas foram calculadas e expressas em U/mL de hemolisado. A quantificação de TrxR foi determinada por um método colorimétrico baseado na redução do ácido 5-5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) com NADPH para 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), que produz uma

forte coloração amarela medida a 421 nm. A quantificação dessa enzima foi calculada e expressa em U/L de hemolisado (CS0170, Sigma-Aldrich).

Para os antioxidantes não enzimáticos foram adotadas técnicas cromatográficas. Os níveis de GSH foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector eletroquímico coulométrico (HPLC-ECD) ajustado com potencial de 650 mV (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1994). Enquanto que, os níveis de ERT foram medidos usando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detector de conjunto de fotodiodo (UHPLC-PDA) a 262 nm, de acordo com Tang et al. (2018) com modificações (Tang, Richard Ming Yi *et al.*, 2018). Resumidamente, as amostras foram injetadas numa coluna Kinetex-HILIC (100 x 2,1 mm, 2,6 µm) (Phenomenex, CA, EUA) mantida a 30°C. O solvente A foi a acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% e o solvente B foi o ácido fórmico a 0,1% em água ultrapura. A cromatografia foi realizada com fluxo de 0,5 ml/min, de acordo com o seguinte gradiente: 2 min de 30% de solvente B, seguindo-se um aumento de gradiente de 1 min do solvente B até 90% e mantido durante 4 min. Em seguida, redução do solvente B novamente para 30% em 1 min e foi mantido durante 7 min para reequilibrar a coluna. O tempo total de execução foi de 15 min com um tempo de retenção de 1,2 min para ERT.

Para a análise de imunomarcação, as frações proteicas (~75 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) não redutor e transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). O bloqueio foi realizado *overnight* a 4°C em 5% (p/v) de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (TBS) / Tween 20 a 0,1%. A incubação com anticorpo para Prx2 (1: 5.000) foi realizada durante 1 hora a temperatura ambiente em 5% (p / v) de leite desnatado em TBS / 0,1% de Tween 20. Utilizou-se anticorpo para β-actina (1: 25.000) como controle endógeno, incubou-se durante 1 hora a temperatura ambiente em TBS / 0,1% Tween 20. As bandas foram detectadas com peroxidase de *horseradish* usando reagentes de quimiluminescência e visualizadas com o sistema de documentação ImageQuant LAS 4000 Minigel (GE Healthcare, IL, EUA). A análise densitométrica das intensidades das bandas foi realizada utilizando-se o software ImageJ versão 1.51j8 (National Institutes of Health, EUA). A membrana de imunomarcação foi representativa dos experimentos realizados com eritrócitos de seis indivíduos do grupo REF e cinco do grupo AF.

3.2.4 Enzimas e subprodutos metabólicos e quantificação de proteínas

As atividades de hexoquinase (HXK) (MAK091, Sigma-Aldrich), MetHb redutase (Kedar *et al.*, 2017), G6PDH (Beutler, 1994), LDH (MAK066, Sigma-Aldrich) e NADPH foram determinadas por análise espectrofotométrica. Os níveis de proteína foram medidos pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A quantificação da HXK foi obtida por um conjunto de reações enzimáticas determinadas pelo fabricante. Inicialmente, a glicose foi convertida a G6P por ação da HXK, a qual foi oxidada por G6PDH para formar NADH. Esse NADH resultante foi detectado por método colorimétrico a 450 nm, produto proporcional a atividade da HXK presente. Para a dosagem da atividade de metHb redutase foi preparado dois reagentes, o 1 (TRIS-HCl 1M, pH 7,5; NADH 2mM e H₂O up) e o reagente 2 (K₃F(CN)₆ e hemolisado). Inicialmente, 178 µL do reagente 1 foram incubados por 10 min a 37°C. Posteriormente, 20 µL do reagente 2 (K₃F(CN)₆ e hemolisado) foram adicionados junto ao reagente 1 já incubado e o consumo de NADH foi monitorado a 340 nm por 10 min. A atividade da G6PDH foi determinada por meio de reação contendo NADP e G6P, que atuou para a formação de NADPH ocasionando um acréscimo na absorbância em 340 nm. Finalmente, a atividade da enzima LDH foi determinada de maneira semelhante a mencionada anteriormente para o plasma, sendo a quantificação desta em hemolisado. A quantificação da HXK, MetHb redutase, G6PDH e LDH foram calculadas e expressas em U/mL de hemolisado.

Os compostos de adenilato e metabólitos foram determinados utilizando UHPLC-PDA monitorizado a 260 nm, de acordo com Yu *et al.* (2018) com modificações (Yu *et al.*, 2018). As separações cromatográficas foram realizadas com fluxo de 0,5 mL/min em uma coluna Kinetex XB-C18 (100 x 2,1 mm, 2,6) (Phenomenex, CA, EUA) mantida a 25°. A fase móvel A consistiu em 50 mM de KH₂PO₄, pH 6,8 e a fase B foi 100% de metanol. O esquema de eluição de gradiente contínuo foi, aos 0, 14,5, 15,5, 17,5, 21,5, 23 e 30 minutos, respectivamente, 0,5%, 0,5%, 20%, 20%, 10%, 0,5% e 0,5% da fase móvel B. Os comprimentos de onda de absorção máxima (λ_{max}) foram 290 nm (ácido úrico), 260 nm (ATP, ADP e AMP) e 248 nm (hipoxantina).

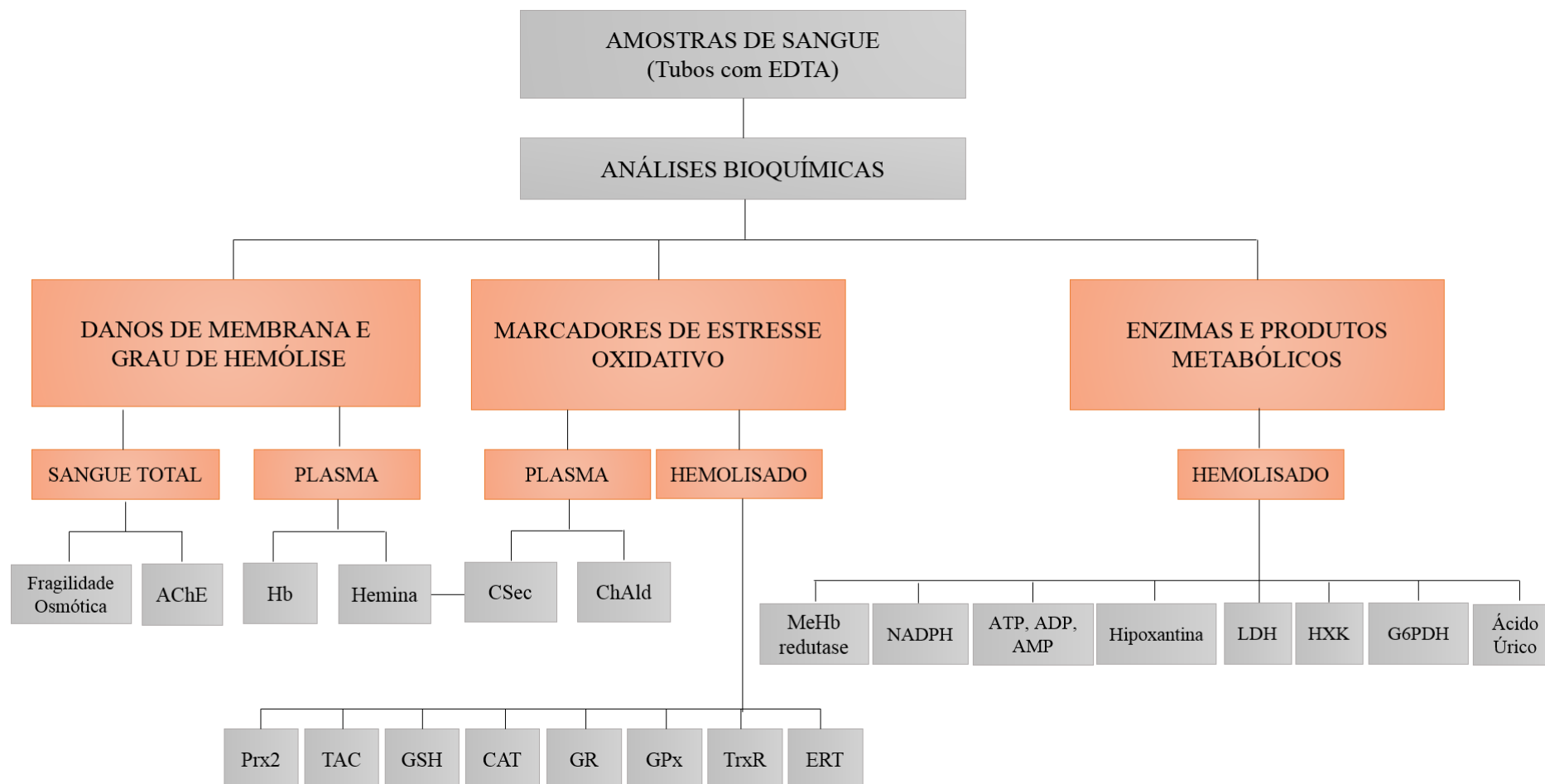
3.2.5 Marcadores de lesão oxidativa

Os níveis plasmáticos de hemina (MAK036, Sigma-Aldrich) foram quantificados de acordo com o protocolo do fabricante, no qual diferentes reações enzimáticas

resultaram em um produto colorimétrico medido a 570 nm e os resultados foram expressos em nM de hemina plasmática. A hemina é uma forma oxidada de heme que catalisa a formação de ERO, induz dano celular e amplifica respostas inflamatórias. Além disso, a principal fonte de hemina é o processo hemolítico. Como lesão oxidativa específica, foram medidos os níveis plasmáticos do CSec e o produto de sua reação aldólica: ChAld, subprodutos da oxidação do colesterol (Ch) promovidos pelas ERO. Entretanto, os níveis de CSec ficaram abaixo do limite inferior de detecção do método. Dessa forma, os resultados foram apresentados somente como a relação ChAld /Ch.

Para a análise de ChAld/Ch, a separação cromatográfica foi realizada a um fluxo de 1 mL/min em uma coluna Kinetex C18 (50 × 6 mm, 2,6 µm) (Phenomenex, CA, EUA) mantida a 30° C, para ambos os marcadores (Ch e ChAld). A concentração de Ch foi determinada por HPLC-UV, de acordo com (Dantas *et al.*, 2018), enquanto que para o ChAld usamos HPLC-FD como descrito por (Mansano *et al.*, 2010). A Figura 11 sumariza os procedimentos experimentais realizados.

Figura 11. Fluxograma das análises bioquímicas do presente estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Análises Estatísticas

Inicialmente, foi realizada uma análise multivariada baseada em um método de agrupamento/classificação – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), usando o *software* MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) (Xia *et al.*, 2009). As análises univariadas foram realizadas por meio do *software* Statistica 9.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), enquanto que os gráficos foram feitos no *software* GraphPad Prisma versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A normalidade dos dados foi verificada usando *Normal Probability Plots of Residuals* enquanto a homocedasticidade dos dados pelo teste de Levene, assumindo nível de significância de 0,05. Assim, alguns dados foram transformados por $\log_{10}$, quando necessário. Para comparação entre os grupos, foram adotados os *General Linear Models* (GLM), abordagem que possibilita a análise de modelos com combinações de variáveis categóricas e contínuas, com múltiplos fatores preditivos. Assim, estabelecemos os grupos (REF e AF) como preditores com ajuste para sexo, uso de HC e idade, e os parâmetros bioquímicos avaliados como variáveis dependentes (Quinn Gp, 2002)

Para avaliar o grau de associação individual entre os parâmetros bioquímicos foram utilizadas as correlações de Pearson, para dados paramétricos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e $P < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo (Quinn Gp, 2002; Mc Donald, 2014).

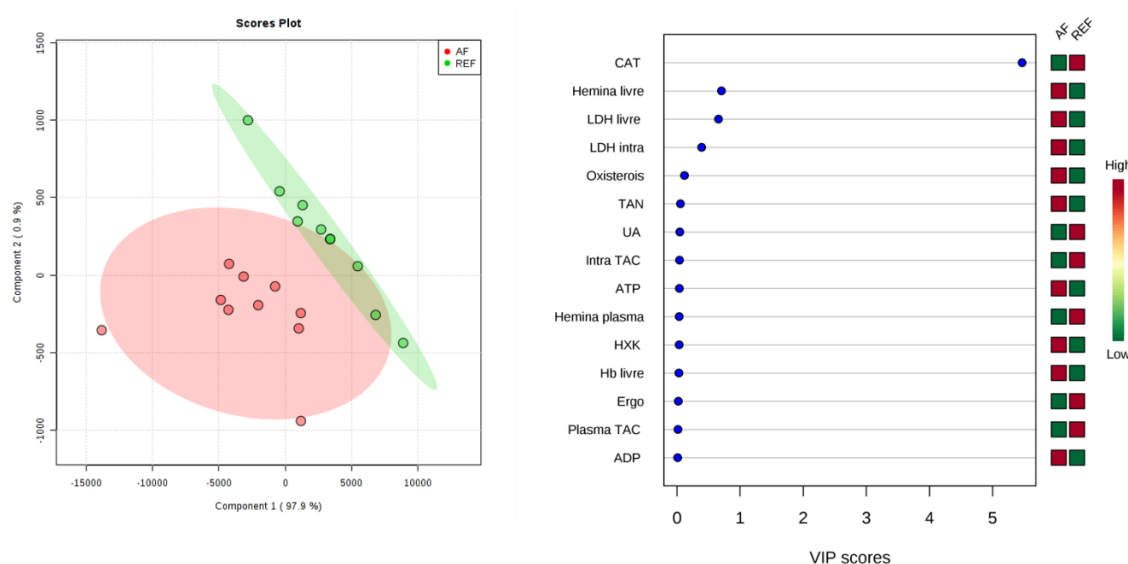
RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Separação metabólica de células falciformes e normais

Foi investigado, por meio de análise estatística multivariada, se seria possível distinguir as células falciformes das normais, por meio do conjunto de biomarcadores do metabolismo celular analisados. De fato, observamos uma clara separação dos grupos analisados, apesar de uma pequena sobreposição das variâncias, indicada pelas áreas elípticas sombreadas no gráfico PLS-DA (Figura 12-A), devido à maior dispersão de dados entre os pacientes com AF. Além disso, a análise identificou as quinze características mais importantes classificadas com base na projeção de variáveis importantes (VIP) (Figura 12-B), as quais contribuíram para a separação dos grupos estudados, reforçando as observações univariadas a seguir.

Figura 12. Separação metabólica de eritrócitos falciformes e normais.



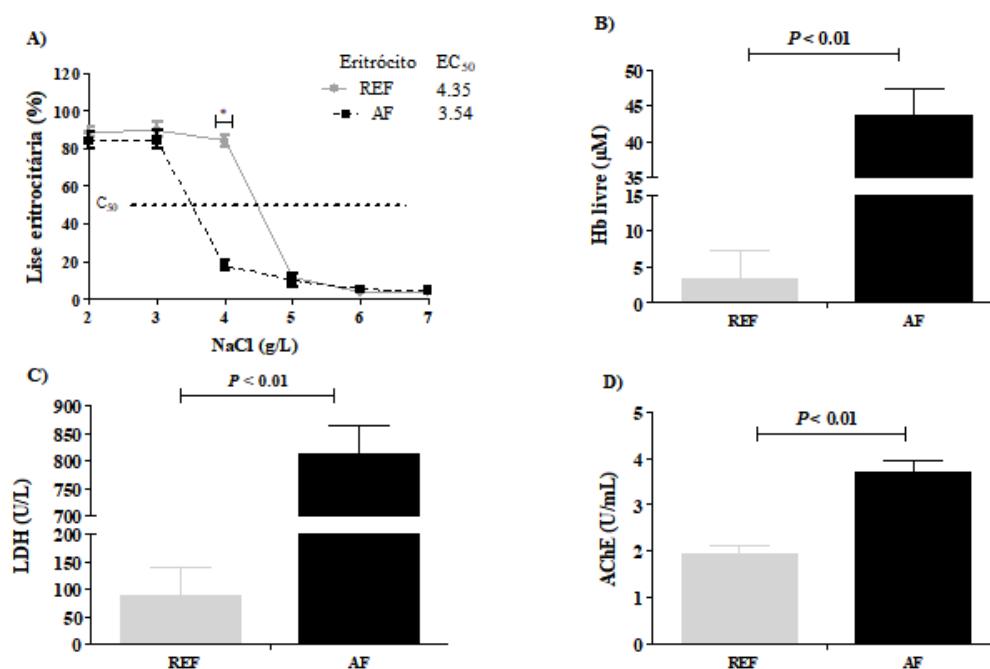
(A) *Score plot* de PLS-DA dos dois componentes principais. áreas elípticas sombreadas indicam as regiões com 95% de confiança. (B) Características mais importantes classificadas pelo VIP Score. O mini *heatmap* a direita representa as variações de concentrações dentro dos grupos. Fonte: Metaboanalyst.

4.2 Grau de hemólise e enzima da membrana eritrocitária

Os parâmetros hemolíticos foram comparados, bem como a atividade da AChE entre indivíduos com AF e REF. Análises das curvas de fragilidade osmótica dos eritrócitos na concentração de NaCl, variando de 2 a 7 g / L, indicaram uma diminuição significativa no grau de hemólise na concentração de 4 g/L no grupo de estudo, o que evidenciou a típica resistência globular osmótica das células falciformes (Figura 13-A). Além disso, os níveis de Hb livre foram cerca de oito vezes maiores nos indivíduos com

AF (Figura 13-B). Da mesma forma, a atividade da LDH plasmática foi cerca de dez vezes maior no grupo de estudo (Figura 13-C); confirmando o estado hemolítico característico na AF. Em relação à atividade da AChE, foi encontrado um aumento de cerca de duas vezes nos indivíduos com AF, evidenciando o comprometimento da membrana eritrocitária (Figura 13-D).

Figura 13. Resistência osmótica, marcadores de hemólise e enzima de membrana eritrocitária alterada em AF



A) lise osmótica induzida por NaCl, mostrando diminuição do grau de hemólise a 4 g/L para as células falciformes (*P = 0,03). Níveis mais elevados de marcadores de hemólise direta (B) e indireta (C) em pacientes com AF. Da mesma forma, a enzima de membrana eritrocitária (D) avaliada foi aumentada na AF.

E50: metade da concentração efetiva máxima; Hb: hemoglobina; LDH: lactato desidrogenase; AChE: acetilcolinesterase. Foram plotados os valores de média ± erro padrão. *General Linear Models (GLM)*.

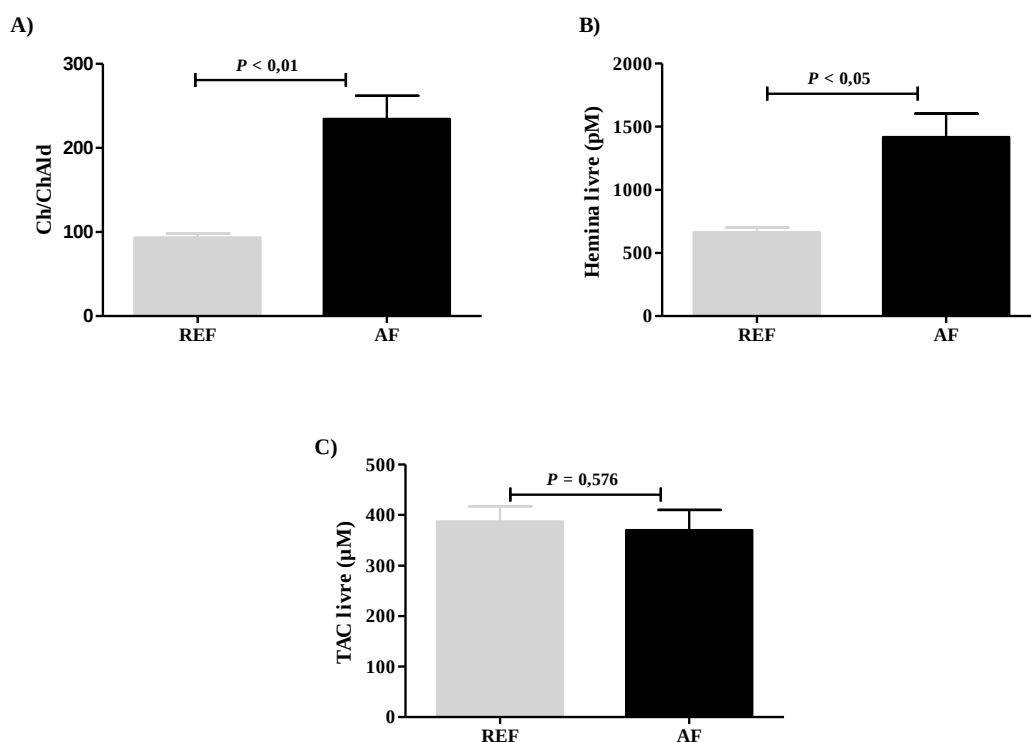
Fonte: elaborado pelo autor

4.3 Marcadores de estresse oxidativo

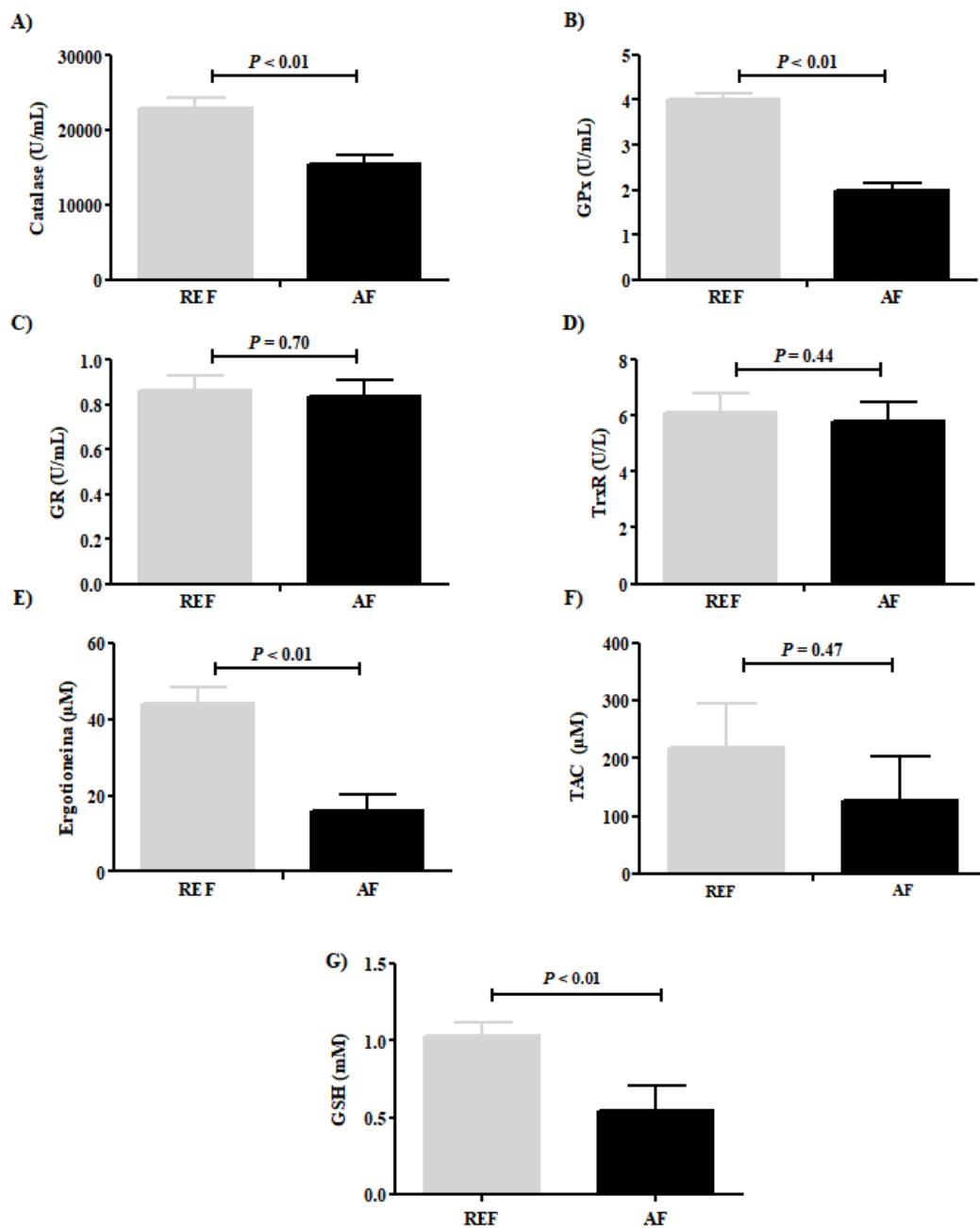
Com relação aos níveis de ChAld, foi encontrado um aumento de cerca de duas vezes nos indivíduos com AF (Figura 14-A). Da mesma forma, nos níveis de hemina plasmática, foi encontrado um aumento nos indivíduos com AF (Figura 14-B) evidenciando a condição oxidativa crônica nesse grupo. Embora não tenha sido encontrado diferença estatisticamente significativa nos níveis de TAC no plasma, foi observado um comportamento de consumo de TAC plasmático no grupo AF (Figura 14-

C). Ainda em relação aos parâmetros antioxidantes avaliados, foram medidas as atividades de CAT, GPx, GR, GSH, Prx2 e TrxR, e os níveis de ERT e TAC nas hemácias. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para CAT, GPx, Prx2, GSH e ERT, as quais foram diminuídas na AF. Mais uma vez, apesar da falta de diferenças estatisticamente significativas, foi possível observar o mesmo padrão decrescente nos outros antioxidantes, sugerindo sua depleção pelos conhecidos altos níveis de ERO nas células falciformes (Figura 15). A Prx 2 reduzida foi diminuída em pacientes com AF e a forma oxidada foi aumentada em indivíduos com AF (Figura 16).

Figura 14. Marcadores de estresse oxidativo no plasma



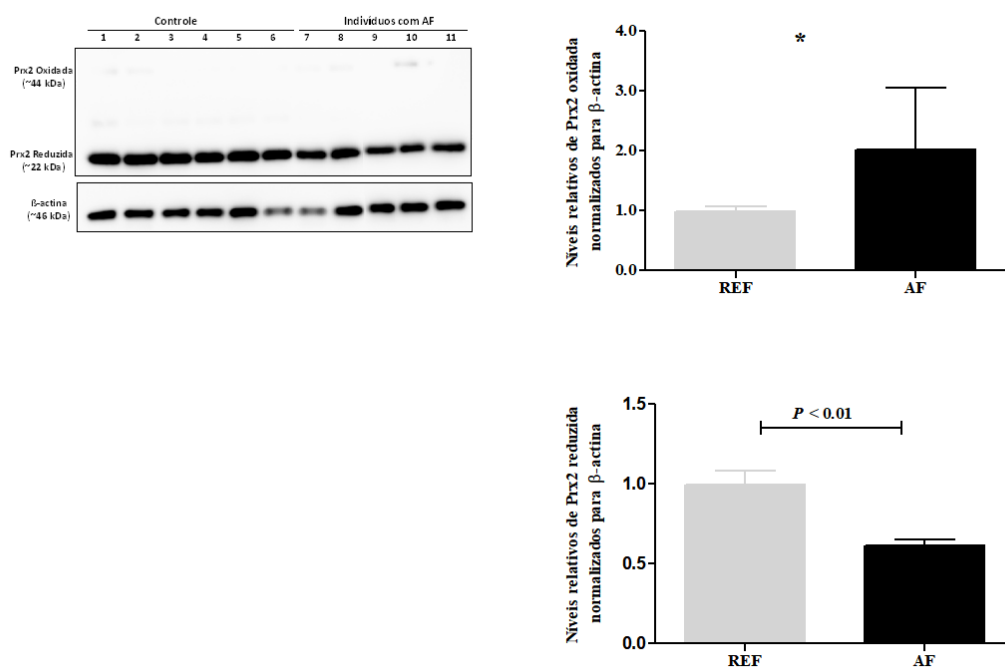
A) Níveis mais altos de ChAld em pacientes com AF. B) maiores níveis de hemina livre em pacientes com AF. C) Padrão sugestivo de consumo da capacidade antioxidante total (TAC) em indivíduos com AF. Foram plotados os valores de média $\pm$ erro padrão. *General Linear Models (GLM)*.
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15. Padrão de consumo de antioxidantes falciformes

Diminuição de catalase (A), glutathione peroxidase (B), ergothioneine (E) e GSH (G) e comportamento diminuído, mas sem diferença estatística, para glutathione redutase (C) tioredoxina redutase (D) e capacidade antioxidante total (F) nas células falciformes.

Foram plotados os valores de média $\pm$ erro padrão. *General Linear Models (GLM)*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16. Estado redox de Prx2 nos eritrócitos

As células foram pré-incubadas com NEM 100 mM durante 20 minutos, depois lisadas em tampão de amostra de SDS não redutor na presença de NEM 100 mM. As amostras foram então submetidas a imonumeração para a presença de Prx 2. As análises quantitativas foram realizadas por densitometria utilizando o software ImageJ.

*: Indica baixo número amostral (N=2), o que impossibilitou a análise estatística.

Grupo controle (N=6); indivíduos com AF (N=5)

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão.

Fonte: elaborado pelo autor.

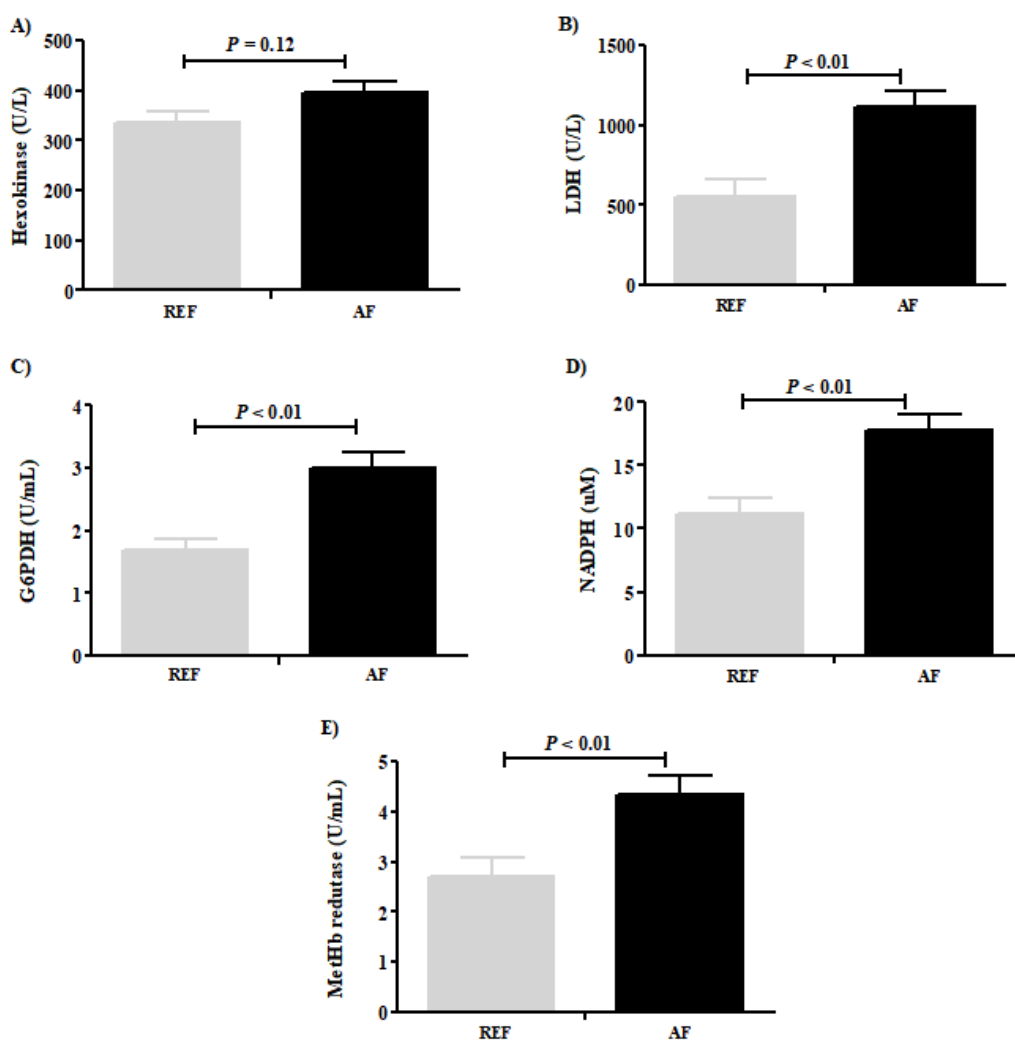
4.4 Enzimas e subprodutos metabólicos

A influência da presença de Hb S sobre enzimas metabólicas e subprodutos de eritrócitos também foi investigada. Em relação à glicólise, foram avaliadas as atividades da HXK e da LDH. Diante disso, foi encontrado um aumento de 50% de LDH nas células falciformes (Figura 17-B) e esse mesmo comportamento de “*up-regulation*” para a HXK, mas sem diferença estatística (Figura 17-A). Na via das pentoses fosfato, foram encontrados resultados interessantes para atividade da G6PDH (Figura 17-C) e níveis de NADPH (Figura 17-D), ambos os marcadores foram aumentados nos grupos AF. Também foi avaliado a atividade da MetHb redutase, a qual mostrou maior atividade nos indivíduos com AF (Figura 17-E).

Em relação ao metabolismo de nucleotídeos, foi encontrado um aumento significativo no nível de ATP em pacientes com AF quando comparado a indivíduos

saudáveis (Figura 18-A). Da mesma forma, níveis mais elevados de hipoxantina nas células falciformes (Figura 18-D). Por outro lado, os conteúdos de ADP (Figura 18-B), AMP (Figura 18-C) e ácido úrico (Figura 18-E) não mostraram alteração entre os grupos estudados. Finalmente, as razões de nucleotídeos de adenina, níveis de nucleotídeos totais de adenina (TAN): $[ATP] + [ADP] + [AMP]$ e carga energética adenina (AEC): $([ATP] + 0.5 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$ também foram verificadas (Figura 19). Entre esses marcadores, foi encontrado diferença apenas no TAN, que aumentou nos indivíduos com AF (Figura 18-C).

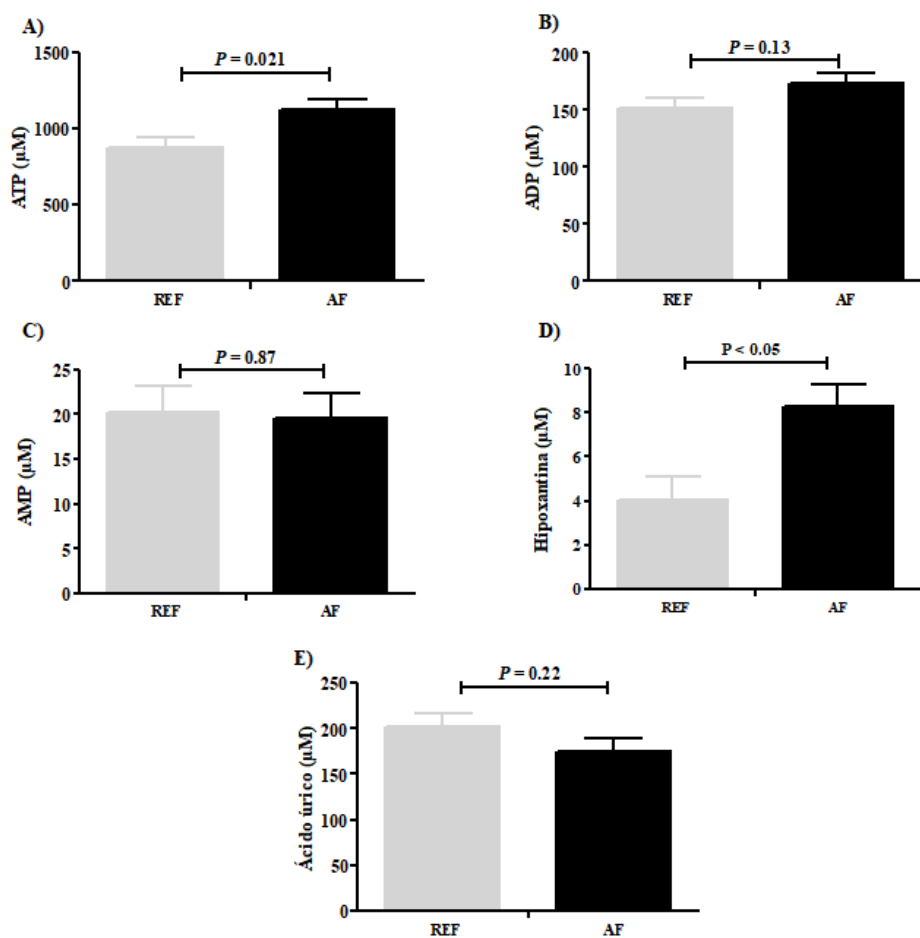
Figura 17. Padrão aumentado de marcadores metabólicos em pacientes com AF



Atividades mais altas de hexouinase (A), lactato desidrogenase (B) glicose-6-fosfato desidrogenase-G6PDH (C), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-NADPH (D) e methb redutase (E) em células falciformes.

Foram plotados os valores de média $\pm$ erro padrão. *General Linear Models (GLM)*.

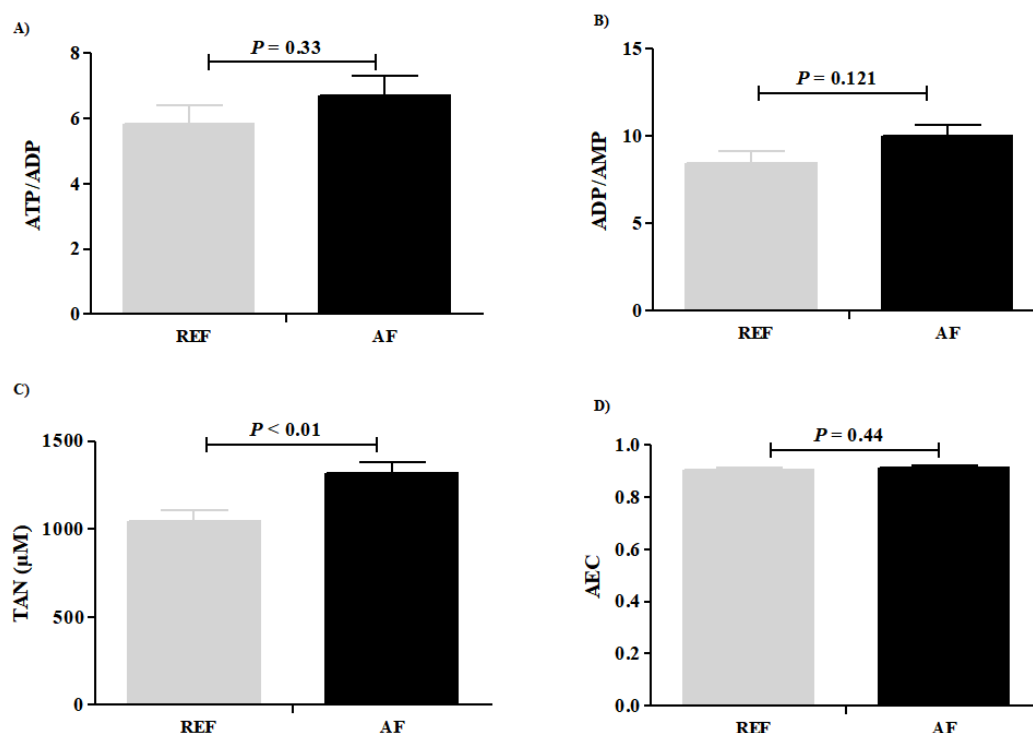
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 18. Níveis de nucleotídeos e metabólitos de adenina

Diferenças significativas apenas para níveis de adenosina trifosfato (A) e hipoxantina (D) mais altos no grupo AF. Outros marcadores não mostraram influência da presença de Hb S: adenosina difosfato (B), adenosina monofosfato (C) ácido úrico (E).

Foram plotados os valores de média $\pm$ erro padrão. *General Linear Models (GLM)*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 19. Relações entre os nucleotídeos da adenina nos grupos

A) Relação ATP/ADP e B) relação ATP / AMP não apresentaram diferença estatística. C) os nucleotídeos totais de adenina ([ATP] + [ADP] + [AMP]) foram aumentados no grupo AF. D) nenhuma influência na carga energética de adenina $([ATP] + 0,5 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$. Foram plotados os valores de média $\pm$ erro padrão. *General Linear Models (GLM)*.

Fonte: elaborado pelo autor.

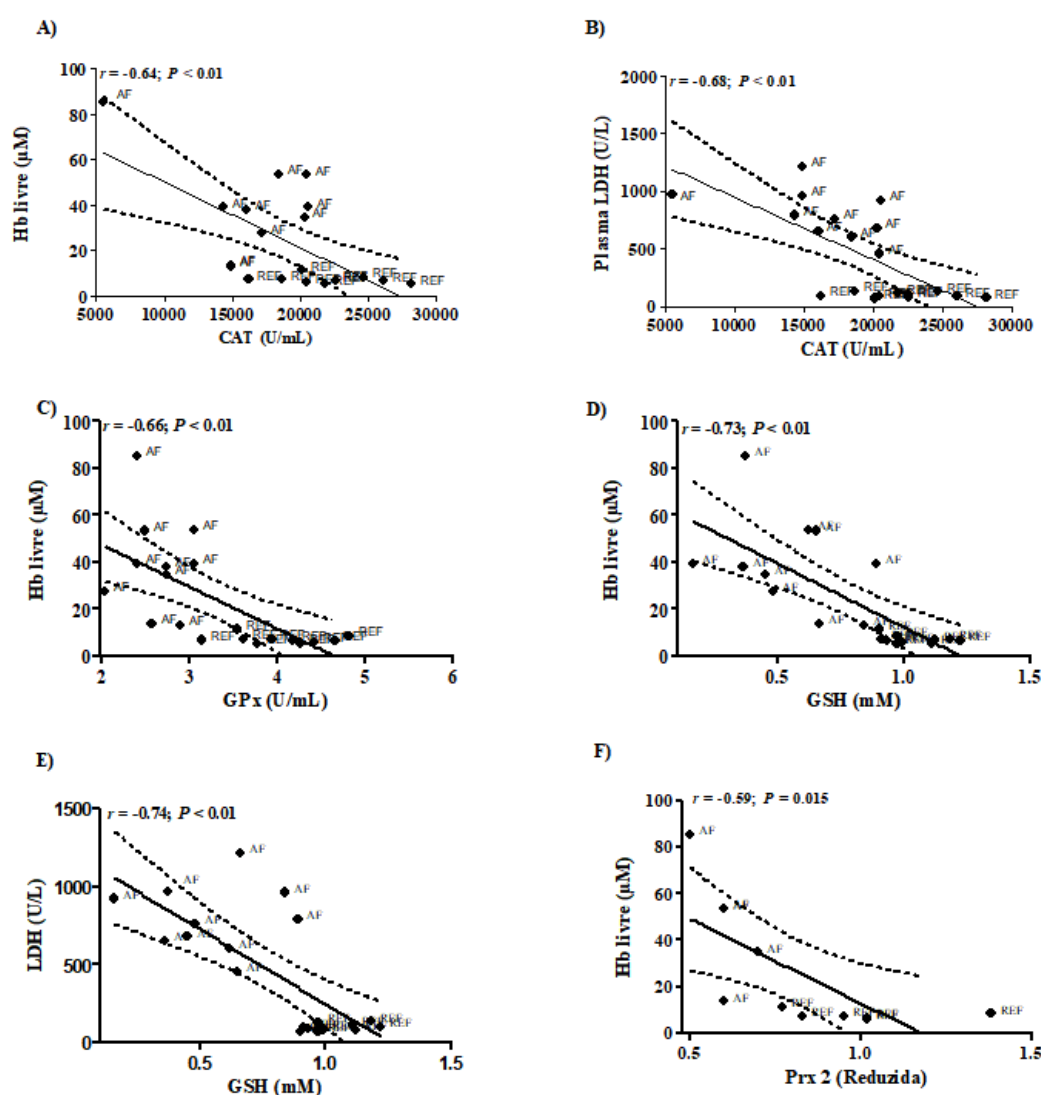
4.5 Principais associações de biomarcadores relacionadas à homeostase metabólica

As análises de grau de associação forneceram as correlações entre antioxidantes, marcadores de hemólise e produtos de oxidação. O efeito protetor dos antioxidantes nos produtos de hemólise e oxidação foi encontrado, uma vez que maiores valores de CAT (Figura 20-A), GPx (Figura 20-C), GSH (Figura 20-D) e Prx2 (Figura 20-F) associaram-se com os menores níveis de marcadores de hemólise. Além disso, foram encontradas outras correlações negativas entre a GPx (Figura 21-A); CAT (Figura 21-B), ERT (Figura 21-C); GSH (Figura 21-D) e Prx 2 (Figura 21-E) com hemina livre. Ainda, foi observado uma correlação negativa entre GSH e ChAld (Figura 21-F).

A interdependência de vias metabólicas e subprodutos também foi avaliada. Diante disso, foram encontradas associações positivas entre a atividade da G6PDH e o

NADPH (Figura 22-A); G6PDH e MetHb redutase (Figura 22-B) e MetHb redutase e NADPH (Figura 22-C), estes resultados refletem, provavelmente, uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo e auto oxidação de Hb. Foram encontradas ainda, outras associações, como a correlação negativa entre MetHb redutase e ERT (Figura 23-A); entre hipoxantina e ERT (Figura 23-B) e positiva entre GPx e ERT (Figura 23-C). Finalmente, foram evidenciadas associações positivas entre ChAld e NADPH (Figura 24-A) ChAld e G6PDH (Figura 24-B) e ChAld e LDH plasmática (Figura 24-C).

Figura 20. Efeitos da proteção antioxidante contra hemólise

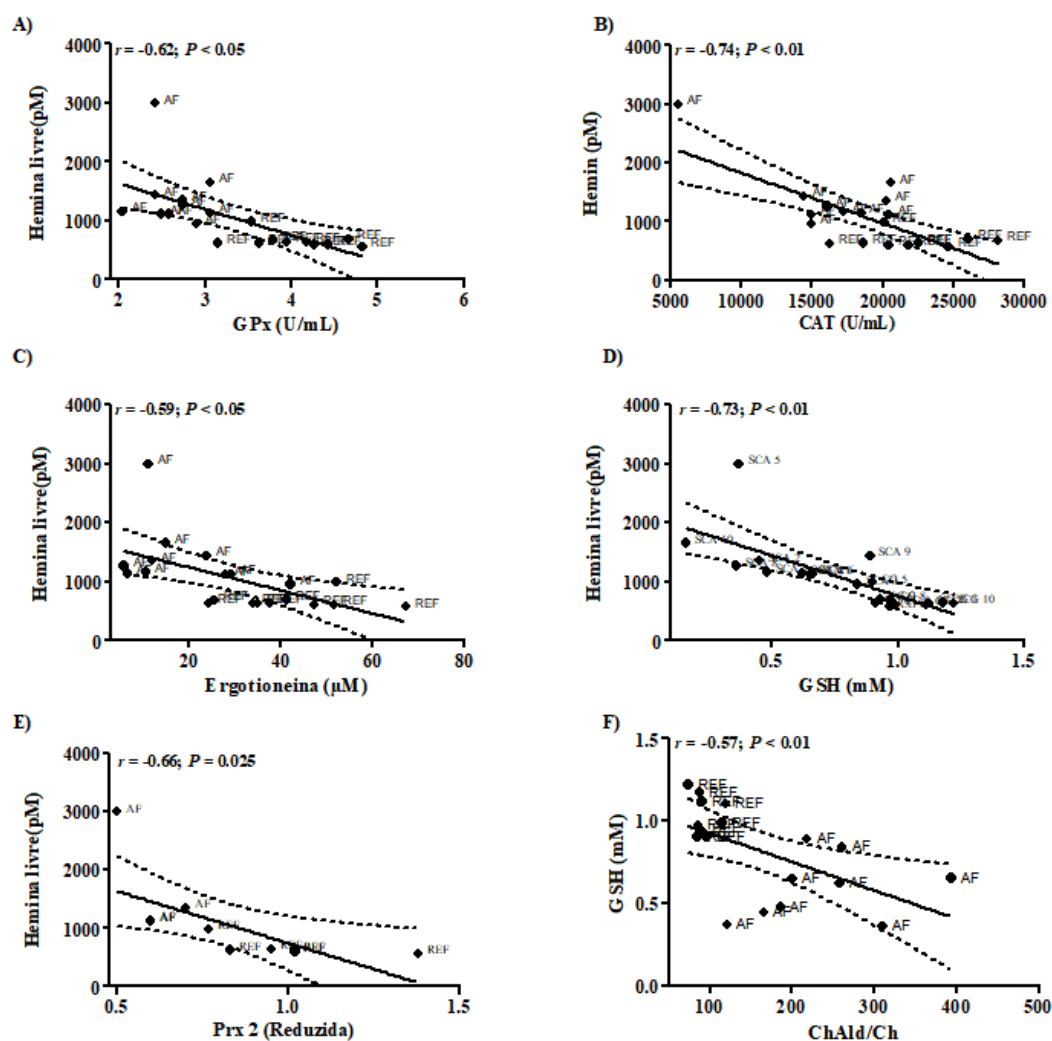


Correlações negativas entre antioxidantes e marcadores de hemólise, tais como (A) catalase e Hb livre; (B) catalase e LDH plasmático (C) GPx e Hb livre; (D) GSH e Hb livre; (E) GSH e LDH plasmático e (F) Prx 2 reduzida e Hb livre.

r : coeficiente de correlação obtido da análise de *Person*.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 21. Efeitos da proteção antioxidante contra o produto de oxidação

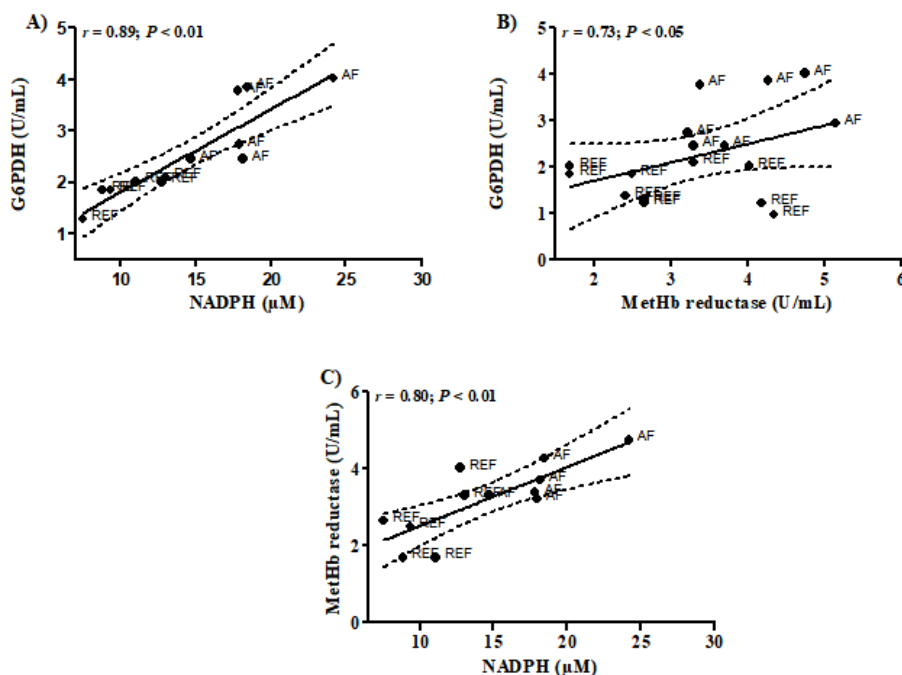


Correlações negativas entre antioxidantes e produtos de oxidação, tais como: (A) GPx e hemina livre; (B) catalase e hemina livre; (C) ergotioneina e hemina livre; (D) GSH e hemina livre; (E) Prx 2 reduzida e hemina livre e (F) GSH e Ch-Ald.

r : coeficiente de correlação obtido da análise de *Person*.

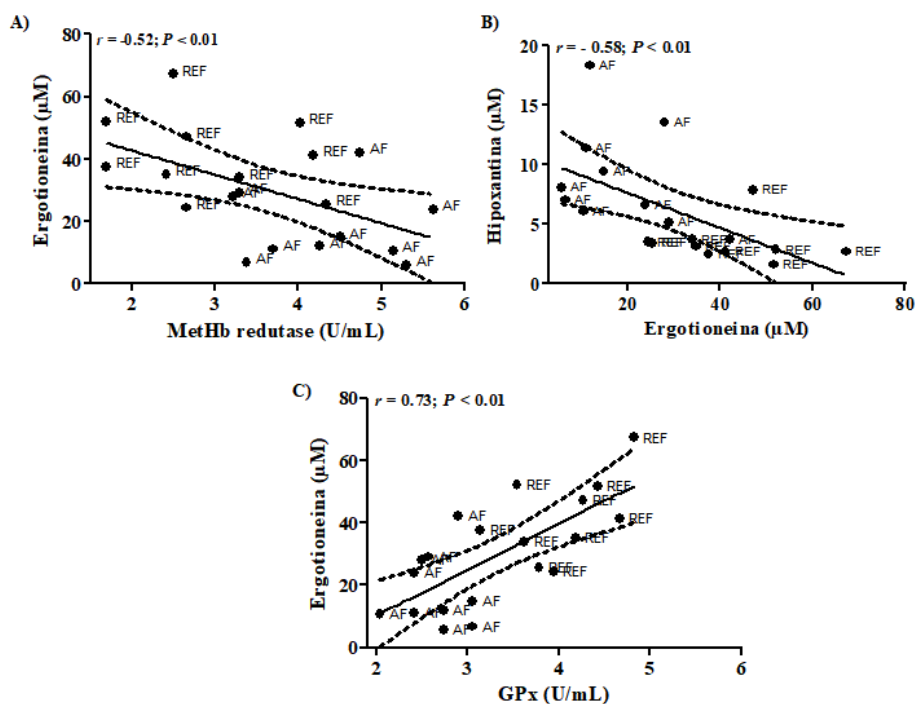
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 22. Interdependência do metabolismo dos eritrócitos



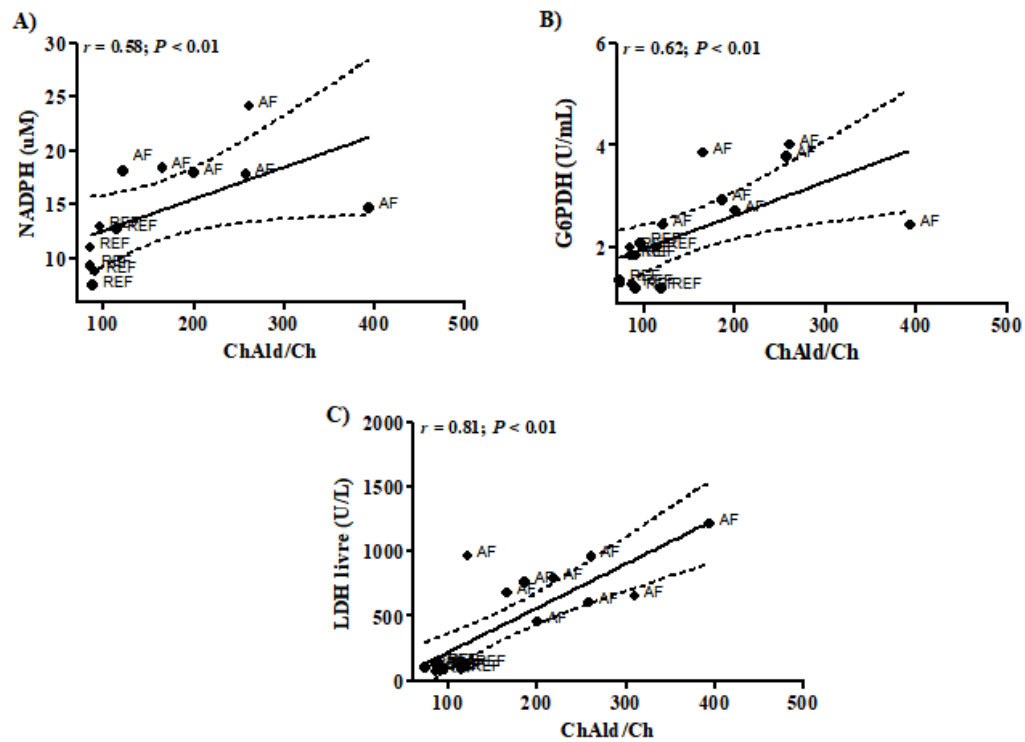
G6PDH mostrou uma correlação positiva com NADPH (A) e com MetHb redutase (B). Além disso, foi evidenciada uma correlação positiva entre MetHb r : coeficiente de correlação obtido da análise de *Person*. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 23. Interdependência de antioxidantes e metabólito de nucleotídeos



ERT foi negativamente correlacionado com MetHb reductase (A) e hipoxantina (B). Enquanto ERT e GPx apresentaram correlação positiva (C). r : coeficiente de correlação obtido da análise de *Person*. Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 24. Interdependência do ChAld, metabolismo dos eritrócitos e marcador de hemólise.



O Ch-Ald correlacionou-se positivamente com NADPH (A), G6PDH (B) e LDH livre (C).

r : coeficiente de correlação obtido da análise de *Person*.

Fonte: elaborado pelo autor.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O estado hiperoxidativo dos eritrócitos falciformes é bem conhecido na literatura (Silva, D. G. *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016; Alayash, 2017), desencadeado pela polimerização da Hb S (ocorrência fisiopatológica essencial na AF) (Vekilov, 2007) e potencializado pela auto oxidação instável da Hb S (Hebbel *et al.*, 1988), o que culmina em perturbações graves do metabolismo redox dos eritrócitos (Silva, D. G. *et al.*, 2013). A via do metabolismo redox está intimamente relacionada com a via das pentoses fosfato, o único meio pelo qual os eritrócitos podem reciclar o NADPH (Messana *et al.*, 1996), assim também está interconectada com a glicólise, a via da MetHb redutase, o metabolismo de nucleotídeos e outros (Nemkov *et al.*, 2016). Neste contexto, muitos estudos investigaram individualmente enzimas e/ou metabólitos de tais vias, mostrando atividades mais elevadas de enzimas glicolíticas e via das pentoses fosfato, bem como níveis aumentados de 2,3-BFG (Lachant *et al.*, 1983; Lachant *et al.*, 1989) e conteúdo anormal de nucleotídeos de piridina (Zerez *et al.*, 1988); e, recentemente, alterações nos níveis de metabólitos dos nucleotídeos na AF (Castilhos *et al.*, 2017b). No entanto, segundo o conhecimento dos autores, evidências de adaptações metabólicas de eritrócitos devido a presença da Hb S, levando em consideração uma análise integrada das vias metabólicas mencionadas, não foram relatadas na literatura até o momento.

Os resultados de fragilidade osmótica encontrados estão de acordo com a literatura, uma vez que confirmaram a típica resistência osmótica dos eritrócitos falciformes (Rogers *et al.*, 2013; Parrow *et al.*, 2017). Isso ocorre, principalmente, devido à polimerização da Hb S associada à disfunção dos canais iônicos da membrana, incluindo o cotransportador K-Cl, que resulta na perda de K^+ intracelular, retração de eritrócitos, aumento da rigidez e desidratação celular (Kuypers, 2007; Biswal *et al.*, 2018). Os polímeros e a oxidação de Hb S também afetam proteínas de membrana que possuem funções estruturais, especialmente, a proteína transportadora da banda 3 (Kato *et al.*, 2018). Nos eritrócitos, a proteína da banda 3 medeia a translocação do ON (Carvalho *et al.*, 2008) e seus efeitos estão fortemente relacionados aos estados intracelulares de fosforilação/desfosforilação (Bordin *et al.*, 1995). A associação entre as proteínas banda 3 e Gi com as subunidades $G\alpha_{1/2}$ e $G\beta$ ocorrem e um envolvimento de AChE em uma ligação conformacional entre as proteínas Gi e banda 3 tem sido proposto, associado à atividade da AChE dependendo do status de fosforilação da banda 3 (Carvalho *et al.*, 2009).

Os eritrócitos são os elementos sanguíneos com maior expressão da enzima ligada à membrana – AChE, a qual hidrolisa a ACh (Wright e Plummer, 1973). Além disso, muitos estudos atribuíram à ACh um papel significativo em vários eventos eritrocitários, tais como propriedades hemorreológicas e de transporte de oxigênio, metabolismo do ON e mobilização de metabólitos derivados do ON, além de mudanças relevantes nos íons do plasma e no pH (Mesquita *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2004; Saldanha *et al.*, 2007). No entanto, pouco se sabe sobre a AChE dos eritrócitos, além de sua influência na limitação da bioatividade da ACh. Assim, juntando os resultados encontrados no presente estudo (aumento da atividade da AChE nas células falciformes) que são consistentes com achados anteriores (Eluwa, 1990), e as propriedades da ACh já mencionadas, supõe-se que a AChE possa influenciar as vias de transdução de sinal que regulam o metabolismo do ON e a polimerização da HbS, sendo válidas mais investigações a seu respeito.

A forma anormal da célula falciforme torna as células propensas à hemólise, levando à liberação de Hb livre (marcador direto de hemólise) e LDH plasmática (marcador indireto de hemólise) na circulação (Gladwin *et al.*, 2012; Soares e Bozza, 2016; Kucukal *et al.*, 2018). Um aspecto importante da hemólise associada às crises de falcização é que grandes quantidades de liberação de Hb na circulação podem contribuir para as complicações de lesão e inflamação dos vasos sanguíneos (Alayash, 2018). Assim, os marcadores hemolíticos aumentados na AF nesse trabalho, confirmaram o estado hemolítico esperado dos pacientes com essa doença, uma vez que as células falciformes são altamente instáveis, apresentando um tempo de vida bastante reduzido (Alayash, 2018). A esse respeito, as análises de grau de associação entre marcadores antioxidantes e hemolíticos do presente estudo, mostraram que a capacidade antioxidante diminuída das células falciformes contribui significativamente para a hemólise, como recentemente sugerido por Kato *et al.* (2018) (Kato *et al.*, 2018). Além disso, os resultados encontrados mostraram, estatisticamente significativo ou não, um padrão geral diminuído dos marcadores antioxidantes avaliados no grupo AF, refletindo seu consumo devido ao estresse oxidativo crônico e acentuado desta doença (Chirico e Pialoux, 2012).

Walter e colaboradores (2006) demonstraram que a diminuição da capacidade antioxidante é uma importante causa de lesão tecidual na AF (Walter, 2006), corroborando com os resultados aumentados de ChAld nos pacientes com AF (Kucuk, 1992). Estudos anteriores demonstraram que, comparados aos eritrócitos contendo HbA, os eritrócitos falciformes mostraram um aumento de lipídios oxidados (Shohet, 1984) que

pode induzir alterações na conformação da membrana celular, levando à hemólise (Farag e Alagawany, 2018). Esse processo hemolítico pode explicar a correlação positiva entre LDH e ChAld obtida no presente estudo. Além disso, os oxisteróis têm a capacidade de alterar vias metabólicas, induzir a modificação de proteínas e aumentar a concentração intracelular de ERO (Kulig *et al.*, 2016). Assim, as correlações positivas com NADPH e G6PDH podem refletir uma resposta adaptativa da célula, uma vez que o NADPH e a G6PDH atuam na proteção dos eritrócitos das lesões desencadeadas pelo processo de oxidação.

A inflamação crônica é um componente-chave da fisiopatologia da AF devido ao processo de polimerização da Hb S que pode desencadear uma cascata de interações celulares mediadas por proteínas inflamatórias (citocinas) (Hoppe, 2014). As citocinas pró-inflamatórias são produzidas predominantemente por macrófagos ativados, como interleucinas (IL) -1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Ashley-Koch *et al.*, 2008). Estudos já demonstraram níveis elevados de IL-8 e TNF- α no plasma de pacientes com AF, contribuindo para o agravamento da fisiopatologia da doença (Lanaro *et al.*, 2009). No entanto, estudos recentes revelaram que os oxisteróis, como o ChAld, podem atuar como estimulantes das reações inflamatórias, induzindo tanto a expressão quanto a síntese de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, IL-8 e moléculas de adesão, incluindo molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e E-selectina (Vejux e Lizard, 2009). Assim, sugere-se que o aumento de ChAld na AF possa contribuir significativamente para o processo inflamatório nessa doença.

Ainda com relação aos marcadores de oxidação, foram encontrados maiores níveis de hemina livre nos indivíduos com AF do que grupo REF. Esse resultado pode ser explicado, uma vez que cerca de 75-80% do Fe biodisponível em mamíferos estão contidos dentro dos grupos heme prostéticos de hemoproteínas (Gozzelino e Soares, 2014). O heme é uma molécula hidrofóbica de baixo peso molecular que pode ser absorvida pelas membranas celulares, proteínas plasmáticas e lipídios. Da mesma maneira que o sistema de Haptoglobina-Hb, a hemopexina plasmática (Hpx) sequestra heme em uma forma inerte, não-tóxica e o transporta para o fígado, a fim de ser catabolizado e excretado, prevenindo os efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios dessa molécula (Kato, 2009; Schaer *et al.*, 2014). No entanto, os eventos fisiopatológicos da AF sobrecarregam a capacidade de eliminação endógena da Hpx plasmática (Gouveia *et al.*, 2017), possibilitando efeitos deletérios adicionais de heme, como pró-oxidantes

(Figueiredo *et al.*, 2007), pró-inflamatórios (Figueiredo *et al.*, 2007), vasoativos (Larsen, 2010) e citotóxicos (Ferreira *et al.*, 2008). Assim, este marcador evidenciou a extensão das consequências oxidativas na AF, justificando por que a terapia antioxidante é uma alternativa, promissora e crescente para o tratamento da AF (Da Silva *et al.*, 2015).

A esse respeito, vale ressaltar as múltiplas propriedades do ERT que estão, direta ou indiretamente, envolvidas no processo fisiopatológico da AF. Este marcador é um composto derivado da dieta e o segundo tiol mais abundante nos eritrócitos, devido à presença de um transportador específico, OCTN1, o qual foi detectado em eritrócitos maduros (Kobayashi *et al.*, 2004; Paul e Snyder, 2010; Kuypers, 2014). Mitsuyama and May (Mitsuyama, 1999) demonstraram claramente a captação e o acúmulo de ERT por glóbulos vermelhos maduros (Mitsuyama, 1999). Assim, parece lógico supor que o ERT é um antioxidante especializado na proteção desse tipo de célula. De fato, inúmeros estudos *in vitro* demonstraram a capacidade do ERT de eliminar as ERO (como $\bullet\text{OH}$ (Tang, R. M. Y. *et al.*, 2018) e $^1\text{O}_2$ (Stoffels *et al.*, 2017)), modular a inflamação (Laurenza, 2008), entre outras atividades citoprotetoras (Paul e Snyder, 2010). No presente estudo foi encontrada uma diminuição de cerca de 50% deste marcador em células falciformes, sugerindo um possível efeito protetor, pelo consumo de ERT, devido ao estado hiperoxidativo nessas células. Estudos com roedores mostraram o efeito protetor desse antioxidante contra o dano tecidual induzido por citocinas, como por lesão pulmonar, e lesões do tipo isquemia-reperusão no fígado, coração e intestino (Arduini; Bedirli *et al.*, 2004; Sakrak *et al.*, 2008), configurando alguns argumentos que devem ser levados em consideração para abordar melhor a hipótese de uso farmacológico de ERT para o tratamento de pacientes com AF.

Além disso, foram encontradas associações interessantes entre ERT e marcadores do metabolismo eritrocitário. Com relação ao metabolismo de nucleotídeos, evidenciou-se uma correlação negativa entre ERT e hipoxantina, sugerindo que a ERT possa inibir a formação de hipoxantina ou reagir diretamente com esta, devido ao seu papel pró-oxidante (Zhu, 2011). Na via da MetHb redutase, foi encontrada uma associação negativa entre ERT e metHb redutase, o que pode ser explicado devido à capacidade do ERT em reduzir a metHb de volta para Hb. Assim, é sugerido que, durante a saturação do sistema ou redução da metHb redutase, a ERT possa assumir tal função. Com relação aos marcadores de oxidação, o papel protetor do ERT nos eritrócitos foi confirmado, uma vez que foi encontrada uma correlação negativa com a hemina livre. Além disso, a associação

positiva com a GPx reforça a proteção contra o processo de oxidação e é sugerido ainda, que a ERT possa colaborar com a GSH doando um grupo sulfidrílico para a GPx.

Além do metabolismo redox, foram avaliados importantes marcadores de outras vias metabólicas, como glicólise, via das pentoses fosfato e nucleotídeos. Sabe-se que em condições fisiológicas, como já mencionado, cerca de 70-90% da glicose é metabolizada pela via glicolítica para produção de ATP e NADH (Van Zwieten *et al.*, 2014). A glicose remanescente é direcionada para o via das pentoses fosfato, cuja função principal é a produção de potencial redox na forma de NADPH (Beutler, 1971). No entanto, Davidson e colaboradores (1972) demonstraram *in vitro* que sob condições oxidativas, o fluxo de G6P através do via das pentoses fosfato pode ser acentuada cerca de 20 vezes (Davidson *et al.*, 1972). Ainda, foi encontrado um aumento de G6PDH e NADPH em células falciformes, sugerindo que a glicose foi direcionada para a via das pentoses fosfato, a fim de garantir níveis adequados de NADPH, necessários para proteger os eritrócitos das lesões desencadeadas por oxidantes (Castagnola *et al.*, 2010). A esse respeito, Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 2016) demonstraram *in vitro* que sob situações de estresse oxidativo induzido, os eritrócitos mudaram o metabolismo da glicose em direção à via das pentoses fosfato, buscando a produção de NADPH para a redução do oxidante (Zhang *et al.*, 2016).

De acordo com o mecanismo de mudança mencionado, poderia se esperar uma diminuição nos intermediários da glicólise e nas atividades enzimáticas. Por outro lado, os resultados desse trabalho revelaram que as células falciformes foram caracterizadas pelo aumento da atividade glicolítica em relação as células contendo Hb A. Isso pode ser explicado em razão de atividades mais elevadas de HXK e LDH, o que resultou em níveis mais altos de intermediário glicolítico, o ATP. Esses resultados estão de acordo com o aumento da captação de glicose e a produção de lactato em células falciformes relatados por Rogers e colaboradores (2013) (Rogers *et al.*, 2013). Além disso, os eritrócitos são mais do que simplesmente um transportador de O₂

, mas em virtude de sua capacidade de liberar o ATP, desempenham um papel igualmente importante como regulador de sua própria distribuição, contribuindo para o controle do fluxo sanguíneo tecidual (Ellsworth, 2004). Assim, a realização dessa tarefa regulatória parece ser ainda mais difícil para as células falciformes, devido a sua ruptura da homeostase metabólica. Curiosamente, esta perturbação metabólica não afetou as proporções ATP/ADP, ADP/AMP e AEC.

Sabe-se que em períodos de hipóxia celular ou estresse celular, o ATP é convertido em ADP e AMP, este último pode ser catabolizado, levando ao acúmulo de hipoxantina e xantina no tecido (Osarogiagbon *et al.*, 2000). Os níveis de hipoxantina e ácido úrico encontrados no presente estudo estão de acordo com a literatura, uma vez que Castilhos *et al.* (2017) evidenciaram níveis elevados de hipoxantina e diminuição de ácido úrico em pacientes com AF (Castilhos *et al.*, 2017a). Neste estudo também foi relatado diminuição da atividade da xantina oxidase (XO) em indivíduos com AF. Esta enzima é ativada durante ciclos repetidos de isquemia/reperfusão e catalisa a geração de $O_2^{\bullet-}$ a partir de hipoxantina e causa uma redução de XO (Xu *et al.*, 2004). Este efeito pode explicar os resultados encontrados, pois, como consequência da diminuição da atividade de XO, foi observado o acúmulo de substrato enzimático junto com a diminuição na síntese do produto, ou seja, altos níveis de hipoxantina e baixo conteúdo de ácido úrico em células falciformes.

Nas células falciformes, sob condições de hipóxia, a auto oxidação da Hb é mais evidenciada e é quase inteiramente responsável pela formação de ERO (Rifkind *et al.*, 2014). Neste caso, a Hb oxigenada pode ser auto oxidada fisiologicamente para metHb, a uma taxa de aproximadamente 0,5–3% por dia (Umbreit, 2007). No entanto, a metHb redutase converte a metHb em sua forma funcional reduzida e interrompe o processo de oxidação da Hb antes que hemicromos sejam formados (Zerez, 1990). Zerez *et al.* observaram um aumento significativo da atividade da metHb redutase em células falciformes em comparação com as normais (Zerez, 1990), o que corrobora com nossos dados. Esta enzima requer nucleotídeos reduzidos, principalmente NADH, para converter o metHb na sua forma funcional reduzida, através da catálise de Fe férrico para o ferroso (Hare *et al.*, 2012; Roumenina *et al.*, 2016; Vercellotti *et al.*, 2016). Além disso, foram encontradas correlações positivas entre os marcadores da via das pentoses fosfato e a atividade da metHb redutase, refletindo a coordenação do metabolismo dos eritrócitos.

Finalmente, foram adotados rigorosos critérios de exclusão e resultados basais bem caracterizados dos pacientes com AF, para a composição do grupo de estudo, consolidando o estado hiperoxidativo bem documentado de eritrócitos falciformes que sobrecarrega o sistema de defesa antioxidante, levando à ruptura da homeostase metabólica em eritrócitos falciformes.

CONCLUSÕES

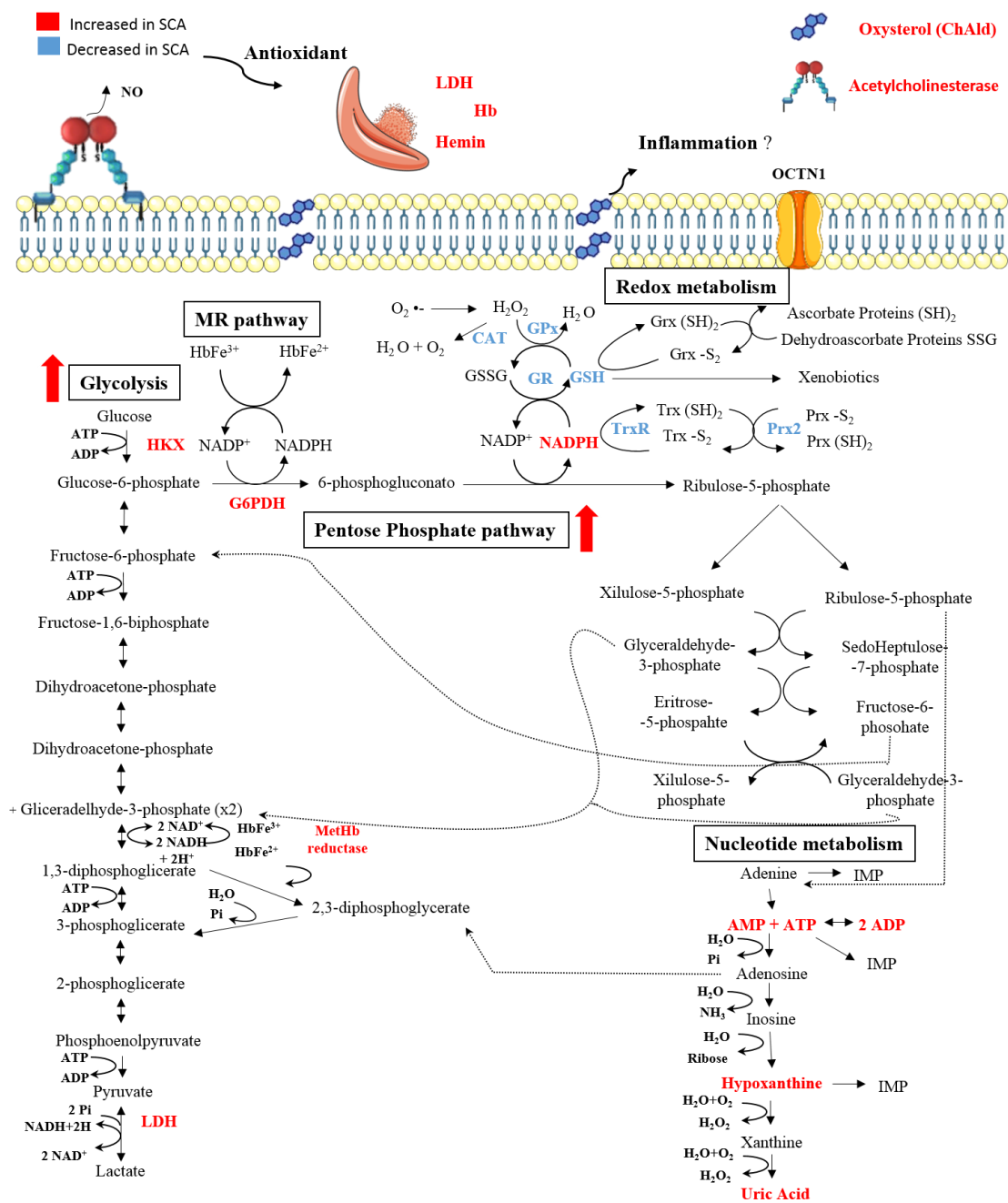
6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir:

1. A capacidade antioxidante prejudicada das células falciformes contribui significativamente para a hemólise;
2. A AChE parece contribuir com o metabolismo dos eritrócitos de um modo muito mais complexo do que foi explorado até o momento;
3. ChAld pode ser investigado com um marcador específico de lesão associado ao processo inflamatório na AF;
4. ERT deve ser considerado como uma alternativa promissora de terapia antioxidante para o tratamento de AF;
5. As células falciformes parecem escapar ou, de alguma forma, alterar o mecanismo de deslocamento entre a glicólise e a via das pentoses fosfato bem descrita para eritrócitos saudáveis, mantendo ambas as vias supra-reguladas.

As conclusões foram sintetizadas na figura 25.

Figura 25. Conclusões sintetizadas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

AJDZANOVIC, V. et al. The negative effect of soy extract on erythrocyte membrane fluidity: an electron paramagnetic resonance study. **J Membr Biol**, v. 239, n. 3, p. 131-5, Feb 2011. ISSN 1432-1424 (Electronic) 0022-2631 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21132426> >.

AKOHOUE, S. A. et al. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. **Pediatr Res**, v. 61, n. 2, p. 233-8, Feb 2007. ISSN 0031-3998 (Print) 0031-3998 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237728> >.

AKRAM, M. et al. Hexose monophosphate shunt, the role of its metabolites and associated disorders: A review. **J Cell Physiol**, Jan 29 2019. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30697723> >.

ALAYASH, A. I. Reactions of Sperm Whale Myoglobin with Hydrogen Peroxide. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY** v. 274, p. 2029–2037, 1999.

_____. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells Mol Dis**, May 20 2017. ISSN 1096-0961 (Electronic) 1079-9796 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28554826> >.

_____. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. **Blood Cells Mol Dis**, v. 70, p. 78-86, May 2018. ISSN 1096-0961 (Electronic) 1079-9796 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28554826> >.

ANIE, K. A. Psychological complications in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 129, n. 6, p. 723-9, Jun 2005. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952997> >.

ANSARI, F. A.; ALI, S. N.; MAHMOOD, R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1878-86, Oct 2015. ISSN 1879-3177 (Electronic) 0887-2333 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26231821> >.

ARAGON-MARTINEZ, O. H. et al. A novel method for measuring the ATP-related compounds in human erythrocytes. **Tohoku J Exp Med**, v. 233, n. 3, p. 205-14, Jul 2014. ISSN 0040-8727.

ARDUINI, L. E., P. HOCHSTEIN, ET AL., . The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: a novel function for ergothioneine. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 281, p. 41-43,

ASHLEY-KOCH, A. E. et al. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5721-6, Jun 15 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187665> >.

ASLAN, M., BROWN, D., FREEMAN, B. . Reactive Species in Sickle Cell Disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 375-391, 2000.

BALLAS, S. K. et al. Beyond the Definitions of the Phenotypic Complications of Sickle Cell Disease: An Update on Management. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-55, 2012. ISSN 1537-744X.

BARABINO, G. A.; PLATT, M. O.; KAUL, D. K. Sickle Cell Biomechanics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 345-367, 2010. ISSN 1523-9829 1545-4274.

BARODKA, V. et al. Nitroprusside inhibits calcium-induced impairment of red blood cell deformability. **Transfusion**, v. 54, n. 2, p. 434-44, Feb 2014. ISSN 1537-2995 (Electronic) 0041-1132 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23781865> >.

BEDIRLI, A. et al. Ergothioneine pretreatment protects the liver from ischemia-reperfusion injury caused by increasing hepatic heat shock protein 70. **J Surg Res**, v. 122, n. 1, p. 96-102, Nov 2004. ISSN 0022-4804 (Print) 0022-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522321> >.

BELCHER, J. D., BECKMAN, J.D., BALLA, G. ET AL. Heme Degradation and Vascular Injury. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, p. 234-248 2010.

BENFEITAS, R. et al. Hydrogen peroxide metabolism and sensing in human erythrocytes: a validated kinetic model and reappraisal of the role of peroxiredoxin II. **Free Radic Biol Med**, v. 74, p. 35-49, Sep 2014. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952139> >.

BEUTLER, E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 10, p. 1957-1966, 1969.

BEUTLER, E. Red cell metabolism. **Bases moleculaires de la pathologie**, v. 54, p. 759-764, 1971.

_____. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. . **New York: Grune & Stratton**, 1975.

_____. G6PD deficiency. **Blood** v. 84, n. 11, p. 3613, 1994.

BISWAL, S. et al. Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. **Hematology**, p. 1-9, Jul 16 2018. ISSN 1607-8454 (Electronic) 1024-5332 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30010491> >.

BORDIN, L. et al. Functional link between phosphorylation state of membrane proteins and morphological changes of human erythrocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 213, n. 1, p. 249-57, Aug 4 1995. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRAGA, J. A. et al. Guidelines on neonatal screening and painful vaso-occlusive crisis in sickle cell disease: Associacao Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular: Project guidelines:

Associacao Medica Brasileira - 2016. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 38, n. 2, p. 147-57, Apr-Jun 2016. ISSN 1516-8484 (Print) 1516-8484 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208574> >.

CARRELL, R. W., WINTERBOURN, C.C, RACHMILEWITZ, E. A. Activated oxygen and haemolysis. **Br J Haematol** v. 30, p. 259-264, 1975.

CARVALHO, F. A. et al. Non-neuronal cholinergic system and signal transduction pathways mediated by band 3 in red blood cells. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 40, n. 3, p. 207-27, 2008. ISSN 1386-0291 (Print) 1386-0291.

CARVALHO, F. A. et al. Modulation of erythrocyte acetylcholinesterase activity and its association with G protein-band 3 interactions. **J Membr Biol**, v. 228, n. 2, p. 89-97, Mar 2009. ISSN 1432-1424 (Electronic) 0022-2631 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19294450> >.

CARVALHO, F. A. et al. Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels. **J Appl Toxicol**, v. 24, n. 6, p. 419-27, Nov-Dec 2004. ISSN 0260-437X (Print) 0260-437x.

CASTAGNOLA, M. et al. Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art. **Blood Transfus**, v. 8 Suppl 3, p. s53-8, Jun 2010. ISSN 1723-2007 (Print) 1723-2007 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606750> >.

CASTILHOS, L. G. et al. Increased oxidative stress alters nucleosides metabolite levels in sickle cell anemia. **Redox Rep**, v. 22, n. 6, p. 451-459, Nov 2017a. ISSN 1743-2928 (Electronic) 1351-0002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209096> >.

_____. Increased oxidative stress alters nucleosides metabolite levels in sickle cell anemia. **Redox Rep**, p. 1-9, Feb 16 2017b. ISSN 1743-2928 (Electronic) 1351-0002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209096> >.

CHAVES, M. A.; LEONART, M. S.; DO NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**, v. 13, n. 3, p. 187-92, Jun 2008. ISSN 1607-8454 (Electronic) 1024-5332 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18702879> >.

CHEAH, I. K.; HALLIWELL, B. Ergothioneine; antioxidant potential, physiological function and role in disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, n. 5, p. 784-93, May 2012. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001064> >.

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v. 64, n. 1, p. 72-80, Jan 2012. ISSN 1521-6551 (Electronic) 1521-6543 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131167> >.

COHEN, G. et al. Signaling properties of 4-hydroxyalkenals formed by lipid peroxidation in diabetes. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 978-987, Dec 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23973638> >.

DA SILVA, D. G. et al. Potential utility of melatonin as an antioxidant therapy in the management of sickle cell anemia. **J Pineal Res**, v. 58, n. 2, p. 178-88, Mar 2015. ISSN 0742-3098.

DANTAS, L. S. et al. Cholesterol secosterol aldehyde adduction and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase: Potential implications in ALS. **Redox Biol**, v. 19, p. 105-115, Oct 2018. ISSN 2213-2317 (Electronic) 2213-2317 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30142602> >.

DAS, S. K., AND NAIR, R. C. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. **Br. J. Haematol**, v. 44, n. 87-92, 1980.

DASGUPTA, T. H., R. P.; KAUL D. K. Protective Effect of Arginine on Oxidative Stress in Transgenic Sick Mouse Models. **Free Radical Biology and Medicine** v. 41, p. 1771-1778, 2006.

DAVIDSON WD, T. K. Factors affecting pentose phosphate pathway activity in human red cells. **Br J Haematol.**, v. 23, n. 3, p. 371-385, 1972.

DIEPSTRATEN, S. T.; HART, A. H. Modelling human haemoglobin switching. **Blood Rev**, v. 33, p. 11-23, Jan 2019. ISSN 1532-1681 (Electronic) 0268-960X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30616747> >.

ELLSWORTH, M. L. Red blood cell-derived ATP as a regulator of skeletal muscle perfusion. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 1, p. 35-41, Jan 2004. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14707765> >.

ELUWA, E. O., OBIDOA, O., OGAN, A. U., ONWUBIKO, H. A. . Erythrocyte Membrane Enzymes in Sick Cell Anemia 2. Acetylcholinesterase and ATPase Activities. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, v. 4, p. 234-237, 1990.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. **Chem Biol Interact**, v. 279, p. 73-83, Jan 5 2018. ISSN 1872-7786 (Electronic) 0009-2797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29128605> >.

FARTHING, D. E.; FARTHING, C. A.; XI, L. Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: from bench to point-of-care. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 240, n. 6, p. 821-31, Jun 2015. ISSN 1535-3699 (Electronic) 1535-3699 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25956679> >.

FERREIRA, A. et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **J Mol Med (Berl)**, v. 86, n. 10, p. 1097-111, Oct 2008. ISSN 0946-2716 (Print) 0946-2716 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641963> >.

FIGUEIREDO, R. T. et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v. 282, n. 28, p. 20221-9, Jul 13 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502383> >.

FOLLER, M.; HUBER, S. M.; LANG, F. Erythrocyte programmed cell death. **IUBMB Life**, v. 60, n. 10, p. 661-8, Oct 2008. ISSN 1521-6551 (Electronic) 1521-6543 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720418> >.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sick cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **J Clin Invest**, v. 117, n. 4, p. 850-8, Apr 2007. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17404610> >.

GLADWIN, M. T.; KANIAS, T.; KIM-SHAPIRO, D. B. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease. **J Clin Invest**, v. 122, n. 4, p. 1205-8, Apr 2012. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22446184> >.

GOUVEIA, Z. et al. Characterization of plasma labile heme in hemolytic conditions. **FEBS J**, v. 284, n. 19, p. 3278-3301, Oct 2017. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28783254> >.

GOZZELINO, R.; SOARES, M. P. Coupling heme and iron metabolism via ferritin H chain. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 11, p. 1754-69, Apr 10 2014. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24124891> >.

GRIFFITHS, W. J. et al. New methods for analysis of oxysterols and related compounds by LC-MS. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 162, p. 4-26, 2016. ISSN 09600760.

GUPTA, S. E. A. Correlation of red blood cell acetylcholinesterase enzyme activity with various RBC. **Ind J Clin Biochem** 2017.

HARE, G. M. et al. Plasma methemoglobin as a potential biomarker of anemic stress in humans. **Can J Anaesth**, v. 59, n. 4, p. 348-56, Apr 2012. ISSN 1496-8975 (Electronic) 0832-610X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271507> >.

HEBBEL, R., ET AL. Spontaneous Oxygen Radical Generation by Sick Erythrocytes. **The American Society for Clinical Investigation**, p. 1253-1259, 1982.

HEBBEL, R. P. et al. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sick hemoglobin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 1, p. 237-41, Jan 1988. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The Endothelial Biology of Sick Cell Disease: Inflammation and a Chronic Vasculopathy. **Microcirculation**, v. 11, n. 2, p. 129-151, 2004. ISSN 1073-9688 1549-8719.

HIERSO, R. et al. Exacerbation of oxidative stress during sickle vaso-occlusive crisis is associated with decreased anti-band 3 autoantibodies rate and increased red blood cell-derived microparticle level: a prospective study. **Br J Haematol**, v. 176, n. 5, p. 805-813, Mar 2017. ISSN 1365-2141 (Electronic) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27984639> >.

HOPPE, C. C. Inflammatory mediators of endothelial injury in sickle cell disease. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 28, n. 2, p. 265-86, Apr 2014. ISSN 1558-1977 (Electronic) 0889-8588 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589266> >.

JANG, H. H. et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 625-35, May 28

2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163410> >.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol**, v. 1, p. 244-57, Feb 8 2013. ISSN 2213-2317 (Electronic) 2213-2317 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024158> >.

KASSA, T. et al. Sick Cell Hemoglobin in the Ferryl State Promotes betaCys-93 Oxidation and Mitochondrial Dysfunction in Epithelial Lung Cells (E10). **J Biol Chem**, v. 290, n. 46, p. 27939-58, Nov 13 2015. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26396189> >.

KATO, G. J. Haptoglobin halts hemoglobin's havoc. **J Clin Invest**, v. 119, n. 8, p. 2140-2, Aug 2009. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19620777> >.

KATO, G. J. et al. Sick cell disease. **Nat Rev Dis Primers**, v. 4, p. 18010, Mar 15 2018. ISSN 2056-676X (Electronic) 2056-676X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29542687> >.

KEDAR, P. et al. A microplate reader-based method to quantify NADH-cytochrome b5 reductase activity for diagnosis of recessive congenital methaemoglobinemia. **Hematology**, v. 22, n. 4, p. 252-257, May 2017. ISSN 1607-8454 (Electronic) 1024-5332 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27863456> >.

KOBAYASHI, D. et al. Expression of organic cation transporter OCTN1 in hematopoietic cells during erythroid differentiation. **Exp Hematol**, v. 32, n. 12, p. 1156-62, Dec 2004. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588940> >.

KUCUK, O. E. A. The effects of cholesterol oxidation products in sickle and normal red blood cell membranes. **Biochimica et Biophys Acta**, p. 296-302, 1992.

KUCUKAL, E. et al. Red Blood Cell Adhesion to Heme-Activated Endothelial Cells Reflects Clinical Phenotype in Sickle Cell Disease. **Am J Hematol**, Jun 15 2018. ISSN 1096-8652 (Electronic) 0361-8609 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29905377> >.

KULIG, W. et al. Cholesterol oxidation products and their biological importance. **Chem Phys Lipids**, v. 199, p. 144-160, Sep 2016. ISSN 1873-2941 (Electronic) 0009-3084 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26956952> >.

KUYPERS, F. A. Membrane Lipid Alterations in Hemoglobinopathies. . **American society of haematology**. , p. 68-73, 2007.

KUYPERS, F. A. Hemoglobin s polymerization and red cell membrane changes. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 28, n. 2, p. 155-79, Apr 2014. ISSN 1558-1977 (Electronic) 0889-8588 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589260> >.

LACHANT, N. A.; DAVIDSON, W. D.; TANAKA, K. R. Impaired pentose phosphate shunt function in sickle cell disease: a potential mechanism for increased Heinz body formation and membrane lipid peroxidation. **Am J Hematol**, v. 15, n. 1, p. 1-13, Aug 1983. ISSN 0361-8609 (Print) 0361-8609.

LACHANT, N. A.; ZEREZ, C. R.; TANAKA, K. R. Relationship between the nicotinamide adenine dinucleotide redox potential and the 2,3-diphosphoglycerate content in the erythrocyte in sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 72, n. 2, p. 265-71, Jun 1989. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048.

LAGODA, G. et al. Sustained nitric oxide (NO)-releasing compound reverses dysregulated NO signal transduction in priapism. **FASEB J**, v. 28, n. 1, p. 76-84, Jan 2014. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24076963> >.

LANARO, C. et al. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **J Leukoc Biol**, v. 85, n. 2, p. 235-42, Feb 2009. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19004988> >.

LANG, E.; QADRI, S. M.; LANG, F. Killing me softly - suicidal erythrocyte death. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 44, n. 8, p. 1236-43, Aug 2012. ISSN 1878-5875 (Electronic) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561748> >.

LANG, K. S., LANG, P.A., BAUER, C., DURATON, C, ET AL. Mechanisms of suicidal erythrocyte death. **Cell Physiol Biochem** v. 15, p. 195-202, 2005.

LARSEN, R. E. A. A Central Role for Free Heme in the Pathogenesis of severe sepsis. . **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 51, p. 51-71, 2010.

LAURENZA, I. E. A. Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: Evidence of an anti-inflammatory action. **IOS Press**, v. 33, p. 237-247, 2008.

LAZZARETTI, L. L. et al. Blood Antioxidant Parameters in Sickle Cell Anemia Patients in Steady State. **Journal of the National Medical Association**, v. 100, n. 8, p. 897-902, 2008. ISSN 00279684.

LIU, S. C., ET AL. Uncoupling of the Spectrin-Based Skeleton from the Lipid Bilayer in Sickled Red Cell. **American Association for the Advancement of Science**, v. 254, p. 574-577, 2016.

LOW, F. M. et al. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. **Blood**, v. 109, n. 6, p. 2611-7, Mar 15 2007. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105810> >.

LOW, F. M.; HAMPTON, M. B.; WINTERBOURN, C. C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 9, p. 1621-30, Sep 2008. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18479207> >.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. **IUBMB Life**, v. 60, n. 2, p. 94-111, Feb 2008. ISSN 1521-6543 (Print) 1521-6543 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18379999> >.

MANNERNVIK, B. The enzymes of glutathione metabolism: an overview. **The enzymes of glutathione metabolism: an overview.**, v. 15, n. 4, p. 717-718, 1987.

MANNU, F. E. A. Role of Hemichrome Binding to Erythrocyte Membrane in the Generation of Band-3 Alterations in P-Thalassemia Intermedia Erythrocytes. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 2014-2020, 1995.

MANSANO, F. V. et al. Highly sensitive fluorescent method for the detection of cholesterol aldehydes formed by ozone and singlet molecular oxygen. **Anal Chem**, v. 82, n. 16, p. 6775-81, Aug 15 2010. ISSN 0003-2700.

MATTE, A. et al. Membrane association of peroxiredoxin-2 in red cells is mediated by the N-terminal cytoplasmic domain of band 3. **Free Radic Biol Med**, v. 55, p. 27-35, Feb 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23123411> >.

MATYASH, V. et al. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 5, p. 1137-1146, 2008. ISSN 0022-2275 1539-7262.

MC DONALD, J. H. Handbook of biological statistics. . 3rd ed. Batimore: Sparky House Publishing, 2014.

MESQUITA, R. et al. Effects of acetylcholine and spermineNONOate on erythrocyte hemorheologic and oxygen carrying properties. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 25, n. 3-4, p. 153-63, 2001. ISSN 1386-0291 (Print) 1386-0291.

MESSANA, I. et al. Human erythrocyte metabolism is modulated by the O2-linked transition of hemoglobin. **FEBS Lett**, v. 390, n. 1, p. 25-8, Jul 15 1996. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

MEZZANO, D. et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 95, n. 01, p. 94-99, 2017. ISSN 0340-6245 2567-689X.

MITSUYAMA, H. A. M., M. J. Uptake and antioxidant effects ofUptake and antioxidant effects ofUptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes **Clinical Science** v. 97, p. 407-411, 1999.

MIYAMOTO, S. E. A. Direct Evidence of Singlet Molecular Oxygen [O₂ (1Δg)] Production in the Reaction of Linoleic Acid Hydroperoxide with Peroxynitrite. **J AM CHEM. SOC.**, v. 125, p. 4510-4517, 2003.

MOHANDAS, N.; GALLAGHER, P. G. Red cell membrane: past, present, and future. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3939-48, Nov 15 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988878> >.

NEMKOV, T. et al. Metabolomics in transfusion medicine. **Transfusion**, v. 56, n. 4, p. 980-93, Apr 2016. ISSN 1537-2995 (Electronic) 0041-1132 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26662506> >.

NEY, P. A., ET AL Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. **Blood**, v. 75, p. 1192-1198, 1990.

NUR, E. et al. Increased efflux of oxidized glutathione (GSSG) causes glutathione depletion and potentially diminishes antioxidant defense in sickle erythrocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 11, p. 1412-7, Nov 2011. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558001> >.

ODEH, M., J. The Role of Reperfusion-Induced Injury in the Pathogenesis of the Crush Syndrome. **The new england journal of medicine**, v. 324 p. 1417-1422, 1991.

OSAROGIAGBON UR, C. S., BELCHER JD, ET AL. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. . **Blood**, v. 96, p. 314-320, 2000.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Biomarkers of Oxidative Stress in Red Blood Cells. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 2, p. 131-136, 2011. ISSN 12138118 18047521.

PANTALEO, A. et al. Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions. **Autoimmun Rev**, v. 7, n. 6, p. 457-62, Jun 2008. ISSN 1568-9972 (Print) 1568-9972 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558362> >.

PARROW, N. L. et al. Measurements of red cell deformability and hydration reflect HbF and HbA2 in blood from patients with sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**, v. 65, p. 41-50, Jun 2017. ISSN 1096-0961 (Electronic) 1079-9796 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472705> >.

PATAJ, Z. et al. Quantification of oxysterols in human plasma and red blood cells by liquid chromatography high-resolution tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1439, p. 82-88, Mar 25 2016. ISSN 1873-3778 (Electronic) 0021-9673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607314> >.

PAUL, B. D.; SNYDER, S. H. The unusual amino acid L-ergothioneine is a physiologic cytoprotectant. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 7, p. 1134-40, Jul 2010. ISSN 1476-5403 (Electronic) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911007> >.

PERRONE, S. et al. Oxidative injury in neonatal erythrocytes. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 25, n. Suppl 5, p. 104-8, Oct 2012. ISSN 1476-4954 (Electronic) 1476-4954 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23025782> >.

PIEL, F. B. et al. The distribution of haemoglobin C and its prevalence in newborns in Africa. **Sci Rep**, v. 3, p. 1671, 2013. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23591685> >.

PIEL, F. B. et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 142-151, 2013. ISSN 01406736.

PRIES, A., S., ET AL. Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature **Cardiovascular Research** v. 32, p. 654-667, 1996.

QUINN, C. T. et al. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. **Am J Hematol**, v. 91, n. 12, p. 1195-1201, Dec 2016. ISSN 1096-8652 (Electronic) 0361-8609 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648808> >.

QUINN GP, K. M. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. **New York: Cambridge University Press**, 2002.

REID, M. J., F. Glutathione in disease. . **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 4, p. 65-71, 2001.

REITER, C. D. et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat Med**, v. 8, n. 12, p. 1383-9, Dec 2002. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12426562> >.

RHEE, S. G. Overview on Peroxiredoxin. **Mol Cells**, v. 39, n. 1, p. 1-5, Jan 2016. ISSN 0219-1032 (Electronic) 1016-8478 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26831451> >.

RIFKIND, J. M.; MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. **Front Physiol**, v. 5, p. 500, 2014. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25642190> >.

RODRIGUEZ-ARIZA, A.; TORIBIO, F.; LOPEZ-BAREA, J. Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection. **J Chromatogr B Biomed Appl**, v. 656, n. 2, p. 311-8, Jun 17 1994. ISSN 1572-6495 (Print) 1572-6495.

ROGERS, S. C. et al. Sickle hemoglobin disturbs normal coupling among erythrocyte O₂ content, glycolysis, and antioxidant capacity. **Blood**, v. 121, n. 9, p. 1651-62, Feb 28 2013. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23297128> >.

ROMANA, M.; CONNES, P.; KEY, N. S. Microparticles in sickle cell disease. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 68, n. 2-3, p. 319-329, 2018. ISSN 1875-8622 (Electronic) 1386-0291 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29614639> >.

ROUMENINA, L. T. et al. Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. **Trends Mol Med**, v. 22, n. 3, p. 200-213, Mar 2016. ISSN 1471-499X (Electronic) 1471-4914 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26875449> >.

SAKRAK, O. et al. Ergothioneine modulates proinflammatory cytokines and heat shock protein 70 in mesenteric ischemia and reperfusion injury. **J Surg Res**, v. 144, n. 1, p. 36-42, Jan 2008. ISSN 0022-4804 (Print) 0022-4804 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17603080> >.

SALDANHA, C. Physiological role of erythrocyte nitric oxide. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 64, n. 4, p. 517-520, 2016. ISSN 1875-8622 (Electronic) 1386-0291 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27767981> >.

_____. Human Erythrocyte Acetylcholinesterase in Health and Disease. **Molecules**, v. 22, n. 9, Sep 8 2017. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28885588> >.

SALDANHA, C. et al. Modulation of erythrocyte hemorheological properties by band 3 phosphorylation and dephosphorylation. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 36, n. 3, p. 183-94, 2007. ISSN 1386-0291 (Print) 1386-0291.

SANKARAN, V. G.; WEISS, M. J. Anemia: progress in molecular mechanisms and therapies. **Nat Med**, v. 21, n. 3, p. 221-30, Mar 2015. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25742458> >.

SANTOS, T. et al. Effects of choline on hemorheological properties and NO metabolism of human erythrocytes. **Clin Hemorheol Microcirc**, v. 29, n. 1, p. 41-51, 2003. ISSN 1386-0291 (Print) 1386-0291.

SAÚDE, M. D. Doença Falciforme: o que deve saber sobre herança. p. 1-49, 2014.

SCHACTER, L., WARTH, J. A., GORDON, E. M., PRASAD, A., & KLEIN, B. L. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. **The FASEB Journal**, v. 2, n. 3, p. 237-243, 1988.

SCHAER, D. J. et al. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. **Front Physiol**, v. 5, p. 415, 2014. ISSN 1664-042X (Print) 1664-042X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389409> >.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927-3928, 2008.

SHINAR, E. E. A. Differing Erythrocyte Membrane Skeletal Protein Defects in Alpha and Beta Thalassemia. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 404-410, 1989.

SHOHET, S. K. J. A. S. B. A Novel Phospholipid in Irreversibly Sickled Cells: Evidence for In Vivo Peroxidative Membrane Damage in Sickle Cell Disease. **Blood**, v. 63, p. 362-367, 1984.

SIES H, K. O., MARTINO E, BOVERIS A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Lett**, v. 103, n. 2, p. 287-290, 1979.

SILVA, D. G. et al. Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 1101-9, Dec 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002011> >.

SILVA, D. G. H. et al. Oxidative Stress and Sickle Cell Disease. In: AHMAD, S. (Ed.). **Reactive Oxygen Species in Biology and Human Health**. 1. Boca Raton: CRC Press, 2016. cap. 24, p.335-347.

SILVA, D. G. H. et al. Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 1101-1109, Dec 2013. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002011> >.

SOARES, M. P.; BOZZA, M. T. Red alert: labile heme is an alarmin. **Curr Opin Immunol**, v. 38, p. 94-100, Feb 2016. ISSN 1879-0372 (Electronic) 0952-7915 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26741528> >.

SOTGIA, S. et al. Quantification of L-ergothioneine in whole blood by hydrophilic interaction ultra-performance liquid chromatography and UV-detection. **J Sep Sci**, v. 36, n. 6, p. 1002-6, Mar 2013. ISSN 1615-9314 (Electronic) 1615-9306 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23418129> >.

STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. **Am J Hematol**, v. 87, n. 8, p. 795-803, Aug 2012. ISSN 1096-8652 (Electronic) 0361-8609 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641398> >.

STOFFELS, C. et al. Ergothioneine stands out from hercynine in the reaction with singlet oxygen: Resistance to glutathione and TRIS in the generation of specific products indicates high reactivity. **Free Radic Biol Med**, v. 113, p. 385-394, Dec 2017. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29074402> >.

SUN, K. et al. Structural and Functional Insight of Sphingosine 1-Phosphate-Mediated Pathogenic Metabolic Reprogramming in Sickle Cell Disease. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 15281, Nov 10 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29127281> >.

TANG, R. M. Y. et al. Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018. ISSN 2045-2322.

TANG, R. M. Y. et al. Distribution and accumulation of dietary ergothioneine and its metabolites in mouse tissues. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 1601, Jan 25 2018. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29371632> >.

TATUM, V. L., AND CHOW, C. K. . Antioxidant Status and Susceptibility of Sickle Erythrocytes to Oxidative and Osmotic Stress. **Free Radic Biol Med**, v. 25, p. 133-139, 1996.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** v. 27, p. 502-522, 1969.

UMBREIT, J. Methemoglobin--it's not just blue: a concise review. **Am J Hematol**, v. 82, n. 2, p. 134-44, Feb 2007. ISSN 0361-8609 (Print) 0361-8609 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16986127> >.

VAN WIJK, R.; VAN SOLINGE, W. W. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. **Blood**, v. 106, n. 13, p. 4034-42, Dec 15 2005. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051738> >.

VAN ZWIETEN, R.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. **Free Radic Biol Med**, v. 67, p. 377-86, Feb 2014. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24316370> >.

VEJUX, A.; LIZARD, G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospho lipidosis. **Mol Aspects Med**, v. 30, n. 3, p. 153-70, Jun 2009. ISSN 1872-9452 (Electronic) 0098-2997 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19248805> >.

VEKILOV, P. G. Sick cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sickle cell anaemia? **Br J Haematol**, v. 139, n. 2, p. 173-84, Oct 2007. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897293> >.

VERCELLOTTI, G. M. et al. Hepatic Overexpression of Hemopexin Inhibits Inflammation and Vascular Stasis in Murine Models of Sickle Cell Disease. **Mol Med**, v. 22, p. 437-451, Sep 2016. ISSN 1528-3658 (Electronic) 1076-1551 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27451971> >.

VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in beta-thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biol**, v. 6, p. 226-39, Dec 2015. ISSN 2213-2317 (Electronic) 2213-2317 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26285072> >.

WALTER, P. B. E. A. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassaemia or sickle cell disease. **Br J Haematol**, v. 135, n. 2, p. 254-263, 2006.

WEATHERALL, D. J. The challenge of haemoglobinopathies in resource-poor countries. **Br J Haematol**, v. 154, n. 6, p. 736-44, Sep 2011. ISSN 1365-2141 (Electronic) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21726207> >.

WOOD, B. D. F. G., AND JONATHAN F. TAIL. Increased Erythrocyte Phosphatidylserine Exposure in Sickle Cell Disease: Flow-Cytometric Measurement and Clinical Associations. **Blood**, v. 88, p. 1873-1880, 1996.

WOOD Z, A., ET AL. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 28, p. 32-40 2003.

WRIGHT, D. L.; PLUMMER, D. T. Multiple forms of acetylcholinesterase from human erythrocytes. **Biochem J**, v. 133, n. 3, p. 521-7, Jul 1973. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021.

XIA, J. et al. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n. Web Server issue, p. W652-60, Jul 2009. ISSN 1362-4962 (Electronic) 0305-1048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19429898> >.

XU, W. et al. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea. **Neuroscience**, v. 126, n. 2, p. 313-23, 2004. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207349> >.

YAWATA, Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell As a Model. **Cell Membrane: The Red Blood Cell As a Model**, p. 133-150 2003.

YEUNG, P. K. et al. Adenosine 5'-Triphosphate Metabolism in Red Blood Cells as a Potential Biomarker for Post-Exercise Hypotension and a Drug Target for Cardiovascular Protection. **Metabolites**, v. 8, n. 2, May 2 2018. ISSN 2218-1989 (Print) 2218-1989 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29724022> >.

YU, D. et al. The effects of edible chitosan-based coatings on flavor quality of raw grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 242, p. 412-420, 2018. ISSN 03088146.

ZEREZ, C. R. et al. Decreased erythrocyte nicotinamide adenine dinucleotide redox potential and abnormal pyridine nucleotide content in sickle cell disease. **Blood**, v. 71, n. 2, p. 512-5, Feb 1988. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.

ZEREZ, C. R., LACHANT, N.A. TANAKA, K.R Impaired Erythrocyte Methemoglobin Reduction in Sickle Cell Disease: Dependence of Methemoglobin Reduction on Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Content. **Blood**, v. 76, p. 1008-1014, 1990.

ZHANG, Y. et al. Elevated sphingosine-1-phosphate promotes sickling and sickle cell disease progression. **J Clin Invest**, v. 124, n. 6, p. 2750-61, Jun 2014. ISSN 1558-8238 (Electronic) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24837436> >.

ZHANG, Z. Z. et al. Glutathione Depletion, Pentose Phosphate Pathway Activation, and Hemolysis in Erythrocytes Protecting Cancer Cells from Vitamin C-induced Oxidative Stress. **J Biol Chem**, v. 291, n. 44, p. 22861-22867, Oct 28 2016. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27660392> >.

ZHU, B. Z. E. A. Ergothioneine Prevents Copper-Induced Oxidative Damage to DNA and Protein by Forming a Redox-Inactive Ergothioneine-Copper Complex. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 24, p. 30-34, 2011.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO A - Técnicas citológicas, eletroforéticas e cromatográfica para identificação da Hb S e caracterização dos haplótipos β^S

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

Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária

Os esfregaços sanguíneos foram analisados à microscopia de luz, com objetivas de 40x, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos (BONINI-DOMINGOS, 2006).

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

Técnica seletiva, baseada no aumento resistência globular osmótica promovido, principalmente, pela presença de eritrócitos microcíticos. A microcitose é característica de algumas hemoglobinopatias, porém mais comum em casos de talassemias do tipo beta, principalmente na forma heterozigota, e também em anemias carências e hemoglobinopatia do tipo Hb C (SILVESTRONI e BIANCO, 1975).

Eletroforese de hemoglobinas em pH alcalino

As amostras de sangue, previamente hemolisadas (NAOUM, 1990), foram submetidas à eletroforese de Hb em pH 8,6 em acetato de celulose. Técnica qualitativa utilizada para detecção perfil hemoglobínico normal e de Hb variantes, baseada nas diferentes cargas líquida dessas proteínas que acarretam mobilidades eletroforéticas específicas (MARENGO-ROWE, 1965).

Eletroforese de hemoglobinas em pH ácido

Técnica utilizada para diferenciação de alguns tipos de Hb variantes que migram em posições muito semelhantes na eletroforese em pH alcalino. Os hemolisados,

previamente preparados, são submetidos a uma corrida eletroforética em gel de ágar-fosfato, pH 6,2 (VELLA, 1968).

Cromatografia líquida de alta performance de frações hemoglobínicas

Método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) desenvolvido para o fracionamento de hemoglobinas com alta sensibilidade e especificidade. Técnica inteiramente baseada em cromatografia de troca iônica acoplada a detecção UV/Vis. O sistema utilizado foi o *Ultra²*, da Trinity Biotech PLC (Bray, Co Wicklow, Ireland) com o Kit de análise *Genesys*, que permitiu a separação e identificação presumível de Hb variantes por meio de "janelas" específicas de tempo de retenção, e a quantificação percentual relativa das frações hemoglobínicas, baseada em calibradores previamente injetados no sistema.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue periférico, segundo a técnica de extração por fenol-clorofórmio e precipitação por etanol (SAMBROOK et al., 1989).

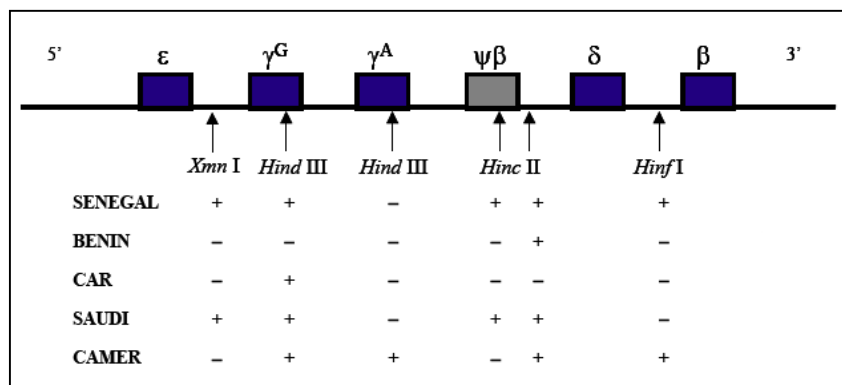
Confirmação da homozigose para o polimorfismo no gene HBB*S (c.20A>T; rs334) por PCR-RFLP

Para a realização da PCR foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: P 277 (*sense*) 5' GGC AGA GCC ATC TAT TGC TTA 3' e P 278 (*antisense*) 5' ACC TTA GGG TTG CCC ATA AC 3'. Após a amplificação, o fragmento gerado de 382 pb foi submetido à restrição enzimática a 37 °C por 5 minutos pela enzima *FastDigest DdeI*. A mutação elimina um sítio de restrição; assim após a digestão o alelo normal gerou 3 fragmentos de 201 pb, 88 pb e 87 pb o alelo mutante gerou dois, um de 288 pb e outro de 88 pb (SAIKI et al., 1985).

Análise dos haplótipos HBB*S (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989)

A determinação dos haplótipos foi realizada por PCR – RFLP, por meio da análise de seis sítios polimórficos (SUTTON et al., 1989) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática dos sítios polimórficos estudados na determinação dos haplótipos β^S



Fonte: (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989).

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para análise dos polimorfismos do *cluster* da globina β estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de regiões do *cluster* β .

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

→: sense ; ← anti-sense

O produto da PCR foi digerido, a 37°C durante 3 horas, para a região 5' γ^G e para as demais foi digerido por 5 minutos a 37°C com endonucleases de restrição apropriadas para cada sítio polimórfico. O tamanho dos produtos de amplificação e após clivagem, podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Tamanho dos produtos amplificados e após a clivagem com as endonucleases específicas.

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

REFERÊNCIAS

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

MARENGO-ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobins on cellulose acetate. **J Clin Pathol**, v. 18, n. 6, p. 790-2, Nov 1965.

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

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-4, Dec 20 1985.

SAMBROOK, J.; FRITISCH, E. F.; MANATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Ed. 2. Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 1989.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I. Screening for microcytemia in Italy: analysis of data collected in the past 30 years. **Am J Hum Genet**, v. 27, n. 2, p. 198-212, Mar 1975.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **Am J Hematol**, v. 32, n. 1, p. 66-9, Sep 1989.

VELLA, F. Acid-agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **Am J Clin Pathol**, v. 49, n. 3, p. 440-2, Mar 1968.

8.2 Anexo B: Parecer consubstanciado do CEP

UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Metabolismo redox eritrocitário: implicações para o uso de melatonina no tratamento de pessoas com anemia falciforme

Pesquisador: Danilo Grünig Humberto da Silva

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 54648616.7.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do Rio Preto

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.554.162

Apresentação do Projeto:

À medida que os eritrócitos emergem da medula óssea, os mesmos perdem toda a capacidade de divisão celular, de síntese de proteínas e lipídeos, e de fosforilação oxidativa. Apesar desta maquinaria metabólica limitada, as hemácias são capazes de realizar o seu papel funcional que envolve, principalmente, o transporte e fornecimento de oxigênio (O₂) para os tecidos.

Ao longo do caminho, as hemácias enfrentam i) choque osmótico; ii) a integridade de suas membranas é constantemente desafiada; iii) são expostas a efeitos pró-oxidantes de espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas na circulação; etc. Além disso, os glóbulos vermelhos apresentam ambiente interno com constante produção de ERO, cuja principal fonte geradora é a proteína transportadora de O₂, a hemoglobina (Hb). Esta sofre auto-oxidação, produzindo meta-hemoglobina e radical superóxido. Com intuito de neutralizar o estresse oxidativo, os eritrócitos possuem um sistema de defesa antioxidante competente e autossustentável. Porém, hemácias falciformes que contêm Hb com estrutura e propriedades físico-químicas alteradas (Hb S), apresentam geração incessante de agentes pró-oxidantes, comprometendo a

capacidade destas células de lidar com o estresse oxidativo, o que resulta em um estado de

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2428

Fax: (17)3221-2500

E-mail: liliane@ibilce.unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS



Continuação do Parecer: 1.554.162

desequilíbrio redox. Assim, a investigação de novos biomarcadores mais específicos e sensíveis relacionados ao metabolismo redox eritrocitário é válida e potencialmente útil, tanto para identificação de risco elevado de danos oxidativos, quanto para avaliação de novas terapias antioxidantes.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem como objetivo geral, avaliar possíveis efeitos moduladores diretos e indiretos do tratamento de melatonina sobre a metabolismo eritrocitário, usando uma suspensão de hemácias submetida a autoincubação seguida pelo modelo de "envelhecimento rápido de eritrócitos".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Haverá um risco considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de mancha roxa no local da picada da agulha durante coleta da amostra de sangue. O pesquisador não descreve os riscos no projeto. Ele descreve os riscos apenas no TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem escrito, detalhando os requisitos para aceitação e exclusão de participantes para este estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está bem escrito, possibilitando o entendimento do mesmo pelas pessoas participantes deste estudo.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião de 16 de maio de 2016, deliberou, com 12 (doze) votos favoráveis e 02 (duas) abstenções, pela aprovação do presente projeto de pesquisa. Os relatórios parciais devem ser encaminhados semestralmente, a contar desta data.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica da presente Dissertação, em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 26 de fevereiro de 2019

Nayara Alves Chaves