

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO RS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**



Perfil oxidativo e bioquímico em pacientes que apresentam anemia
falciforme ou traço falciforme

Tese de Doutorado

Vanusa Manfredini

Porto Alegre, janeiro de 2008.

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Biotecnologia no Estado do Rio Grande do Sul**

**Perfil oxidativo e bioquímico em pacientes que apresentam
anemia falciforme ou traço falciforme**

Vanusa Manfredini

Tese submetida ao
Programa de Pós-
Graduação em Biologia
Celular e Molecular do
Centro de Biotecnologia da
UFRGS como um dos
requisitos para a obtenção
do grau de Doutor em
Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof. Dra. Mara da Silveira Benfato

Este trabalho foi realizado no laboratório de Estresse Oxidativo no Departamento de Biofísica da UFRGS e Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com apoio financeiro do CNPq, FAPERGS, PROPESQ e Ministério da Saúde, Brasil.

À Deus que sempre iluminou meus caminhos

“A maior recompensa de nosso trabalho
não é o que nos pagam por ele, mas
aquilo em que ele nos transforma.”

John Ruskin

“O segredo não é correr atrás das borboletas...
É cuidar do jardim para que elas venham até você.”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter permitido a realização de mais um sonho e nunca ter me abandonado, mesmo nos momentos mais difíceis, que não foram poucos.

Quero fazer um agradecimento especial a minha orientadora, professora Dra. Mara Benfato, que acreditou no meu trabalho desde IC. Obrigada pelos ensinamentos diários, paciência e carinho.

À minha comissão de acompanhamento no doutorado, professor Dr. Arthur Fett Neto e professora Dra. Célia Carlini, pela disponibilidade, atenção, carinho e dedicação durante esses anos. Muito obrigada pelas sugestões ao longo do trabalho!

Às professoras colaboradoras do projeto, Dra. Simone M. Castro (Faculdade de Farmácia – UFRGS) e Ms. Sandrine C. Wagner (Feevale), pelos ensinamentos e pela atenção dada ao trabalho.

À professora Dra. Maria do Carmo, do Instituto de Química (UFRGS) pelo uso de equipamentos e reagentes. Obrigada pelos ensinamentos e paciência no uso do HPLC.

À farmacêutica bioquímica Ana Lúcia do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, por ter permitido a realização das coletas dos pacientes em seu laboratório. Muito obrigada!

Às minhas amadas bolsistas de iniciação científica, Luísa L. Lazzaretti e Isabel H. Griebeler, que sempre foram muito dedicadas ao projeto. Guardarei vocês sempre no meu coração. Obrigada por tudo!

À Ana Paula Santin do Laboratório de Hematologia da UFRGS, pela dedicação na hora das coletas e processamento das amostras. Obrigada pela ajuda durante a padronização da técnica molecular.

Aos coletadores (auxiliares de enfermagem) do laboratório de Análises Clínicas, Gabriel e Felipe, que mesmo nas horas mais difíceis, sempre se mantiveram calmos e concentrados no trabalho.

Aos colegas do HPS, especialmente o Dr. Sérgio Bueno e Dra. Juçara Steyer, que permitiram a realização do meu estágio curricular na unidade e nunca se importaram com as minhas “saídas” em horário antes do previsto. Obrigada pelos ensinamentos na rotina laboratorial!

A todos os amigos do Laboratório de Estresse Oxidativo, em especial a Vanessa Martins e Aline C. Baccin. Quantas risadas e brincadeiras!

À Carem Fortunato, presidente do CAPAF/RS, que nunca mediu esforços na captação de voluntários para a pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, você é um exemplo de vida. Continue lutando pela causa da Anemia Falciforme no Rio Grande do Sul.

À enfermeira Tânia da UBS de Erebango, que buscou novos doentes na região e em especial à família Ribeiro de Erechim, pela disponibilidade, história de vida e participação na pesquisa.

A todos os voluntários que participaram da pesquisa, principalmente aqueles que vieram de longe do Estado do Rio Grande do Sul, e acreditaram no sucesso do trabalho.

Á professora Emília da URI (Erechim) que revisou o inglês da minha tese. Muito obrigada, você é um amor.

Á querida Sílvia e Luciano da Secretaria do PPGBCM, pela atenção, pelo apoio e sorrisos diários.

A adorável Dona Helena, pela amizade, carinho e pelos cafezinhos.

À Rosane, pela amizade diária e conversas.

Ao Sr. Otelo, pela alegria e sinfonias de todas as manhãs.

Aos demais colegas, professores e funcionários do Departamento de Biofísica, Faculdade de Farmácia da UFRGS e Laboratório de Terapia Gênica do HCPA.

À minha grande amiga e quase irmã, Vivi pelo carinho, incentivo e torcida constantes. Minha companheira de estágio no HPS. Muito obrigada, amiga!

Ao Vinícius, pelo amor, incentivo, cuidado e dedicação. Desculpa pelos momentos em que não pude te dar a atenção que merecia e pelos dias em que me ausentava na semana. Te amo demais!

A Vovó Stanis (polonesa), que é uma pessoa que eu amo muito, minha segunda mãe. Exemplo de vida e dedicação. Obrigada por tudo que fizeste por mim!

A minha irmã Simone, que sempre me apoiou em todos os momentos.

À Nathália, minha mais nova sobrinha. Teu sorriso me dá força para crescer e buscar sempre à felicidade.

Ao meu afilhado Gui, pelo teu jeitinho encantador e ao meu sobrinho Hyran, pelas alegrias.

À Vanessa e ao Mano, pelo incentivo.

À minha mãe, pelo pensamento positivo e pelas orações que fez por mim. Obrigada pela convivência em Erechim, durante o período letivo.

Ao meu pai, que mesmo distante, torceu por mim. Obrigada por sempre me incentivar a crescer profissionalmente.

A toda minha família, por todos os ensinamentos, amor, compreensão, carinho, incentivo e apoio.

Agradeço a Universidade Regional Integrada (URI), Campus de Erechim, pelo suporte financeiro durante a realização do doutorado. É o meu local de trabalho hoje. Apesar da distância é muito gratificante dar aula nesta universidade e faço com muito prazer!

Agradeço ao Prof. Ms. Carlos Alberto Brandão, ex-coordenador do curso de Farmácia da URI que foi a primeira pessoa que acreditou no meu potencial e me abriu as portas da universidade. Muito obrigada por tudo!

A todas as demais pessoas que, embora não ilustradas, também contribuíram na execução desse trabalho.

Aos órgãos financiadores da pesquisa: CNPq, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS e Ministério da Saúde/Brasil.

RESUMO

Título: Perfil oxidativo e bioquímico em pacientes que apresentam anemia falciforme ou traço falciforme

A Anemia Falciforme (AF) é uma doença autossômica recessiva e, dentre as hemoglobinopatias, é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. Sua distribuição é ampla, abrangendo todos os continentes. AF foi a primeira doença caracterizada em nível molecular. É causada por uma mutação no gene beta da globina, produzindo uma alteração estrutural na molécula. No gene da globina beta S, há a substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição número seis da globina beta. Essa troca dos aminoácidos que resulta na HbS, altera estruturalmente a molécula e, sob determinadas condições, ocorre a polimerização, trazendo graves conseqüências ao indivíduo sintomático. As espécies reativas de oxigênio (ERO) podem causar profundas lesões em eritrócitos, diminuindo seu período de vida útil, em especial nos pacientes com AF. Acredita-se que, os eritrócitos falcizados estejam sob constante estresse oxidativo e, assim, liberem produtos de degradação da HbS, contribuindo para a progressão da doença. Dessa forma, o dano oxidativo agrava a fisiopatologia dos doentes falciformes. Utilizando técnica espectrofotométrica, foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) e quantificada a glutathiona total (GSH) nos eritrócitos dos pacientes. Também determinou-se o dano oxidativo nas proteínas plasmáticas e no hemolisado celular pelo método do carbonil a 360 nm. Os níveis da peroxidação lipídica (MDA) e da vitamina C foram determinados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Quantificou-se, por fim, os níveis de proteína C reativa ultra-sensível (CRP_{us}) por técnica turbidimétrica. Os participantes da pesquisa (30 HbAA, 28 HbAS e 20 HbSS) foram selecionados junto ao Centro de Apoio do Portador de Anemia Falciforme (CAPAF/RS) e/ou cadastrados no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia (UFRGS). Os doentes falciformes foram identificados por HPLC e confirmados por estudo molecular, utilizando a reação da polimerase em cadeia (PCR). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram submetidos a um questionário nutricional. Os dados obtidos foram expressos como médias \pm desvio padrão e analisados utilizando-se o Teste ANOVA de uma via com posterior teste ad hoc. Os resultados do trabalho mostram que os indivíduos traço falciforme (HbAS) apresentam atividade significativamente elevada da CAT em relação aos indivíduos controle. Por outro lado, os doentes falciformes possuem maior atividade da GPx e SOD. O nível de GSH foi proporcionalmente maior nos HbSS seguido dos HbAS e HbAA. Observamos também, dano oxidativo em proteínas plasmáticas, mas não no hemolisado celular. Os HbSS possuem dano oxidativo em proteínas plasmáticas significativamente maior que nos demais grupos. Um aumento significativo da produção de MDA no soro dos HbSS foi observado, como um indicativo do aumento da auto-oxidação dos lipídios sob condições de estresse oxidativo. Os níveis séricos da vitamina C foram significativamente maiores nos HbSS que nos indivíduos controle. A CRP_{us} apresentou-se significativamente elevada nos HbSS em relação aos HbAA. Esses resultados reforçam a idéia de que os pacientes com AF estão sujeitos a um estresse oxidativo crônico, o que contribui para a progressão das complicações dessa anemia hemolítica. Já, os indivíduos traço possuem elevada atividade das defesas antioxidantes capazes de reduzir o dano oxidativo em biomoléculas como proteínas e lipídios.

Palavras chave: radicais livres, anemia falciforme, traço falciforme, dano oxidativo, carbonil, MDA.

ABSTRACT

Title: Oxidative and biochemistry profile in sickle cell trait subjects and sickle cell anaemia patients

Sickle cell anaemia (SCA) is an autosomal recessive disease and, among the hemoglobinopathies, is the most common of the known hereditary hematologic alterations in man. Its distribution is ample, enclosing all the continents. Sickle cell anaemia (SCA) was the first disease to be characterized on the molecular level. It is basically a red blood cell (RBC) disorder in which the gene encoding the human β -globin subunit presents a mutation with the resulting replacement of $\beta 6$ glutamic acid (Glu) by valine (Val). This exchange of the amino acids that results in the HbS modifies the molecule structurally, and under determined conditions, the polymeration occurs, bringing serious consequences to the symptomatic individual. The reactive oxygen species (ROS) can cause deep injuries in erythrocytes, diminishing its period of useful life, specially in patients with sickle cell anaemia. Sickled erythrocytes are under constant oxidative stress and thus liberate products of degradation of the HbS, contributing for the progression of the disease. Because of the oxidative damage aggravates the pathophysiology of sickle cell patients. Using spectrophotometrically technique, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), were determined the activities of antioxidant enzymes and total glutathione (GSH) quantified in the erythrocytes of the patients. We also determined oxidative damage of plasma proteins and in hemolysate using carbonyl assay at 360 nm. The levels of lipid peroxidation (MDA) and vitamin C were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Finally, we quantified the levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) using turbidimetry technique. The participants of the research (30 HbAA, 28 HbAS and 20 HbSS) were selected from Centro de Apoio ao Portador de Anemia Falciforme (CAPAF/RS) and/or registered in cadastre in Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia (UFRGS). Sickle cell patients had been identified by HPLC and confirmed by molecular study, using the polymerase chain reaction amplification (PCR). All individuals signed the term of free and clarified assent and were submitted to a nutritional questionnaire. Data were expressed as average \pm SD and analyzed using ANOVA test of one way via with the post ad hoc test. Results show that sickle cell trait subjects (HbAS) had significantly high activity of CAT when compared to healthy controls. On the other hand, sickle cell patients had greater activity of GPx and SOD. The GSH levels was proportionally higher in the followed HbSS of the HbAS and HbAA. We also observe oxidative damage in plasma proteins, but not in the cellular hemolysate. HbSS have significantly higher oxidative damage in plasma proteins than other groups. A significant increasing of the production of MDA in the serum of the HbSS was observed as an indicative of the increasing of the auto-oxidation of the lipids under oxidative estress. Serum vitamin C levels in HbSS were significantly higher than healthy control. The hsCRP was presented significantly higher in HbSS than HbAA. These results reinforce the idea that patients with SCA are subjected to chronic oxidative stress, that contributes for the progression of this hemolytic anaemia. On the other hand, sickle cell trait subjects have higher antioxidant defenses that are able to reduce oxidative damage in biological macromolecules such as proteins and lipids.

Key words: free radicals, sickle cell anaemia, sickle cell trait subjects, oxidative damage, carbonyl, MDA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do heme (Reproduzido de Kumar & Bandyopadhyay, 2005).

Figura 2. Anemia Falciforme (esfregaço do sangue periférico). A – Menor aumento mostra drepanócitos, anisocitose e poiquilocitose (40X). B – Maior aumento mostra uma célula irreversivelmente falcizada no centro (100X) (Reproduzido de Frenette & Atweh, 2007).

Figura 3. Distribuição dos diferentes haplótipos do grupamento do gene beta no continente africano e asiático (Adaptado de Kan & Dozy, 1980).

Figura 4. Principais haplótipos do complexo do gene β^S , definidos pela ação de 13 enzimas de restrição (Reproduzido de (Mears *et al.*, 1981; Antonarakis, 1982)

Figura 5. Representação esquemática da fisiopatologia da Anemia Falciforme. A HbS é o resultado da troca de uma A por uma T no sexto códon do gene da β - globina, conduzindo para a substituição do ácido glutâmico por valina. Na desoxigenação, a HbS forma polímeros, causando falcização dos eritrócitos e dano na sua membrana. Alguns eritrócitos aderem ao endotélio, onde, conseqüentemente levam à vaso-oclusão (Steinberg, 2006).

Figura 6. Mecanismo de ação da HU na AF. A HU age na medula óssea e, por seus efeitos citotóxicos, aumenta a população de eritroblastos que sintetizam grandes quantidades de HbF. A celularidade da medula pode também ser diminuída (**Esquerda**). Altas concentrações de HbF reduzem a polimerização da HbS e o número de eritrócitos deformados, densos ou danificados. As células que contêm HbF possuem sobrevida longa, atenuando a hemólise e diminuindo a contagem de reticulócitos. As contagens de granulócitos, monócitos e plaquetas circulantes diminuem (**Centro**). A diminuição no número de eritrócitos densos e deformados que podem aderir ou lesar o endotélio reduz a probabilidade de ocorrer as crises vaso-oclusivas (**Direita**) (Steinberg, 1999).

Figura 7. A hemólise intravascular reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico (Reproduzido de Kato *et al.*, 2007).

Figura 8. Novos alvos de investigação terapêutica propostos para os pacientes com Anemia Falciforme (Reproduzido de Mack & Kato, 2006).

Figura 9. Geração de radicais livres na membrana eritrocitária (Reproduzido de Gladwin *et al.*, 2004).

Figura 10. Principais enzimas antioxidantes capazes de neutralizar a ação dos radicais livres (Reproduzido de Mruk *et al.*, 2002).

Figura 11. Mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) no endotélio vascular (Reproduzido de Gladwin *et al.*, 2004).

Figura 12. Cromatograma representativo de um indivíduo normal (HbAA), cujos valores das hemoglobinas estão expressos em % de acordo com a área de cada pico obtido.

Figura 13. Cromatograma representativo de um indivíduo heterozigoto para anemia falciforme (HbAS), cujos valores das hemoglobinas estão expressos em % de acordo com a área de cada pico obtido.

Figura 14. Cromatograma representativo de um doente falciforme (HbSS), cujos valores das hemoglobinas estão expressos em % de acordo com a área de cada pico obtido.

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, para visualização do resultado da digestão enzimática com a enzima *Dde I*. Todos os HbAS, HbSD, HbSC e HbSS identificados por HPLC tiveram a confirmação do seu perfil por técnica molecular. A mutação no códon 6 (GAG – GTG) elimina um sítio de restrição para a enzima *Dde I*, assim, após a digestão o alelo normal gera 3 fragmentos de 78pb, 201pb e 88pb, e o alelo mutante gera 2, um de 288pb e o outro de 87pb. As linhas 3 e 6 são HbAA, as linhas 2,8-12 são HbAS, a linha 5 é HbSS e a linha 4 é HbSD. A linha 1 é o produto da PCR não digerido.

Figura 16. Cromatograma representativo da vitamina C e do MDA, respectivamente, de um doente falciforme (HbSS). Ao soro foi adicionado 0,6 mL de ácido perclórico 0,1M e após centrifugação (10 min, 4500 rpm), injetou-se 100 µL no HPLC. Utilizou-se uma coluna LC-18-DB, cuja fase móvel era composta por 82,5:17,5 (v/v) de fosfato de potássio monobásico 30 mM e metanol (pH 3,6). O efluente foi monitorado a 250 nm, segundo método descrito por Karatepe, 2004. Os picos da vitamina C e do MDA eluem a 1,950 min e 5,032 min, e possuem uma área de 1068578 e 40588, respectivamente.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais causas de morte por idade em pacientes com anemia falciforme, segundo Vichinsky, 1991.

Tabela 2. Agentes narcóticos mais frequentemente utilizados em crises álgidas (ANVISA, 2002).

Tabela 3. Alterações da morfologia eritrocitária nos diferentes genótipos das síndromes falcêmicas (Adaptado de Naoum, 1997).

Tabela 4. Alterações laboratoriais específicas na anemia falciforme (Adaptado de Naoum, 1997).

Tabela 5. Drogas e Químicos Associados com Hemólise em Indivíduos com Deficiência da G6PD , segundo Beutler, 1994.

Tabela 6. Perfil hemoglobínico dos indivíduos participantes da pesquisa. Os resultados representam à média percentual dos valores de hemoglobina obtidos por quantificação em HPLC.

Tabela 7. Valores da G6PD (U/gHb) a 37°C encontrados nos eritrócitos dos grupos abaixo.

Tabela 8: Frequência (%) de consumo alimentar pelos indivíduos com AF participantes do estudo.

ABREVIATURAS

AF	anemia falciforme
CAR	República da África Central
CAT	catalase
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
CRP	proteína C reativa
CRP-us	proteína C reativa ultra-sensível
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxiribonucléico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DNMT	DNA metiltransferase
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
DTNB	ácido 5,5`-bisditio-2-nitrobenzóico
EIE	enzimaimunoensaio
EPO	eritropoetina
ERO	espécies reativas de oxigênio
EV	endovenosa
GFR	taxa de filtração glomerular
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona total
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
GSSG	glutaciona oxidada
GTP	guanosina trifosfato
Hb	hemoglobina
HbF	hemoglobina fetal
HbPA	hemoglobina Porto Alegre
HMG-CoA	hidroxi-metil-glutaril CoA redutase
HU	hidroxiuréia
IL	interleucina
IL-6	interleucina-6
IM	intramuscular

INF- γ	interferon gama
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
LMC	leucemia mielóide crônica
MDA	malondialdeído
MO	medula óssea
e-NOS	óxido nítrico sintase
OH \cdot	radical hidroxila
O ₂ \cdot^-	radical superóxido
PCR	reação da polimerase em cadeia
PETN	Programa Estadual de Triagem Neonatal
PLA ₂	fosfolipases A ₂
PHHF	persistência hereditária da hemoglobina fetal
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
pl	ponto isoelétrico
RO \cdot	radical alcóxil
RO ₂ \cdot	radical peróxil
ROOH	alquilhidroperóxido
SEA	seqüestro esplênico agudo
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
STA	síndrome torácica aguda
TCA	ácido tricloroacético
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
VO	via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1. A hemoglobina (Hb)	19
1.1 Estrutura e função da Hb	19
1.2 Ontogenia	20
1.3 Hemoglobina normal	21
1.4 Hemoglobinas variantes	22
1.5 Hemoglobinopatias	24
1.5.1 Origem e diferentes haplótipos do grupamento do gene beta	24
1.5.2 Homo e heterozigose na Doença Falciforme	27
1.5.2.1 Paciente Falciforme (HbSS)	27
1.5.2.2 Traço falciforme (HbAS)	28
1.6 Alterações Físico-químicas na Anemia Falciforme	29
1.6.1 Alteração molecular da HbS	29
1.6.2 Alteração celular dos eritrócitos com HbS	31
1.6.2.1 Processo inflamatório na Anemia Falciforme	32
1.7 Principal manifestação clínica da Anemia Falciforme	33
1.8 Complicações na Anemia Falciforme	34
1.8.1 Infecção infantil	34
1.8.2 Infecção em adultos	35
1.8.3 Crises de seqüestro esplênico	35
1.8.4 Crises aplásicas	36
1.8.5 Síndrome torácica aguda (STA)	37
1.8.6 Crises algidas	38
1.8.7 Alterações renais	40
1.8.8 Alterações cardíacas	42
1.8.9 Lesões osteoarticulares	44
1.8.10 Alterações osteoarticulares	45
1.8.10.1 Dactilite (Síndrome mão-pé)	45
1.8.10.2 Necrose isquêmica da cabeça do fêmur	45
1.8.11 Alterações neurológicas	46
1.8.12 Alterações oculares	47
1.8.13 Úlcera de membros inferiores	48
1.8.14 Priapismo	49
1.9 Diagnóstico Laboratorial	51
1.10 Lei 822/01 – Triagem Neonatal	54
1.11 Medidas Gerais para Tratamento da Anemia Falciforme	56
1.11.1 Terapia Farmacológica com Hidroxiuréia (HU)	57
1.12 Estresse Oxidativo	62
1.12.1 Oxidação de eritrócitos	64
1.12.2 Defesas antioxidantes nos eritrócitos	65
1.12.3 Processo oxidativo na Anemia Falciforme	67
1.12.4 O óxido nítrico (NO) na Anemia Falciforme	68
1.13. Rotas Metabólicas e G6PD	71
2. OBJETIVOS	74

2.1 Objetivo Geral	74
2.2 Objetivos Específicos	74
3. MATERIAL E MÉTODOS	75
3.1 Sujeitos	75
3.2 Amostras clínicas	78
3.3 Medida da atividade das enzimas antioxidantes	79
3.3.1 Catalase (CAT)	79
3.3.2 Glutaciona Peroxidase (GPx)	79
3.3.3 Superóxido Dismutase (SOD)	79
3.4 Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)	79
3.5 Ensaio da Glutaciona Total (GSH) – defesa não enzimática	79
3.6 Quantificação da vitamina C	80
3.7 Avaliação de dano oxidativo em componentes celulares	80
3.7.1 Proteínas plasmáticas e do hemolisado celular	80
3.7.2 Lipídios de membrana	80
3.8 Índices Hematométricos	82
3.9 Caracterização Molecular pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	82
3.10 Ferro Total	82
3.11 Transferrina	82
3.12 Ferritina	82
3.13 Proteína C reativa ultra-sensível (CRP _{us})	83
3.14 Descarte de reagentes	83
3.15 Cálculos e Estatística	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO (ARTIGOS)	84
5. CONCLUSÕES	148
6. PERSPECTIVAS	149
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
8. ANEXOS	168
Anexo 1 Resultados adicionais	168
Anexo 2 Termo de Consentimento	172
Anexo 3 Questionário Nutricional	174
Anexo 4 Curriculum Vitae	176

INTRODUÇÃO

1. A Hemoglobina (Hb)

1.1 Estrutura e função da Hb

A hemoglobina (Hb) é uma proteína de estrutura globular e quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas – que variam muito geneticamente – e um grupo prostético (o grupo heme), formado por quatro núcleos pirrólicos, que estão unidos entre si por radicais metanílicos ($-\text{CH}=\text{}$), contendo ferro (Figura 1) (Perutz *et al.*, 1960; Steinberg & Brugnara, 2003).

As cadeias globínicas têm sido agrupadas conforme suas similaridades genéticas e estruturais considerando-se a síntese multigênica específica para cadeias do tipo alfa (α) e beta (β). A multigenicidade das cadeias globínicas do tipo α se deve à presença de dois genes específicos para produzir globina α e outro gene também específico para gerar a globina zeta (ζ), todos no cromossomo 16. As cadeias de globina do tipo β são sintetizadas por genes unitários e exclusivos para globinas β , delta (δ), gama (γ) e épsilon (ϵ), todos localizados no cromossomo 11 (Wagener *et al.*, 2001; Okpala, 2004).

A molécula de hemoglobina é, portanto, um tetrâmero de cadeias de globina formado por duas cadeias de globina do tipo α e duas do tipo β dispostas aos pares (Naoum, 1996; Steinberg & Brugnara, 2003).

A hemoglobina (Hb) é uma proteína presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos e tem como principal função o transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões até os tecidos. Esse transporte está baseado na capacidade dos seus átomos de ferro se combinarem reversivelmente com o oxigênio molecular e ao movimento de suas subunidades (Naoum, 1996; Wagener *et al.*, 2001; Steinberg & Brugnara, 2003; Okpala, 2004). Mudanças conformacionais na molécula de Hb regulam sua interação com o oxigênio, hidrogênio, dióxido de carbono (CO_2) e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Desse modo, quando a Hb está desoxigenada, íons hidrogênio determinam a formação de pontes de sais

entre as diferentes cadeias e a ligação do CO_2 e 2,3-DPG às cadeias beta. Com a oxigenação da hemácia, estas pontes de sais se rompem e as cadeias beta expõem o CO_2 e 2,3-DPG, aumentando a afinidade da Hb pelo oxigênio, de modo a criar uma curva sigmóide de dissociação do oxigênio. Alterações genéticas que ocorrem na molécula de Hb, como a substituição de aminoácidos nas cadeias da globina, podem alterar a afinidade da Hb pelo oxigênio, deixando a molécula de Hb instável e sujeita à desnaturação (Naoum, 1996).

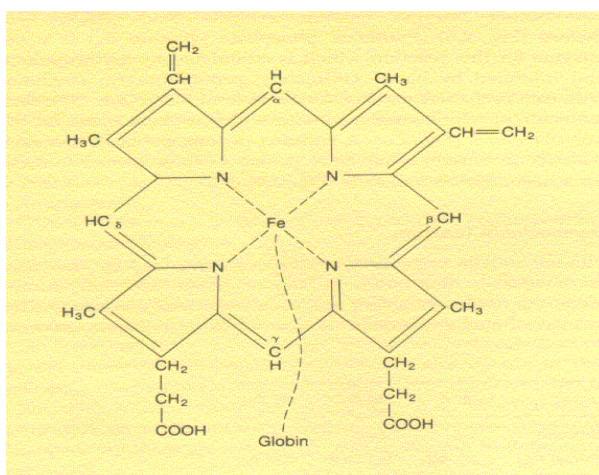


Figura 1. Estrutura do heme (Reproduzido de Kumar & Bandyopadhyay, 2005).

1.2 Ontogenia

Na espécie humana, as primeiras moléculas de hemoglobinas embrionárias são produzidas nas ilhotas sanguíneas que se desenvolvem no saco vitelínico, precedendo o desenvolvimento da circulação sanguínea e estabelecendo as trocas gasosas realizadas através da placenta (Perutz, 1968).

A síntese dos diferentes tipos de hemoglobinas embrionárias, fetal e adulta obedece a um rígido controle genético, envolvendo os genes tipo alfa do cromossomo 16 e os do tipo beta do cromossomo 11. As expressões desses genes podem ser avaliadas relacionando-as com o período do desenvolvimento embrionário e fetal (Stamatoyannopoulos, 2005). Dessa forma, os diferentes tipos de hemoglobinas embrionárias são sintetizadas,

gradativamente, até atingirem suas concentrações máximas específicas. A partir desse estágio de produção, inicia-se a diminuição de suas sínteses, dando lugar à elaboração da hemoglobina fetal e, a seguir, das hemoglobinas A e A₂ (Naoum, 1996).

O primeiro tetrâmero hemoglobínico, predominante nas quatro semanas iniciais do período embrionário, é composto por pares de dímeros de cadeias zeta e épsilon ($\xi_2\varepsilon_2$) que formam a Hb Gower-1. Outras duas hemoglobinas embrionárias, presentes até a 12^a semana, são compostas por dois pares de zeta e gama ($(\xi_2\gamma_2)$) e alfa e épsilon ($(\alpha_2\varepsilon_2)$), que constituem as hemoglobinas Portland e Gower-2, respectivamente. Ao término desse período não ocorre mais síntese das hemoglobinas embrionárias, predominando nessa fase a hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$), cuja produção tem início na quarta semana de gestação com aumento do seu nível quantitativo progressivo ao desenvolvimento fetal. A hemoglobina A, composta por dímeros de cadeias alfa e beta ($\alpha_2\beta_2$) é sintetizada a partir da 10^a semana e se mantém em concentrações próximas a 10% até o nascimento. A partir deste, passa a aumentar até que, no sexto mês de vida pós-natal, constitui aproximadamente 97% do conteúdo total de hemoglobina do indivíduo. A hemoglobina A₂, por sua vez, formada por cadeias alfa e delta ($\alpha_2\delta_2$), começa a ser sintetizada na 25^a semana em concentrações reduzidas que permanecem até o nascimento, aumentando lentamente até se estabilizarem no sexto mês de vida quando atinge 2 a 3%, que corresponde ao conteúdo hemoglobínico de A₂ do adulto (Steinberg, 1994; Naoum, 1996; Eaton, 2003).

1.3 Hemoglobina normal

A hemoglobina A, ou HbA, é o tipo predominante entre as hemoglobinas normais, e sua estrutura apresenta dimensões de 50X55X64 nm, com peso molecular de 64.458 Da e 574 aminoácidos, possuindo as cadeias de globina tipo alfa 141 aminoácidos e as do tipo beta totalizam 146 (Muirhead *et al.*, 1967; Perutz, 1968; Gibson & Ellory, 2002; Cesquini *et al.*, 2003).

As cadeias alfa e beta são semelhantes em comprimento, estrutura primária e estrutura secundária. Elas também se assemelham à mioglobina

(proteína transportadora de oxigênio no músculo), mas esta possui apenas uma cadeia polipeptídica. As semelhanças na seqüência dos aminoácidos e estrutura terciária sugerem que as moléculas de hemoglobina e da mioglobina evoluíram a partir de um polipeptídio ancestral comum (Perutz, 1968; Gibson & Ellory, 2002; Cesquini *et al.*, 2003).

O tetrâmero da hemoglobina A tem um grupo sulfidril (-SH) na cadeia alfa (cisteína 104) e dois na cadeia beta (cisteína 93 e 113). Somente o -SH da cisteína 93 é reativo ao p-cloromercuribenzoato na hemoglobina nativa. Apesar da existência de seis grupos -SH na hemoglobina não se formam, nesta molécula, pontes de sulfeto nem intra nem intercadeias (Perutz *et al.*, 1960).

A estabilidade da hemoglobina é dependente do arranjo estrutural que ocorre entre as duas globinas do tipo alfa com as duas do tipo beta. A conformação globular da molécula de Hb se deve à extensa disposição helicoidal das globinas que representa 75% do total de sua estrutura. Estudos utilizando a técnica de cristalografia de raios X, estabeleceram que cada globina tem duas regiões bem específicas denominadas de superfícies externa e interna (Muirhead *et al.*, 1967). A superfície externa é composta por aminoácidos polares e hidrofílicos que entram em contato com o meio aquoso circulante. A superfície interna é constituída por aminoácidos não-polares e hidrofóbicos, que rejeitam a presença da água e, estruturalmente, representa as regiões dobradas da molécula, e também estabelece a proteção do grupo heme por meio da formação de uma bolsa totalmente impermeável à água formada por aminoácidos apolares (Perutz, 1972; Perutz *et al.*, 1999; Gibson & Ellory, 2002; Cesquini *et al.*, 2003).

1.4 Hemoglobinas variantes

Anormalidades genéticas podem dar origem a variantes estruturais de hemoglobina, sendo que atualmente mais de 900 variantes foram descritas (Vernon, 2004). As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações na porção globínica da molécula de hemoglobina, com ampla distribuição mundial. Estas alterações podem ser classificadas como estruturais e de síntese (Perutz & Mitchinson, 1950). As alterações estruturais incluem a substituição, deleção e inserção de um ou

mais aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias globínicas diferentes causando a formação de uma hemoglobina anormal. As alterações de síntese, as chamadas talassemias, caracterizam-se pela síntese reduzida ou nula de um ou mais tipos de cadeias globínicas (Bunn, 1997). Ambas modificações, resultam na formação de moléculas de hemoglobina com características bioquímicas alteradas em relação às hemoglobinas normais e, portanto, são denominadas de hemoglobinas variantes (Powars, 1991; Steinberg, 1994). A hemoglobina variante de maior frequência mundial é a Hb S ($\alpha_2\beta^S_2$), causada por uma mutação no gene beta da globina, produzindo uma alteração estrutural na molécula. No gene da globina beta S, há a substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição número seis da globina beta. Essa troca dos aminoácidos que resulta na HbS altera estruturalmente a molécula e, sob determinadas condições, ocorre a polimerização trazendo graves conseqüências ao indivíduo sintomático (Figura 2) (Wagener *et al.*, 2001).

As mutações que afetam o controle dos genes para a síntese quantitativa das globinas são muito diversificadas. Em geral, essas mutações provocam um bloqueio da síntese de uma das globinas com intensidades variáveis, ou até mesmo total. Nesses casos ocorrem desequilíbrios do conteúdo entre as cadeias de globina, provocando conseqüências fisiopatológicas proporcionais ao desbalanço ocorrido (Wagener *et al.*, 2001). Também podem ocorrer alterações na síntese do heme, causando efeitos na síntese de porfirina, provocando o surgimento das porfírias e protoporfírias eritropoiéticas. Essas modificações no grupo prostético são decorrentes de dois processos: defeitos enzimáticos hereditários e deficiência de ferro (Powars, 1991; Steinberg, 1994).

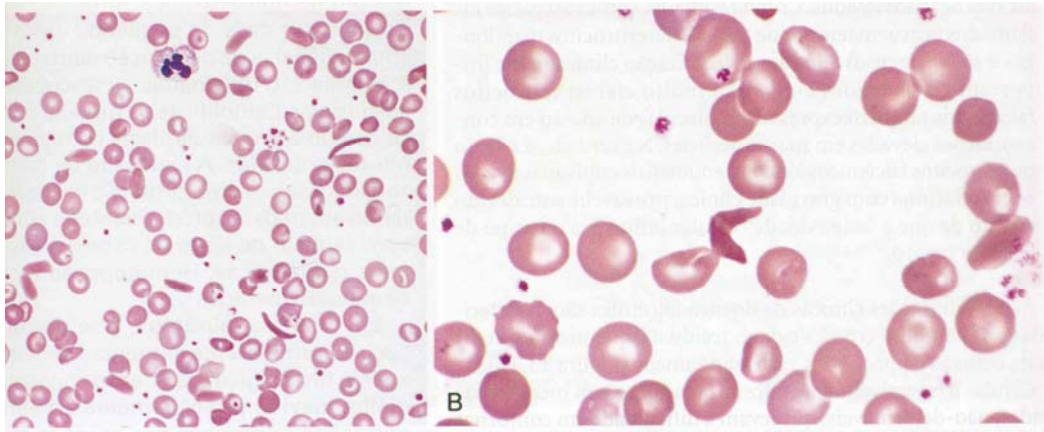


Figura 2. Anemia Falciforme (esfregaço do sangue periférico). A – Menor aumento mostra drepanócitos, anisocitose e poiquilocitose (40X). B – Maior aumento mostra uma célula irreversivelmente falcizada no centro (100X) (Reproduzido de Frenette & Atweh, 2007).

1.5 Hemoglobinopatias

1.5.1 Origem e diferentes haplótipos do grupamento do gene beta

Dentre as alterações estruturais que podem ocorrer na molécula de hemoglobina, a drepanocitose é a mais freqüente. Sua distribuição é ampla, abrangendo todos os continentes. Estima-se que 8% da população africana contêm o gene β^S (Pauling *et al.*, 1949; Powars, 1991; Daudt *et al.*, 2002).

A anemia falciforme (AF) é conhecida há séculos por povos de diferentes regiões da África. Apesar de sua incidência prevalecer em indivíduos desta região, estudos populacionais têm demonstrado a presença da HbS em indivíduos descendentes de populações do Mediterrâneo, Caribe, América Central e Sul, Arábia e Índia. A AF no Brasil, especialmente nas regiões norte, nordeste e sudeste, é a doença hereditária de maior prevalência, estimando-se 0,1 a 0,3% da população negra, com tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população, devido ao alto grau de miscigenação em nosso país (Azevedo, 1980; Bandeira *et al.*, 1999; Silla, 1999). Isso indica que a presença da AF no Brasil foi decorrente da imigração de indivíduos originários principalmente do continente africano (Flint *et al.*, 1993).

Estudos antropológicos e análises biomoleculares sugerem que o gene anormal para a síntese da HbS surgiu entre os períodos Paleolíticos e Mesolítico, aproximadamente entre 50 e 100 mil anos, nas regiões centro-oeste da África, Índia e leste da Ásia. A causa que motivou a mutação espontânea do gene da hemoglobina normal (HbA) para o gene da HbS ainda permanece desconhecida, porém, admite-se que a origem da HbS foi multi-regional, atingindo populações com diferentes características genéticas (Naoum, 2000).

Alguns estudos realizados na década de 80 mostraram origens independentes da mutação nas células falciformes em diferentes regiões da África e Ásia (Bortolini & Salzano, 1999; Salzano & Bortolini, 2002). Esses trabalhos, após análise do grupamento dos genes tipo beta do cromossomo 11 concluíram que há, pelo menos, cinco tipos de HbS: SS-Benin, SS-Bantu, SS-Senegal, SS-Camarões e SS-Árabe-indiano (Figura 3), todas com resultado final da troca do ácido glutâmico por valina, na posição 6 da globina beta. Porém, cada uma delas apresenta diferentes extensões de lesões moleculares ocorridas ao longo do agrupamento dos genes beta, delta, gama, e pseudogene beta e épsilon (Searjeant, 1992; Sears, 1994).

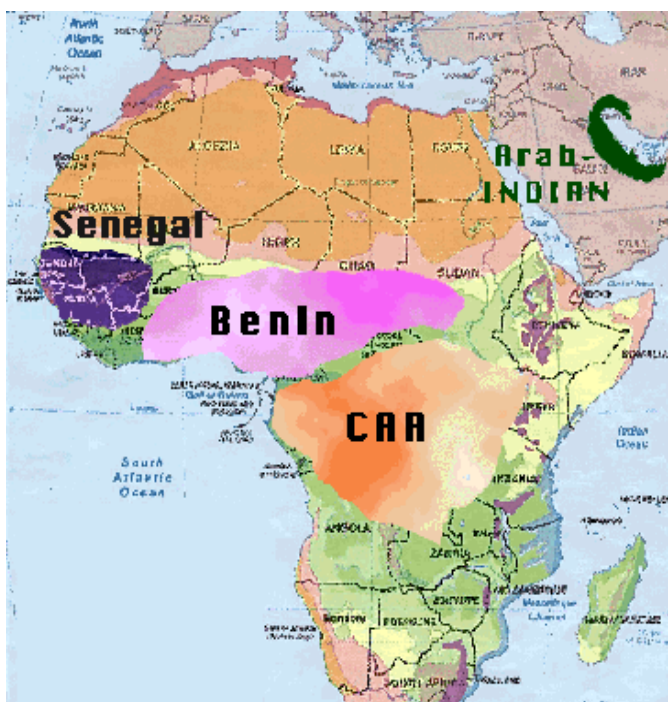


Figura 3. Distribuição dos diferentes haplótipos do grupamento do gene beta no continente africano e asiático (Adaptado de Kan & Dozy, 1980).

Em cada uma das quatro regiões da África e da Ásia onde o gene β^S é altamente prevalente, o gene anormal está associado com um haplótipo diferente do cluster do gene beta (Zago *et al.*, 1999).

O haplótipo Benin, originado na costa oeste Africana, alcança o norte da África (Argélia e Tunísia), oeste da Arábia e sul da Europa (Portugal, Sílicia e Grécia). Esta abrangência, provavelmente, ocorreu pelo contato com árabes do norte da África, especialmente durante a expansão árabe entre os séculos VIII e XIII. O haplótipo Bantu foi originalmente identificado na República da África Central (por esta razão, é algumas vezes conhecido como haplótipo CAR) e após, em várias populações de língua Bantu, em regiões geográficas separadas do sul da África. Os haplótipos Senegal e Camarões estão restritos a duas pequenas regiões geográficas. O haplótipo Árabe ocorre na Índia e leste da Arábia, por esta razão é chamado também de haplótipo Indo-Árabe (Zago *et al.*, 1999).

Estudo realizado por Neto e colaboradores (2005) indicou que há uma predominância do haplótipo Benin, com frequência de 55,9% no estado do Ceará, seguido do CAR com 41,2% e 2,9% para o haplótipo Senegal.

Assim, o estudo dos haplótipos pode ser utilizado com diferentes objetivos: para a determinação da origem unicêntrica ou multicêntrica de uma mutação, para discriminar eventos epistáticos (quando outros genes interferem na expressão fenotípica do gene mutante) e para definir o caminho de fluxo de um gene específico mutante. Quando os dados e informações estão suficientemente consolidados como no caso do *cluster* do gene β mutante, então os haplótipos podem ser úteis no estudo da origem e na evolução da raça humana (Figura 4) (Nagel & Ranney, 1990; Powars, 1991). A importância dos haplótipos da mutação β^S na evolução clínica dos pacientes com AF foi determinada através das observações quanto ao surgimento e a intensidade das complicações de natureza orgânica e da curva de sobrevivência dos pacientes, sugerindo melhores prognósticos para os portadores dos haplótipos Senegal e árabe-indiano (Ásia) e pior evolução clínica para os pacientes portadores dos haplótipos CAR e Benin (Powars, 1991).

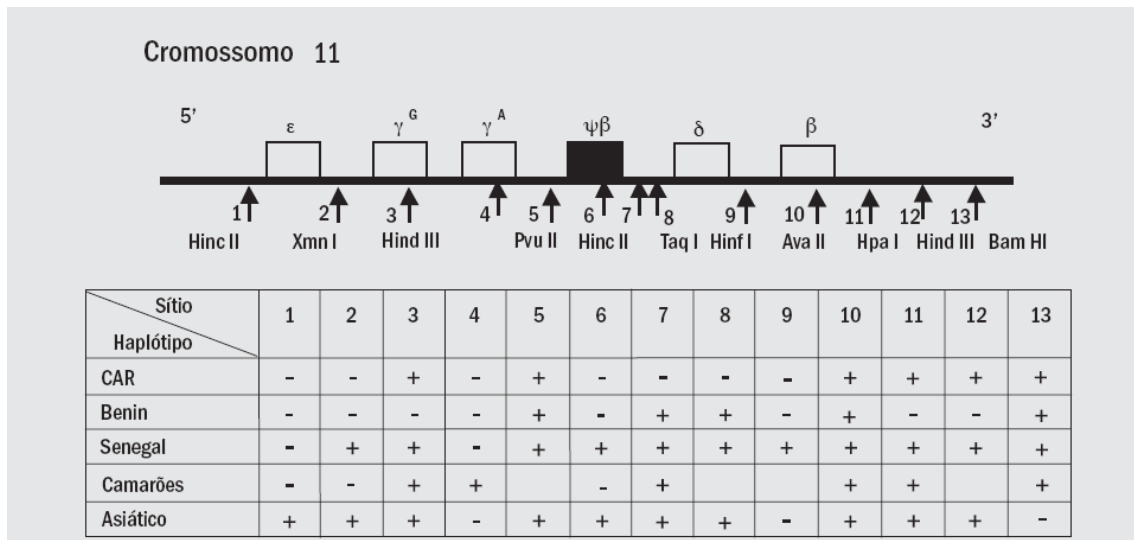


Figura 4. Principais haplótipos do complexo do gene β^S , definidos pela ação de 13 enzimas de restrição (Reproduzido de Antonarakis, 1985).

1.5.2 Homo e heterozigose na Doença Falciforme

1.5.2.1 Paciente falciforme (HbSS)

Doença falciforme é um termo genético usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio de HbS. Essas alterações incluem a anemia falciforme (AF), que é a forma homocigota da HbS (*Hb SS*). A AF também pode ser denominada siclemia ou drepanocitose (Okpala *et al.*, 2002).

Relatos históricos feitos por Vemon (2004) denotam que a AF foi descrita pela primeira vez em 1910 por Herrick, que observou eritrócitos alongados e em formato de foice na distensão sanguínea de um estudante negro, originário da Jamaica, que apresentava quadro anêmico grave acompanhado de icterícia, complicações pulmonares e úlceras de membros inferiores. Em 1922, o termo AF foi utilizado por Mason, e em 1927, Hahn e Gillepsie descobriram que a falcização dos eritrócitos era dependente da baixa tensão de oxigênio. Em 1947, Accioly, na Bahia, sugeriu que a falciformação ocorria como consequência de uma herança autossômica recessiva, sendo confirmada em 1949 por Neel e Beet, que definiram a doença somente em estado homocigoto, sendo os heterocigotos portadores assintomáticos (Neto & Pintombeira, 2003). Linus Pauling e colaboradores (1949) por meio de técnicas de eletroforese

identificaram a HbS, sendo assim os pioneiros no relato do que chamaram de “doença molecular”. Ingran, em 1956, utilizando a técnica de “fingerprint” (eletroforese bidimensional, associada à cromatografia) demonstrou que a síntese de HbS era ocasionada pela substituição do ácido glutâmico pela valina, na posição 6 da cadeia β -globina (Steinberg, 1996; Okpala *et al.*, 2002; Gómez-Chiari *et al.*, 2003; Iniguez *et al.*, 2003; Vernon, 2004).

1.5.2.2 Traço falciforme (HbAS)

A heterozigose para hemoglobina S define uma situação relativamente comum, clinicamente benigna, em que o indivíduo apresenta as hemoglobinas A e S (indivíduo AS, heterozigoto) (Naoum, 1996).

Sua prevalência varia enormemente nas diferentes regiões do globo e atinge valores máximos nos países da África equatorial, Arábia, Índia, Turquia, Grécia e Itália. Nos EUA, assim como no Brasil, análises de grande número de indivíduos da população negra revelaram prevalências variáveis de 6,7% a 10,1%. O nível de HbS também é variável nas diferentes populações e usualmente está abaixo de 45% (e sempre abaixo de 50%), com valores ainda menores quando há concomitância de talassemia alfa, condição genética também comum nas diferentes populações oriundas da África. Os níveis de Hb F estão geralmente dentro da faixa da normalidade (Taylor *et al.*, 2006).

O traço falciforme, portanto, caracteriza o portador assintomático, clinicamente normal (Taylor *et al.*, 2006). Este não padece da doença e não apresenta alterações hematológicas. Os processos vaso-oclusivos sob condições fisiológicas normais inexistem, e, portanto, não há mortalidade nem morbidade seletivas. Geralmente, detecta-se o portador de HbAS em estudos populacionais, ou análise devido à presença do gene da hemoglobina S em algum membro da família. Geneticamente, a condição heterozigota se deve à herança do gene da globina β^S por parte de um dos pais, juntamente com o gene da globina β^A proveniente do outro. Nessa condição, a concentração de HbA é sempre mais elevada que HbS, e suas hemácias têm meia-vida fisiológica normal e a falciformação *in vivo* só ocorre nos casos dos indivíduos portadores serem submetidos a: anestesia geral, infecções, vôo em avião não-

pressurizado, exposição a regiões de grande altitude e excesso de esforço físico (Steinberg, 1996).

Recentes estudos apontam que a hematúria microscópica é uma complicação rara, porém descrita nesse grupo de indivíduos. Sua etiologia é obscura e o quadro é geralmente auto-limitado, embora menos frequentemente possa apresentar-se de forma grave. Outros trabalhos mostram que gestantes heterozigotas para AF têm maior probabilidade de desenvolver bacteriúria assintomática, crises de cistite e pielonefrite do que gestantes HbAA (Bencaiova *et al.*, 2006; Thurman *et al.*, 2006).

Bencaiova e colaboradores (2005) também mostraram que pacientes com diabetes tipo 2 (DM2) associado ao traço falciforme têm maior risco em desenvolver alterações micro e macrovasculares, contribuindo para a progressão do DM2.

1.6 Alterações Físico-químicas na Anemia Falciforme

1.6.1 Alteração molecular da HbS

A substituição da base nitrogenada do códon **GAG** para **GTG**, resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina, provoca modificações estruturais na molécula da hemoglobina, como citado anteriormente.

A valina é um aminoácido neutro com ponto isoelétrico (pI) igual a 6 e o ácido glutâmico é carregado negativamente (pI=2,8). Essa troca altera o pI da HbS, tornando-a menos negativa, fato que resulta em uma mobilidade mais lenta quando comparada com a HbA em eletroforese alcalina (pH 8 a 9). Além disso, na HbA o ácido glutâmico da posição seis da globina beta auxilia no afastamento das moléculas desoxigenadas de hemoglobinas e a entrada da valina nesta posição favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio. No estado oxigenado, a molécula de HbS está “relaxada”, e nesta conformação estrutural as globinas beta S estão mais separadas. No estado

desoxigenado, a molécula de HbS torna-se tensa e as globinas beta S ficam mais próximas. Essa mudança de conformação favorece o contato entre as regiões da desoxiemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado. Por meio da união de vários tetrâmeros de HbS, forma-se um número considerável de moléculas agregadas que geram longos polímeros que precipitam no citoplasma, alterando a morfologia do eritrócito para a forma de foice (Figura 5). Nesta etapa há a mudança do estado líquido e solúvel para o estado sólido e insolúvel, alterando-se a viscosidade da solução e formando-se cristais de HbS. Essa alteração da solubilidade é a diferença estrutural mais marcante sob o ponto de vista patológico da presença da HbS (Nahavandi *et al.*, 2004). A polimerização da HbS é dependente da tensão de oxigênio, concentração intracelular da HbS, temperatura e associação com outras hemoglobinas e talassemias (Steinberg & Rodgers, 2001; Nahavandi *et al.*, 2004).

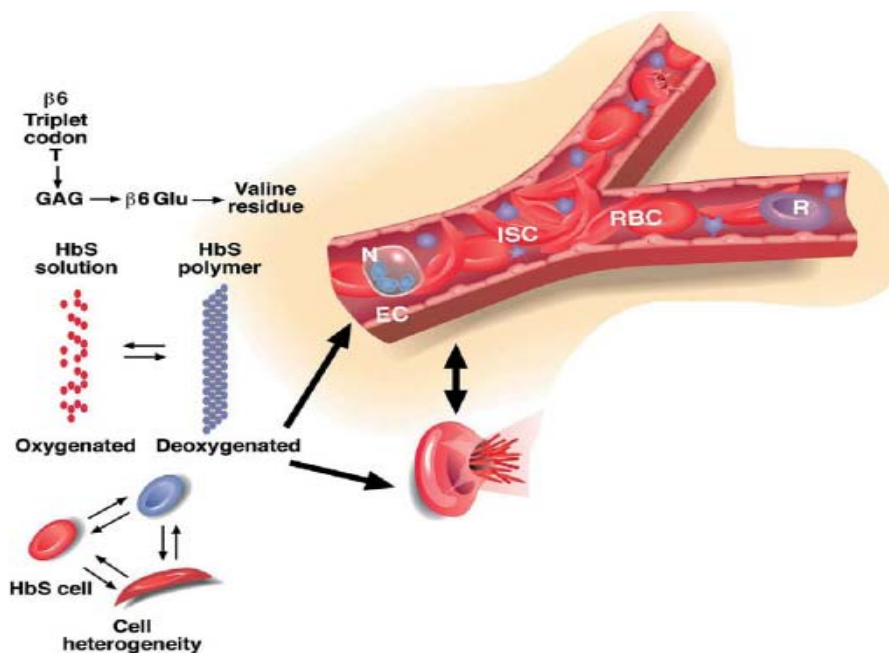


Figura 5. Representação esquemática da fisiopatologia da Anemia Falciforme. A HbS é o resultado da troca de uma A por uma T no sexto códon do gene da β - globina, conduzindo para a substituição do ácido glutâmico por valina. Na desoxigenação, a HbS forma polímeros, causando falcização dos eritrócitos e dano na sua membrana. Alguns eritrócitos aderem ao endotélio, onde, conseqüentemente levam à vaso-oclusão (Steinberg, 2006).

1.6.2 Alteração celular dos eritrócitos com HbS

A polimerização da HbS deforma o eritrócito, fazendo com que a célula perca seu formato discóide, tornando-se alongada com filamentos na sua extremidade (Figura 5).

A seqüência que causa a deformação dos eritrócitos discóides em falcizados altera a funcionalidade da bomba Na^+/K^+ , com conseqüente perda de potássio e água, tornando os eritrócitos mais densos e favorecendo o aumento de polímeros de HbS. Ocorre também, a elevação da concentração intracelular de cálcio, pela falência da bomba de $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$ e, conseqüentemente, aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) da desoxi-HbS (Herrick, 1910; Wagener *et al.*, 2001; Brugnara, 2003). Todas essas alterações diminuem a capacidade da permeabilidade celular. A contínua alteração da morfologia dos eritrócitos com HbS provoca lesões crônicas da membrana celular, a ponto do eritrócito tornar-se irreversivelmente falcizado, acentuando os problemas não só em nível celular como também em nível circulatório (Brugnara, 2003). Dentre as alterações da membrana temos os seguintes eventos: rearranjo das proteínas espectrina-actina, diminuição de glicoproteínas, geração de radicais livres, externalização da fosfatidilserina (Ren *et al.*, 2006) e aceleração da apoptose, devido ao aumento da atividade citosólica de cálcio (Ca^{2+}) (Lang *et al.*, 2002; Yasin *et al.*, 2003).

No processo de falcização em nível celular, as células irreversivelmente falcizadas nos homozigotos HbS (*HbSS*) representam entre 4 e 44% do total dos eritrócitos. Assim, os eritrócitos irreversivelmente falcizados formam-se logo após sua liberação pela medula óssea e são rapidamente retirados da circulação, 1/3 por hemólise intravascular e 2/3 por fagocitose (Eaton & Hofrichter, 1987; Eaton & Hofrichter, 1990).

1.6.2.1 Processo inflamatório na Anemia Falciforme

Pacientes com AF apresentam um certo estado de inflamação. As reações inflamatórias são uma resposta do organismo aos diferentes tipos de agressão tecidual (química, física ou biológica), como as infecções virais, bacterianas, parasitárias ou fúngicas, e as agressões físicas, químicas e imunológicas (Ablij & Meinders, 2002; Prasad, 2003). Diante da reação inflamatória, os leucócitos iniciam a produção de diferentes interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama 1,2 (INF- γ). A interleucina-6 (IL-6) estimula os hepatócitos a produzir proteínas de fase aguda, entre elas a Proteína C Reativa (CRP) (Ballou, 1992; Ablij & Meinders, 2002). Esta última é constituída de um polímero não glicosilado, composta por cinco subunidades idênticas ligadas covalentemente. Cada subunidade consiste de 206 aminoácidos em uma única cadeia polipeptídica com peso molecular total de aproximadamente 23 KDa (Ballou, 1992; Clos & Terry, 2000).

A CRP se liga ao tecido lesado, a antígenos nucleares, e a certos organismos patogênicos de uma maneira cálcio-dependente (Agrawal, 2005). Seu papel biológico não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que ela é capaz de ativar o sistema do complemento, intimamente relacionado aos estágios iniciais do processo de formação da placa aterosclerótica e também, relacionado ao estímulo da síntese de fator tecidual pelos monócitos (efeito procoagulante). Por outro lado, a CRP também apresenta ação antiinflamatória ao inibir a adesão de neutrófilos e células endoteliais através da inibição de expressão de L-selectina, inibindo a produção de superóxido (Misra & Fridovich, 1972) pelos neutrófilos, e estimulando a síntese de antagonista do receptor de Il-1 pelos monócitos (Ballou, 1992). Estudos recentes sugerem que a CRP seja uma parte do sistema imune inato onde esta atue como uma molécula padrão de reconhecimento para ativar a resposta imune inata (Clos & Terry, 2000; Agrawal, 2005).

Em situações mórbidas agudas, tais como nas infecções, processos inflamatórios ou de destruição tecidual, ela se eleva rapidamente. Nos pacientes com inflamação aguda, a concentração pode aumentar 1000 vezes dentro de 1 a 2 dias após o processo de dano tecidual ativo e caem

rapidamente com o desaparecimento do estímulo. A CRP destaca-se por apresentar meia-vida plasmática curta, de aproximadamente 19 horas. Estudos comparativos mostram que a CRP é um marcador mais sensível na detecção da resposta inflamatória endotelial, em relação a outros como o soro amilóide A, IL-6, apoproteína A, apoproteína B e homocisteína. No entanto, a especificidade desta proteína faz com que interferentes como o tabagismo, obesidade, sexo, menopausa, possam produzir resultados falso positivos (Clos & Terry, 2000; Agrawal, 2005).

Nos últimos anos, com a utilização de metodologias mais sensíveis e práticas, tem sido possível detectar a CRP em pequenos níveis de concentração, permitindo identificar o que se chama de processos inflamatórios de baixo grau. A utilização destas novas técnicas de maior sensibilidade permite que este ensaio apresente um limite de detecção de 0,05 mg/L, razão pela qual é denominado de proteína C reativa ultra-sensível (CRP-us) (Agrawal, 2005).

1.7 Principal manifestação clínica da Anemia Falciforme

A alteração celular causada pelo processo de falcização influencia intensamente o fluxo sanguíneo, aumentando a sua viscosidade (Searjeant, 2001; Gladwin *et al.*, 2004). Os eritrócitos falciformes irreversíveis têm capacidade aumentada de adesão ao endotélio vascular, principalmente, devido à alta viscosidade do sangue e também pela elevação dos níveis de fibrinogênio, que ocorre como resposta natural a infecções. A adesividade pode ser devida às forças eletrostáticas. A deposição de grande número de eritrócitos alterados na superfície endotelial reduz a luz dos capilares, provocando estase, que poderá se intensificar pela diminuição da temperatura do ambiente. Como consequência da estase, ocorre hipóxia tecidual, levando mais moléculas de HbS ao estado desoxigenado, piorando a situação circulatória já desfavorável e lesando os tecidos irrigados por estes capilares (Horiuchi *et al.*, 1988). Os tecidos mal perfundidos podem sofrer infartos com necrose e formação de fibrose, principalmente no baço, medula óssea e

placenta. Esses eventos podem causar lesões tissulares agudas, com crises dolorosas e também crônicas (Wagener *et al.*, 2001).

A lesão tecidual é principalmente produzida por hipóxia resultante da obstrução dos vasos sanguíneos por acúmulo de eritrócitos falcizados. Os órgãos que sofrem maiores riscos são aqueles com *sinus* venoso, onde a circulação do sangue é lenta e a tensão de oxigênio e o pH são baixos (por exemplo: rim, fígado e medula óssea), ou aqueles com limitada suplementação de sangue arterial como olhos e cabeça do fêmur (Wagener *et al.*, 2001; Drew *et al.*, 2004).

Os sintomas da hipóxia também podem ser agudos com crises dolorosas, ou insidiosas, caracterizadas por necrose asséptica do quadril e retinopatia causada por células falciformes. Os efeitos dos danos teciduais agudos ou crônicos podem, em último caso, resultar na falência do órgão, principalmente em pacientes com idade avançada. Além disso, os pacientes podem apresentar cardiomegalia, hematúria, úlcera de perna, osteoporose vertebral, manifestações neurológicas e fertilidade relativamente diminuída (Ballas, 2002; Steinberg & Brugnara, 2003; Wagener *et al.*, 2003; Drew *et al.*, 2004).

Um problema adicional e menos reconhecido nos pacientes falciformes é sua vida sob condições de estresse psicossocial. Esses pacientes possuem não somente o estresse advindo do fato de serem portadores de uma doença crônica, mas também convivem com o problema da natureza de sua doença cuja repetição das crises, afeta sua atuação, tanto na escola, quanto no trabalho e reduz potencialmente seu senso de auto-estima (Compri *et al.*, 1996; Weatherall & Clegg, 2001).

1.8 Complicações na Anemia Falciforme

1.8.1 Infecção infantil

Na AF, os processos infecciosos ocorrem logo no início da vida, sendo, portanto, importante o aconselhamento dos pais sobre a imunização precoce e

a profilaxia com penicilina. Os pacientes com AF apresentam maior incidência de hipertrofia amigdaliana e amigdalites de repetição, corroborando com o aparecimento de crises álgidas, síndrome de seqüestro pulmonar e acidente vascular cerebral (AVC) (Gaston *et al.*, 1986).

Febre em crianças com AF e idade inferior a cinco anos, geralmente indicam infecção bacteriana grave, havendo grande possibilidade de infecção por meningite pneumocócica ou por *H. influenzae*. Em caso de sepse, ocorrem episódios febris com temperatura acima de 38,9°C (Dreyer, 1995), sendo que a antibioticoterapia deve ser iniciada imediatamente devido à possibilidade de infecção por bactérias encapsuladas. A sepse por pneumococo é uma causa importante de óbito, uma vez que o baço desses pacientes é incapaz de retirar os patógenos da corrente circulatória. Com isso, as crianças com AF recebem penicilina profilática (125 mg, duas vezes ao dia) até atingirem cinco anos de idade. Um estudo realizado por Gaston e colaboradores (1986) mostrou uma redução de 84% na ocorrência de sepse por pneumococo nas crianças que receberam a penicilino-terapia.

1.8.2 Infecção em adultos

A infecção estreptocócica é menos freqüente após a primeira década da vida, tornando-se mais comuns as infecções devido a outros agentes patogênicos. As infecções tendem a ocorrer em áreas lesionadas, como pulmões, rins e ossos (Gaston *et al.*, 1986).

As transfusões repetidas podem levar a alterações do sistema imunológico, cursando em direção a uma maior propensão aos processos infecciosos (Gaston *et al.*, 1986).

1.8.3 Crises de seqüestro esplênico

A exacerbação aguda de anemia em pacientes com AF é causa importante de morbidade e mortalidade. A causa mais comum que leva à anemia aguda na infância é o seqüestro esplênico (Vichinsky & Lubin, 1987).

O seqüestro esplênico agudo (SEA) ocorre pelo acúmulo de hemácias no interior do baço, que são retiradas da corrente circulatória pelas células

retículo-endoteliais, com conseqüente queda abrupta nos níveis de hemoglobina e risco de choque hipovolêmico. A diminuição de 2g/dL nos níveis da hemoglobina, aumento significativo no número de reticulócitos, palidez cutâneo-mucosa e um aumento rápido no tamanho do baço, são sinais clínicos-laboratoriais importantes no diagnóstico do SEA. Se não tratada, a criança pode evoluir para óbito em poucas horas após os primeiros sinais dessa complicação (Vichinsky & Lubin, 1987).

As crises de seqüestro também podem ocorrer em crianças com hemoglobinopatia SC ou S-talassemia. Nesses casos as crises são leves, com diminuição dos níveis de hemoglobina de 2 a 3g/dL. Raramente há necessidade de terapia transfusional (Ware & Filston, 1992).

O tratamento das crises graves de hiperseqüestro esplênico é dirigido à correção da hipovolemia com expansores plasmáticos e hemo-transfusões. Quando os pacientes são transfundidos, as hemácias seqüestradas no baço são remobilizadas e a esplenomegalia regride. Os níveis de hemoglobina elevam-se geralmente para um valor maior do que o previsto para a quantidade de sangue transfundida. A recidiva é comum e ocorre em cerca de 50% daqueles que sobreviveram ao primeiro episódio. A taxa de mortalidade é de 20% (Ware & Filston, 1992).

Os pacientes que apresentarem mais de uma crise de hiperseqüestro devem ser encaminhados à esplenectomia, devendo receber vacinas antipneumococos e anti-*Haemophilus influenzae*, além de penicilina profilática (Ware & Filston, 1992).

1.8.4 Crises aplásicas

As hemácias dos pacientes com AF têm uma sobrevivência mais curta do que hemácias de indivíduos HbAA e a supressão temporária da eritropoiese pode ocasionar uma anemia grave. A aplasia transitória (crise aplásica) geralmente é precedida de febre, astenia, intensa palidez cutâneo-mucosa e reticulocitopenia. Frequentemente ocorre após uma infecção pelo Parvovírus B19. O Parvovírus B19 é um membro da família *Parvoviridae*, que em pacientes com anemia hemolítica hereditária, pode levar à crise aplásica devido à toxicidade direta sobre os precursores eritróides. A anemia é

acentuada durante esse período, sendo que a melhora ocorre em cinco a dez dias. Na última década foram observadas outras complicações secundárias ao parvovírus como: necrose de medula óssea com pancitopenia, glomerulonefrite, acidente vascular cerebral (AVC), síndrome torácica aguda (STA) e seqüestro esplênico ou hepático (Koshy & Dorn,1996).

Como estas crises são comuns, transitórias e muitas vezes não requerem transfusão, há indicação de transfusão apenas quando há comprometimento da função cardíaca ou níveis de Hb inferiores a 4g/dL com reticulocitopenia. Neste caso deve-se proceder à infusão de 1mL de hemácias/kg/h acompanhado de diuréticos para prevenir falência cardíaca. Pode-se utilizar também exsanguíneo transfusão a fim de evitar perturbações no volume sangüíneo em pacientes clinicamente instáveis O tratamento deve ser dirigido para essas complicações (Koshy & Dorn,1996).

1.8.5 Síndrome torácica aguda (STA)

O pulmão é o maior órgão-alvo para as complicações agudas e crônicas da AF. A síndrome torácica aguda (STA) é uma causa freqüente de morte tanto em crianças quanto em adultos com AF e a segunda causa mais comum de hospitalização. Os problemas pulmonares não diretamente relacionados à oclusão vascular, como pneumonia ou asma, podem agravar a situação porque a hipóxia local ou sistêmica aumentam a polimerização da HbS. A falência multiorgânica geralmente é precedida ou acompanhada por acometimento pulmonar, observado na embolização gordurosa em crises álgidas. A STA é caracterizada pelo aparecimento de um infiltrado pulmonar recente, febre, dor torácica pleurítica, dor abdominal, tosse e hipóxia. Sabe-se que 50% de todos os pacientes (maiores de 10 anos) com AF terão pelo menos um episódio de STA e a probabilidade de recidiva é em torno de 40%, sendo que pode evoluir para doença pulmonar crônica (Tabela 1) (Vichinsky, 1991; Vichinsky & Styles, 1996).

Tabela 1. Principais causas de morte por idade em pacientes com anemia falciforme, segundo Vichinsky,1991.

Causas	≤ 10 anos	> 10 anos
Pulmonar	25%	50%
Sepse / meningite	40%	15%
Seqüestro esplênico	30%	0%
Falência renal	1%	30%
Outras	4%	5%

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são exemplos de enzimas hidrolíticas, presentes em membranas celulares ou em meio aquoso, que hidrolizam substratos insolúveis em água, os fosfolipídios. Elas atuam hidrolizando glicerofosfolipídeos na posição 2 do glicerol, liberando lisofosfolipídeo e ácido graxo. Ocorrem naturalmente nos meios intracelular e extracelular, e hidrolizam vários fosfolipídios naturais e sintéticos. Nos mamíferos, as PLA₂ participam de vias importantes na fertilização, proliferação celular, contração da musculatura lisa, hipersensibilização e doenças inflamatórias crônicas. Elas também são importantes em funções celulares como transdução de sinal na via de biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos. Os níveis séricos da PLA₂ estão aumentados na presença de lesão pulmonar, correlacionando-se com o diagnóstico da STA 48 horas antes do início da clínica e a sua determinação é uma medida diagnóstica não invasiva importante nos pacientes com AF que sofrem de STA (Vichinsky & Styles, 1996).

1.8.6 Crises álgidas

A dor é experienciada ao longo de toda a vida pelos pacientes com AF, principalmente durante as crises de falcização. Esse enorme desconforto localiza-se, sobretudo em extremidades, região lombar, abdômem ou tórax, usualmente associada à febre e urina escura ou vermelha. As crises de dor freqüentemente resultam de necrose avascular da medula óssea. O aumento da pressão intramedular secundário à resposta inflamatória do processo

necrótico é, provavelmente, a causa da dor. Essa hipótese é corroborada pelo achado de aspirado dos sítios de dor óssea que apresenta necrose e/ou infiltrado neutrofílico purulento. A classificação temporal da dor na AF pode ser aguda, crônica ou mista (Powars, 1990).

A dor aguda é mais comum, caracterizada por um início abrupto e a intensidade varia de leve até muito intensa. A dor aguda sem complicações é autolimitada e geralmente dura algumas horas ou alguns dias. Pode ser contínua ou recidivante e pode migrar para outra região. A dor aguda, quando acompanhada de complicações infecciosas ou psicossomáticas profundas, pode perdurar por várias semanas. As crises dolorosas apresentam intervalos variáveis, dependendo de cada paciente (Shapiro, 1989; Powars, 1990).

A dor crônica geralmente é definida como uma dor persistente por três a seis meses, ou mais, sem qualquer outra condição co-mórbida. A dor crônica pode debilitar o paciente tanto física quanto psiquicamente. Os pacientes com dores crônicas necessitam de visitas periódicas ao médico e planos de intervenção terapêutica. Devem ser avaliados por uma equipe multidisciplinar que possa oferecer apoio médico hematológico, psicológico, farmacológico e de assistência social. A dor mista pode ocorrer durante um episódio de dor crônica (Powars, 1990).

Algumas medidas de prevenção da dor são eficazes nas crises álgidas como: evitar hipóxia, desidratação e resfriamento da pele. Em casos de crises álgidas de repetição, deve-se anotar o dia de início e final da crise, para verificar o intervalo destas. É importante anotar também as crises de priapismo, e se o paciente permanecer com dor após quatro horas, deverá ser internado (Powars, 1990).

O uso de antiinflamatórios, analgésicos opióides (veja tabela 2) e intensa hidratação oral contribuem para diminuir a frequência das crises de dor (Shapiro, 1989; Powars, 1990).

Tabela 2. Agentes narcóticos mais freqüentemente utilizados em crises álgidas.

Agentes*	Dose (mg) equivalente a 10mg IM de morfina	Duração do efeito (horas)	Intervalo de administração (horas)
Morfina	10 IM	3-6	4
	20-60 VO	4-7	4
Hidro-morfina	1,5 IM	3-4	4
	7,5 VO	3-4	4
Meperidina	75 IM	3-4	4
	300 VO	3-4	4
Metadona	10 IM	4-6	6
	20 VO		
Codeína	7,5-30 VO	4	3-4
Tramadol	100-400 VO	4	3-4

FONTE: ANVISA, 2002. *Todas estas drogas podem ser tóxicas e se acumular no SNC, rins, fígado e pulmões.

1.8.7 Alterações renais

A AF contribui de várias maneiras para a diminuição da função renal: o lado arterial dos vasos de pequeno calibre possui uma baixa tensão de oxigênio, o meio ambiente da medula é caracterizado por hipóxia, hipertonicidade e um pH baixo, promovendo a formação de polímeros, o que altera a forma das hemácias, com conseqüente aumento da viscosidade sangüínea, ingurgitamento venoso, edema, e predisposição à isquemia e infarto na microcirculação renal. Essas alterações ocorrem com mais freqüência nos pacientes homocigotos para AF, porém, os portadores do traço falciforme (HbAS) também podem apresentar lesões renais. Anemia crônica e crises vaso-oclusivas freqüentes na medula renal são fatores determinantes das alterações renais observadas na doença falciforme. Estas alterações

podem ser estruturais e funcionais (Granfortuna *et al.*, 1986; Powars *et al.*, 1991).

As alterações estruturais podem ser glomerulares e medulares. Dentre as alterações glomerulares observa-se, principalmente a dilatação dos glomérulos com hiper celularidade e lobulação dos tufo s glomerulares, semelhante ao observado nas glomerulonefrites proliferativas. Duplicação da membrana basal e proliferação mesangial podem ocorrer e aumentam com o progredir da idade. Em pacientes idosos pode-se também observar fibrose progressiva, parcial ou completa. As alterações medulares são muito freqüentes porque a medula renal possui condições ideais para falcização, como pH e pO₂ reduzidos e hipertonicidade. Com freqüência há oclusão da vasa recta e lesão dos túbulos renais, com atrofia ou dilatação, presença de cilindros protéicos e deposição de ferro com degeneração do epitélio dos túbulos (Granfortuna *et al.*, 1986; Powars *et al.*, 1991).

Disfunções hemodinâmicas, hipostenúria, proteinúria, e alteração da síntese renal de eritropoetina, renina e prostaglandinas, são as alterações funcionais mais freqüentemente observadas nos doentes falciformes. As alterações hemodinâmicas se relacionam ao grau de anemia e variam com a idade. Em crianças e adultos jovens observa-se aumento da taxa de filtração glomerular (GFR), dos fluxos sangüíneo e plasmático renais efetivos (ERBF, ERPF), mas a fração de filtração encontra-se reduzida. A anemia, assim como a produção aumentada de prostaglandinas pela medula renal, contribui para o aumento da GFR e ERPF. Com a idade, há redução progressiva da GFR, ERBF e ERPF e falência renal é causa freqüente de óbito em pacientes acima de 40 anos. Proteinúria ocorre em 30 a 50% dos pacientes, nunca abaixo dos 10 anos de idade (Granfortuna *et al.*, 1986; Powars *et al.*, 1991).

A função dos túbulos proximais e distais também se encontra comprometida na doença falciforme. As alterações nos túbulos proximais se traduzem por maior excreção de urato e sódio, maior reabsorção de fosfatos e de α 2-microglobulina e menor reabsorção de zinco. Por outro lado, a diminuição da capacidade de acidificar a urina e de excretar potássio têm sido demonstradas em vários estudos, sugerindo comprometimento da função de túbulos distais. Entretanto, a hipercalemia observada nestes pacientes pode ser artefactual, atribuída principalmente à liberação *in vitro* de potássio pelas

hemácias contendo HbS e parcialmente secundária à síntese reduzida de renina e hipoaldosteronismo. Sucessivos eventos de falcização na medula renal levam a alterações na composição da urina. Deste modo, a hipostenúria é a primeira manifestação da obliteração da vasa recta (Granfortuna *et al.*, 1986; Powars *et al.*, 1991).

As infecções do trato urinário parecem ser freqüentes nas doenças falciformes e os patógenos envolvidos são principalmente *E.coli* e *Klebsiella/Enterobacter sp* (Powars *et al.*, 1991). Infarto renal agudo pode ocorrer durante um episódio de crise vaso-oclusiva e costuma evoluir com atrofia progressiva do rim comprometido (Granfortuna *et al.*, 1986).

1.8.8 Alterações cardíacas

As alterações do sistema cardiovascular estão presentes na quase totalidade dos pacientes portadores de AF. Muitas vezes, as manifestações desse aparelho constituem o aspecto dominante no quadro clínico. Essas alterações decorrem basicamente de: a) reações adaptativas ao estado anêmico crônico; b) lesões do sistema cardiovascular especificamente associadas à doença falciforme (Lindsay *et al.*, 1974).

Como em outras anemias crônicas, ocorre na AF um aumento acentuado do débito cardíaco. O fenômeno primariamente relacionado à gênese desse estado hipercinético (situação de débito cardíaco aumentado) é a hipóxia tissular resultante da capacidade de transporte de oxigênio reduzida, vinculada à queda da quantidade de hemoglobina. A hipóxia tissular é um estímulo potente de vasodilatação arteriolar (mediante liberação de agentes vasodilatadores gerados pelo metabolismo anaeróbico que se estabelece nesses tecidos). A vasodilatação arteriolar promove aumento do fluxo sangüíneo que concorre para reequilibrar à oferta de oxigênio. Essa queda da resistência arterial periférica significa, do ponto de vista hemodinâmico, uma significativa facilitação do desempenho ventricular (queda da impedância ejetiva) que assume comportamento hiperdinâmico (aumento da fração ejetiva) e participa no estabelecimento do alto débito cardíaco. Secundariamente, a vasodilatação do leito arteriolar permite trânsito de maior fluxo sangüíneo para o lado venoso da circulação sistêmica que resulta no aumento do retorno

venoso para as cavidades cardíacas. Esse aumento da pré-carga ventricular (aumento do volume de enchimento das cavidades ventriculares) determina aumento da força de contração miocárdica e representa fator adicional na gênese do estado de alto débito (Falk & Hood, 1982).

Além disso, o estado anêmico provoca aumento da atividade simpática reflexa (que provoca taquicardia e aumento da força de contração ventricular) e ativação do sistema humoral (promotor da retenção de sódio e água que expandem a volemia e ampliam o efeito de aumento da pré-carga), fatores coadjuvantes no estabelecimento do estado hipercinético da circulação sangüínea. As células falciformes conferem ao sangue viscosidade relativamente maior do que aquela esperada para o mesmo nível de hematócrito visto em anemias de outras etiologias, nas quais a viscosidade reduzida do sangue circulante constitui fator facilitador da ejeção ventricular e de redução do trabalho cardíaco. Esse aumento relativo da viscosidade na AF representa um fator de desgaste cardíaco que necessita sustentar um débito elevado sem a compensação da queda da viscosidade (Falk & Hood, 1982).

Ainda que um processo miocardiopático especificamente associado à AF não tenha sido documentado do ponto de vista anatomopatológico, observa-se áreas de fibrose causadas por microinfartos isquêmicos que contribuem para o processo degenerativo miocárdico, envolvendo particularmente as regiões supridas por circulação de padrão terminal, como as cabeças dos músculos papilares, que são sede de infartos e substituição fibrótica. Outras áreas de infarto miocárdico transmural com artérias coronárias subepicárdica normais são raramente detectados na doença e atribuídos a fenômenos vasoclusivos na microcirculação coronária (Lindsay *et al.*, 1974; Falk & Hood, 1982).

Como na talassemia, os pacientes com AF politransfundidos podem apresentar depósitos de ferro nas fibras musculares cardíacas com conseqüente fibrose e insuficiência cardíaca. A pericardite e a hipertensão pulmonar também podem ocorrer nos pacientes com sobrecarga de ferro. O estudo eletrocardiográfico não é patognomônico e a disfunção diastólica, quando captada pelo ecocardiograma, auxilia o diagnóstico de doença cardíaca por sobrecarga de ferro (Gaffney *et al.*, 1988).

1.8.9 Lesões osteoarticulares

As lesões ósseas e articulares são complicações freqüentes das doenças falciformes. Elas são decorrentes da falcização com isquemia e infarto da medula óssea (MO) e das estruturas ósseas adjacentes (Baum *et al.*, 1987; Platt *et al.*, 1991).

A crise dolorosa é a manifestação clínica mais característica. Resulta de falcização com necrose isquêmica nos locais de MO ativa. Na infância, os pequenos ossos das mãos e pés são os mais acometidos. Mais tarde a MO ativa localiza-se nas áreas justa-articulares dos ossos longos, nos ossos chatos como o esterno, as costelas e a pelve, e na coluna vertebral. Esta é também a distribuição das crises dolorosas, que embora sejam freqüentemente interpretadas como articulares, envolvem, na maioria das vezes, as áreas justa-articulares dos ossos longos (Platt *et al.*, 1991).

A incidência varia com a idade, o genótipo e os índices hematológicos. A dactilite ocorre quase exclusivamente em crianças abaixo dos 5 anos. As crises dolorosas são menos intensas após os 30 anos e raras acima dos 40 anos. Elas predominam em indivíduos com genótipo SS e β^0 talassemia. São mais freqüentes em pacientes com níveis mais altos de hemoglobina do que nos que apresentam anemia intensa. Níveis elevados de HbF podem proteger contra crises dolorosas, embora nem sempre isto ocorra. A gravidez e o puerpério representam fatores de risco aumentado para crises dolorosas (Baum *et al.*, 1987; Platt *et al.*, 1991).

Dentre os fatores precipitantes devem-se ressaltar as infecções, a acidose, as grandes altitudes e a exposição ao frio. O mecanismo pelo qual as infecções desencadeiam crises dolorosas é multifatorial: febre, desidratação e acidose. Em grandes altitudes (>2000 m), provavelmente as causas são a hipóxia, a exposição ao frio e os níveis mais altos de Hb. Apesar da exposição ao frio ser referida pelos pacientes como fator desencadeante, não foi demonstrada variação sazonal na incidência de crises dolorosas. Outros fatores como estresse emocional, intoxicação alcoólica, sudorese excessiva e exercício têm sido associados ao desencadeamento de crises dolorosas (Baum *et al.*, 1987; Platt *et al.*, 1991).

A dor é mais freqüente nas regiões justa-articulares dos ossos longos, na região lombar e pélvica. Dor afetando o esterno ou as costelas pode simular dor pleurítica. A dor nas grandes articulações pode ser simétrica ou assimétrica, constante ou de caráter migratório. A intensidade é variável, assim como a duração. Pode ocorrer crise leve, transitória, localizada, ou dores lancinantes, generalizadas, que duram dias ou semanas, sendo necessário, por vezes, a hospitalização do paciente (Baum *et al.*, 1987; Platt *et al.*, 1991).

A crise dolorosa é uma situação de risco. O paciente deve ser orientado para procurar atendimento médico imediato. O tratamento consiste em hidratação e analgesia efetiva da dor (Tabela 2).

1.8.10 Alterações Osteoarticulares

1.8.10.1 Dactilite (Síndrome mão-pé)

A dactilite é freqüentemente a primeira manifestação da doença e resulta da necrose isquêmica da MO com dor, secundária ao aumento da pressão intramedular devido ao processo inflamatório subsequente (Watson *et al.*, 1963).

Na infância os pequenos ossos das mãos e pés são afetados e o quadro clínico resultante chamado de síndrome mão-pé, consiste em edema doloroso que pode acometer um segmento de um dedo até as quatro extremidades. Predomina entre 6 meses e 2 anos, tornando-se progressivamente menos freqüente após os 5 anos, quando a MO ativa desaparece dos pequenos ossos periféricos. O quadro é de início súbito e dura 1 a 2 semanas. Pode ser precipitado pelos fatores desencadeantes da crise dolorosa, visto tratar-se de crise vaso-oclusiva. O diagnóstico é clínico, já que as alterações radiológicas aparecem após a resolução do quadro (Watson *et al.*, 1963).

1.8.10.2 Necrose isquêmica da cabeça do fêmur

A necrose isquêmica da cabeça do fêmur é outra forma de necrose da medula óssea, com implicações particulares devido ao local crítico da lesão. A cabeça do fêmur pode apresentar várias alterações com ou sem ruptura da

superfície articular, dependendo da idade em que o infarto ocorre. Embora possa ser observada desde a infância, é mais freqüente no final da adolescência e em adultos jovens (Platt *et al.*, 1991).

A lesão pode ser assintomática ou causar dor no quadril, que piora com a movimentação. O suporte contínuo de peso sobre a cabeça femural amolecida resulta em colapso e lesão da superfície articular. A evolução clínica depende da idade em que o infarto ocorre. Antes dos 18 anos resulta em achatamento da cabeça femural com remodelamento do acetábulo e manutenção da função articular. O envolvimento da cabeça femural madura é segmentar, com colapso da porção medial resultando em dor persistente e em deformidade. Nos estados mais avançados há reabsorção da cabeça femural, sinais de osteoartrose e total destruição óssea com fibrose e anquilose (Platt *et al.*, 1991).

1.8.11 Alterações neurológicas

Muitas complicações do Sistema Nervoso Central (SNC) têm sido associadas à AF, sendo que as principais são o infarto, em 70 a 80% dos casos, e a hemorragia intracraniana (Switzer *et al.*, 2006). Estudando crianças com AF, Powars e colaboradores (1978) observaram uma incidência de 0,70% de acidente vascular cerebral (AVC) por ano nas primeiras duas décadas de vida, e um estudo na Jamaica mostrou uma prevalência de 7,8% até a idade de 14 anos (Balkaran *et al.*, 1992).

A oclusão, parcial ou completa, ocorre nos grandes vasos cerebrais e parece ser devida à estenose progressiva, superposta à formação de trombo no local. Estudos histológicos têm demonstrado que o dano vascular é pelo aumento da espessura da camada segmentar, devido à extensa proliferação de fibroblastos e do músculo liso da íntima, sem a presença de sinais inflamatórios (Switzer *et al.*, 2006).

Os pacientes com AVC normalmente apresentam sinais clínicos evidentes. O sintoma neurológico mais comum é a hemiparesia, seguido por afasia ou disfasia, convulsões e monoparesias. Cefaléia foi achado comum porém, isoladamente, não é fator preditivo de AVC. Raros pacientes podem

apresentar como manifestação inicial, quadro de Acidente Isquêmico Transitório ou até mesmo um coma (Ohene-Frempong, 1991).

O diagnóstico de AVC é normalmente feito a partir de dados clínicos, entretanto, os pacientes podem ser avaliados através de tomografia computadorizada ou ressonância magnética (Steen *et al.*, 2004). Angiografia deve ser realizada nos casos onde não foi feito o diagnóstico por tomografia e/ou ressonância magnética, sendo que, nestes casos, os pacientes necessitam de terapia transfusional previamente ao exame, com o objetivo de prevenir episódio de falcização e conseqüente piora da manifestação neurológica (Powars *et al.*, 1978; Ohene-Frempong, 1991; Switzer *et al.*, 2006).

Exsangüíneo transfusão, manual ou automatizada, é uma intervenção terapêutica imediata que pode diminuir a progressão da doença e reverter as manifestações clínicas. Na ausência de terapia transfusional, o curso clínico da lesão cerebrovascular é progressivo. O objetivo da terapia transfusional, tanto na fase inicial quanto na fase crônica do tratamento, é diminuir a percentagem de hemoglobina S para menos de 30%, uma vez que as recidivas dos episódios de AVC ocorrem em cerca de 67% dos pacientes (Switzer *et al.*, 2006).

Outras medidas de tratamento durante o episódio agudo dependem da manifestação clínica: ventilação assistida, agentes farmacológicos anti-edema cerebral, terapia anticonvulsivante, etc, e, portanto é importante a avaliação e seguimento de um neurologista (Switzer *et al.*, 2006).

1.8.12 Alterações oculares

O evento inicial na patogenia da retinopatia da doença falciforme é a oclusão vascular, que ocorre mais freqüentemente na retina periférica. A angiografia com fluoresceína evidencia a oclusão vascular nas arteríolas retinianas. As oclusões também podem ocorrer nos capilares e vênulas, embora a oclusão das últimas seja menos comum. Esses eventos podem afetar o leito vascular dos olhos, geralmente com conseqüências irreversíveis. O tratamento consiste em hiperoxigenação e rápida redução da pressão intra-ocular, utilizando técnicas cirúrgicas e medicamentosas (Goldberg, 1971).

1.8.13 Úlceras de membros inferiores

Úlceras de membros inferiores estão entre as mais evidentes manifestações cutâneas da AF em virtude de sua elevada freqüência, cronicidade e resistência à terapia disponível, com elevadas taxas de recorrência. Essas lesões podem afetar socialmente o indivíduo acometido, pois comprometem sua capacidade produtiva, e respondem por significativa parcela da procura aos serviços de saúde. Clinicamente há grande variabilidade no tamanho das lesões que podem, ainda, ser extremamente dolorosas. Quase sempre se desenvolvem nos tornozelos, acima dos maléolos lateral e medial; mais raramente surgem na região pretibial e dorso do pé. O início pode ser espontâneo, ou subseqüente a trauma, por vezes leve como a picada de um inseto. Edema subjacente à lesão é um antecedente comum. Tipicamente, as úlceras formam uma depressão central, cercada por uma margem com suave elevação das bordas e edema ao redor. Pode haver exsudação, formação de crostas e tecido de granulação na base. Algumas úlceras são profundas com envolvimento dos tecidos subcutâneos, por vezes acompanhadas de reação periostal que pode ser visível ao exame radiológico. Úlceras mais crônicas podem apresentar margens nodulares e irregulares. Variações em sua aparência são influenciadas pela cronicidade, presença de infecção secundária e terapia prévia (Eckman, 1996).

Bactérias são freqüentemente isoladas da base de úlceras de pacientes com AF e embora possam representar a colonização de tecidos isquêmicos desvitalizados, evidências clínicas sugerem que a infecção pode contribuir para a manutenção e agravamento das úlceras. Exames microbiológicos revelam a presença de infecção única ou múltipla, com igual freqüência. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* e *Streptococcus* são as bactérias mais freqüentemente encontradas, embora não raramente sejam descritos casos de infecção por anaeróbios (*Bacteroides*), encontrados mais freqüentemente em situações de múltipla infecção, geralmente acompanhados de odor fétido (Eckman, 1996).

Surpreendentemente, infecção sistêmica é uma complicação rara dessas úlceras crônicas. Extensão da infecção ao osso adjacente é uma

preocupação constante e de difícil exclusão sem a biópsia na presença de dor, celulite e reação periostal (Eckman, 1996).

A presença de úlceras em membros inferiores não parece estar associada a maiores complicações sistêmicas. Ausência de cicatrização ocorre em até 60% dos casos, freqüentemente com evolução arrastada por meses e até anos e geralmente associada a lesões maiores. A taxa de recorrência é variável nos diversos estudos, de 25 a 97%, dependendo do tamanho da úlcera e, possivelmente, dos cuidados locais administrados. A recorrência geralmente ocorre cerca de 6 a 8 meses após a cicatrização inicial. A fisiopatologia dessas úlceras envolve etiologia multifatorial, mas a hipóxia tissular pode ser entendida como o fator principal e conseqüência, por sua vez, da deformabilidade das hemácias, de alterações no endotélio vascular, alteração na viscosidade sanguínea, ativação da coagulação, alteração no tônus vascular e até mesmo a presença de imunocomplexos circulantes (Eckman, 1996).

1.8.14 Priapismo

Priapismo pode ser definido como uma falha na detumescência do pênis acompanhada de dor. A elucidação do fator etiológico do priapismo tem certa urgência, já que a terapia diretamente relacionada à etiologia pode levar à melhora da condição, sendo que, a AF é o fator causal em cerca de 25% dos casos de priapismo (Nolan *et al.*, 2005).

A capacidade de ereção do pênis é controlada pela interação de eventos endocrinológicos, hipotalâmicos e cerebrais. No seu estado normal, flácido, o músculo liso das artérias e trabéculas está contraído. Com o estímulo, ocorre o relaxamento desta musculatura fazendo com que o sangue passe a fluir e penetre nos plexos venosos, dilatando-os. Um maior volume de sangue penetra nos corpos cavernosos aumentando o seu volume e impedindo a drenagem venosa, tornando estes corpos túrgidos e ocasionando a ereção (Nolan *et al.*, 2005).

O mecanismo exato do priapismo na AF ainda necessita ser elucidado. A falha na detumescência pode ser devida a numerosos fatores: vasoclusão no fluxo de saída do sangue, liberação excessiva de neurotransmissores, prolongado relaxamento do músculo liso ou ainda uma combinação destes

episódios. Uma porcentagem significativa, mas indefinida, dos pacientes apresenta os episódios de priapismo durante o sono. Como frequentemente estes episódios se iniciam durante ereção normal no sono REM, acredita-se que eles podem estar associados com desidratação e hipoventilação, condições que causam acidose metabólica. A diminuição no pH circulatório e na tensão de oxigênio leva a um aumento na rigidez do eritrócito e conseqüente falcização, resultando na estagnação do sangue nos sinusóides do corpo cavernoso. Os efeitos dessa eritroestase no endotélio vascular resultam na reação inflamatória e subseqüente fibrose do trabéculo esponjoso (Powars & Johnson, 1996).

No paciente com AF, tipicamente observa-se alta pressão intracavernosa no nível sistólico, com baixo-fluxo no tecido cavernoso no estado isquêmico. O grau de isquemia está relacionado com o número de veias emissárias envolvidas e com a duração da vaso-oclusão (Nolan *et al.*, 2005). Exame histopatológico tem revelado sérias alterações na infra-estrutura peniana relacionadas ao priapismo:

- Com 12 horas, existe evidência de edema intersticial trabecular;
- Após 24 horas observa-se destruição do endotélio do sinusóide, exposição da membrana basal e aderência plaquetária;
- Com 48 horas, ocorre o aparecimento de trombos nos espaços sinusóides, necrose do músculo liso, com adelgaçamento e edema do septo corporal.

Estes eventos podem ser responsáveis pelo alto índice de impotência (>50%) visto mesmo em pacientes tratados. Cerca de 7% dos pacientes masculinos com AF apresentam quadro de priapismo com conseqüente disfunção. Baseado em estudos recentes, o envolvimento tricorporal (corpo esponjoso e corpos cavernosos) parece ser o aspecto mais característico do priapismo na AF. Recorrência de episódios e impotência estão presentes em 50% dos adultos afetados. O envolvimento bicorporal, onde somente os corpos cavernosos estão envolvidos, é visto com maior freqüência em pacientes pré-puberes. O priapismo em idade pré-puberal não apresenta recorrência tão freqüente e não está tão fortemente associado com impotência como nos adultos (Powars & Johnson, 1996).

O diagnóstico é feito através da história clínica, exame físico, dados laboratoriais e testes radiológicos específicos. Vários sinais e sintomas podem estar associados, tais como: disúria, crises de dor generalizada, febre e sepse (Nolan *et al.*, 2005).

O exame físico revela ingurgitamento do pênis. Na avaliação laboratorial, a determinação da porcentagem de HbS é útil na monitorização da terapêutica transfusional; e a medida dos gases sanguíneos penianos é importante para a diferenciação entre priapismo de alto ou baixo fluxo, auxiliando na escolha do tratamento. Quanto maior o grau de hipóxia e acidose, maior a isquemia e pior o prognóstico, conseqüentemente uma terapia mais agressiva é necessária. Outros métodos diagnósticos incluem: monitorização da pressão intracorporal, Doppler sonografia de fluxo colorida e cintilografia peniana (Powars & Johnson, 1996).

Emond e colaboradores (1980) descreveram que baixos níveis de HbF associados a altas contagens de plaquetas são considerados fatores de risco para o priapismo em pacientes com AF.

A terapia inicial, tanto em adultos como em crianças, é a melhora da dor e ansiedade, que podem ser obtidos com infusão contínua EV de morfina ou hidroxizine por VO ou EV. Deve-se iniciar a infusão de fluidos hipotônicos EV rapidamente. Sem a análise do tipo de fluxo, nem sempre é possível diferenciar entre o priapismo severo e o priapismo com fluxo normal (Powars & Johnson, 1996).

1.9 Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico das doenças falciformes preconizam-se as seguintes metodologias: eletroforese alcalina em acetato de celulose, eletroforese ácida em agar ou agarose, teste de solubilidade, dosagem da HbF, dosagem da HbA₂ e hemograma completo (Naoum, 1997).

Tratando-se especificamente da AF, o diagnóstico laboratorial de triagem é feito através de eletroforese de hemoglobina, focalização isoelétrica ou cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Di Nuzzo & Fonseca, 2004), testes de avaliação qualitativa (falcização e solubilidade) e dosagem da

HbF (Naoum, 1997). As cadeias β globínicas são detectáveis em fase precoce da vida fetal, a partir da 10^a a 12^a semana de gravidez, o que possibilita o diagnóstico pré-natal da AF (Di Nuzzo & Fonseca, 2004).

O HPLC é uma metodologia automatizada que permite identificar e quantificar as frações hemoglobínicas normais e variantes (Wilson *et al.*, 1983; Joutovsky *et al.*, 2004). Por ser rápida, precisa e com uma alta sensibilidade e especificidade, esta automação tem sido muito utilizada para a rotina de laboratórios clínicos e de triagem neonatal (Wild & Stephens, 1997; Campbell *et al.*, 1999; Ou & Rognervd 2001).

As metodologias desenvolvidas a partir da tecnologia do DNA têm ajudado na elucidação da base molecular de muitas hemoglobinopatias, que são as doenças genéticas mais comuns na população humana. As alterações genéticas identificadas por esses métodos incluem: deleções que removem parte do grupamento do gene da globina β e mutações de ponto que geram códons “nonsense” e “missense”, mRNA instáveis e “splicing” anormais, resultando no decréscimo da síntese proteica, ausência ou anormalidade estrutural de uma das subunidades da globina. A partir da utilização de primers que flanqueiam uma determinada região polimórfica do DNA, é possível amplificar um segmento de DNA que pode ser, então, analisado sob diferentes formas, como por exemplo, por seqüenciamento direto do DNA ou por clivagem com endonuclease de restrição. A análise dos produtos da PCR por determinação da seqüência de nucleotídeos é a mais informativa em relação aos polimorfismos e, muito utilizada na detecção molecular dos doentes falciformes (Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988; Sutton *et al.*, 1989).

Mesmo assim, a realização do hemograma, com especial atenção à morfologia eritrocitária (Tabelas 3 e 4), contribui muito para se chegar a um resultado seguro.

Tabela 3. Alterações da morfologia eritrocitária nos diferentes genótipos das síndromes falcêmicas (Adaptado de Naoum, 1997).

Genótipo	Alterações da morfologia eritrocitária
<i>AS</i>	Normocitose, normocromia.
<i>SS</i>	Células falcizadas e em alvo. Hipocromia e policromasia. Eritroblastos e corpos de Howell-Jolly.
<i>S / tal beta</i>	Anisocitose, poiquilocitose, células falcizadas e em alvo. Hipocromia e policromasia.
<i>S / tal alfa</i>	Anisocitose, microcitose, células falcizadas. Hipocromia e policromasia.
<i>SC</i>	Aniso-poiquilocitose. Hipocromia e células em alvo.
<i>SD</i>	Células falcizadas e em alvo. Policromasia.
<i>S / PHHF</i>	Discreta anisocitose ou normocitose e normocromia.

Legenda: Variantes genotípicas. *AS* (heterozigoto, traço falciforme), *SS* (homozigoto, paciente falciforme), *S / tal beta* (associação da HbS com talassemia beta), *S / tal alfa* (associação da HbS com talassemia alfa), *SC* (heterozigoto, HbS associada à HbC), *SD* (heterozigoto, HbS associada à HbD) e *S / PHHF* (heterozigoto, HbS associado à persistência hereditária da hemoglobina fetal).

Tabela 4. Alterações laboratoriais específicas na anemia falciforme (Adaptado de Naoum, 1997).

Parâmetro analisado	Valores encontrados
Concentração da HbS	90-100%
Dosagem da HbF	2-10%
Tipo de anemia	Normocítica e normocrômica
Dosagem da Hb g/dL	7-9
Reticulócitos	5-30
Leucócitos	Acima de 10.000/ μ L durante as crises. Pode ocorrer desvio à esquerda
Plaquetas	Trombocitose com formas anormais
Fragilidade osmótica	Diminuída
Fragilidade térmica e mecânica	Aumentada
Bilirrubina indireta	Elevada, acima de 5 mg/dL
Urobilinogênio urinário	Elevado
Urobilinogênio fecal	Elevado
Hematúria	Freqüente
Ácido úrico sérico	Pode estar elevado
Fosfatase alcalina sérica	Elevada nas crises
Medula óssea	Hiperplasia das células eritróides
Ferro sérico	Normal ou aumentado
Ferritina	Aumentada
Transferrina	Diminuída

1.10 Lei 822/01 – Triagem Neonatal

A Portaria do Ministério da Saúde Nº 822, de 06 de junho de 2001, regulamentou a triagem neonatal da fenilcetonúria, do hipotireoidismo congênito, das doenças falciformes e outras hemoglobinopatias, bem como da fibrose cística, embora ainda em fase teste, em todo território nacional. Essa medida restaurou um dos princípios fundamentais da Ética Médica, que é o da igualdade, garantindo acesso igual aos testes de triagem a todos os recém-nascidos brasileiros, independentemente da origem geográfica, raça e classe socioeconômica (Ramalho *et al.*, 2002).

De fato, só a AF, por exemplo, tem uma incidência entre recém-nascidos brasileiros cerca de dez a trinta vezes maior que a da fenilcetonúria, que, juntamente com o hipotireoidismo congênito, era tradicionalmente associada ao "teste do pezinho". Com essa afirmação, não se quer, evidentemente, diminuir

a importância da triagem neonatal da fenilcetonúria e de outros distúrbios metabólicos ainda mais raros, mas apenas salienta a necessidade da inclusão das hemoglobinopatias nessa triagem (Ramalho *et al.*, 2002).

Embora as maiores taxas de mortalidade ocorram nos dois primeiros anos de vida, a inclusão obrigatória da pesquisa de hemoglobinopatias no exame de triagem neonatal vem demonstrando ser um passo importante para a diminuição dessa taxa, pois permite a identificação precoce desses indivíduos e a conseqüente introdução de profilaxia adequada e seguimento ambulatorial regular (Di Nuzzo & Fonseca, 2004).

Em relação à AF, espera-se que o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), associado a algumas medidas terapêuticas, tais como antibioticoterapia profilática, entre os três meses e os cinco anos de idade, a vacinação específica (Pneumococos, *Haemophilus*, Hepatite B) e o seguimento ambulatorial regular, garantam maior sobrevivência e melhor qualidade de vida aos seus portadores (Ramalho *et al.*, 2002).

O maior estudo de prevalência e distribuição de hemoglobinopatias realizado no Brasil, analisou amostras de 55.217 indivíduos, em quarenta cidades, com idades entre um mês e noventa anos, provenientes de centros de saúde, escolas e bancos de sangue. Resultados deste estudo mostraram que 3,08% dos indivíduos apresentavam hemoglobinas anormais desdobradas em variantes moleculares (2,49%), talassemias (0,53%) e alterações induzidas pela formação de meta-hemoglobina (0,06%). A condição HbAS foi a mais prevalente, com 1.038 casos (60,95%) do total de 1.703 portadores; as talassemias alfa e beta somaram 265 casos (15,56%); a condição HbAC foi detectada em 243 casos (14,27%) e as formas mais raras, em 156 casos (9,27%). A frequência de HbSS na população total analisada foi de 0,04% (Naoum, 1987).

Atualmente já foram descritas mais de 900 variantes estruturais da hemoglobina (Vernon, 2004). Tondo e colaboradores (1961) durante um levantamento da população negra de Porto Alegre descobriram uma nova variante da hemoglobina humana designada hemoglobina Porto Alegre (Hb PA). Entre os membros da família analisada, havia um casamento entre primos de primeiro grau, sendo que dos seus oito filhos estudados, cinco mostravam

apenas HbPA e três tinham HbA e HbPA observados na separação eletroforética em gel de amido, pH 8,6. Esses dados podem ser interpretados, admitindo que a HbPA é controlada por um gene autossômico, alelo do que controla a HbA. Nos casos com ausência da HbA, o gene estaria em homozigose e, nos casos com HbA e HbPA estaria em heterozigose. O gene que controla a HbPA é muito raro, pois, até agora foi encontrado somente nesta família, apesar de terem sido estudados 2722 negróides (Salzano et al., 1968) e 754 índios e mestiços (Salzano & Tondo, 1968). Apesar da mobilidade da HbPA, em gel de amido, ser próxima da HbS distingue-se desta por não formar precipitado em solução de fosfato 2,24 M e por não apresentar o fenômeno de falcização quando sob a forma reduzida (Tondo et al., 1963).

Salzano e colaboradores (1968) através de exames realizados na rotina de um laboratório público de Porto Alegre, encontraram uma frequência de HbAS de 6,8%, HbAC de 1%, HbSC de 0,1% e HbSS de 0,1% em uma população negróide formada em sua maioria por adultos.

Outro estudo realizado por Sommer e colaboradores (2006) mostraram uma prevalência das doenças falciformes em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul de (HbSS e HbSC) (1:39.000 ou 0,0025%) e de indivíduos traço falciforme (HbAS) foi de 1:72 ou 0,73% do total de recém-nascidos analisados. Esses dados representam 72% dos casos rastreados na experiência de um ano na rede de saúde pública após ter sido implantado o Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN). Somando-se àqueles da iniciativa privada, a cobertura atinge 92% dos recém-nascidos vivos.

Portanto, os benefícios do diagnóstico e da intervenção precoce no acompanhamento das doenças falciformes têm levado à ampla difusão em todo o território brasileiro do programa para a detecção dessas variantes, permitindo o atendimento médico e o aconselhamento genéticos adequados (Sommer et al., 2006).

1.11 Medidas Gerais para Tratamento na Anemia Falciforme

Não há tratamento específico para as doenças falciformes. Assim, medidas gerais e preventivas no sentido de minimizar as conseqüências da

anemia crônica, crises de falcização e susceptibilidade às infecções são fundamentais na terapêutica destes pacientes. Estas medidas incluem boa nutrição; profilaxia, diagnóstico e terapêutica precoce de infecções; manutenção de boa hidratação e evitar condições climáticas adversas. Além disso, acompanhamento ambulatorial duas a quatro vezes ao ano e educação da família e paciente sobre a doença são auxiliares na obtenção de bem-estar social e mental (Jacob *et al.*, 2006).

Os avanços na prevenção de infecções e crises de falcização têm proporcionado uma maior sobrevida aos pacientes, de modo que, em longo prazo, a manutenção da boa qualidade de vida é essencial para os indivíduos com doenças falciformes e deve ser objetivo dos profissionais que tratam destes pacientes. Penicilina profilática previne 80% das septicemias por *S. pneumoniae* (Pneumococo) em crianças com AF até 3 anos de idade. O impacto da profilaxia é enorme e deve ser iniciado aos 3 meses de idade para todas as crianças com doenças falciformes (SS, SC, S β). A terapêutica deve continuar até 5 anos de idade (Gaston *et al.*, 1986).

1.11.1 Terapia Farmacológica com Hidroxiuréia (HU)

Até o momento, duas formas de terapia podem ser utilizadas alternativamente ao tratamento convencional das doenças falciformes, como o transplante de medula óssea e a administração oral de hidroxiuréia (HU), um agente indutor da síntese de HbF. A experiência com o uso de HU nestes casos é muito maior do que com o transplante de medula óssea. Ambos podem ser indicados em grupos selecionados de pacientes (Steinberg & Brugnara, 2003; Richard *et al.*, 2005).

Vários estudos em adultos vêm demonstrando a eficácia do uso da HU (Bandeira *et al.*, 2002), único agente específico disponível para tratar as complicações da AF, cujo principal efeito é a elevação dos níveis de HbF em pacientes portadores de síndromes falcêmicas (Bandeira *et al.*, 2002; Steinberg, 2005). Estudos recentes têm demonstrado que a HU pode, também, reduzir a contagem de granulócitos, monócitos e plaquetas, e ainda reduzir a expressão de moléculas de adesão na superfície dos eritrócitos (Figura 6). Essas células, quando elevadas, são um fator de risco para a oclusão vascular,

pois permitem interações adesivas entre células falciformes, células endoteliais e leucócitos, e estimulam plaquetas a liberar citocinas que contribuem para a adesão (Steinberg, 1999; Hillery *et al.*, 2000; Halsey *et al.*, 2003; Covas *et al.*, 2004). Trabalho realizado por Koc e colaboradores (2005) analisou o efeito da HU nos níveis de alguns fatores da coagulação e inibidores naturais em crianças, e concluiu que havia uma diminuição em todos os fatores da coagulação, com exceção dos fatores IX e XII, e dos inibidores naturais da coagulação.

A HU foi sintetizada em 1869, e somente em 1960 foi utilizada como um agente quimioterápico, bastante conhecido e utilizado para tratamento de síndromes mieloproliferativas como leucemia mielóide crônica (LMC) e policetemia vera. Sua função principal encontra-se no bloqueio da síntese de DNA através de inibição da ribonucleotídeo redutase, mantendo as células em fase S (Figura 6). É de fácil utilização, com poucos efeitos tóxicos e com um efeito mielossupressor facilmente revertido. O uso da HU nos protocolos de tratamento da AF teve seu início na década de 80, nos pacientes adultos, sendo o seu uso posteriormente autorizado em crianças. Ao longo dos anos, estudos em crianças têm demonstrado igual eficácia da HU sem grandes efeitos colaterais (Bandeira *et al.*, 2002; James *et al.*, 2006).

Os resultados com a HU são muito animadores tanto em adultos quanto em crianças. As doses iniciais podem ser de 10 mg/Kg de peso alcançado até 30 mg/Kg. Sendo a HU um agente que induz depressão da medula óssea, atenção especial deve ser tomada em relação ao número de granulócitos, plaquetas e reticulócitos que não devem ser inferiores a $2 \times 10^9/L$, $100 \times 10^9/L$ e $50 \times 10^9/L$, respectivamente (Bandeira *et al.*, 2002; James *et al.*, 2006).

A despeito de vários relatos de benefícios obtidos por este agente terapêutico, há registro de que pelo menos 25% dos pacientes (Lavelle, 2004), tratados com HU tem demonstrado falha no aumento da concentração da HbF, tornando assim necessária a utilização de outras drogas nesses pacientes refratários à HU. Deste modo, agentes como butiratos e derivados, ou ácidos orgânicos de cadeia curta como ácido valpróico (King, 2004), bem como inibidor de DNA metiltransferase (DNMT) (Lavelle, 2004; Pace & Zein, 2006), que também induzem ao aumento da HbF, encontram-se em estudos para

eventual uso nestes pacientes. Grandes doses de eritropoetina (EPO) e ferro associado à HU também parecem aumentar substancialmente os níveis de HbF (ANVISA, 2002).

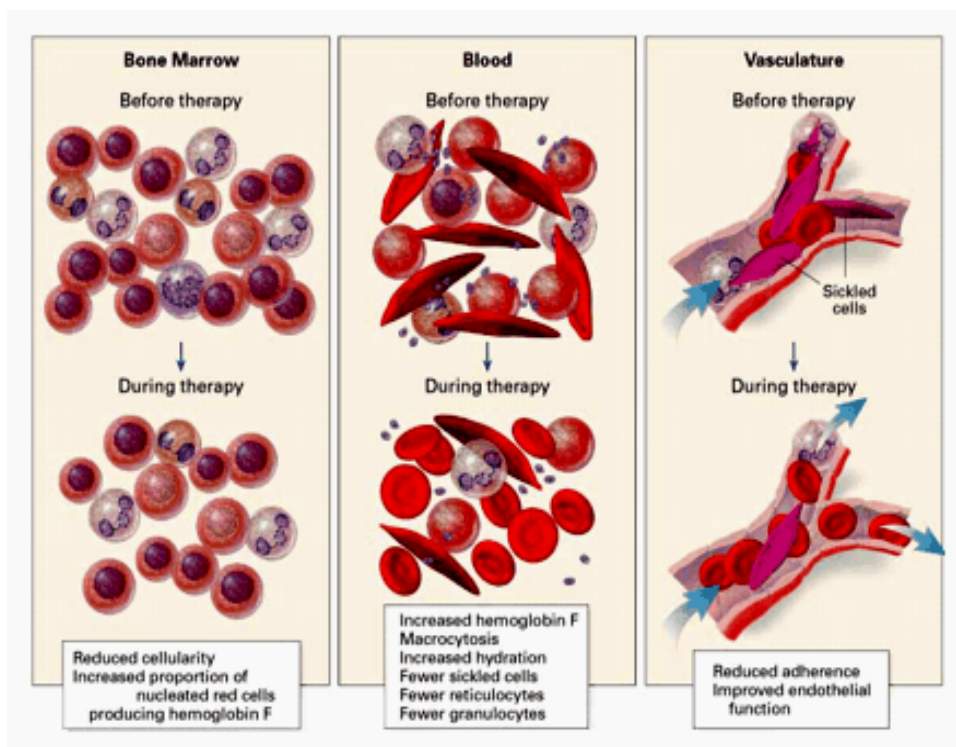


Figura 6. Mecanismo de ação da HU na AF. A HU age na MO e, por seus efeitos citotóxicos, aumenta a população de eritroblastos que sintetizam grandes quantidades de HbF. A celularidade da medula pode também ser diminuída (**Esquerda**). Altas concentrações de HbF reduzem a polimerização da HbS e o número de eritrócitos deformados, densos ou danificados. As células que contêm HbF possuem sobrevivência longa, atenuando a hemólise e diminuindo a contagem de reticulócitos. As contagens de granulócitos, monócitos e plaquetas circulantes diminuem (**Centro**). A diminuição no número de eritrócitos densos e deformados que podem aderir ou lesar o endotélio reduz a probabilidade de ocorrer as crises vaso-oclusivas (**Direita**) (Steinberg, 1999).

Contudo, pesquisas recentes apontam novos alvos de investigação terapêutica direcionadas a reestabelecer a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Estudos apontaram que mais de 50% dos pacientes com AF apresentam disfunção endotelial devido à baixa biodisponibilidade endógena do NO (Mack & Kato, 2006).

O NO é um gás solúvel, possui um tempo de meia vida de segundos e é constantemente sintetizado pelas células endoteliais a partir do aminoácido L-

arginina, pela óxido nítrico sintase (e-NOS). O NO liberado do endotélio ativa a guanilato ciclase solúvel no músculo liso, após ligação com o grupo heme, resultando no aumento intracelular do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Este, por sua vez, ativa quinases que diminuem a concentração intracelular de cálcio no músculo liso, promovendo relaxamento, vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo local (Furchgott & Zawadzki, 1980).

Segundo Morris e colaboradores (2000), baixos níveis plasmáticos de L-arginina são observados nos doentes falciformes, principalmente durante as crises vaso-oclusivas e síndrome torácica aguda (STA). Outra pesquisa encontrou que esses mesmos pacientes possuem altos níveis plasmáticos de arginase, conseqüentemente baixa relação de arginina e ornitina (Morris *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2005). Níveis elevados de arginase plasmática são encontrados em indivíduos com taxa hemolítica acelerada. A arginase é uma enzima particularmente abundante nos eritrócitos jovens, que predominam nestes pacientes, uma vez que possuem um rápido “turnover” eritrocitário. Portanto, pacientes que possuem baixos níveis de arginina na corrente circulatória têm maior probabilidade de desenvolver hipertensão pulmonar, AVC, crises de priapismo e úlceras de perna, e, com isso vir ao óbito precocemente (Figura 7) (Morris *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2007).

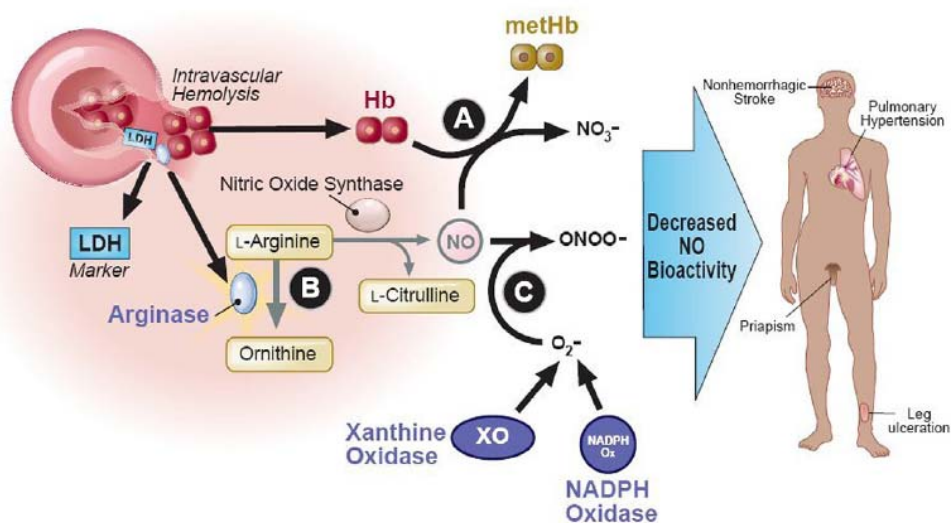


Figura 7. A hemólise intravascular reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico (Reproduzido de Kato *et al.*, 2007).

Pesquisas recentes propõem as seguintes terapias alternativas visando o aumento da produção de NO: a) inalação diária de NO nos pacientes falciformes que sofrem de hipertensão pulmonar; b) administração de HU em episódios de crise vaso-oclusiva (King em 2004 mostrou que a HU além de aumentar os níveis da HbF, melhora a biodisponibilidade do NO); c) suplementação oral de L-arginina. Entretanto, são propostos outros mecanismos e alvos terapêuticos para diminuir a destruição do NO como: a) alopurinol (droga que inibe a enzima xantina oxidase, reduzindo a geração de ERO e, assim, diminui o consumo de NO); b) estatinas (fármacos que inibem a hidroximetilglutaril CoA redutase – HMG-CoA redutase) que têm a propriedade de reprimir a expressão de inúmeras moléculas de adesão, beneficiando a vascularização tecidual; e c) citrato de sildenafil (droga que inibe a hidrólise do cGMP pela 5-fosfodiesterase), assim, amplificando a resposta do NO no endotélio vascular (Figura 8) (Machado *et al.*, 2005).

Esses mecanismos alternativos são promessas de novos alvos para intervenção terapêutica em pacientes falciformes que sofrem as conseqüências de possuírem redução da biodisponibilidade do NO no endotélio (Mack & Kato, 2006).

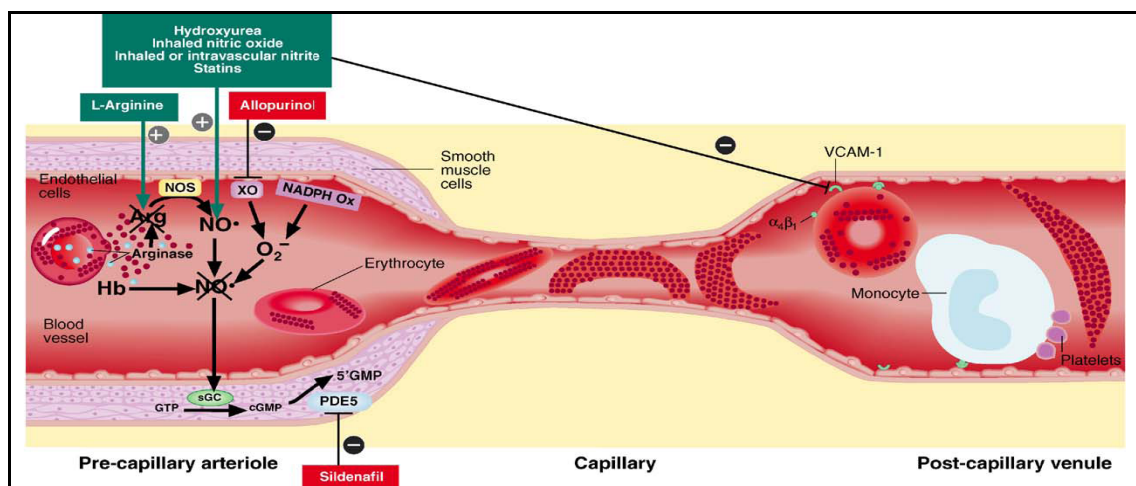


Figura 8. Novos alvos de investigação terapêutica propostos para os pacientes com Anemia Falciforme (Reproduzido de Mack & Kato, 2006).

1.12 Estresse Oxidativo

O oxigênio (O_2) é necessário para inúmeras formas de vida. Sua redução à água fornece a energia que permite a impressionante complexidade dos organismos superiores. Entretanto, a redução do oxigênio gera subprodutos altamente reativos, os quais podem ocasionar dano a proteínas, lipídios e ao DNA. Estes subprodutos são as espécies reativas de oxigênio (ERO) (Halliwell & Gutteridge, 2007). Este termo compreende radicais livres e outros compostos não radicalares. Radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (Figura 9) (Halliwell & Gutteridge, 2007). O termo ERO inclui não somente radicais de Oxigênio (como $O_2^{\bullet-}$ radical superóxido, OH^{\bullet} radical hidroxil, RO_2^{\bullet} , radical peroxil, RO^{\bullet} radical alcoxil) mas também abrange derivados de O_2 que podem atuar como oxidantes ou redutores (H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; HOCl, ácido hipocloroso, e O_3 , ozônio) (Halliwell & Gutteridge, 2007). As ERO são produzidas normalmente durante o metabolismo celular, onde estão envolvidas em reações de transferência de elétrons. Na respiração, a maior parte do oxigênio consumido é reduzido à água na mitocôndria, durante a passagem pela cadeia respiratória, possibilitando a síntese do ATP pela fosforilação oxidativa. No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A partir deste, uma série de reações ocorrem, gerando compostos como H_2O_2 e o radical hidroxila OH^{\bullet} , o mais reativo e danoso dos radicais formados (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Para proteger o organismo do ataque destas ERO existe uma série de sistemas de defesa antioxidante, como enzimas específicas que inativam algumas das ERO como a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), enzimas que controlam a disponibilidade de metais na célula, além de captadores não protéicos de radicais. Em paralelo, os organismos desenvolveram sistemas de regeneração e reparação de macromoléculas danificadas, especialmente o DNA, a fim de corrigir possíveis falhas ou sobrecargas nos mecanismos de defesa (Thomas *et al.*, 1998; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Quando ocorre um aumento das ERO e/ou uma diminuição da capacidade antioxidante, as ERO são capazes de lesar componentes celulares direta ou indiretamente, modificando sua estrutura e/ou função e gerando o **estresse oxidativo**. Diversos estudos têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio participam no mecanismo de instalação de várias doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes, esclerose múltipla, cirrose hepática e alguns tipos de câncer (Halliwell & Gutteridge, 2007).

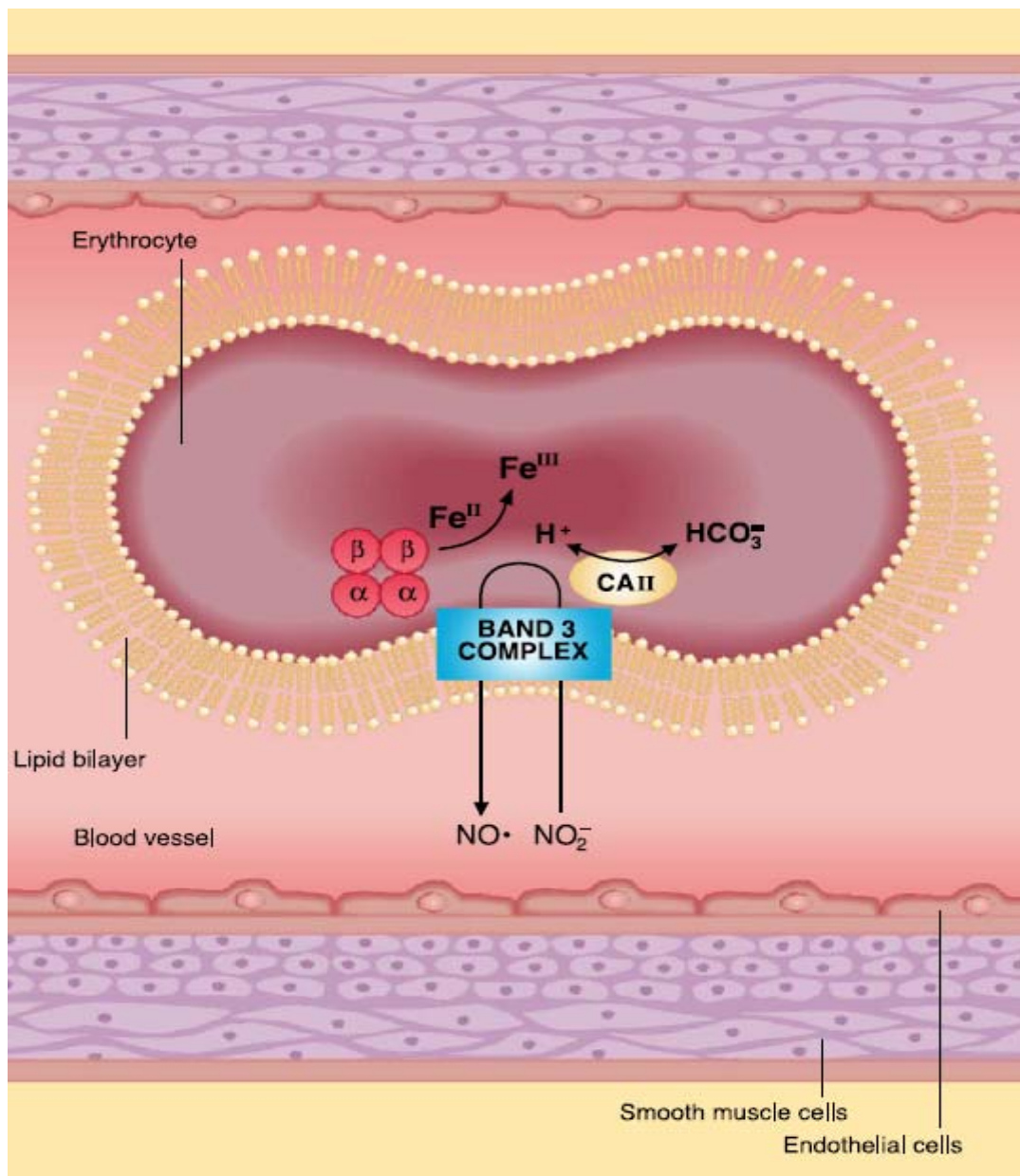


Figura 9. Geração de radicais livres na membrana eritrocitária (Reproduzido de Gladwin *et al.*, 2004).

1.12.1 Oxidação em eritrócitos

As ERO podem causar profundas lesões em eritrócitos, diminuindo seu período de vida útil, em especial nos pacientes com anemia falciforme e talassemias. Situações semelhantes ocorrem também na deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), bem como em oxidações adquiridas por ingestão de drogas oxidantes e inalação de poluentes oxidantes (Winterbourn, 1990; Nasserullah *et al.*, 2003). A suscetibilidade da hemoglobina oxigenada (Oxi-Hb) em se auto-oxidar está relacionada à capacidade de um elétron do ferro ligado ao grupo heme tornar-se desemparelhado. A molécula da hemoglobina, em especial a região não polar que contém o grupo heme, necessita que o ferro esteja no estado ferroso (Fe^{2+}) para que o mesmo exerça o transporte reversível do oxigênio. Qualquer modificação neste complexo químico que proteja o grupo heme pode permitir o acesso de pequenos íons ou moléculas de água, com deslocamento de elétrons do grupo heme e, conseqüentemente, dar origem à formação de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), desencadeando o processo de oxidação da hemoglobina (Naoum, 1996; Wagener *et al.*, 2001; Halliwell & Gutteridge, 2007).

No curso normal dos eventos biológicos que acontecem dentro do eritrócito, ocorre um discreto grau de autooxidação espontânea da hemoglobina (Das & Essman, 1990; Winterbourn, 1990) Esse processo é normalmente neutralizado pelas defesas antioxidantes da célula. Qualquer situação patológica que estimule o processo oxidativo da hemoglobina, ou que desequilibre as defesas antioxidantes, aumentará a geração de radicais livres no eritrócito (Figura 9) (Winterbourn, 1990). Entre estas situações, destaca-se a anemia falciforme, cuja susceptibilidade oxidativa se localiza nos hidroperóxidos da membrana das células falciformes, e as talassemias, principalmente, a talassemia beta, que por excesso de ferro circulante, além dos hemicromos ligados à membrana e dos complexos residuais de ferro intracelular, tornam as células eritrocitárias altamente sensíveis à oxidação (Vaughn *et al.*, 1987; Wagener *et al.*, 2001).

1.12.2 Defesas antioxidantes nos eritrócitos

Os eritrócitos são células que possuem sistemas enzimáticos bastante específicos, capazes de diminuir e neutralizar a reatividade dos radicais livres (Figura 10). Alguns sistemas estão localizados na membrana celular e no citoplasma eritrocitário, e também extracelularmente. Na autooxidação da hemoglobina, a enzima metahemoglobina redutase dependente de NADH reconverte a metahemoglobina para deoxihemoglobina; esta por sua vez retorna ao estado inicial de oxihemoglobina. O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) formado no desencadeamento da oxidação da hemoglobina para metahemoglobina sofre ação enzimática da superóxido dismutase (SOD) dismutando-a em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que possui reatividade limitada (Naoum, 1996). A redução do H_2O_2 à água (H_2O) é realizada por um ciclo contínuo mediado pela catalase e glutathione peroxidase. A manutenção dos níveis elevados da glutathione peroxidase (GPx) é essencial para proteger e manter no estado reduzido os grupos constituídos por compostos organosulfurados (grupo tiol) das enzimas celulares, bem como das proteínas intermembrana e do citoesqueleto. Além disso, a atividade de GPx é dependente da glutathione reduzida. A enzima glutathione redutase (GR) dependente de NADPH reconverte continuamente a glutathione oxidada (GSSG) para o estado reduzido. Cabe destacar que a glutathione reduzida além de ser um substrato para a GPx, também é o principal composto antioxidante intracelular. A catalase, por sua vez, tem atuação importante, pois decompõe H_2O_2 em H_2O . O tocoferol (vitamina E) é um dos mais importantes antioxidantes localizado na membrana eritrocitária, com a função de interromper o processo oxidativo e evitar a propagação da geração de radicais livres (Dailly *et al.*, 1998). Extracelularmente, o ácido ascórbico destaca-se entre os mais eficientes mecanismos biológicos com capacidade redutora, atuando sinergisticamente com o tocoferol, transferrina e ceruloplasmina. As defesas antioxidantes dos eritrócitos estão, portanto, relacionadas com o potencial oxidativo que atinge a célula e, normalmente, suas ações consistem em neutralizar a geração de radicais livres e restaurar as lesões de causa química (Naoum, 1996; Hallwell & Gutteridge, 2007). O radical superóxido gerado no processo de transformação da oxihemoglobina para

metahemoglobina, ao se ligar com Fe^{3+} proveniente da depleção do grupo heme promove uma reação com a liberação de Fe^{2+} . Este, por sua vez, ao se combinar com H_2O_2 desencadeia a Reação de Fenton, com a liberação do danoso radical hidroxila (OH^{\bullet}) (De Freitas & Meneghini, 2001; Halliwell & Gutteridge, 2007). Por esta razão, as células mantêm um rígido controle da homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado e a maioria destes está de alguma forma complexado a enzimas e proteínas, onde são armazenados, ou fazem parte da estrutura funcional das mesmas (Thomas *et al.*, 1998). Nesse processo, o Fe^{3+} participa de contínuas reações com o radical superóxido, causando estresse oxidativo e contribuindo para aumentar a rigidez da membrana eritrocitária, cujo potencial antioxidante depende principalmente da vitamina E e beta-caroteno (Shinar *et al.*, 1987; Naoum, 1996; Halliwell & Gutteridge, 2007).

As situações que desequilibram as ações antioxidantes do eritrócito podem ser devidas a um excesso proveniente do meio externo (poluição ambiental e drogas, ambas com potencial oxidante), ou por causas endógenas – no caso, as deficiências das enzimas antioxidantes: CAT, SOD e GPx. Além dessas alterações hereditárias bastante específicas, outras situações que envolvem um descontrole na síntese de metahemoglobina com aumento da sua concentração são capazes de causar constante estresse oxidativo, como são os casos das hemoglobinas instáveis, metahemoglobinopatias por HbM e metahemoglobinemias por deficiências das enzimas que compõem o sistema da metahemoglobina redutase (Shinar *et al.*, 1987; Naoum, 1996; Wagener *et al.*, 2001; Halliwell & Gutteridge, 2007).

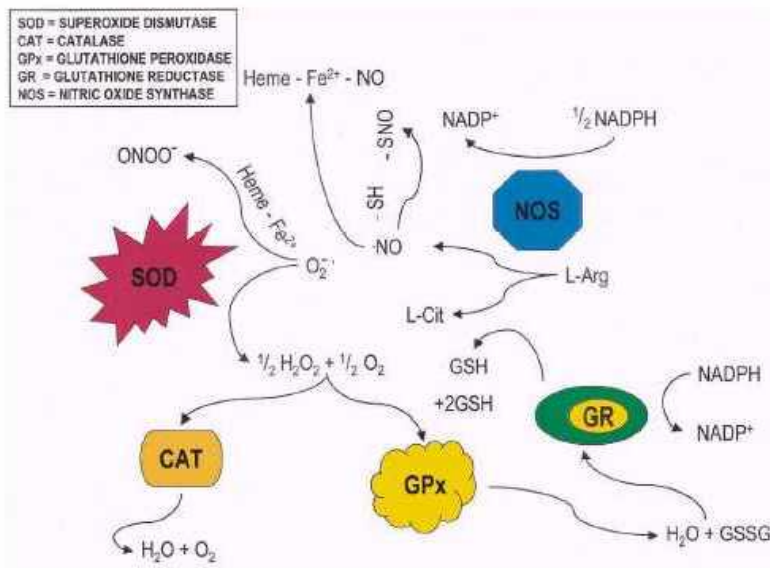


Figura 10. Principais enzimas antioxidantes capazes de neutralizar a ação dos radicais livres (Reproduzido de Mruk *et al.*, 2002).

1.12.3 Processo oxidativo na Anemia Falciforme

A AF é uma doença hereditária que se caracteriza por um quadro de anemia hemolítica. A causa básica dessa alteração se deve à presença da HbS em concentrações superiores a 90% do conteúdo total de hemoglobina nos eritrócitos. A HbS quando submetida à desoxigenação, se polimeriza alterando a morfologia eritrocitária, tornando-a no formato de foice (Naoum, 1996). Acredita-se que os eritrócitos falcizados estejam sob constante estresse oxidativo e, assim, liberem produtos de degradação da HbS (complexos de Fe^{2+} e Fe^{3+}), que atacam a membrana eritrocitária e catalisam a destruição de hidroperóxidos lipídicos com a formação de radicais alcóxil e peróxil (Becker *et al.*, 2004). A geração destes radicais amplia as lesões devido aos processos contínuos de novos ciclos de peroxidação lipídica, resultando na liberação de alcanos como o malondialdeído (MDA) e alquenos como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (Dailly *et al.*, 1998; Cesquini *et al.*, 2003). Dosagens destes produtos de peroxidação lipídica em eritrócitos falcizados confirmam esta hipótese. No entanto, avaliações mais recentes e precisas não são encontradas na literatura, apenas a sugestão de que ocorre estresse oxidativo nestas células. Medidas de dano em outros compostos celulares, além de lipídios, nunca foram

realizados e nem mesmo dosagens mais acuradas dos níveis de compostos antioxidantes, como glutathiona ou de enzimas antioxidantes.

O estresse oxidativo nos eritrócitos irreversivelmente falcizados se deve a vários fatores, tais como: produtos endógenos da peroxidação lipídica da própria membrana do eritrócito, a exposição a oxidações exógenas e, possivelmente, à falha dos mecanismos antioxidantes. Portanto, as lesões causadas pela geração de radicais livres na anemia falciforme dependem da proporção das células falciformes irreversíveis. Dados da literatura indicam que, quando esta proporção se situa entre 5 e 25% do total de eritrócitos, o nível de produtos oxidativos gerados da membrana (dano em lipídios) do eritrócito está aumentado, resultando em profundas modificações. Quando a proporção das células falciformes irreversíveis é menor que 5%, o estresse oxidativo é baixo com poucas conseqüências lesivas aos eritrócitos com HbS (Franck *et al.*, 1985; Das & Essman, 1990).

1.12.4 O óxido nítrico (NO) na Anemia Falciforme

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, portanto, possuindo um elétron desemparelhado. É moderadamente solúvel em água e sua meia vida varia de 3 a 60 segundos. O NO reage facilmente com oxigênio, radical superóxido ou metais de transição como ferro, cobalto, manganês ou cobre (Misra & Fridovich, 1972). Dependendo do meio em que se encontra, o NO pode atuar como oxidante ou redutor, sendo que a sua oxidação produz nitrito e nitrato. É citotóxico e vasodilatador, modula as reações inflamatórias e antiinflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo, inibe a agregação plaquetária e regula a função imunológica. O NO tem alta afinidade pelo heme, encontrado em proteínas intracelulares (óxido nítrico sintase, cicloxigenase e guanilato ciclase) e também liga-se em grupos –SH, formando tiol (Bonaventura *et al.*, 2002; Gladwin *et al.*, 2004).

O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sangüíneo. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células

endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*), levando à ativação da e-NOS presente nestas células e à conseqüente produção de NO. A e-NOS está estrategicamente ancorada à membrana da célula endotelial, o que favorece a presença de grandes quantidades de NO próximo à camada muscular do vaso e às células sangüíneas circulantes. Em resposta a agonistas como a bradicinina, ocorre a fosforilação da e-NOS, determinando sua translocação para o citosol. Este mecanismo provavelmente tem um papel na regulação da produção de NO *in situ* e na sua atividade biológica (Figura 11). O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas. No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase, acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa. A guanilato ciclase ativa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O sistema GCGMPc parece ter uma importância central para a ação fisiológica do NO. O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento desta célula. O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da entrada de Ca^{2+} para a célula, a inibição da liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e o aumento do seqüestro de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático. O mecanismo pelo qual o NO é removido da GC após ocorrer a vasodilatação necessária é desconhecido. Sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do NO da enzima guanilato ciclase (Gladwin *et al.*, 2004).

O NO que deixa a célula endotelial em direção à corrente sangüínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso ou nas hemácias (Figura 11). No interior das plaquetas, de modo análogo ao da célula muscular, o NO promove um aumento de GMPc e a conseqüente diminuição do Ca^{2+} livre. Como o Ca^{2+} é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo é inibido. As plaquetas

humanas possuem e-NOS e são também produtoras de NO. Tanto o NO oriundo das células endoteliais quanto o produzido endogenamente são importantes no controle da função plaquetária (Reiter *et al.*, 2002).

Se o NO penetra nas hemácias, ele é eliminado através de sua reação com o ferro da hemoglobina, tanto oxigenada (Hb-O₂) quanto desoxigenada (Reiter *et al.*, 2002).

- Hb-O₂ + NO → Metemoglobina (metHb) + NO₃⁻
- Hb + NO → Nitrosil-hemoglobina (NO-Hb)
- NO-Hb + O₂ → MetHb + NO₃⁻

Na AF, a polimerização da HbS gera uma desestabilização da membrana do eritrócito e a destruição prematura de 10% do total de eritrócitos por dia, que equivale a 30g/dia de hemoglobina descompartmentalizada. Aproximadamente, 30% de toda hemólise ocorre dentro dos vasos, e é suficiente para saturar o sistema de seqüestro da hemoglobina. Assim, a hemoglobina livre retém NO, diminuindo a sua biodisponibilidade e a vasodilatação (Reiter *et al.*, 2002). Trabalhos atuais propõem medidas alternativas para aumentar a disponibilidade do NO como a inalação diária do gás, terapias que aceleram oxidação ou que fazem seqüestro da hemoglobina livre e/ou suplementação com L-arginina (Reiter *et al.*, 2002).

Recentemente, o citrato de sildenafil mostrou-se eficaz para tratamento das crises de priapismo em doentes falciformes. A ação deste medicamento se dá pela inibição potente e seletiva da enzima fosfodiesterase tipo 5, que promove a degradação da GMPc. Assim, o citrato de sildenafil promove a manutenção de níveis elevados de GMPc, amplificando a resposta do NO no endotélio vascular, facilitando, assim, a saída do sangue do corpo cavernoso do pênis (Machado *et al.*, 2005).

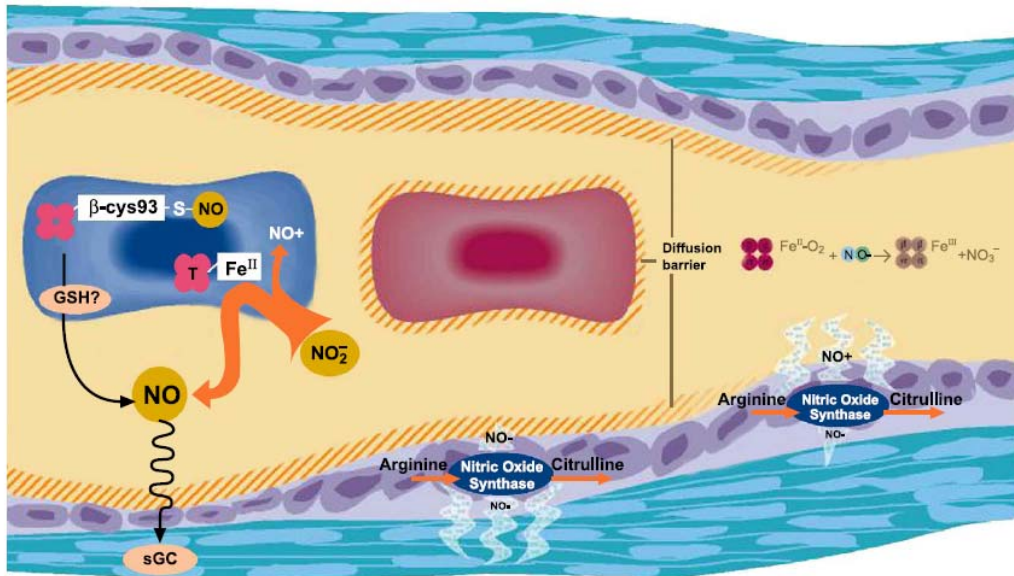


Figura 11. Mecanismo de ação do óxido nítrico (NO) no endotélio vascular (Reproduzido de Gladwin *et al.*, 2004).

1.13 Rotas metabólicas e G6PD

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é composta por um dímero ou tetrâmero de cadeias polipeptídicas idênticas, constituído por 515 aminoácidos e com peso molecular de 59.256 Da. Para a sua atividade, esta enzima requer NADP. A G6PD catalisa o primeiro passo na via das hexoses monofosfato. Ela oxida glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato, reduzindo NADP a NADPH. A via das hexoses monofosfato é a única fonte de NADPH nos eritrócitos e nos reticulócitos e ainda serve para produzir a ribose necessária para a síntese de nucleotídeos nas vias de salvação. A principal função desta via é proteger as células sanguíneas vermelhas contra o dano oxidativo. O NADPH é um cofator necessário em muitas reações de biossíntese, sendo utilizado na redução da glutationa. Esta, por sua vez, age como um seqüestrador de metabólitos oxidativos na célula, e é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (Yoshida & Beutler, 1986). Os eritrócitos são particularmente uma fonte rica em CAT, mas esta enzima é relativamente ineficiente em remover os níveis de peróxidos. Portanto, a G6PD é uma enzima que controla a atividade redutora da célula (Beutler, 1994; Nasserullah *et al.*, 2003).

A deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo e apresenta frequência relativamente alta em afro-americanos (13%) e populações do mediterrâneo (5 a 40%). Possui herança ligada ao X e seu locus está localizado na região telomérica do braço longo do cromossomo X, tendo como principal manifestação a anemia hemolítica. A hemólise pode ser desencadeada por infecções e por algumas drogas com propriedades oxidativas, como ácido acetil salicílico, vitamina K, cloranfenicol e antimaláricos (Tabela 5). A G6PD presente nos neutrófilos e eritrócitos é codificada pelo mesmo gene, localizado no cromossomo Xq28 e esta pode sofrer freqüentes mutações, tendo sido relatadas mais de 200 variantes (Beutler, 1994).

Níveis muito baixos de G6PD (abaixo de 5% do normal) nos neutrófilos, podem ser encontrados em algumas raras mutações, levando a falha no metabolismo oxidativo e conseqüente redução da atividade microbicida dependente de oxigênio dos fagócitos. Nesses casos raros, os pacientes com deficiência de G6PD tornam-se susceptíveis a infecções repetidas. Os locais mais afetados são pulmões, fígado, pele, trato gastrointestinal e linfonodos. A osteomielite quando presente requer uma resolução difícil. Foram relatadas também lesões nos olhos, incluindo córnea e retina. A morte normalmente resulta de infecções fúngicas, principalmente causadas por espécies de *Aspergillus* (Beutler, 1994; Nasserullah *et al.*, 2003)

Em pacientes com deficiência em G6PD, as bactérias são fagocitadas porém, não são destruídas. Desta forma, esses indivíduos tendem a desenvolver abscessos e granulomas crônicos que podem levar a complicações não infecciosas como hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, hipergamaglobulinemia, diarréia crônica e obstrução granulomatosa em certos órgãos, podendo ser fatais (Beutler, 1994). A maioria dos pacientes desenvolve os sinais e sintomas durante os dois primeiros anos de vida, entretanto, alguns deles manifestam ainda no período neonatal. A linfadenopatia está presente em quase todos os casos e geralmente é uma das primeiras manifestações da doença. Abscessos hepáticos e perihepáticos podem ser ocasionalmente os primeiros achados (Beutler, 1994; Nasserullah *et al.*, 2003). O diagnóstico é

estabelecido avaliando o nível de atividade da G6PD nos pacientes suspeitos (Beutler, 1994; Nasserullah *et al.*, 2003).

Tabela 5. Drogas e Químicos Associados com Hemólise em Indivíduos com Deficiência da G6PD, segundo Beutler, 1994.

Drogas	Associação Definitiva	Associação Possível*
Antimaláricos	Primaquina, Pamaquina e Pentaquina	Cloroquina
Sulfonamidas	Sulfonamida, Sulfanilamida Sulfacetamida Sulfapiridina Sulfametoxazol Tiazolesulfona Diafenilsulfona (DDS) Dapsona	Sulfametoxipiridazina Sulfadimidina
Nitrofuranos	Nitrofurantiona	
Analgésicos-Antipiréticos	Acetanilida	
Outros	Ácido Nalidixico Naftaleno Niridazol Fenilhidrazina Azul de Toluidina Trinitrotulento (TNT) Azul de Metileno Fenazolpiridina	Cloranfenicol Vitamina K análogas

*Causam hemólise significativa apenas quando administradas em doses terapêuticas elevadas ou quando ingeridas por indivíduos com variantes da classe I.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Traçar o perfil oxidativo e bioquímico de pacientes que apresentam anemia falciforme ou traço falciforme.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar índices hematimétricos (eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas) nos indivíduos normais (HbAA), heterozigotos (HbAS) e nos homozigotos para anemia falciforme (HbSS);
- Identificar ou não a mutação no gene da globina β através da reação da polimerase em cadeia (PCR) nos indivíduos citados acima;
- Medir a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos;
- Medir a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) nas hemácias dos indivíduos acima citados;
- Quantificar a glutathione total (GSH), principal composto antioxidante nas hemácias;
- Determinar o dano oxidativo em proteínas citosólicas tanto no plasma quanto no hemolisado celular dos indivíduos;
- Determinar o dano oxidativo em lipídios de membrana dos eritrócitos gerado pelo estresse oxidativo característico da patologia;
- Determinar os níveis de vitamina C no soro;
- Determinar os níveis séricos da proteína C-reativa ultra-sensível (CRP_{us});
- Determinar os níveis de ferro total no plasma;
- Determinar os níveis séricos de ferritina;
- Determinar os níveis séricos de transferrina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Foram coletadas 78 amostras de sangue total de indivíduos de ambos os sexos, origens étnicas distintas, provenientes de diversas regiões do estado do Rio Grande do Sul cadastrados no Centro de Apoio ao Portador de Anemia Falciforme (CAPAF/RS) e/ou no setor de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os participantes da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2) e foram submetidos a um questionário nutricional (ANEXO 3).

A análise das hemoglobinas dos pacientes foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), equipamento Variant[®] que utiliza o kit β -talassemia Short Program, da Bio-Rad[®] (Figuras 12 a 14) e análise molecular através da reação da polimerase em cadeia (PCR) (Figura 15). Desta forma, obtivemos 30 indivíduos normais (HbAA), 28 indivíduos traço falciforme (HbAS) e 20 pacientes com anemia falciforme (HbSS), sendo 24 homens e 54 mulheres com idade entre 20-40 anos. O perfil hemoglobínico dos indivíduos participantes do estudo encontram-se agrupados na tabela 6. Os indivíduos controle e os traço falciforme foram selecionados das mesmas famílias que os pacientes falciformes para diminuir a variabilidade genética e hábitos alimentares. Nenhum dos participantes era deficiente em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e os indivíduos normais eram saudáveis e não anêmicos. Estes também não apresentavam complicações médicas e não faziam uso de vitaminas e/ou suplementos minerais. Indivíduos fumantes, transfusionados e que sofreram crise hemolítica nos três meses que antecederam o estudo foram excluídos da amostragem.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) na reunião número 30, ata 51 de novembro de 2004, por estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

**** Beta Thal Short 00405-A ****
 DATE:05/11/01 TIME:10:44:21

TECH ID# 998
 VIAL# 22
 SAMPLE ID# 0000000000000000459

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	0.5	1.11	8925
P2	5.1	1.32	96016
P3	3.7	1.74	70235
Ao	87.6	2.56	1642248
A2	3.2	3.67	50596
TOTAL AREA			1868020
F	0.5%	A2	3.2%

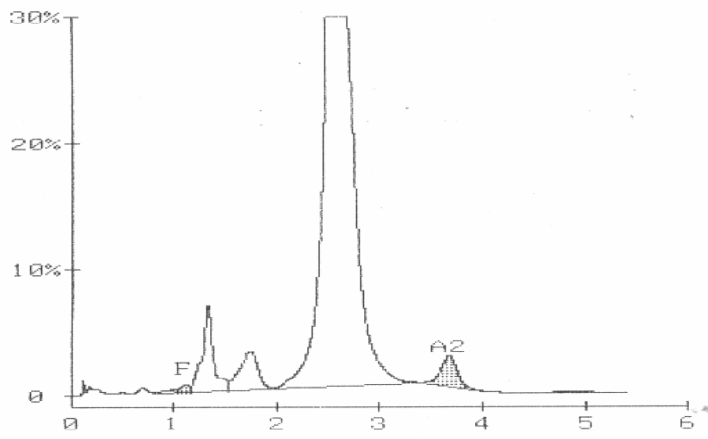


Figura 12. Cromatograma representativo de um indivíduo normal (HbAA), cujos valores das hemoglobinas estão expressos em % de acordo com a área de cada pico obtido.

**** Beta Thal Short 00405-A ****
 DATE:01/10/01 TIME:14:04:45

TECH ID# 998
 VIAL# 7
 SAMPLE ID# 0000000000000000322

ANALYTE ID	%	TIME	AREA
F	0.1	0.97	2874
P2	3.7	1.32	80085
P3	2.3	1.70	50129
Ao	51.8	2.54	1126156
A2	4.2	3.66	72877
S-WINDOW	38.2	4.54	829691
TOTAL AREA			2161812
F	0.1%	A2	4.2%

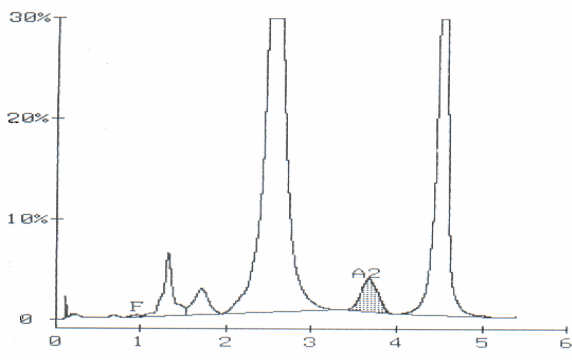


Figura 13. Cromatograma representativo de um indivíduo heterozigoto para anemia falciforme (HbAS), cujos valores das hemoglobinas estão expressos em % de acordo com a área de cada pico obtido.

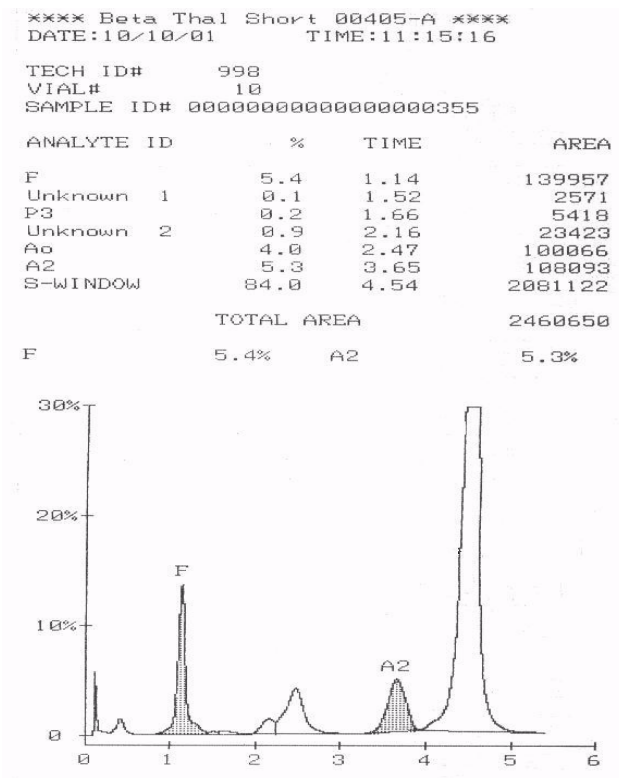


Figura 14. Cromatograma representativo de um doente falciforme (HbSS), cujos valores das hemoglobinas estão expressos em % de acordo com a área de cada pico obtido.

Tabela 6. Perfil hemoglobínico dos indivíduos participantes da pesquisa.

Hb (%)	n	A	A ₂	F	S
Grupos					
<i>HbAA</i>	30	96,56	2,77	0,66	-----
<i>HbAS</i>	28	56,10	4,2	0,33	39,26
<i>HbSS</i>	20	-----	3,91	11,60*	74,54

Os resultados representam a média percentual dos valores de hemoglobina obtidos por quantificação em HPLC. *Apenas três dos vinte pacientes falciformes fazem uso da hidroxiuréia, terapia que aumenta a síntese da hemoglobina fetal, deixando os valores falsamente elevados.

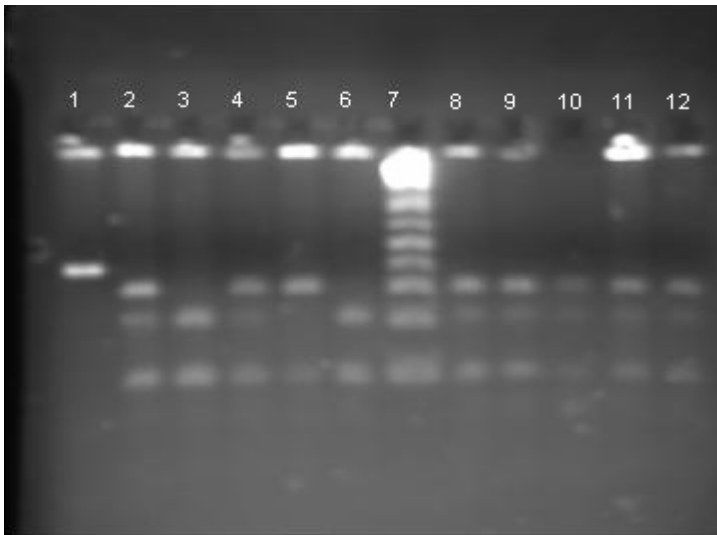


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, para visualização do resultado da digestão enzimática com a enzima *Dde I*. Todos os HbAS, HbSD, HbSC e HbSS identificados por HPLC tiveram a confirmação do seu perfil por técnica molecular. A mutação no códon 6 (GAG – GTG) elimina um sítio de restrição para a enzima *Dde I*, assim, após a digestão o alelo normal gera 3 fragmentos de 78pb, 201pb e 88pb, e o alelo mutante gera 2, um de 288pb e o outro de 87pb. As linhas 3 e 6 são HbAA, as linhas 2,8-12 são HbAS, a linha 5 é HbSS e a linha 4 é HbSD. A linha 1 é o produto do PCR não digerido.

3.2 Amostras Clínicas

O sangue periférico (10 mL) foi coletado por punção venosa realizada por profissionais capacitados, utilizando EDTA 5% e citrato 2% como anticoagulantes e tubo sem anticoagulante com gel separador. O tubo de vácuo foi imediatamente aberto após a coleta, para evitar o processo de falcização dos eritrócitos dentro dos tubos. O plasma foi removido após consecutivas centrifugações (10 min, 1500 rpm) e lavado com NaCl (0,9% p/v). Os eritrócitos foram resuspendidos em PBS (50 mM NaCl, 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4). Para a obtenção dos extratos, as hemácias foram lisadas utilizando etanol 2% (1:10).

3.3 Medida da atividade das enzimas antioxidantes

3.3.1 Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) nas hemácias foi determinada por método espectrofotométrico, em que se monitorou a decomposição do H₂O₂ a 240 nm (Pinto & Bartley, 1969; Taniguchi & Gutteridge, 2000).

3.3.2 Glutaciona Peroxidase (GPx)

A atividade da glutaciona peroxidase (GPx) nos eritrócitos foi determinada observando-se o decaimento do NADPH a 340 nm (Pinto & Bartley, 1969; Taniguchi & Gutteridge, 2000).

3.3.3 Superóxido Dismutase (SOD)

A medida da atividade da superóxido dismutase (SOD) nas hemácias foi determinada utilizando o Kit RANSOD[®] (RANDOX BRASIL Ltda). Este método emprega a xantina e xantina oxidase para gerar radicais superóxido os quais reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (INT) que forma o composto vermelho de formazan. A atividade da superóxido dismutase foi medida através do grau de inibição dessa reação a 505 nm.

3.4 Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

O ensaio OSMMR (Kit OSMMR 300 G6PD – R&D Diagnostics Ltda) utiliza a glicose-6-fosfato desidrogenase, a qual, na presença de NADP, catalisa a reação da glicose-6-fosfato para 6-fosfogliconato. O NADPH produzido é medido colorimetricamente em modo cinético a 340 nm (Beutler, 1994; Nasserullah *et al.*, 2003).

3.5 Ensaio da Glutaciona Total (GSH) – defesa não enzimática

A quantificação da glutaciona total (GSH) nas hemácias foi feita a 412 nm, observando o aparecimento de uma coloração amarela, produto da

oxidação do ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico (DTNB). O padrão contendo 1 mM GSSG e o branco foram medidos separadamente (Akerboom & Sies, 1981).

3.6 Quantificação da Vitamina C

A vitamina C foi quantificada por HPLC segundo o método descrito por Karatepe (2004). Após o soro ter sido desproteínizado com ácido perclórico 0,1M, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4500 rpm. O método analisa amostras aquosas contendo vitamina C, usando a coluna LC-18-DB e detecção espectrofotométrica (Chemical Laboratory LC – 10AD Shimadzu) a 250 nm. Os cromatogramas obtidos foram analisados pelo software EZChrom (Analysis System version 1.63). A fase móvel era composta por 82,5:17,5 (v/v) de fosfato de potássio monobásico 30 mM (pH 3,6) e metanol. O fluxo foi mantido a 1,2 mL/min e os cromatogramas foram monitorados a 250 nm. Foi traçada uma curva de calibração utilizando 2,5; 12,5 e 25 mM do padrão da vitamina C.

3.7 Avaliação de dano oxidativo em componentes celulares

3.7.1 Proteínas plasmáticas e do hemolisado celular

A presença do grupamento carbonil é um indicativo de oxidação. Às amostras de plasma e do hemolisado celular foram adicionadas 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e colocadas no gelo por 5 minutos. Após a centrifugação (5 min, 8000g), foi adicionado 1 mL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10mM em HCl 2M às amostras e 1 mL de HCl 2M nos tubos brancos e deixados por 90 min a 37°C. As proteínas foram dissolvidas em guanidina 6M e os interferentes foram removidos após lavagens com etanol-acetato de etila 1:1 (v/v). A medida do dano foi feita por leitura de absorvância a 370 nm (Bradford , 1976; Levine *et al.*, 1990; Levine, 2002).

3.7.2 Lipídios de membrana

Radicais livres liberados em reações oxidativas durante a peroxidação lipídica levam a formação de hidroperóxidos lipídicos que se decompõem em

vários produtos secundários, tais como: aldeídos, cetonas, etc. Dentre os aldeídos que podem ser formados está o malondialdeído (MDA). A sua quantificação foi feita por HPLC segundo o método descrito por Karatepe (2004). 600 μ L de ácido perclórico 0,1M foi adicionado às amostras de soro dos indivíduos com a finalidade de precipitar as proteínas e liberar o MDA a elas ligado. As amostras foram centrifugadas por 5 min a 4500 rpm e analisadas por HPLC. O método analisa amostras aquosas contendo MDA, usando a coluna LC-18-DB e detecção espectrofotométrica (Chemical Laboratory LC – 10AD Shimadzu) a 250 nm, pico de absorção máxima do ânion enolato livre do MDA. Os cromatogramas obtidos foram analisados pelo software EZChrom (Analysis System version 1.63). A fase móvel foi composta por 82,5:17,5 (v/v) de fosfato de potássio monobásico 30 mM (pH 3,6) em metanol. O fluxo foi mantido a 1,2 mL/min e os cromatogramas foram monitorados a 250 nm. A curva de calibração foi traçada a partir de uma solução estoque de MDA 10 mM (Esterbauer & Cheeseman, 1998).

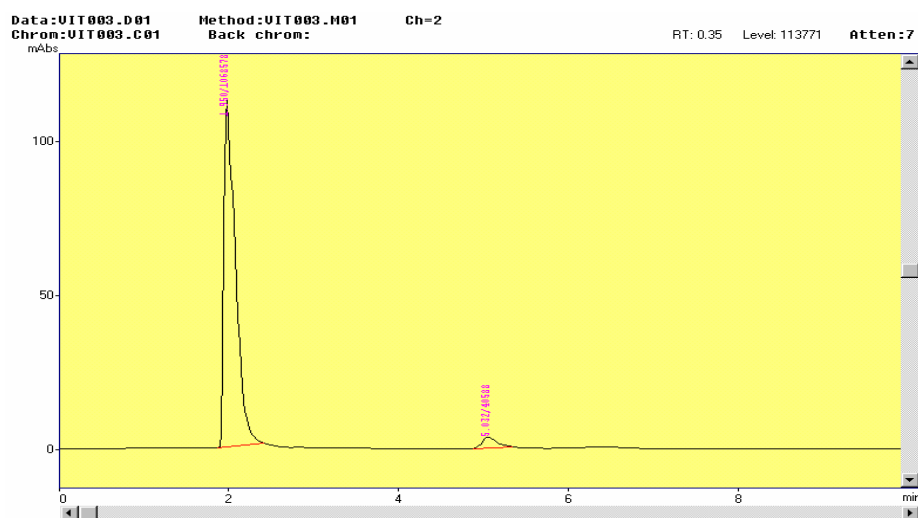


Figura 16. Cromatograma representativo da vitamina C e do MDA, respectivamente, de um doente falciforme (HbSS). Ao soro foi adicionado 0,6 mL de ácido perclórico 0,1M e após centrifugação (10 min, 4500 rpm), injetou-se 100 μ L no HPLC. Utilizou-se uma coluna LC-18-DB, cuja fase móvel era composta por 82,5:17,5 (v/v) de fosfato de potássio monobásico 30 mM e metanol (pH 3,6). O efluente foi monitorado a 250 nm, segundo método descrito por Karatepe, 2004. Os picos da vitamina C e do MDA eluem a 1,950 min e 5,032 min, e possuem uma área de 1068578 e 40588, respectivamente.

3.8 Índices Hematimétricos

Os hemogramas foram obtidos utilizando o equipamento ABX Micros 60[®] (ABX Diagnostics Ltda), em contador automatizado de células (método de impedância). O exame diferencial foi realizado através de extensão sangüínea com coloração de May Grunwald – Giensa e visualizado ao microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada mediante análise de 100 leucócitos.

3.9 Caracterização Molecular pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

O DNA foi extraído dos leucócitos dos pacientes, amplificado em PCR e cortado com enzima de restrição *Dde I*. A mutação no códon 6, elimina o sítio de restrição da enzima, assim, após a digestão o alelo normal gerou três fragmentos: 78pb, 201pb e 88pb e o alelo mutante gerou apenas dois, um de 288pb e outro de 87pb (Saiki *et al*, 1985; Saiki *et al*, 1988; Sutton *et al.*, 1989).

3.10 Ferro total

Para a dosagem de ferro total no plasma (200 μ L), adicionou-se o ácido nítrico 4% v/v (concentração final) com o objetivo de digerir a amostra. A digestão foi feita em chapa de aquecimento a 200°C, até que o volume se reduza a 1mL. O ferro é, então, liberado na sua forma livre. O conteúdo de ferro presente no plasma foi determinado em espectrofotômetro de absorção atômica /chama ar acetileno (Srinivasan *et al*, 2000; Doner & Ege, 2004).

3.11 Transferrina

A transferrina foi quantificada no soro por método imunoturbidimétrico, utilizando o Kit Transferrina Turbiquest[®] (Labtest Diagnóstica Ltda), sendo que os resultados foram expressos em mg/dL.

3.12 Ferritina

A dosagem da ferritina no soro foi realizada no aparelho Cobas Mira Plus (Roche[®]) segundo o protocolo do kit Ferritina Turbiquest[®] (Labtest Diagnóstica Ltda) utilizando a turbidimetria para quantificação final em ng/mL.

3.13 Proteína C reativa ultra-sensível (CRP_{us})

Para quantificação da CRP_{us} sérica foi utilizado o kit Biosys[®]. A técnica de imunoturbidimetria permitiu detectar uma concentração mínima de 0,05 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em mg/L.

3.14 Descarte do material biológico

O descarte do material biológico foi realizado segundo resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.15 Cálculos e Estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm desvio padrão e analisados utilizando-se o Teste ANOVA de uma via com posterior teste ad hoc. Foi utilizada a correlação de Pearson. Os resultados obtidos neste estudo foram analisados através do programa SPSS (versão 8.0 para Windows) em um computador PC compatível. Os valores foram considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO (ARTIGOS)

Artigo submetido

Annals of Hematology

Blood antioxidant parameters in sickle cell trait subjects and sickle cell anaemia patients

Manfredini Vanusa *², Lazzaretti Luísa L. *, Griebeler Isabel H. *, Santin Ana P.¹, Wagner Sandrine C.¹, Castro Simone S.¹, Peralba Maria C. R.³ and Benfato Mara S. *^{#2}

*Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Porto Alegre, Brazil

¹ Laboratório de Hematologia, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³ Departamento de Química Inorgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

#Address correspondence to:

Dr. Mara Silveira Benfato

Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves 9500 prédio 43431, Porto Alegre, RS, Brazil,
91501-970

Tel: (55-51) 33087603

Fax: (55-51) 33087003

E-mail mara.benfato@ufrgs.br

Running title: Blood antioxidant parameters in sickle cell anaemia

Abstract

Sickle cell anaemia (SCA) is a hereditary disorder with higher potential for oxidative damage due to chronic redox imbalance in red cells. We measured antioxidant defenses including catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), vitamin C, and total glutathione (GSH). We also determined oxidative damage of proteins in red blood cells (RBC) and plasma (carbonyl assay). We characterized the membrane damage in terms of lipid peroxidation by accumulation of malonaldehyde (MDA) by HPLC in 30 healthy controls, 28 sickle cell trait subjects and 20 SCA patients in steady-state condition. The data shows that sickle cell trait subjects had significant higher CAT levels than healthy controls. On the other hand, SCA patients had elevated levels of GPx and SOD. GSH was higher in SCA patients and sickle cell trait subjects than healthy controls. Carbonyl assay was noted in plasma but not in hemolysate. An enhanced production of MDA was observed in the serum of SCA patients. These results reinforce the idea that patients with SCA are subjected to chronic oxidative stress and show that sickle cell trait subjects have higher antioxidant defenses that are able to reduce oxidative damage in biological macromolecules such as proteins and lipids.

Keywords: Antioxidant systems - Oxidative damage - Sickle cell anaemia

Sickle cell trait subjects

Introduction

Sickle cell anaemia (SCA) was the first disease to be characterized at the molecular level [1]. The fault has since been found to be in the gene encoding the human β -globin subunit with the resulting replacement of $\beta 6$ glutamic acid by valine [2,3]. In a low-oxygen-tension environment, the replaced valine can bind to a complementary hydrophobic site on a β subunit of another hemoglobin tetramer in a polymerization process that leads to the sickling of the red blood cells. Polymerization of desoxygenated sickle hemoglobin (HbS) tetramers is central to the process of vaso-occlusions [4]. This event occurs when normally round red blood cells become sickle shaped and sticky under conditions of hypoxia, dehydration or acidosis. These cells clump inside large and small blood vessels, resulting in ischemia, pain and infarction [5,6]. As a result there is sludging of the sickle blood, vaso-occlusive crises, erythroid hyperplasia in the bone marrow, hemolysis and an increased intravascular hemolysis. The irreversibly sickled cells, characteristically seen in the peripheral smear, are red cells which have been postulated to have a membrane defect, since these cells leak potassium and hemoglobin and accumulated calcium. Because of these increased intravascular events, there may be greater utilization of defense systems [3,7].

The clinical manifestations of SCA are characterized by chronic hemolytic anemia, recurrent vaso-occlusive painful attacks, frequent bacterial infections, and, in some cases, eventual loss of organ function [8]. However, a marked clinical diversity exists in this disease. For instance, some sickle-cell patients have many vaso-occlusive crises and require frequent blood transfusion and hospitalizations while others seldom have complications. Although there is

little doubt that the molecular defect of SCA resides in the hemoglobin, additional or secondary factors may relate to membrane peroxidative damage and its effects on the pathophysiology of SCA [9].

Patients with SCA are subjected to increased oxidative stress [10,11], particularly during vaso-occlusive crises and acute chest pain [10,12,13]. Several aspects of the abnormalities in SCA are thought to result from the oxidative stress of RBC, white blood cells (WBC) and endothelial cells [14,15] and activation of platelets [16]. Oxidative stress represents the imbalance between enhanced generation of reactive oxygen species (ROS) and low cellular content of antioxidants [17,18]. While continuously subjected to oxidative stress in cellular environment, the red cell possesses various antioxidant systems for its protection. The major defense systems include those that scavenge free radicals such as glutathione, vitamin C, vitamin E and superoxide dismutase and that reduce hydroperoxides formed by glutathione peroxidase and catalase [19,20]. ROS can cause damage to biological macromolecules such as proteins, lipids and DNA [21,22,23]. The insaturated chain of membrane fatty acids can readily react with free radicals and undergo peroxidation. This process can become autocatalytic after initiation and yields lipid peroxides, lipid alcohols and aldehydic by-products, such as, 4-hydroxynonenal (4-HNE) and malondialdehyde (MDA) [21]. Peroxidative reactions have long been recognized as potential factors that contribute to degenerative cellular processes [24,25]. RBC are particularly susceptible to peroxidative damage because they contain hemoglobin, one of the most powerful catalysts for initiation of peroxidative reaction [24,25]. Oxidative damage has been shown to change a number of RBC membrane properties.

Increased membrane rigidity and decreased RBC deformability can be induced in vitro as a consequence of oxidant-induced cross-linking of spectrin [26,27]. Similar cross-linking of spectrin has been demonstrated to occur in vivo [28,29]. Oxidative damage can also alter membrane permeability and lead to hemolysis [27,30]. In addition, oxidative insult can result in immune recognition of RBC [31]. Other reactions of ROS with proteins result in the oxidation of various amino acid side chains, often leading to a loss of function [32]. The most widely studied markers of protein oxidation are protein carbonyl groups. Protein carbonyl groups are formed by oxidation of the side chains of lysine, proline, arginine, and threonine residues. In addition to the direct oxidation of protein side chains, carbonyl groups can be introduced into proteins by Michael addition reactions of 4HNE, a product of lipid peroxidation [33].

The purpose of our current study is to determine blood antioxidant parameters in healthy controls, sickle cell trait subjects and sickle cell anaemia patients, clinically stable. Our study can provide additional information concerning the antioxidant systems in these patients.

Materials and methods

Materials

All reagents were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), unless otherwise stated.

Subjects

Approval for utilizing human specimens was obtained from the Ethics Commission of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Informed consent was obtained from all patients and the controls.

Twenty SCA patients and twenty eight sickle cell trait subjects were identified and characterized by ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC) [34] of haemoglobins, molecular study by polymerase chain reaction amplification (PCR) to determination of the β -like globin gene [35-37] and by family history studies. All patients were not detectably deficient in red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Only patients who had not been transfused or in hemolytic crisis for at least 3 months prior to study and non smokers were selected. The 30 control subjects were healthy and not anemic. They had no underlying medical problems and did not take vitamin or mineral supplements. They were 24 males and 54 females with an age range of 20-40 years. Healthy controls and sickle cell trait subjects were selected to the same families` s SCA patients for decreased variability genetics and home diet.

Red blood cell separation

Blood samples were provided from Centro de Apoio ao Portador de Anemia Falciforme (CAPAF/RS). Blood was collected by vein puncture using an acid-citrate-dextrose vacutainer. The vacuum in the vacutainer was immediately broken after collection to avoid sickling of cells in the collection tubes. Plasma, platelets and the buffy coat were removed by consecutive centrifugations and washing in cold NaCl (0.9% w/v). The resulting red blood cells (RBC) were suspended in PBS (50 mM NaCl, 0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4). Hemolysates were obtained by lysing RBC with ethanol 2% (ratio 1:10) followed by centrifugation to obtain crude extracts. Plasma was used for protein carbonyl groups determination and serum was used for MDA and vitamin C determinations.

Enzyme Activities

Catalase activity was determined spectrophotometrically by monitoring the disappearance of H₂O₂ at 240 nm [38]. Glutathione peroxidase activity was determined by monitoring NADPH consumption rate at 340 nm [39]. Superoxide dismutase activity was determined using RANDOX[®] kit at 505 nm.

Assay of total glutathione

Crude extracts (1mL) were washed, suspended in 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) at a concentration of 10% (v/v) and mixed thoroughly with an equal volume of cold 10% trichloroacetic acid containing 4mM EDTA. After 10 min incubation the suspensions were centrifuged; 100 μ L aliquots of the supernatants of KOH-neutralized trichloroacetic acid extracts were added to cuvettes containing 1 mL of 100mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)

containing 1mM EDTA, 50 μ L 0.4% NADPH in 0.5% NaHCO₃, 20 μ L 0.15% 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) and 20 μ L of glutathione reductase solution (6 U/mL). The reaction rate, measured as an increase in absorbance at 412 nm, is proportional to the glutathione concentration [40].

Carbonyl Assay

Triplicate aliquots of plasma and hemolysate protein (0.8 mL) were added with 0.2 mL of 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged and 1 mL of either 2M HCl or 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2M HCl were added to the precipitates and incubated at 37°C for 90 min. The protein was then dissolved by addition of 6M of guanidine hydrochloride, dinitrophenylhydrazine excess was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1 (v/v). Quantification was performed using a spectrophotometer at an absorbance of 370 nm. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone of 21.000 M⁻¹ cm⁻¹. Values of carbonyl content for crude extracts are given in nmol/g hemoglobin [32].

Malondialdehyde (MDA) and vitamin C determination

MDA and vitamin C were measured by HPLC by the method described by Karatepe (2004). 25 mL of 0,1M perchloric acid and 55 mL of distilled water were added to a 20 mL aliquot portion of human serum. Addition of acid was necessary to precipitate proteins and release the malondialdehyde bound to the amino groups of proteins and other amino compounds. The samples then were centrifugated at 4500 rpm for 5 min and used for HPLC analysis. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-

methanol, the flow rate was 1.2 mL/min and the chromatograms were monitored at 250 nm [41].

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS software (version 8.0 for Windows). Results are expressed as means \pm SD, and they were analyzed by one-way ANOVA with the Tukey post hoc test. The results were transformed using log to MDA and $1/x^2$ to vitamin C. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Enzyme activities

Patients (see Table 1 for clinical details) diagnosed as homozygous for HbS, in steady state, who attended the Laboratory of Haematology, UFRGS, Brazil, were chosen to participate in the study. Patients were considered to be in steady state if they were afebrile, had not received blood transfusion nor experience any vaso-occlusive episode during the previous 3 months.

Table 1. Characteristics of healthy controls, sickle cell trait subjects and SCA patients.

Characteristic	<i>Hb AA</i>	<i>Hb AS</i>	<i>Hb SS</i>
n	30	28	20
Age (years)	27.95±11.60	32.5±6.92	24.7±6.15
Haemoglobin (g/dL)	12.85±1.54	12.48±1.15	8.1±1.61 *
Haematocrit (%)	38.59±3.99	37.51±3.61	23.22±4.48
Reticulocytes (K/mm ³)	1.08±0.55	1.16±0.62	7.9±1.90
Platelets (10 ³ /μL)	272±47.02	318±62.21	374±93.14
Total iron (mg/L)	1.6±0.27	0.9±0.22	3.4±0.46
Ferritin ng/mL	62±20.18	64±12.39	380±59.56
Transferrin (mg/dL)	276±26.05	253±56.47	216±46.11

Hb AA, healthy controls; Hb AS, sickle cell trait subjects and Hb SS, sickle cell anaemia patients. The present data are mean±SD. *Three of the 20 patients with SCA were taking hydroxyurea, a therapy that increases haemoglobin levels on average.

In erythrocytes, the following Pearson correlations (r) were highly significant ($P < 0.05$ in all cases) among some of the variables: reticulocytes and haematocrit correlated negatively ($r = -0.015$); SOD and GPx activity correlated positively ($r = 0.012$), and GPx and CAT activity correlated negatively ($r = -$

0.015). Data on the activity of catalase in RBC of healthy controls, sickle cell trait subjects and with sickle cell anaemia are shown in Fig 1. Erythrocytes from sickle cell trait subjects had significant higher CAT activity than healthy controls. On the other hand, GPx and SOD activities were significantly increased in SCA patients (Fig 2 and Fig 3).

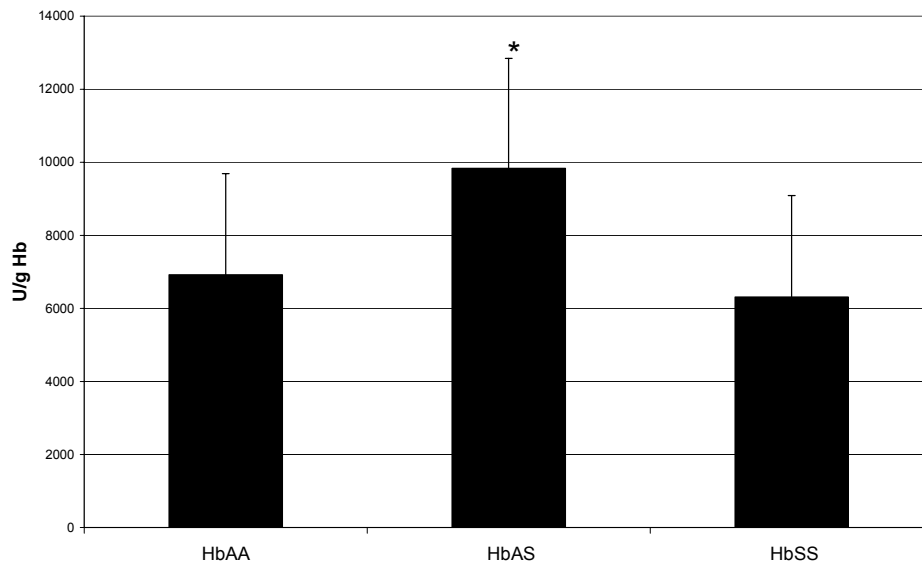


Fig 1. Activity of catalase (CAT) in red blood cells of healthy controls (HbAA), sickle cell trait subjects (HbAS) and sickle cell anaemia patients (HbSS). Catalase activity in crude extracts of RBC was determined spectrophotometrically by monitoring the disappearance of H_2O_2 at 240 nm as described in Materials and Methods. Results are expressed as the means \pm SD. * indicate different from $P < 0.05$.

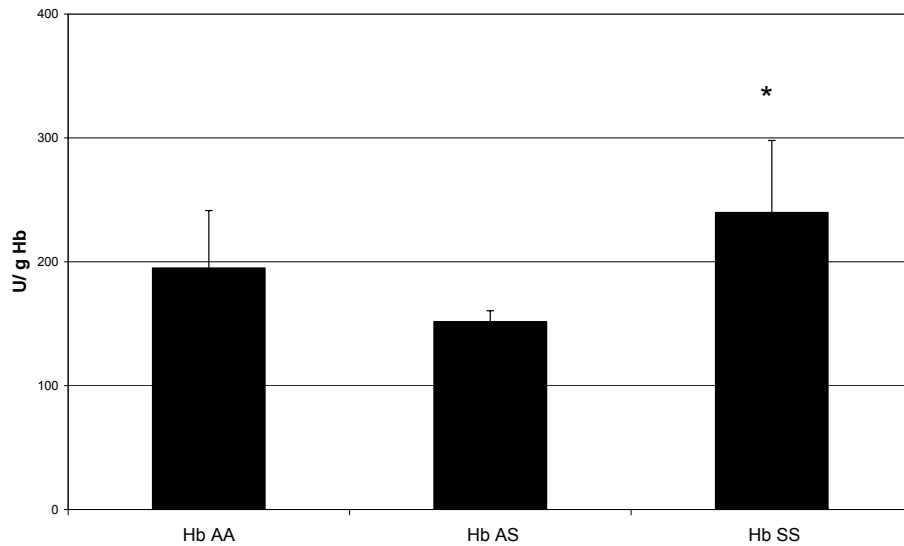


Fig 2. Activity of glutathione peroxidase (GPx) in red blood cells of healthy controls (HbAA), sickle cell trait subjects (HbAS) and sickle cell anaemia patients (HbSS). Glutathione peroxidase activity in crude extracts of RBC was determined by monitoring NADPH consumption rate at 340 nm. Data are expressed as the means \pm SD. * indicate different from $P < 0.05$.

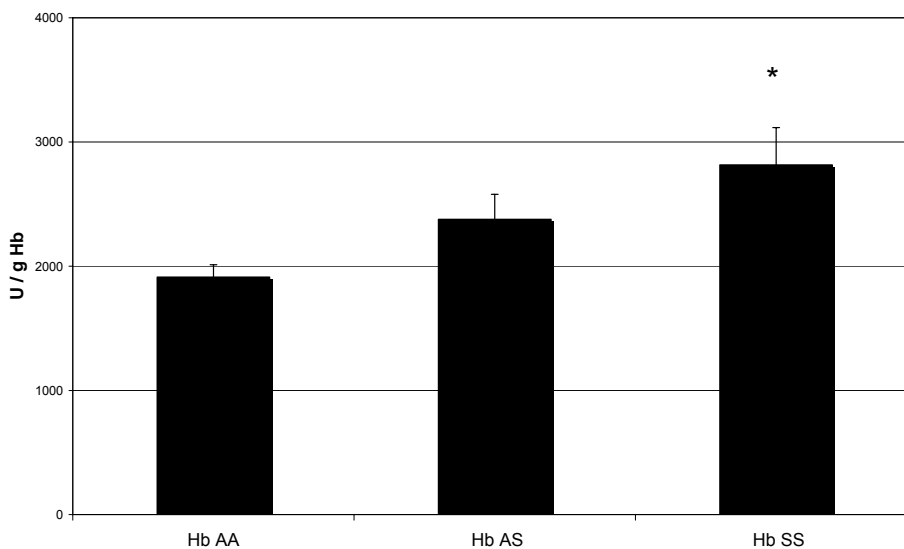


Fig 3. Activity of superoxide dismutase (SOD) in red blood cells of healthy controls (HbAA), sickle cell trait subjects (HbAS) and sickle cell anaemia patients (HbSS). Superoxide dismutase activity in crude extracts of RBC was determined using RANDOX[®] kit at 505 nm. Results are expressed as the means \pm SD. * indicate different from $P < 0.05$.

Assay of Total Glutathione

The glutathione concentration was higher in SCA patients and sickle cell trait subjects than healthy controls (Fig 4). Three groups of patients are statistically different which one.

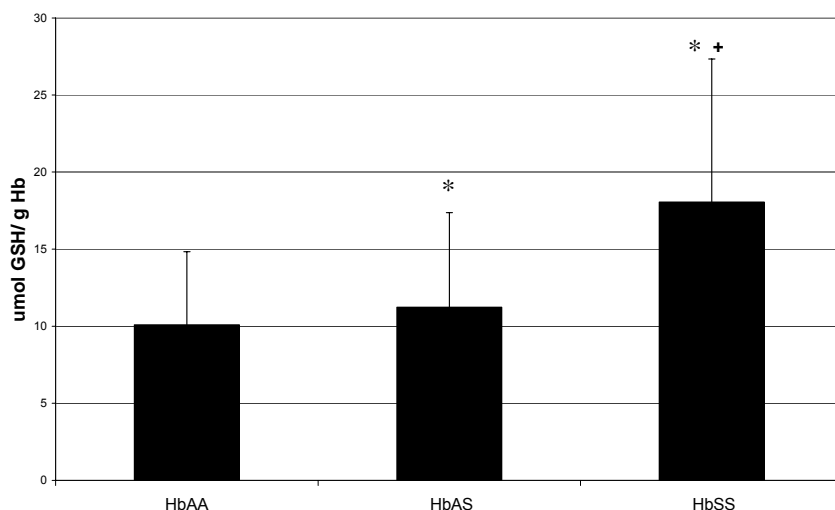


Fig 4. Total glutathione (GSH) in red blood cells of healthy controls (HbAA), sickle cell trait subjects (HbAS) and sickle cell anaemia patients (HbSS). Total glutathione concentration (reduced plus disulphide) was measured using 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) and glutathione reductase. The rate of 5.5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) reduction was recorded spectrophotometrically at 412 nm. Data are expressed as means \pm SD. * indicates difference from HbAA, $P < 0.05$; + difference from HbAS, $P < 0.05$.

Vitamin C determination

Vitamin C (ascorbic acid) is the most potent intra and extracellular antioxidant. The present study found that SCA patients had significant higher levels of serum ascorbic acid (Fig 6).

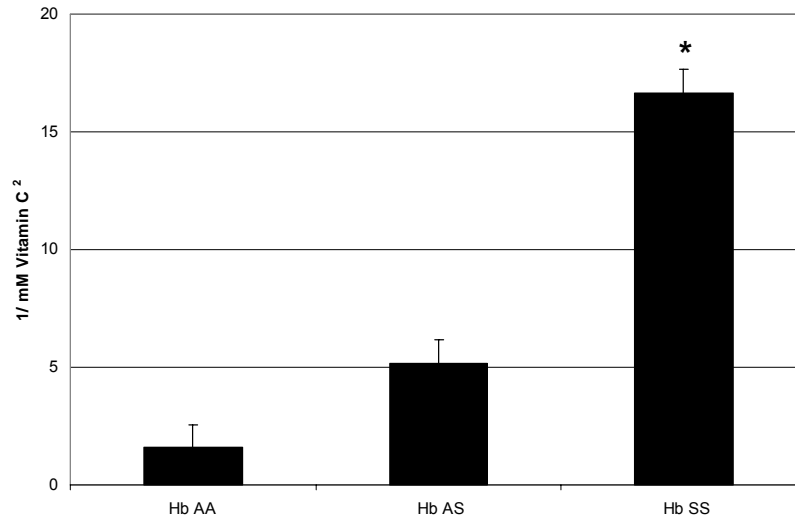


Fig 6. Levels of vitamin C in serum of healthy controls (HbAA), sickle cell trait subjects (HbAS) and sickle cell anaemia patients (HbSS). Vitamin C was measured by HPLC by the method described in Materials and Methods. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol, the flow rate was 1.2 mL/min and the chromatograms were monitored at 250 nm. These results were transformed using $1/x^2$ of the areas under the peaks. Data are expressed as means \pm SD. * indicate different from $P < 0.05$.

Carbonyl Assay

The carbonyl content of hemolysate and plasma proteins from RBCs are shown in Table 2. The level of protein oxidation indicates the extent of oxidative damage of proteins in plasma and not in hemolysate. The value is significantly higher in SCA patients than other groups.

Table 2. Carbonyl content of haemolysate and plasma in healthy controls, sickle cell trait subjects and SCA patients.

Groups	Carbonyl in haemolysate (nmol / g Hb)	Carbonyl in plasma (nmol / g Hb)
<i>HbAA</i>	1.52±0.12	2.63±0.60
<i>HbAS</i>	0.83±0.22	2.74±0.56
<i>HbSS</i>	1.07±0.11	3.87±0.33 *

* P<0.05

Malondialdehyde determination

The lipid peroxidation index was determined on the basis of MDA levels (Fig 5). The highest MDA levels were observed in SCA patients.

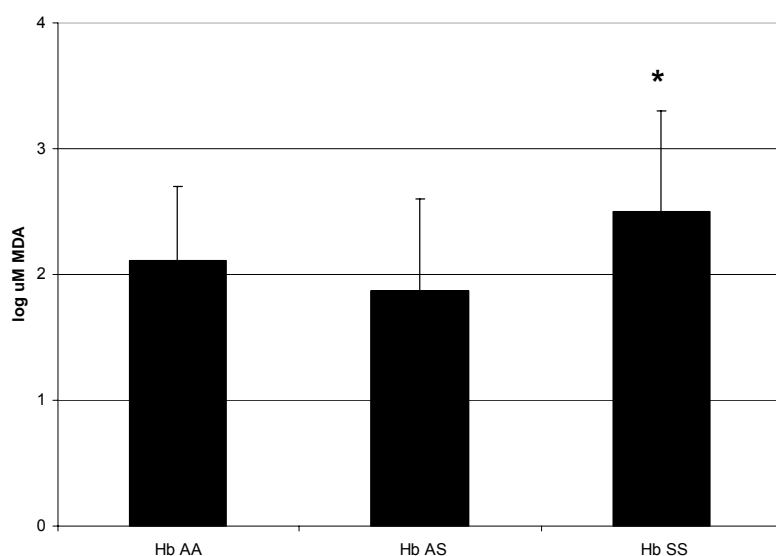


Fig 5. Levels of MDA in serum of healthy controls (HbAA), sickle cell trait subjects (HbAS) and sickle cell anaemia patients (HbSS). MDA was measured by HPLC by the method described in Materials and Methods. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol, the flow rate was 1.2 mL/min and the chromatograms were monitored at 250 nm. These results were transformed using log of the areas under the peaks. Data are expressed as means ±SD. * indicate different from P<0.05.

Discussion

The generation of reactive oxygen species (ROS) is a steady-state cellular event in respiring cells [18]. Their production can be grossly amplified in response to a variety of pathophysiological conditions such as inflammation, immunologic disorders, hypoxia, hyperoxia, metabolism of drug or alcohol, exposure to UV or therapeutic radiation, and deficiency in antioxidants enzymes. Uncontrolled production of ROS often leads to damage of cellular macromolecules (DNA, protein, and lipids). A number of major cellular defense mechanisms exist to neutralize and combat the damaging effects of these reactive substances. Enzymatic systems function to directly or sequentially remove ROS (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase), thereby terminating their activities [18,42]. Sickle cell anaemia (SCA) is a hereditary disorder with higher potential for oxidative damage due to chronic redox imbalance in red cells that often results in clinical manifestation of mild to severe hemolysis in patients with this genetic disorder [43].

It was shown that SCA produced greater quantities of $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and OH^{\cdot} than normal RBC [10,14]. SCA patients showed higher SOD activity (Fig 3). However, we did not observed increased activity of catalase in SCA (Fig 1). The normal low rate of production of H_2O_2 in RBC seems to be mainly dealt with GPx, but, catalase does make some contribution if the intracellular concentration of H_2O_2 is raised, when it becomes more important in removing H_2O_2 [44]. This makes sense in view of the high K_M of catalase for H_2O_2 ($\sim 10^7$ M s^{-1}) and its very high rate of H_2O_2 destruction when high H_2O_2 levels are present. In our study GPx activity was significantly increased in SCA patients

(Fig 2). Two others studies with SCA patients from USA shown also increased GPx activity [19, 45]. The major function of glutathione peroxidase may be the disposal of organic peroxides rather than removal of H_2O_2 . GPx may protect both membrane and hemoglobin from peroxidative damage [46,47].

Erythrocytes from sickle cell trait subjects had significant higher CAT activity than healthy controls. To our knowledge this is the first work measuring antioxidant enzymes in sickle cell trait subjects. Catalase regulates intracellular ROS levels by converting H_2O_2 to H_2O and O_2 in peroxisomes [48]. However, the mechanisms responsible for the regulation of catalase are largely unknown, particularly the effects of post-translational modifications [49,50]. Recent studies indicate that c-Abl and Arg (family of mammalian non-receptor tyrosine kinases) regulate catalase in mouse embryo fibroblasts and that this signaling pathway is important in the oxidative stress response [49,50]. Moreover, we must have in mind that transcripcional regulation does not occur in the erythrocytes, but must occur in the bone marrow cells from which all the cells in the circulating blood are derived. These results reinforce the idea that patients with SCA are subjected to chronic oxidative stress and indicate that sickle cell trait subjects suffer from different way of oxidative stress.

Non-enzymatic antioxidants are low-molecular-mass agents that scavenge free radicals. They are present in extra and intracellular fluids and some of them come from the diet. In this work we have determined total glutathione (GSH) and vitamin C levels in serum of healthy controls, sickle cell trait subjects and SCA patients. Glutathione is a tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine), an endogenous hydrophilic antioxidant that serves several essential functions within the cell. It is present intracellularly at millimolar

concentration ranges up to 10mM, with 95% present in the reduced sulfhydryl form and is the main non-protein thiol in aerobic species. GSH is an antioxidant and is implicated in many biological processes [43]. The role of intracellular GSH in the detoxification of xenobiotics and reactive oxygen species has been well established. Furthermore, it is a coenzyme for various enzymes such as glutathione peroxidase (GPx), which plays an essential protective role against oxidative stress [43]. Our results shown that SCA patients and sickle cell trait subjects have higher glutathione concentration than healthy controls (Fig 4). These result associated with the increase of catalase (Fig 1) suggests that the sickle cell trait subjects are under oxidative stress, but the antioxidant defenses are enough to prevent oxidative damage in macromolecules as evidenced for the lack of damage in lipids and proteins (Fig 5 and Table 2). On the other hand, vitamin C (ascorbic acid) is the most potent intra and extracellular antioxidant and come from the diet. It scavenges superoxide anion, hydroxyl and peroxy radicals, reacts with hypochlorite and singlet oxygen [43]. We found that SCA patients had significant higher levels of serum ascorbic acid than control values (Fig 6). This significant increase of vitamin C levels in the serum of SCA patients can be explained a time that they possess monthly nutritional accompaniment. Also a nutritional questionnaire was applied (data not shown) where it observed the high ingestion of foods rich in ascorbic acid was observed.

However, although the antioxidant defenses to be increased in the SCA patients, what it could minimize oxidative stress, in this work we observe that it has an increase of the oxidative damage in proteins and lipids of membrane.

The level of protein carbonyl groups, a measurement of the oxidative damage, was higher in plasma proteins than hemolysate (see Table 2). Alterations of protein structure by oxidants, which include modifications of amino acid side chain, covalent cross-linking, and non-enzymatic cleavage, may result in a partial or complete loss of protein functionality [51,52]. Among plasma proteins, blood fibrinogen undergoes free radical oxidation and is the most oxidizable plasma protein [53,54]. Amongst all the amino acids in this hexamer, 21.50% are capable to suffer oxidation and to be detected by the carbonyl method (see <http://srs.embl-heidelberg.de:8000/srs5/>). This adhesive plasma glycoprotein, a dimer composed of three pairs of non-identical polypeptide chains (α , β , γ), plays a central role in haemostasis, but only γ -chain may result in increased activation of plasminogen thereby contributing to fibrinolysis and proteolysis in areas of inflammation. In response to blood vessel injury, platelets initiate haemostasis by adhering and spreading over fibrinogen and/or extracellular matrix components readily exposed at the site of vascular damage. The adhesive event itself and/or the action of agonists then induce the platelet activation and aggregation [53,54,55]. When plasma is exposed to a radical-generating system, fibrinogen is much more susceptible to oxidative modification compared to other major plasma proteins: albumin, immunoglobulins, and transferrin. In many *in vivo* circumstances, such as inflammation and post-ischemic reperfusion, fibrinogen may undergo the attack of oxidants. The first biological outcome of oxidative changes to fibrinogen primary structure is the inhibition of thrombin-catalyzed clot formation. The introduction of carbonyls in fibrinogen polypeptidic chain was used as an early marker of the oxidative damage in Alzheimer's disease (AD) [55]. Oxidized

proteins accumulate in the AD brain at sites of neurodegeneration and are found in blood plasma of subjects with AD [55]. Another study showed that fibrinogen is the only oxidized protein present in human plasma of lung cancer patients and smokers [56]. In summary, our data indicate that only a relatively small percentage of plasma proteins are oxidized, but their oxidation levels are significantly higher in plasma from SCA subjects. The observation of these oxidized proteins in plasma suggests that these oxidized isoforms may be useful as diagnostic biomarkers for SCA.

RBC are particularly susceptible to peroxidative damage because they contain hemoglobin, one of the most powerful catalysts for initiation of peroxidative reaction [24,25]. In this work we found highest MDA levels in SCA patients (Fig 5).

Oxidative damage has been shown to change a number of RBC membrane properties. For, example, Hebbel and Miller [31] treated RBCs with malondialdehyde (MDA), a by-product of lipid peroxidation, and demonstrated that such cells were recognized and ingested by macrophages. An increased MDA level has been found in circulating sickle red cells [57]. In addition, oxidative damage to hemoglobin can induce band 3 clustering, which in turn leads to increased autologous immunoglobulin G (IgG) binding to the RBC [58]. Clustering of membrane proteins by Heinz bodies has been demonstrated in sickle red cells [59,60]. Moreover, Jain [61,62] has found that lipid peroxidation can cause externalization of phosphatidylserine (PS) in red cell membranes [63], Schroit and co-workers have found that PS exposure on the outer surface of RBC membrane is associated with enhanced phagocytosis of RBC by monocytes [64]. Abnormal exposure of PS on the cell surface can enhanced

complement activation, which could contribute to cell lysis and could also enhance blood coagulation [65], which may explain the hypercoagulability in sickle cell patients. These findings strongly support the notion that peroxidative damage to the red cell membrane can contribute to the pathophysiology of SCA [11,19,57].

Acknowledgements

The authors are deeply indebted to the many patients with sickle cell anaemia, trait and the control subjects who donated blood for these studies. The authors would also thank Carem Fortunato from CAPAF/RS for her extraordinary help in this research. This work was supported by grants from FAPERGS, CNPq and FNS (Brazilian agencies for research support). The authors also wish to thank Dr. C. R. Carlini for generously providing access the equipments.

References

1. Pauling L, Itano HA, Singer SR, et al (1949) Sickle-cell anemia, a molecular disease. *Science* 110, 543-548
2. Glover RE, Ivy ED, Orringer EP et al (1999) Detection of Nitrosyl Hemoglobin in Venous Blood in the Treatment of Sickle Cell Anemia with Hydroxyurea. *Mol Pharmacol* 53, 1006-1010
3. Steinberg MH (1994) Sickle cell anemia and fetal hemoglobin. *Am J Med Sci* 308, 259-265
4. Serjeant GR (1997) Sickle cell disease. *Lancet* 350, 725–730.
5. Beyer JE, Simmons LE (2004) Home Treatment of Pain for Children and Adolescents with Sickle Cell Disease. *Pain Management Nursing* 5, 126-135
6. Steinberg MH (2006) Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *TRENDS Pharmacol Sci* 27, 204-210
7. Wagener FADTG, Abraham NG, Kooyk YV, et al (2001) Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. *TRENDS Pharmacol Sc*, 22, 52-54
8. Steinberg MH (2005) Predicting clinical severity sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 129, 465-481
9. Pryor WW (1977) The involvement of radical reactions in aging and carcinogenesis. *Med Chem* 5, 331-358
10. Hebbel RP, Eaton JW, Balasingam M, Steinberg MH (1982) Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest* 70, 1253-1259
11. Rice-Evans C, Omorphos SC, Baysal E (1986) Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J* 237, 265-269

12. Klings ES, Christman BW, McClung J, Stucchi AF, McMahon L, et al (2001) Increased F₂ Isoprostanes in the Acute chest Syndrome of Sickle Cell Disease as a Marker of Oxidative Stress. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1248-1252
13. Klings ES, Farber HW (2001) Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respir Res* 2, 280-285
14. Repka T, Hebbel, RP (1991) Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood* 78, 2753-2758
15. Dhalla NS, Elmoselbi AB, Hata T, Makino N (2000) Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 47, 446-456
16. Ataga KI, Orringer EP (2003) Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med* 115, 721-728
17. Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E (2005) Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol* 132, 108-113
18. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Ed, Oxford University Press, NY
19. Chiu D, Lubin B (1979) Abnormal vitamin E and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 94, 542-548
20. Natta CL, Chen LC, Chow CK (1990) Selenium and Glutathione Peroxidase Levels in Sickle Cell Anemia. *Acta Haematol* 83, 130-132
21. Antunes F, Salvador A, Marinho HS, Alves R, Pinto RE (1996) Lipid peroxidation in mitochondrial inner membranes I. An integrative Kinetic model. *Free Radic Biol Med* 21, 917-943

22. Wiseman H, Halliwell B (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313, 17-28
23. Stadman ER, Berkett, BS (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10, 485-494
24. Chiu D, Lubin B, Shohet SB (1982) Peroxidative reactions in red cell biology. In: Pryor W, ed. *Free Radicals in Biology*. New York: Academic Press 5, 115-160
25. Chiu D, Claster S (1988) Measurement of red cell membrane oxidation and generation of oxidative intermediates. In: Shohet S, Mohandas N, eds. *Red cell membranes*. New York: Churchill Livingstone 203-235
26. Palek J, Liu SC (1979) Dependence of spectrin organization in red blood cell membranes on cell metabolism: implication for control red cell shape, deformability, and surface area. *Semin Hematol* 14, 75-93
27. Lubin B, Chiu, D (1982) Properties of vitamin E-deficient erythrocytes following peroxidant injury. *Pediatr Res* 16, 928-932
28. Johnson GJ, Allen DW, Cadman S, et al (1979) Red cell membrane polypeptide aggregates in glucose-6-phosphate dehydrogenase mutants with chronic hemolytic disease: a clue to the mechanism of hemolysis. *N Engl J Med* 301, 522-527
29. Snyder LM, Leb L, Piotrowski J, et al (1983) Irreversible spectrin-hemoglobin crosslinking in vivo: a marker for red cell senescence. *Br J Haematol* 53, 379-384
30. Dormandy TL (1971) The auto-oxidation of red cells (annotation). *Br J Haematol*, 20, 457-461

31. Hebbel RP, Miller WJ (1984) Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and determinants of hemolytic anemia. *Blood* 64, 733-741
32. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Alm B, Shaltie IS, Stadman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186, 464-478
33. Beal MF (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32, 797-803
34. Wilson JB, Headlee ME, Huisman TH (1983) A new high performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantification of various hemoglobin variants in adults and newborn babies. *J Lab Clin Med* 102, 174-186
35. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354
36. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermstable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-490
37. Sutton M, Bouhassira E, Nagel RL (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of the β -like gene cluster haplotypes. *Am J Hematolog*, 32, 66-69
38. Taniguchi N, Gutteridge JMC (2000) Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species. 1st Ed, Oxford University Press NY

39. Pinto RE, Bartley W (1969) Effect of age and sex on Glutathione reductase and Glutathione peroxidase activities and on aerobic Glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J* 112, 109-115
40. Akerboom TPM, Sies H (1981) Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77, 373–382
41. Karatepe M (2004) Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North Americ* 22, 362-365
42. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkmanhn HN (1996) Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen-peroxide within human erythrocytes. *Blood* 47, 1595-1599
43. Chan AC, Chow CK, Chiu D (1999) Interaction of Antioxidants and Their Implication in Genetic Anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 222, 274-282
44. Zimmermann CP, Natta, C (1981) Glutathione Peroxidase Activity in Whole Blood of Patients with Sickle Cell Anaemia. *Scand J Haematol* 26, 177-181
45. Dailly E, Urien S, Barré J, Reinert P, Tillement JP (1998) Role of Bilirubin in the Regulation of the Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Activity of Plasma in Sickle Cell Disease. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 303-306
46. Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, et al (2001) Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc. Natl Acad Sci USA* 98, 15215-15220
47. Cesquini M, Torsoni MA, Stoppa GR, Ogo SR (2003) t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57, 124-129

48. Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault ME, Moret R, et al (1991) The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 30, 9305-9313
49. Cao C, Leng Y, Liu X, Yi Y, Li P, Kufe D (2003) Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine Kinases. *Biochemistry* 42, 10348-10353
50. Cao C, Leng Y, Kufe D (2003) Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 278, 29667-29675
51. Levine RL (1983) Oxidative modification of glutamine synthetase 1. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 258, 11823-11827
52. Saha A, Adak S, Chowdhury S, Bhattacharyya M (2005) Enhanced oxygen releasing capacity and oxidative stress in diabetes mellitus and diabetes mellitus-associated cardiovascular disease: A comparative study. *Clin Chim Acta* 361, 141-149
53. Shacter E, Willians JA, Lim M, Levine RL (1994) Different susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med* 17, 429-437
54. Belisario MA, Domenico Di C, Pelagalli A, Morte Della R, Staiano N (1997) Metal-ion catalysed oxidation affects fibrinogen activity on aggregation and adhesion. *Biochimie* 79, 449-455
55. Choi J, Malakowsky CA, Talent JM, Conrad CC, Gracy RW (2002) Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1566-1577

56. Pignatelli B, Li C-Q, Boffetta P, Chen Q, et al (2001) Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res* 61, 778-784
57. Das SK, Nair RD (1980) Superoxide dismutase, glutathione peroxidative, catalase and lipid peroxidation of normal and sickle erythrocytes. *Br J Haematol* 44, 87-92
58. Low P, Waugh SM, Zinke K, et al (1985) The role of hemoglobin desnaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science* 227, 522-531
59. Lachant NA, Davidson WD, Tanaka KR (1983) Impaired Pentose Phosphate Shunt Function in Sickle Cell Disease: A Potential Mechanism for Increased Heinz Body Formation and Membrane Lipid Peroxidation. *Am J Hematology* 15, 1-13
60. Waugh SM, Willardson BM, Kannan R, et al (1985) Heinz bodies induce clustering of band 3, glycoporphin and ankyrin in sickle cell erythrocytes. *J Lab Clin Invest* 78, 1155-1160
61. Jain SK (1984) The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J Biol Chem* 259, 3391-3394
62. Jain SK (1985) In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. *J Clin Invest* 76, 281-286
63. Ren H, Ghebremeskel K, Okpala I, Ugochukwu CC, Crawford M, Ibegbulam O (2006) Abnormality of erythrocyte membrane n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in sickle cell haemoglobin C (HbSC) disease is not as remarkable as

in sickle cell anaemia (HbSS). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 74, 1-6

64. Schwartz S, Tanaka Y, Fidler ZY, et al (1985) Increased adherence of sickle and phosphatidylserine-enriched human erythrocytes to culture human peripheral blood monocytes. *J Clin Invest* 75, 1965-1972

65. Chiu D, Lubin B, Shoheit SB, et al (1981) Sickle erythrocytes accelerate clotting in vitro: an effect of abnormal membrane lipid asymmetry. *Blood* 58, 398-401

Artigo submetido

Cell Biology International

Short communication

**Serum concentrations of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in
Steady-State Sickle Cell Patients**

Vanusa Manfredini ^a, Diogo Poletto ^b, Luísa Lauermann

Lazzaretti ^a, Isabel Heinzmann

Griebeler ^a, Sandrine Comparsi Wagner ^b, Simone Martins Castro ^c, Simone

Rossetto ^b, Mara da Silveira Benfato ^{a*}

^a Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ^b Centro Universitário Feevale , Novo Hamburgo, Brazil, ^c Laboratório de Hematologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

CORRESPONDENCE SHOULD BE ADDRESSED TO:

*Dr. Mara da Silveira Benfato

Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves 9500 prédio 43431, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: 55 51 3316-7603

Fax: 55 51 3316-7003

E-mail: mara.benfato@ufrgs.br

Abstract

Sickle Cell Disease (SCD) is characterized by a haemolytic anaemia and vascular occlusion phenomena, which trigger painful crisis and tissue and organic lesion. C-reactive Protein (CRP) is a sensitive systemic indication of inflammation and tissue damage. More specifically, serum CRP is regarded as an important marker for risk of atherothrombotic events since the elevated level of high sensitive CRP is associated with cardiovascular events. The concentrations of hsCRP were determined using immunoturbidometry kit in 30 healthy controls, 28 sickle cell trait subjects and 20 SCD patients in steady-state condition. The present study has shown that the value of hsCRP is significantly higher in SCD patients (7.33 ± 6.50) when compared healthy controls (0.58 ± 0.69). The data suggest that patients with SCD showed a high inflammatory response in steady-state even when they were not in crisis and it can be associated with increased risk of cardiovascular events.

Keywords: High sensitivity C-reactive protein; Sickle cell disease; Inflammatory marker

1. Introduction

Sickle Cell Disease (SCD) was the first disease to be characterized on the molecular level (Pauling et al., 1949). The fault has been found to be on the gene encoding the human β -globin subunit with the resulting replacement of $\beta 6$ glutamic acid by valine (Steinberg, 1994). In a low-oxygen-tension environment, the valine replacement can bind to a complementary hydrophobic site on a β subunit of another haemoglobin tetramer in a polymerization process that leads to the sickling of the red blood cells. Polymerization of deoxygenated sickle haemoglobin (HbS) tetramers is central to the process of vaso-occlusions (Steinberg, 1994; Steiberg and Brugnara, 2003). SCD is characterized by a haemolytic anaemia and vascular occlusion phenomena, which trigger painful crisis and tissue and organic lesion. C-reactive protein (CRP) is an acute phase protein, which is synthesized in the liver and released after an inflammatory process or tissue injury (Black et al., 2004). In addition, a large amount of data indicated that CRP is a sensitive marker of underlying systemic inflammation, are increased among men and women at risk for future cardiovascular events. The development of robust assay of superior sensitivity compared to those for basic CRP measurement has allowed for the distinction patients who have low levels of inflammation. These high-sensitivity CRP (hsCRP) assays have led to increasing use of this protein in the study of the inflammation nature of many chronic diseases including atherosclerosis (Ridker, 2004). The purpose of our current study is to determine serum concentrations of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in healthy controls (HbAA), sickle cell trait subjects (HbAS) and SCD patients (HbSS), clinically stable, not in haemolytic crisis. Our study can

provide additional information concerning the cardiovascular risk in these patients.

2. Materials and methods

2.1 Blood collection and analytical methods

Approval for utilizing human specimens was obtained from the Ethics Commission of the *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*. Informed consent was obtained from all patients and the controls. All the subjects – 30 healthy controls (HbAA), 28 sickle cell trait (HbAS) and 20 sickle cell patients (HbSS) – were identified and characterized by ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC) (Wilson, 1983) of haemoglobins and by family history studies. All patients were not detectably deficient in red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Only patients who had not been transfused or in haemolytic crisis for at least 3 months prior to study and not smoking were selected. The control subjects were healthy and not anaemic. They had no underlying medical problems and did not take vitamin or mineral supplements. Healthy controls and sickle cell trait subjects were selected to the same families' SCD patients for decreased variability *genetics and home diet*.

Blood samples were providing from Centro de Apoio ao Portador de anemia Falciforme (CAPAF/RS). Ten millilitre of whole blood was collected for serum hsCRP concentration. Serum samples were stored at -80°C prior to assay. The concentrations of hsCRP were determined using immunoturbidometry at Biosys[®] Kit as per the manufacturer's instructions and

blinded to the clinical information. The assay is reported to have a minimum detectable concentration of 0.05 mg/L. The concentrations of ferritin and transferrin were determined using immunoturbidometry at Labtest[®] Kit.

2.2 Measurement of total iron

Aliquots of plasma (200 μ L) were resuspended in 1mL of 4% ultrapure nitric acid and heated at 200°C for 18 h. After complete digestion, 1mL was diluted to 10mL in metal free water and subjected to analysis using an inductively coupled plasma atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer 3300) (Doner and Ege, 2004).

2.3 Statistics

All statistical analyses were performed using SPSS software (version 8.0 for Windows). Results of clinical parameters are expressed as mean \pm SD and serum concentrations of hsCRP were analyzed by Kruskal-Wallis test with the Mann-Whitney post hoc test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

Patients (see Table 1 for clinical details) diagnosed as homozygous for HbS, in steady state, and who attended the Laboratory of Haematology, UFRGS, Brazil, have participated in the study. Patients were considered to be in steady state if they were afebrile, had not received blood transfusion nor experienced any vaso-occlusive episode during the prior 3 months. The serum

concentrations of hsCRP in patients are shown in Table 2. The level of hsCRP indicates the extent inflammatory process in SCD patients (7.33 ± 6.50). The value is significantly higher in SCD patients than in controls (0.58 ± 0.69).

4. Discussion

C-reactive protein (CRP) is a phylogenetically highly conserved plasma protein, with homologs in vertebrates and many invertebrates that participate in the systemic response to inflammation. CRP is a pattern recognition molecule, binding to specific molecular configurations that are typically exposed during cell death or found on the surfaces of pathogens. Its rapid increase in synthesis within hours after tissue injury or infection suggests that it contributes to host defence and that it is part of the innate immune response (Black et al., 2004).

CRP is a sensitive systemic indication of inflammation and tissue damage. More specifically, serum CRP is regarded as an important marker for risk of atherothrombotic events since the elevated level of high sensitive CRP is associated with cardiovascular events (Danesh et al., 2004). A large body of studies suggested that CRP is involved in many processes of atherogenesis including endothelial cell dysfunction, mononuclear cell adhesion, foam cell formation, smooth muscle cell migration, proliferation and formation of the fibrous cap (Jialal et al., 2004). Recently, an association between minor CRP elevation and future major cardiovascular events has been recognized, leading to the recommendation by the Centres for Disease Control and the American Heart Association that patients at intermediate risk of coronary heart disease might benefit from measurement of CRP (Danesh et al., 2004; Jialal et al., 2004).

The present study found that the value of hsCRP is significantly higher in SCD patients than in other groups (see table 2). In SCD, deoxygenation of intra-erythrocytic haemoglobin S leads to haemoglobin polymerization (increasing blood viscosity), erythrocyte rigidity, haemolysis, and microvascular occlusion. Ischemia-reperfusion injury, plasma haemoglobin-mediated nitric oxide (NO) consumption, and free radical generation activate systemic inflammatory responses; therefore, SCD is well recognized as a chronic inflammatory disease (Jison et al., 2004). Recent studies suggest that patients with SCD suffer from decreased NO reserves. NO is an inorganic and colourless free radical gas containing seven electrons from nitrogen and eight from oxygen and one unpaired electron. At the moment, NO constitutes one of the most important mediators of intra and extra cellular processes. This radical is produced from the L-arginine involves a reaction mediated by constitutive and inducible NO synthase. NO is involved in the vascular relaxing and it protects the blood vessels (Gladwin et al., 2004; Halliwell and Gutteridge, 2007; Reiter et al., 2002). Blood plasma levels of L-arginine (the precursor to NO) are depressed in patients with SCD particularly during vaso-occlusive crisis and the acute chest syndrome, and these levels vary inversely with pain symptoms. Furthermore, NO dependent blood flow is impaired in patients with SCD (Belhassen et al., 2001; Marck and Kato, 2006). Decreased NO reserves produce vasoconstriction, platelet activation, leukocyte adhesion and oxygen free radical generation that can contribute to muscle infarction (Belhassen et al., 2001; Das and Nair, 1980; Reiter et al., 2002).

Our data shows that SCD patients were under an inflammatory process in steady-state even when they were not in crisis. Inflammation, manifested by

elevated serum of CRP is associated with increased risk of cardiovascular events. HsCRP is a reliable predictor of atherosclerosis-related events because both local and systemic inflammations have been found to be highly correlated with arterial plaque development.

5. Acknowledgements

The authors are deeply indebted to the many patients with sickle cell anaemia, trait and the control subjects who donated blood for these studies. The authors would also thank Carem Fortunato from CAPAF/RS for her extraordinary help in this research. This work was supported by grants from FAPERGS, CNPq and FNS (Brazilian agencies for research support).

6. References

- Belhassen L, Pelle G, Sediame S, Bachir D, Carville C, Bucherer C. et al. Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress-mediated vasodilation. *Blood* 2001; 97: 1584–1589.
- Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 1387–1397.
- Das SK, Nair RC. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *Br J Haematol* 1980; 44: 87-92.
- Doner G, Ege A. Evaluation of digestion procedures of the determination of iron and zinc in biscuits by flame atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* 2004; 520: 217–222.
- Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP. The biochemistry of nitric oxide, nitrite and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 707-717.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Ed, Oxford University Press, NY, 2007.
- Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* 2004; 44: 6–11.
- Jison ML, Munson PJ, Barb JJ, Suffredini AF, Talwar S, Logun C, Raghavachari N, Beigel JH, Shelhamer JH, Danner RL, Gladwin MT. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood* 2004; 104: 270–280.

Marck AK, Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *Int J Biochem & Cell Biol* 2006; 38: 1237-1243.

Pauling L, Itano HA, Singer SR, et al. Sickle-cell anemia, a molecular disease. *Science* 1949; 110: 543-548.

Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free haemoglobin limits nitric oxide bioavailability in Sickle-cell disease. *Nat Med* 2002; 8: 1383-1389.

Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. *Am Heart J* 2004; 148: 19-26.

Steinberg MH. Sickle cell anaemia and fetal hemoglobin. *Am J Med Sci* 1994; 308: 259-265.

Steinberg MH, Brugnara C. Pathophysiological-Based Approaches to Treatment of Sickle Cell Disease. *Annu Rev Med* 2003; 54: 89-112.

Black S, Kushmer I, Saloms D. C-reactive protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 48487-48490.

Wilson JB, Headlee ME, Huisman TH. A new high performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantification of various haemoglobin variants in adults and newborn babies. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 174-186.

Table 1. Clinical parameters of healthy controls, sickle cell trait subjects and SCD patients.

Characteristic	<i>Hb AA</i>	<i>Hb AS</i>	<i>Hb SS</i>
n	30	28	20
Age (years)	27.95±11.60	32.5±6.92	24.7±6.15
Haemoglobin (g/dL)	12.85±1.54	12.48±1.15	8.1±1.61 *
Haematocrit (%)	38.59±3.99	37.51±3.61	23.22±4.48
Reticulocytes (K/mm ³)	1.08±0.55	1.16±0.62	7.9±1.90
Platelets (10 ³ /μL)	272±47.02	318±62.21	374±93.14
Total iron (mg/L)	1.6±0.27	0.9±0.22	3.4±0.46
Ferritin ng/mL	62±20.18	64±12.39	380±59.56
Transferrin (mg/dL)	276±26.05	253±56.47	216±46.11

Hb AA, healthy controls; Hb AS, sickle cell trait subjects and Hb SS, sickle cell disease patients. The present data are mean±SD. *Three of the 20 patients with SCD were taking hydroxyurea, a therapy that increases haemoglobin levels on average.

Table 2. Serum concentrations of high sensitivity C-reactive protein (mg/L) in healthy controls, sickle cell trait subjects and SCD patients.

Groups	n	Median	Mean \pm SD	W	P-value
<i>Hb AA</i> ^a	30	0.23	0.58 \pm 0.69	807.0 ^(a,b)	>0.05 ^(a,b)
<i>Hb AS</i> ^b	28	0.26	0.77 \pm 1.06	488.0 ^(a,c)	<0.05 ^{(a,c)*}
<i>Hb SS</i> ^c	20	4.96	7.33 \pm 6.50	439.0 ^(b,c)	<0.05 ^{(b,c)*}

(a): Hb AA - healthy controls; (b): Hb AS - sickle cell trait subjects and (c): Hb SS - sickle cell disease patients.

* Values of P<0.05 were considered statistically significant.

5. CONCLUSÕES

- As hemoglobinas variantes dos indivíduos traço falciforme (n=28) e doentes falciformes (n=30) identificadas e quantificadas por HPLC foram confirmadas por técnica molecular (PCR);
- Nenhum dos participantes da pesquisa mostrou-se deficiente em G6PD;
- Os HbAS tem atividade da CAT significativamente elevada em relação aos demais grupos;
- Por outro lado, os HbSS possuem atividade significativamente elevada da GPx e SOD;
- Os níveis de GSH total encontram-se elevados nos doentes falciformes (HbSS), seguido dos traço falciforme (HbAS) e indivíduos normais (HbAA) respectivamente;
- Os HbSS possuem níveis significativamente elevados de vitamina C;
- Foi encontrado elevado nível de oxidação ($P < 0,05$) nas proteínas plasmáticas dos HbSS em relação aos demais grupos, mas não nas do hemolisado celular;
- Os níveis de MDA estão significativamente aumentados nos HbSS em relação aos demais grupos;
- A medida sérica da CRPus mostrou-se aumentada ($P < 0,05$) tanto nos traço falciforme quanto nos doentes falciformes, mesmo estes não estando em crise hemolítica.

6. PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectivas os itens citados abaixo:

1. Avaliar o dano oxidativo no DNA dos indivíduos traço falciforme (HbAS) e pacientes falciformes (HbSS) através da medida do 7,8-diidro-8-oxo-2'-deoxiguanina por HPLC;
2. Realizar estudos dos haplótipos da cadeia da globina β utilizando a reação da polimerase em cadeia (PCR) e posterior digestão enzimática;
3. Quantificar a hepcidina no soro dos indivíduos traço falciforme (HbAS) e pacientes falciformes (HbSS) por ensaio imunoenzimático (EIE). A hepcidina é peptídeo sintetizado no fígado que controla a homeostase do ferro e seu gene é regulado por anemia, hipóxia e inflamação, situações que ocorrem na anemia falciforme;
4. Verificar possível efeito genotóxico (sangue) e mutagênico (medula óssea) administrando doses padronizadas de hidroxiúria em camundongos transgênicos através dos testes micronúcleo e cometa, respectivamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ablij HC, Meinders AE (2002). C-reactive protein: history and revival. *European Journal of Internal Medicine*, 13: 412-422.

Agrawal A (2005). CRP After 2004. *Molecular Immunology*, 42: 927-930.

Akerboom TPM, Sies H (1981). Assay of Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology*, 77: 373-382.

Antonarakis SE, Kazazian Jr HH, Orkin SH (1985). DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. *Human Genetics*, 69: 1-14.

ANVISA (2002). *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes*, 1 ed. Brasília.

Azevedo ES (1980). Subgroup studies of back admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. *Annals of Human Genetics*, 44: 55-60.

Balkaran B, Char G, Moirris JS, Thomas PW, Serjeant BE, Serjeant GR (1992). Stroke in a cohort on patients with homozygous sickle cell disease. *Journal of Pediatrics*, 120: 360-366.

Ballas SK (2002). Sickle cell anaemia: progress in pathogenesis and treatment. *Drugs*, 62: 1143-1172.

Ballou SPI (1992) C-Reactive protein and the acute phase response. *Advanced of Internal Medicine*, 37: 313-316.

Bandeira FM, Leal MC, Souza RR, Furtado VC, Gomes YM, Marques NM (1999). Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina S

detectados através da triagem em sangue de cordão umbilical. *Journal of Pediatrics*, 75: 167-171.

Bandeira FMGC et al (2002). Hidroxiuréia com pacientes com síndromes falciformes acompanhados em hospital Hemope, Recife-PE. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia*, 26: 189-194.

Baum KF, Dunn DT, Maude GH, Serjeant GR (1987). The painful crises of homozygous sickle cell disease. A study of risk factors. *Archives of Internal Medicine*, 147: 1231-1234.

Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H (2004). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology*, 34: 163-189.

Bencaiova G, Krafft A, Zimmermann R (2005). Is the sickle cell trait a risk factor in patients with type 2 diabetes mellitus? *European Journal of Internal Medicine*, 16: 462-462.

Bencaiova G, Krafft A, Breymann CH (2006). Sickle cell trait and urinary tract infection in pregnancy. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 92: 128-129.

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

Bonaventura C, Godette G, Ferruzzi G, Tesh S, Stevens RD, Henkens R (2002). Responses of normal and sickle cell hemoglobin in S-nitrosocysteine: implications of therapeutic applications of NO in treatment of Sickle Cell Disease. *Biophysical Chemistry*, 98: 165-181.

Bortolini MC, Salzano FM (1999). β^S Haplotype diversity in Afro-Americans, Africanos and Euro-Asiatics an attempt at a synthesis. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 51: 175-180.

Bradford M (1976). A Rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brugnara C (2003). Sickle cell disease: From membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 25: 927-933.

Bunn FH (1997). Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 337: 762-769.

Campbell M, Henthron JS, Davies SC (1999). Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. *Clinical Chemistry*, 45: 969-975.

Cesquini M, Torsoni MA, Stoppa GR, Ogo SH (2003). t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57: 124-129.

Clos, D, Terry W (2000). Function of C-reactive protein. *Annals of Medicine*, 4: 274-278.

Compri MB, Polimeno NC, Stella MB, Ramalho AS (1996). Programa comunitário de hemoglobinopatias hereditárias em população estudantil brasileira. *Revista de Saúde Pública*, 30: 187-195.

Covas DT, Lucena AI, Vianna BPP, Zago MA (2004). Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica*, 89: 273-280.

Dailly E, Urien S, Barré J, Reinert P, Tillement JP (1998). Role of Bilirubin in the Regulation of the Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Activity of Plasma in Sickle Cell Disease. *Biochemical and Biophysical Communications*, 248: 303-306.

Das DK, Essman WB (1990). Oxygen radicals systemic events and disease processes. Karges Publ. Basel, 196p.

Daudt LE, Zechmaister D, Portal L, Neto EC, Silla LMR, Giugliani R (2002). Triagem Neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Caderno de Saúde Pública*, 18: 833-841.

De Freitas JM, Meneghini R (2001). Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutation Research*, 475: 153-159.

Di Nuzzo VVP, Fonseca SF (2004). Anemia falciforme e infecções. *Journal of Pediatrics*, 80: 347-357.

Doner G, Ege A (2004). Evaluation of digestion procedures of the determination of iron and zinc in biscuits by flame atomic absorption spectrometry. *Analitical Chimica Acta*, 520: 217-222.

Drew C, Ball V, Robinson H, Ellory JC, Gibson JS (2004). Oxygen sensitivity of red cell membrane transporters revisited. *Bioelectrochemistry*, 62: 153-158.

Dreyer ZE (1995). Initial Approach to the Child Who Presents With Sickle Cell Disease and Fever. *Seminars Pediatric Infectious Diseases*, 6: 232-236.

Eaton W (2003). Linus Pauling and sickle cell disease. *Biophysical Chemistry*, 100: 109-116.

Eaton W, Hofrichter J (1987). Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. *Blood*, 70: 1245-1266.

Eaton W, Hofrichter J (1990). Sickle cell hemoglobin polimerization. *Advances in Protein Chemistry*, 40: 263-269.

Eckman JR (1996). Leg ulcers in sickle cell disease. *Hematology/ Oncology Clinics of North America*, 10: 1321-1332.

Emond AM, Holman R, Hayes RJ, Serjeant GR (1980). Priapism and impotence in homozygous sickle cell disease. *Archives of Internal Medicine*, 140: 1434-1437.

Esterbauer H, Cheeseman KH (1998). Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186: 407-431.

Falk RH, Hood WB (1982). The heart in sickle cell anemia. *Archives of Internal Medicine*, 142: 1680-1684.

Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB (1993). The population genetics of haemoglobinopathies. *Baillieres Clinical Haematology*, 6: 215-262.

Franck PFH, Bevers EM, Ludin B (1985). Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 75:183-190.

Frenette PS, Atweh GF (2007). Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The Journal of Clinical Investigation*, 117: 850-858.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376.

Gaffney JW, Bierman FZ, Donnelly CM et al (1988). Cardiovascular adaptations to transfusion/ chelation therapy of homozygote sickle cell anemia. *American Journal of Cardiology*, 62: 121-125.

Gaston MH, et al (1986). Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. *New England Journal of Medicine*, 314: 1593-1596.

Gibson JS, Ellory JC (2002). Membrane Transport in Sickle Cell Disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 28: 303-314.

Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP (2004). The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 36: 707-717.

Goldberg MF (1971). Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, 71: 649-655.

Gómez-Chiari M, Puigbert JT, Aramburu JO (2003). Depranocytosis: experiência de um centro. *Anales de Pediatría*, 58: 95-99.

Granfortuna J, Zamkoff K, Urrutia E (1986). Acute renal infarction in sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 23: 59-64, 1986.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Ed, Oxford University Press, NY.

Halsey C, Roberts IAG (2003). The role of hydroxyurea in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 120: 177-186.

Herrick JB (1910). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Archives of Internal Medicine*, 6: 517-521.

Hillery CA, Ming CD, Winfred CW, Scott IP (2000). Hydroxyurea therapy decreases the *in vitro* adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. *British Journal of Haematology*, 109: 322-327.

Horiuchi K, Ballas SK, Asakura T (1988). The effect of desoxygenation rate on the formation of irreversibly sickled cells. *Blood*, 71: 46-51.

Iñiguez ED, López MAC, Julian MEC, García PG (2003). Detección precoz neonatal de anemia falciforme y otras hemoglobinopatías en la comunidad autónoma de Madrid – Estudio piloto. *Anales de Pediatría*, 58: 146-155.

Jacob E, Miaskowski C, Savedra M, beber JE, Treadwell M, Styles L (2006). Changes in Sleep, Food Intake, and Activity Levels During Acute Painful Episodes in Children with Sickle Cell Disease. *Journal of Pediatric Nursing*, 21: 23-34.

James H, Nahavandi M, Wyche M-Q, Taylro RE (2006). Quantitative analysis of trimethylsilyl derivative of hydroxyurea in plasma by chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 831: 42-47.

Joutovsky A, Hadzi-Nesic J, Nardi NA (2004). HPLC retention time as a diagnostic tool for hemoglobin variants and hemoglobinopathies. A study of 6000 samples in a clinical diagnostic laboratory. *Clinical Chemistry*, 50: 1736-1747.

Kan YW, Dozy AM (1980). Evolution of the hemoglobin S and C genes in world populations. *Science* 209: 388-391.

Karatepe M (2004). Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North America*, 22: 362-365.

Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH (2007). Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews*, 21: 37-47.

King SB (2004). Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radicals Biology and Medicine*, 37: 737-744.

Koc A, Gumuruk F, Gurgey A (2005). The effect of hydroxyurea on the coagulation system in sickle cell anemia and beta-thalassemia intermedia

patients: a preliminary study. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 20: 429-434.

Koshy M, Dorn L (1996). Continuing care for adult patients with sickle cell disease. *Hematology/ Oncology Clinics of North America*, 10: 1265-1273.

Kumar S, Bandyopadhyay U (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*, 157: 175-188.

Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-Walter HG, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber SM, Weder T (2002). Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 12: 365-372.

Lavelle DE (2004). The molecular mechanism of fetal hemoglobin reactivation. *Seminars in Hematology*, 4: 3-10.

Levine RL (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32: 790-796.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Alm B, Shaltiel S, Stadman ER (1990). Damage to proteins and lipids tissues under oxidative stress. *Methods in Enzymology*, 186: 464-478.

Lindsay J, Meshel JC, Patterson RH (1974). The cardiovascular manifestations of sickle cell disease. *Archives of Internal Medicine*, 133: 63-651.

Machado RF, Martyr S, Kato GJ et al (2005). Sildenafil therapy in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *British Journal of Haematology*, 130: 445-453.

Mack AK, Kato GJ (2006). Sickle Cell Disease and nitric oxide: A paradigm shift? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38: 1237-1243.

Misra HP, Fridovich I (1972). Superoxide dismutase activity. *Journal Biological Chemistry*, 247: 3170-3175.

Morris CR, Kuypers FA, Larkin S, Vichinsky EP, Styles LA (2000). Patterns of arginine and nitric oxide in patients with sickle cell disease with vaso-occlusive crisis and acute chest syndrome. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 22: 515-520.

Morris CR, Vichinsky EP, Machado L et al (2003). Hydroxyurea and arginine therapy: impact on nitric oxide production in sickle cell disease. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 25: 629-634.

Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X et al (2005). Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *The Journal of the American Medical Association*, 29: 81-90.

Mruk DD, Silvestrini B, Mo M, Cheng Y (2002). Antioxidant superoxide dismutase – a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65: 305-311.

Muirhead H, Cox JM, Mazzarella L, Perutz MF (1967). Structure and function of haemoglobin: III. A three-dimensional fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 28: 117-150.

Nagel RL, Ranney, HM (1990). Genetic epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. *Seminars in hematology*, 27: 342-359.

Nahavandi M, Tavakkoli F, Hasan SP, Wyche MQ, Castro O (2004). Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 34: 143-148.

Naoum PC (1996). Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 18: 75-81.

Naoum PC (1997). *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo: Sarvier.

Naoum PC (2000). Interferentes Eritrocitários e Ambientais na Anemia Falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 22: 05-22.

Naoum PC, Alvarez F, Domingos CRB, Ferrari F, Moreira HW, Sampaio ZA, Maziero PA, Castilho EM (1987). Hemoglobinas anormais no Brasil. Prevalência e distribuição geográfica. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, 23: 68-79.

Nasserullah Z, Alshammari A, Al Abbas M, Abu-Khamsseen Y, Qadri M, Jafer M, Wabel MA (2003). Regional experience with newborn screening for sickle cell disease, other hemoglobinopathies and G6PD deficiency. *Annals of Saudi Medicine*, 23: 354-357.

Neto GC, Pitombeira MS (2003). Molecular aspects for sickle cell anemia. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39: 51-56.

Neto GC, Pintomeira MS, Vieira HF, Vieira MLC, Farias DAB (2005). Análise dos haplótipos do gene da β^S -globina no Ceará. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 41: 315-321.

Nolan VG, Wyszynski DF, Farrer LA, Steinberg MH (2005). Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood*, 106:3264-3267.

Ohene-Frempong K (1991). Stroke in sickle cell disease: demographic, clinical, and therapeutic considerations. *Seminars in Hematology*, 28: 213-219.

Okpala I (2004). The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red disorder. *Blood Reviews*, 18: 65-73.

Okpala I, Thomas V, Westerdale N, Jegede T, Raj K, Daley S, Costello-Binger H, Mullen J, Rochester-Peart C, Helps S, Tulloch E, Akpala M, Dick M, Bewley

S, Davies M, Abbs I (2002). The comprehensiveness care of sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, 68: 157-162.

Ou C, Rognervd CL (2001). Diagnosis the hemoglobinopathies: electrophoresis vs HPLC. *Clinical Chemistry Acta*, 313: 187-194.

Pace BS, Zein S (2006). Understanding mechanism of γ -Globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. *Developmental Dynamics*, 235: 1727-1737.

Pauling L, Itano HA, Singer SR, Wells IC (1949). Sickle-cell anemia, a molecular disease. *Science*, 110: 543-548.

Perutz MF (1968). Preparation of Haemoglobin crystals. *Journal of Crystal Growth*, 2: 54-56.

Perutz MF (1972). Molecular pathology of human haemoglobin. *Biochimie*, 54: 621-622.

Perutz MF, Mitchinson JM (1950). State of hemoglobin in Sickle cell anemia. *Nature*, 166: 677-680.

Perutz MF, Rossmann, MG Cullis AF, Muirhead H, North ACT (1960). Structure of hemoglobin. *Nature*, 185: 416-420.

Perutz MF, Paoli M, Lesk AM Fix L, (1999). A haemoglobin that acts as an oxygen sensor: signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains. *Chemistry & Biology*, 6: 291-297.

Pinto RE, Bartley W (1969). Effect of age and sex on Glutathione reductase and Glutathione peroxidase activities and on aerobic Glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochemical Journal*, 112: 109-115.

Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky EP, Kinney TR (1991). Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *New England Journal of Medicine*, 235:11-16.

Powars DR (1990). Sickle cell anemia and major organ failure. *Hemoglobin*, 14: 573-598.

Powars DR (1991). Sickle-Cell Anemia: β^S Gene-cluster Haplotypes as Prognostic Indicators of Vital Organ failure. *Seminars in Hematology*, 28: 202-208.

Powars DR, Johnson CS (1996). Priapism. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 10: 1363-1372.

Powars DR, Wilson B, Imbus C, Pegelow C, Allen J (1978). The natural history of stroke in sickle cell disease. *The American Journal of Medicine*, 65: 461-471.

Powars DR, Elliot DD, Chan L, et al (1991). Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. *Annals of Internal Medicine*, 115: 614-620.

Prasad K (2003). C-Reactive Protein and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Angiology*, 12: 1-12.

Ramalho AS, Magna LA, Silva RBP (2002). A portaria MS n.º 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia*, 24: 244-250.

Reiter CD, Wang X et al (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. *Nature Medicine*, 8: 1383-1389.

Ren H, Ghebremeskel K, Okpala I, Ugochukwu CC, Crawford M, Ibegbulam O (2006). Abnormality of erythrocyte membrane n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in sickle cell haemoglobin C (HbSC) disease is not as remarkable as

in sickle cell anaemia (HbSS). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 74: 1-6.

Richard RE, Siritanaratkul N, Jonlin E, Skarpidi E, Heimfeld S, Balu CA (2005). Collection of blood stem cells from patients with sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 35: 384-388.

Saiki RK, Scharf S, Falooma F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermstable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-490.

Salzano FM, Tondo CV (1968). Hemoglobin types of brazilian indians. *American Journal of Physical Antropology*, 28: 355-359.

Salzano FM, Rocha FJ, Tondo CV (1968). Hemoglobin types and genes flow in Porto Alegre, Brazil. *Acta Genetica et Statistica Medica*, 18: 449-457.

Salzano FM, Bortolini MC (2002). The Evolution an Genetics of Latin American population. Cambridge, 215-227.

Searjeant GR (1992). Sickle cell disease. Oxford, Oxford University Press, p. 415-424.

Searjeant GR (2001). The emerging understanding of sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 112: 1-3.

Sears DA (1994). Sickle cell trait Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. New York, Raven Press, p.381-394.

Shapiro BS (1989). The management of pain in sickle cell disease. *Pediatric Clinics of North America*, 36: 1029-1045.

Shinar E, Stalev O, Rachmilewitz EA et al (1987). Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in severe beta thalassemia. *Blood*, 70: 158-164.

Silla LMR (1999). Doença falciforme: um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil. *Journal of Pediatric*, 75: 145-146.

Sommer CK, Goldbeck AS, Wagner SC, Castro SM (2006). Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul. *Caderno de Saúde Pública*, 22: 1709-1714.

Srinivasan C, Liba A, Imlay JA, Valentine JS, Gralla EB (2000). Yeast Lacking Superoxide Dismutase(s) Show Elevated Levels of "Free Iron" by Whole Cell Electron Paramagnetic Resonance. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 29187-29192.

Stamatoyannopoulos G (2005). Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental Haematology*, 33: 259-271.

Steen RG, Hunte M, Traipe E, Hurh P, Wu S, Bilaniuk L, Haselgrove J (2004). Brain T₁ in young children with sickle cell disease: evidence of early abnormalities in brain development. *Magnetic Resonance Imaging*, 22: 299-306.

Steinberg MH (1994). Sickle cell anemia and fetal hemoglobin. *The American Journal of the Medical Science*, 308: 259-265.

Steinberg MH (1996). Modulation of the phenotypic diversity of cell sickle anemia. *Hemoglobin*, 20: 1-19.

Steinberg MH (1999). Management of Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 340: 1021-1030.

Steinberg MH (2005). Predicting clinical severity sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, 129: 465-481.

Steinberg MH (2006). Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *TRENDS in Pharmacological Science*, 27: 204-210.

Steinberg MH, Rodgers GP (2001). Pathophysiology of Sickle Cell Disease: Role of Cellular and Genetic Modifiers. *Seminars in Haematology*, 38: 299-306.

Steinberg MH, Brugnara C (2003). Pathophysiological-Based Approaches to Treatment of Sickle Cell Disease. *Annual Review of Medicine*, 54: 89-112.

Sutton M, Bouhassira E, Nagel RL (1989). Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of the β -like gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*, 32: 66-69.

Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, Adams RJ (2006). Pathophysiology and treatment of stroke in sickle cell disease: present and future. *Lancet Neurology*, 5: 501-512.

Taniguchi N, Gutteridge J. M. C. (2000). Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford University Press, Oxford.

Taylor MY, Wyatt-Ashmead JW, Gray J, Bofill JA, Martin R, Morrison JC (2006). Pregnancy loss after first-trimester viability in women with sickle cell trait: Time for a reappraisal? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 194: 1604-1608.

Thomas S, Lowe JE, Knowles RG, Green IC, Green MHL (1998). Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. *Mutation Research*, 402: 77-84.

Thurman AR, Steed LL, Hulsey T, Soper DE (2006). Bacteriuria in pregnant women with sickle cell trait. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 194: 1366-1370.

Tondo CV, Salzano FM, Rucknagel DL (1961). Novo Tipo Hereditário de Hemoglobina em Família de raça branca. *Ciência e Cultura*, 13: 154-157.

Tondo CV, Salzano FM, Rucknagel DL (1963). Hemoglobin Porto Alegre, possible polymer of normal hemoglobin in a caucasian brazilian family. *American Journal of Human Genetics*, 15: 265-279.

Vernon MI (2004). Sickle-Cell Anemia Hemoglobin: The Molecular Biology of the First "Molecular Disease"—The Crucial Importance of Serendipity. *Genetics*, 167: 1-7.

Vichinsky EP (1991). Comprehensive care in sickle cell disease: Its impact on morbidity and mortality. *Seminars in Haematology*, 28:220-226.

Vichinsky EP, Lubin BH (1987). Suggested guidelines for the treatment of children with sickle cell anemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1: 483-501.

Vichinsky EP, Styles L (1996). Pulmonary complications. Sickle cell disease. *Hematology/ Oncology clinics of North America*, 10: 1275-1287.

Wagener FADTG, Abraham NG, Kooyk YV, Witte T, Figdor CG (2001). Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 22: 52-54.

Wagner CS, Silvetri MC, Bittar CM, et al (2005). Prevalência de talassemias e hemoglobinas variants em pacientes com anemia não ferropênica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 27: 37-43.

Ware RE, Filston HC (1992). Surgical management of children with hemoglobinopathies. *Surgical Clinics of North America*, 72: 1223-1236.

Watson RJ, Burko H, Megas H, Robinson M (1963). The hand-foot syndrome in sickle cell disease in young children. *Pediatrics*, 31: 975-982.

Waugh SM, Walder JA, Low PS (1987). Partial characterization of the copolymerization reaction of erythrocyte membrane band 3 with hemichromes. *Biochemistry*, 26: 1777-1783.

Weatherall DJ, Clegg JB (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ*, 79: 704-712.

Wild BJ, Stephens AD (1997). The use of automated HPLC to detect and quantitate haemoglobins. *Clinical Laboratory Haematology*, 19: 171-176.

Wilson JB, Headlee ME, Huisman TH (1983). A new high performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantitation of various hemoglobin variants in adults and newborn babies. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 102: 174-186.

Winterbourn CC (1990). Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias. The unstable hemoglobins. *Seminars in Hematology*, 27: 41-50.

Yasin Z, Witting S, Palascak MB, Joiner CH, Rucknagel DL, Franco RS (2003). Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood*, 102: 365-370.

Yoshida A, Beutler E (1986). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. n.p.: Academic Press, Inc.

Zago MA, Silva WA, Franco RF (1999). Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in Brazilian population. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 51: 226-234.

ANEXOS

Anexo 1

RESULTADOS ADICIONAIS

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima presente nos eritrócitos, cuja principal função é proteger as células sanguíneas vermelhas contra o dano oxidativo. A G6PD catalisa o primeiro passo na via das hexoses monofosfato. Ela oxida glicose-6-fosfato a 6-fosfogluconato, reduzindo NADP a NADPH. A via das hexoses monofosfato é a única fonte de NADPH nos eritrócitos e nos reticulócitos e ainda serve para produzir a ribose necessária para a síntese de nucleotídeos nas vias de salvação. A deficiência em G6PD é a enzimopatia mais comum em humanos, cuja herança está ligada ao cromossomo X (Beutler, 1994). No presente trabalho, não foi encontrado nenhum indivíduo deficiente em G6PD (tabela 7).

Tabela 7. Valores da G6PD (U/gHb) a 37°C encontrados nos eritrócitos dos grupos abaixo.

Grupos	n	média ± desvio padrão
<i>HbAA</i>	30	18,28 ± 2,47
<i>HbAS</i>	28	16,56 ± 4,99
<i>HbSS</i>	20	19,74 ± 6,92

Nenhum dos participantes da pesquisa mostrou-se deficiente em G6PD.

Valores de referência para G6PD:

Normal: maior que 7,7 U/gHb a 37°C

Intermediário: entre 2,6 e 7,6 U/gHb a 37°C

Deficiente: menor 2,5 U/gHb a 37°C

Os resultados abaixo foram obtidos através de entrevista direta (questionário nutricional) com os indivíduos que concordaram participar do estudo, após a assinatura no termo de consentimento livre e esclarecido.

Foi observado que 48% dos indivíduos participantes do estudo possuíam renda (salário mínimo referência para o ano de 2004, R\$ 260,00) igual a um (01) salário mínimo; 14% deles, dois a três salários; 18% ganhavam mais de três salários e 20% deles sobreviviam com menos de um salário mínimo (gráfico 1).

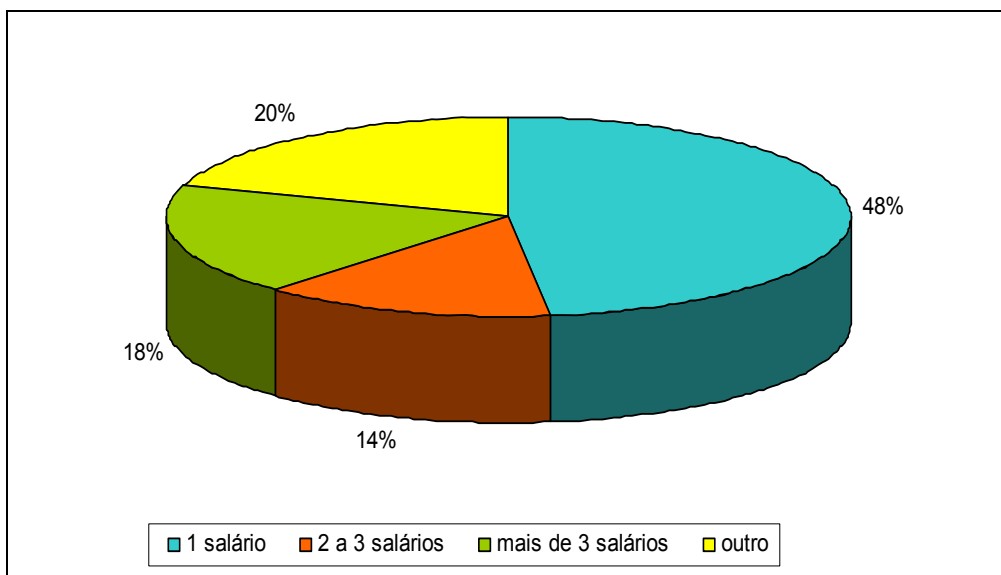


Gráfico 1. Distribuição de renda entre os indivíduos participantes da pesquisa (salário mínimo referência para o ano de 2004: R\$ 260,00).

A origem racial foi classificada segundo critérios do Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), o qual estabelece como opções para cores ou raças na nossa população: branca, negra/parda, amarela, ou índia. Os dados encontram-se agrupados no gráfico 2.

Os dados do censo realizado em 2000 apresentam a classificação da população brasileira de acordo com esta variável. Indivíduos de cor preta ou parda representam 45% da população brasileira, enquanto essa mesma categoria no estado do Rio Grande do Sul representa 13% (Wagner *et al.*, 2005). Neste grupo estudado, identificamos a presença de 83% do total de indivíduos classificados na referida categoria (gráfico 2).

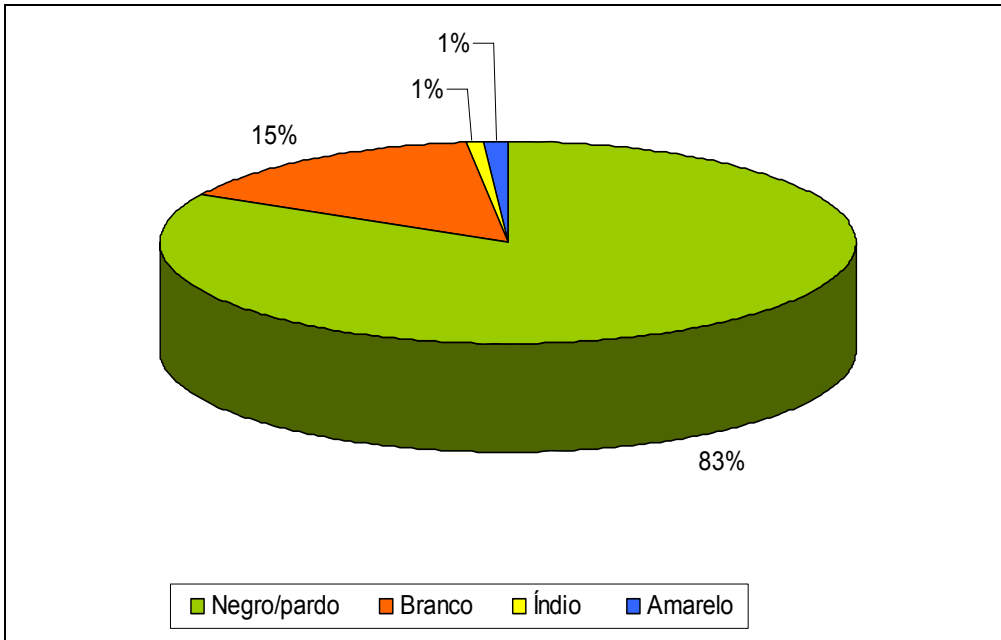


Gráfico 2. Classificação em percentual dos indivíduos participantes do estudo segundo a origem racial.

Dos indivíduos com AF que faziam uso de suplemento alimentar, observou-se que 55% deles administravam diariamente ácido fólico (gráfico 3).

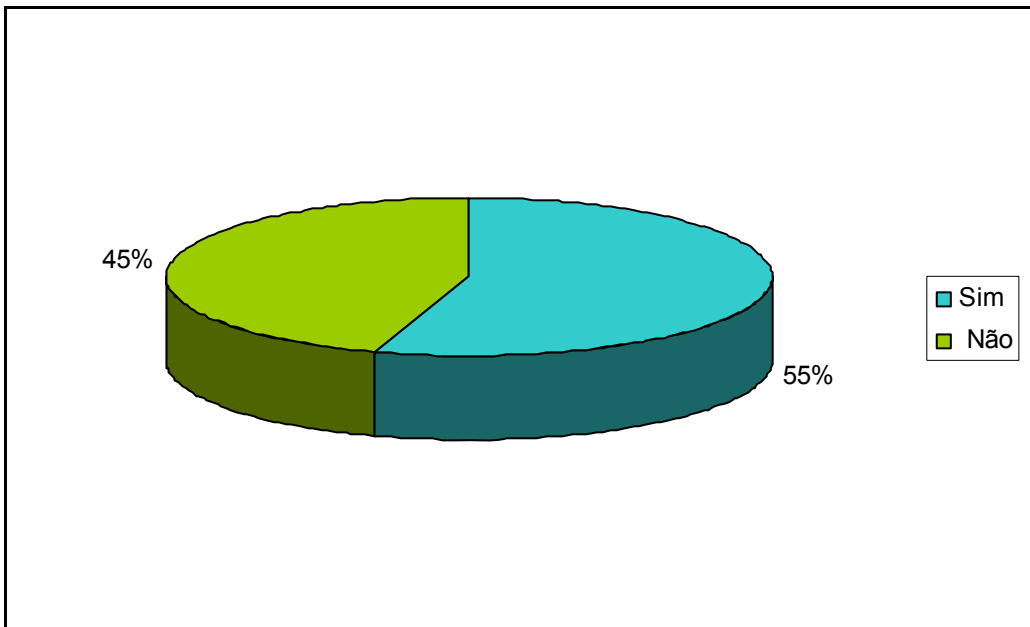


Gráfico 3. Percentagem (%) dos indivíduos com AF participantes da pesquisa que faziam uso ou não de suplemento nutricional.

E através da dosagem sérica da vitamina C por HPLC pode-se observar que os doentes falciformes possuem níveis significativamente elevados desta em relação aos demais grupos analisados. Esse dado pode ser explicado, uma vez que esses indivíduos possuem uma ingestão elevada de frutas e outros alimentos ricos em ácido ascórbico, como mostrado na tabela 8.

Tabela 8: Frequência (%) de consumo alimentar pelos indivíduos com AF participantes do estudo.

Alimentos	Nunca ou raramente	≤ 3 vezes / semana	> 3 vezes / semana
Feijão preto	5	20	75
Arroz	0	15	85
Carne vermelha	10	10	80
Fígado	30	25	45
Frutas	0	20	80
Soja	45	10	45
Chá verde	50	25	25
Vinho	70	20	10
Peixe	70	25	5
Brócolis	70	10	20
Leite e derivados	15	35	50

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO

Prezado Paciente:

A anemia falciforme é uma doença genética que acomete cerca de 0,01% da população brasileira. É causada por uma alteração estrutural na hemoglobina – proteína transportadora de oxigênio - fazendo com que as células vermelhas do sangue adquiram um formato de foice. É caracterizada por destruição dessas células (hemólise) e episódios de dores abdominais e musculoesqueléticas.

Entretanto, existem pessoas que apresentam o traço falciforme (1:70), ou seja, são indivíduos clinicamente normais, podendo suas células adquirir o formato de foice em algumas situações peculiares.

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos pedindo a sua participação, tem como objetivo principal traçar o perfil oxidativo e bioquímico de indivíduos afetados pela anemia falciforme ou traço falciforme e saber se isto vem acompanhado ou não de outra doença, que é a deficiência de G6PD, uma enzima que quando existe em quantidade insuficiente no organismo também pode causar anemia, além de icterícia nos bebês recém-nascidos e outros problemas.

Para o desenvolvimento deste trabalho, precisamos de um grupo de pessoas portadoras de anemia falciforme ou traço falciforme.

É necessário apenas que os participantes do estudo com anemia em investigação colem uma amostra de sangue (10 mL), que será realizada por profissional habilitado e com todas as técnicas adequadas.

Estas amostras de sangue serão analisadas para que seja traçado o “estado oxidativo do paciente”, e verificar se existe deficiência de G6PD. Também será extraído o DNA desta amostra de sangue, que é o material genético que pode auxiliar no esclarecimento do diagnóstico.

Os riscos associados ao presente estudo são apenas os de uma coleta de sangue venoso. Pode haver um pequeno hematoma, isto é, um pequeno

derramamento de sangue no local da coleta. Lembramos que todo material utilizado é descartável e estéril e o profissional que irá realizar a coleta está capacitado para esta função. Além disso, a quantidade de sangue coletada não fará falta alguma ao paciente.

Os benefícios envolvidos são os de possibilitar um estudo familiar, permitindo, assim, a identificação de outros membros afetados e o devido encaminhamento ao serviço de saúde especializado, além de possibilitar o melhor entendimento acerca do assunto.

O resultado do exame lhe será comunicado, caso sejam detectadas alterações na molécula de hemoglobina e/ou deficiências enzimáticas.

Eu, _____, fui informado do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim o desejar, sem prejuízo para o meu tratamento.

O (a) profissional _____ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

- () Concordo com a coleta e a utilização do material obtido.
- () Concordo com a extração, armazenamento e utilização do DNA obtido.

Paciente:

Data:

Pesquisador: Prof. Dra. Mara da S. Benfato

Telefone para esclarecimentos: 0 XX 51-3308-7603

Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa: 0 XX 51-2101-7615

Anexo 3

QUESTIONÁRIO NUTRICIONAL

Dados Pessoais

Nome:

Endereço:

Telefone:

Idade:

Data de Nascimento:

Local de Nascimento:

Sexo: () F () M

Estado civil: () solteiro () casado () outro

Origem étnica: () branco () índio () afro-brasileiro () amarelo

Renda familiar: () 1 salário mínimo () 2 a 3 () mais de 3 () outro

REFERÊNCIA: R\$ 260,00

Patologias Atuais

1. Outras doenças graves ou crônicas?

() Diabetes () Hipertensão () Câncer () outras

2. Alergias, intolerância alimentar ou medicamentosa? () não () sim Quais?

3. Medicações em uso () não () sim Quais? () analgésico () antibiótico () antiinflamatório () outro

Freqüência? () 1X/ dia () 2X/dia () outro

4. História familiar de anemia falciforme: () não () sim

5. Faz tratamento para Anemia Falciforme? () não () sim Há quanto tempo?

Informações Nutricionais

1. Toma algum tipo de suplemento nutricional ? () não () sim

2. Apresentou perda de peso recente não planejada?

() sim () não Quanto? _____ Kg Quanto tempo?

Peso atual:

Peso usual:

Altura:

3. Quantas refeições faz por dia? () 1 () 2 () 3 () outro

4. Que tipo de alimentos costuma consumir? () carnes e verduras
() massas e pães () bolachas e biscoitos

5. Faz ou já fez algum tipo de dieta? () sim () não

6. Apresentou alguma alteração recente no paladar ou no apetite?

Tipo de alteração: _____ Quando ocorreu: _____

7. Toma bebida alcoólica? () não () sim Qual?

8. É fumante? () não () sim

Atividade Física

1. Pratica algum tipo de atividade física ? () não () sim Qual?

2. Com que freqüência? () 1X/ semana () 2X/semana () 3X/semana

Questionário de Freqüência Alimentar

Com que freqüência ingere os seguintes alimentos:

Alimento	Vezes p/ semana	Vezes p/ mês	Vezes p/ ano
Feijão preto			
Arroz			
Carne			
Fígado			
Tomate			
Uva			
Maçã			
Laranja			
Limão			
Soja			
Chá (verde)			
Vinho			
Peixe			
Brócolis			
Leite e derivados			

Anexo 4

CURRICULUM VITAE

Vanusa Manfredini

possui graduação em Farmácia, ênfase em Análises Clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2002) e mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2004). Atualmente é professora titular da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões e aluna de doutorado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tem experiência na área de Farmácia Bioquímica Clínica, com ênfase em Estresse Oxidativo, atuando também na área de hematologia e citologia clínica e genética molecular.


(Texto informado pelo autor)
Última atualização em 04/12/2007

Endereço para acessar este CV:
<http://lattes.cnpq.br/7062274179396656>

Dados Pessoais

Nome	Vanusa Manfredini
Filiação	Alcir Jose Manfredini e Noemi Manfredini
Nascimento	20/06/1980 - Erechim/RS - Brasil
Carteira de Identidade	5060827556 SSP - RS - 20/08/1992
CPF	97158445020
Endereço residencial	Rua Lucas de Oliveira, 2920 apto 401 Petrópolis - Porto Alegre 90460-000, RS - Brasil Telefone: 51 81177884
Endereço profissional	Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica Av. Bento Gonçalves, 9500 prédio 43431 sala 110 Agronomia - Porto Alegre 91501-970, RS - Brasil Telefone: 51 33167372
Endereço eletrônico	e-mail para contato : vanusa_manfredini@yahoo.com.br e-mail alternativo : vanusa_manfredini@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2005
Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Perfil bioquímico e oxidativo em pacientes que apresentam Anemia falciforme ou Traço falciforme
Orientador: Mara da Silveira Benfato
- 2003 - 2004
Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Estresse Oxidativo em mutantes *sod* de *S. cerevisiae*, Ano de obtenção: 2004
Orientador: Mara da Silveira Benfato 
- 2003 - 2006
Especialização em Análises Clínicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Perfil dos casos de meningite bacteriana e viral na Região do Alto Uruguai, RS
Orientador: Luciane C. Myllius
- 1998 - 2002
Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: A indução da Glutathione Peroxidase (GPx) protege duplo mutante *sod1sod2* contra danos oxidativos em *S. cerevisiae*
Orientador: Mara da Silveira Benfato
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

Formação complementar

- 1999 - 1999
Curso de curta duração em Homeopatia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 1999 - 1999
Curso de curta duração em Manejo da Dor.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 1999 - 1999
Curso de curta duração em Noções de Farmácia Hospitalar.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2000 - 2000
Curso de curta duração em Aplicação da Biologia Molecular Em Lab Análises Clínicas.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2000 - 2000
Curso de curta duração em Terapia Gênica.

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Fundamentos de Imunobiologia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Metodologias Para Avaliação da Carcinogenicidade de agentes químicos.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Biologia Molecular Básica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em O Desenvolvimento da Farmácia Clínica Em Hospitais.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Aplicação da Biologia Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Micologia.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC/RS, Porto Alegre, Brasil
- 2001 - 2001 Curso de curta duração em Estudos de Casos Clínicos Em Bioquímica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2002 - 2002 Curso de curta duração em Citometria de Fluxo.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2002 - 2002 Curso de curta duração em Manipulação de Embriões Humanos.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC/RS, Porto Alegre, Brasil
- 2002 - 2002 Curso de curta duração em Bioquímica do Envelhecimento.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2003 - 2003 Curso de curta duração em Discussão Sobre Pesquisa Utilizando Células Tronco.
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
- 2003 - 2003 Curso de curta duração em Genômica e Proteômica Aplicadas á Mutagênese.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2004 - 2004 Extensão universitária em Prospecção de Atividades Biológicas

- Bioensaios e B.
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceió, Brasil
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005 - 2005
Curso de curta duração em Anemia Falciforme.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil
- 2005 - 2005
Extensão universitária em Curso Fani Job de Hematologia.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005
Curso de curta duração em Sangue Fluido da Vida.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005
Curso de curta duração em VII Curso de Multiplicadores em Hemoglobinopatias.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005
Curso de curta duração em Esclerose Múltipla.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005
Curso de curta duração em Neurobiologia do Comportamento.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005
Extensão universitária em IX Encontro Gaúcho de Imunologia.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC/RS, Porto Alegre, Brasil
- 2005 - 2005
Curso de curta duração em Teste de Paternidade.
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, Brasil
- 2005 - 2005
Curso de curta duração em Curso de Aplicação de Injetáveis.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
- 2006 - 2006
Curso de curta duração em Atualização em Lipoproteínas.
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, Brasil
- 2006 - 2006
Extensão universitária em X Encontro Gaúcho de Imunologia.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUC/RS, Porto Alegre, Brasil
- 2007 - 2007
Curso de curta duração em Atenção primária à saúde.
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
- 2007 - 2007
Curso de curta duração em Patologia Clínica.
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil

2007 - 2007	Curso de curta duração em Genética. Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Porto Alegre, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em Urinálise. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em A pesquisa clínica e o profissional farmacêutico. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em III Curso de Extensão de Ética em Pesquisa. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, Brasil

Atuação profissional

1. Drogaria Jardim Botânico - AGAFARMA

Vínculo institucional

2004 - 2004 Vínculo: Responsável Técnico, Enquadramento funcional:
Farmacêutico, responsável Técnico, Carga horária: 44, Regime:
Integral

2. Drogaria Nossa Senhora da Conceição - AGAFARMA

Vínculo institucional

2003 - 2004 Vínculo: Responsável Técnico, Enquadramento funcional:
Farmacêutico, responsável Técnico, Carga horária: 44, Regime:
Integral

3. Universidade de Passo Fundo - UPF

Vínculo institucional

2007 - Atual Vínculo: Professor visitante, Enquadramento funcional: Professor
convidado, Carga horária: 15, Regime: Parcial

Atividades

10/2007 - Atual Pós-graduação, Especialização em Hematologia e Hemoterapia

*Disciplinas Ministradas:
Bioquímica Hematológica*

4. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

1999 - 2002 Vínculo: Aluna de Iniciação Científica, Enquadramento funcional:
Aluna de Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

2003 - 2004 Vínculo: Aluna de Mestrado, Enquadramento funcional: Aluna de
Mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva

2004 - 2005 Vínculo: Colaborador em pesquisa, Enquadramento funcional:
Colaborador em pesquisa, Carga horária: 20, Regime: Parcial

2005 - Atual Vínculo: Aluna de doutorado, Enquadramento funcional: Aluna de
doutorado, Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

07/1999 - 12/2000 Extensão Universitária, Instituto de Biociências, Departamento de
Microbiologia

*Especificação:
Avaliação dos exames parasitológicos de fezes de crianças da região
da grande Porto Alegre-RS*

07/1999 - 12/2000 Estágio, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia

*Estágio:
Exames parasitológicos de fezes de crianças em escolas de
Cachoeirinha-RS*

03/2000 - 12/2000 Treinamento, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica

*Especificação:
Atividade de Monitoria da disciplina de Biofísica para Medicina,
Enfermagem, Farmácia e Ciências Biológicas.*

03/2001 - 12/2002 Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biociências, Departamento
de Biofísica

*Linhas de Pesquisa:
Dosagem de enzimas antioxidantes em mutantes sod de*

Saccharomyces cerevisiae

- 03/2001 -
12/2001 Treinamento, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica
- Especificação:*
Atividade de monitoria da disciplina de Biofísica para Medicina Veterinária, Enfermagem, Ciências Biológicas e Medicina.
- 11/2002 -
04/2003 Estágio, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produção e Controle de Medicamentos
- Estágio:*
Estágio na Farmácia Básica e dos Medicamentos Controlados no Centro de Saúde Modelo
- 01/2003 -
03/2004 Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica
- Linhas de Pesquisa:*
Estresse Oxidativo em mutantes sod de S. cerevisiae
- 07/2003 -
07/2003 Extensão Universitária, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises
- Especificação:*
Minicurso de Hemoglobinopatias
- 03/2004 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica
- Linhas de Pesquisa:*
Hematologia e estresse oxidativo , Parâmetros oxidativos em pacientes homozigotos e heterozigotos para Anemia Falciforme
- 10/2004 -
05/2005 Graduação, Ciências Biológicas
- Disciplinas Ministradas:*
Estresse Oxidativos em Sistemas Biológicos à Distância
- 10/2004 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica
- Linhas de Pesquisa:*
Verificação da atividade antioxidante do óleo volátil de Baccharis punctulata , Verificação da atividade antioxidante do óleo volátil de Eupatorium laevigatum
- 01/2005 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Instituto de Biociências, Departamento de Biofísica
- Linhas de Pesquisa:*
Atividade antioxidante do extrato cloroformio de Valeriana sp
- 06/2005 - Atual Extensão Universitária, Instituto de Biociências, Departamento de

Biofísica

Especificação:

Anemia Falciforme, que doença é essa?

03/2006 - Atual Extensão Universitária, Faculdade de Farmácia

Especificação:

Prevalência de infecções cérvico-vaginais identificadas em esfregaços através da coloração de Papanicolaou

12/2006 -
05/2007

Estágio, Faculdade de Farmácia

Estágio:

Estágio realizado no HPS da Prefeitura de Porto Alegre no Laboratório de Análises Clínicas

5. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI

Vínculo institucional

2005 - Atual Vínculo: Professor, Enquadramento funcional: Professor titular, Carga horária: 30, Regime: Parcial

Atividades

03/2005 - Atual Graduação, Farmácia Bioquímica Clínica

Disciplinas Ministradas:

Citologia Clínica, Fisiologia Geral, Genética Básica Aplicada à Farmácia, Genética molecular em Análises Clínicas, Genética molecular em Farmácia Industrial

03/2006 - Atual Graduação, Ciências Biológicas

Disciplinas Ministradas:

Biologia Celular

07/2007 - Atual Graduação, Farmácia

Disciplinas Ministradas:

Biofísica A

07/2007 - Atual Graduação, Farmácia

Disciplinas Ministradas:

Imunologia básica

07/2007 - Atual Graduação, Fisioterapia

Disciplinas Ministradas:
Biofísica B

10/2007 - Atual Pós-graduação, Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas

Disciplinas Ministradas:
Diagnóstico Molecular de Doenças Genéticas, Citopatologia clínica e suas Bases Ginecológicas

Linhas de pesquisa

1. Hematologia e estresse oxidativo
2. Atividade antioxidante do extrato cloroformio de *Valeriana sp*
3. Dosagem de enzimas antioxidantes em mutantes *sod* de *Saccharomyces cerevisiae*
4. Estresse Oxidativo em mutantes *sod* de *S. cerevisiae*
5. Parâmetros oxidativos em pacientes homozigotos e heterozigotos para Anemia Falciforme
6. Verificação da atividade antioxidante do óleo volátil de *Baccharis punctulata*
7. Verificação da atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium laevigatum*

Áreas de atuação

1. Biofísica
2. Estresse Oxidativo
3. Biologia Molecular
4. Hematologia

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Bem, Lê Bem

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- MANFREDINI, V., CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine Comparsi,
1. BENFATO, Mara Silveira
A Fisiopatologia da Anemia Falciforme. *Infarma (Brasília)*. , v.19, p.3 - 6, 2007.
- VASCONSELOS, Sandra Mary, GOULART M O F, MOURA José Benedito de França, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara Silveira, KUBOTA Lauro Tatsuo
2. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova (Online)*. , v.30, p.1323 - 1338, 2007.
- MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, PERALBA, Maria do Carmo Ruaro, BENFATO, Mara Silveira
3. Adaptative response to enhanced basal oxidative damage in *sod* mutants from *S. cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. , v.276, p.175 - 181, 2005.
- MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara Silveira
4. High levels of Catalase in *sod* of *S. cerevisiae* in high Aeration Conditios. *Brazilian Journal of Microbiology*. , v.36, p.347 - 351, 2005.
- MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, BENFATO, Mara Silveira
5. Chá Verde:benefícios para a saúde humana. *Infarma*. , v.16, p.68 - 70, 2004.
- MANFREDINI, V., ROEHS, Rafael, SAFFI, Jenifer, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, PERALBA, Maria Do Carmo Ruaro, HENRIQUES, João Antonio Pegas, BENFATO, Mara Silveira
6. Glutathione peroxidase (GPx) induction protect *sod1sod2* double mutant against oxidative estress in *S. cerevisiae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. , v.37, p.159 - 165, 2004.

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

- LAZZARETTI, Luisa, BACCIN A C, MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, BENFATO, Mara Silveira
1. Alpha-Lipoic Acid Effect in Antioxidants Enzymes in the Sickle Cell Disease In: Free Radicals in Montevideo 2007, 2007
Free Radicals in Montevideo 2007. , 2007. p.113 - 113
- MARTINS, Vanessa Duarte, BACCIN A C, MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, BENFATO, Mara Silveira
2. Alpha-Lipoic Acid Effect in Carbonyl and Maloindialdehyde Levels in Sickle Cell Disease Patients and Sickle Cell Trait Subjects In: IX Reunião Anual do PPGBCM, 2007, Porto Alegre.
IX Reunião Anual do PPGBCM. , 2007.
- MARTINS, Vanessa Duarte, LAZZARETTI, Luisa, BACCIN A C, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara Silveira
3.

- Alpha-Lipoic Acid Effect in Carbonyl and Malondialdehyde Levels in Sickle Cell Disease Patients and Sickle Cell Trait In: Free Radicals in Montevideo 2007, 2007 **Free Radicals in Montevideo 2007.** , 2007. p.112 - 112
- VEECK G P, MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, LAZZARETTI, Luisa, BACCIN A C, BENFATO, Mara Silveira
4. Alterações na hemostasia de pacientes com Anemia Falciforme pode estar associada com acarbonilação do fibrinogênio In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Porto Alegre.
XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. , 2007. p.492 - 492
- VEECK G P, MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, LAZZARETTI, Luisa, BACCIN A C, BENFATO, Mara Silveira
5. Alterações na hemostasia de pacientes com Anemia Falciforme pode estar associada com acarbonilação do fibrinogênio In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Porto Alegre.
XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. , 2007. p.492 - 492
- VEECK G P, MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, LAZZARETTI, Luisa, BACCIN A C, BENFATO, Mara Silveira
6. Alterações na hemostasia de pacientes com Anemia Falciforme pode estar associada com a carbonilação do fibrinogênio In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Porto Alegre.
XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. , 2007. p.492 - 492
- VEECK G P, MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, MARTINS, Vanessa Duarte, BACCIN A C, BENFATO, Mara Silveira
7. Alterações na hemostasia de pacientes falciforme pode estar associada a carbonilação do fibrinogênio In: 27º Semana científica do HCPA, 2007, Porto Alegre.
Revista HCPA. , 2007. v.27. p.191 - 191
- MANFREDINI, V., COFFERRI N C
8. Análise dos níveis séricos de ferro total e ferritina em crianças de entidades sociais do Município de Erechim RS In: 27º Semana científica do HCPA, 2007, Porto Alegre.
Revista HCPA. , 2007. v.27. p.194 - 195
- SESSI, Samile, COFFERRI N C, SBARDELOTTO, Fernanda Hall, MANFREDINI, V.
9. Análise dos Níveis séricos de Ferro Total e Ferritina em Crianças de Entidades Sociais do Município de Erechim/RS In: IX Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2007, Erechim.
IX Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2007.
- VEECK G P, LAZZARETTI, Luisa, MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara Silveira
10. Anemia Falciforme que doença é essa? In: 8º Salão de Extensão da UFRGS, 2007, Porto Alegre.
8 Salão de Extensão da UFRGS. , 2007.
11. PEZZINI D A, MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., LAZZARETTI,

- Luisa, BACCIN A C, VEECK G P, BENFATO, Mara Silveira
Avaliação do efeito da qualidade da alimentação sobre parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos traço falciforme e pacientes falciformes In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Porto Alegre.
XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. , 2007. p.557 - 557
- PEZZINI D A, MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., VEECK G P, BACCIN A C, BENFATO, Mara Silveira
12. Avaliação do efeito da qualidade na alimentação sobre parâmetros de estresse oxidativo In: 27º Semana científica do HCPA, 2007, Porto Alegre.
Revista HCPA. , 2007. v.27. p.208 - 208
- MOTTIN E, ORO J, SESSI, Samile, VIEIRA R B, BIASI L, SBARDELOTTO, Fernanda Hall, SERAFIN P M, TREMÉA R, SCHWANZ M, MANFREDINI, V.
13. Avaliação do efeito genotóxico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* In: IX Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2007, Erechim.
IX Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2007.
- MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, MARTINS, Vanessa Duarte, BACCIN A C, BENFATO, Mara Silveira
14. Blood antioxidant parameters in sickle cell trait subjects and sickle cell anaemia patients In: Free Radicals in Montevideo 2007, 2007, Montevideo.
Free Radicals in Montevideo 2007. , 2007. p.111 - 111
- CASTRO, Simone, SANTIN, Ana Paula, WAGNER, Sandrine, ZALESKI C, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara Silveira
15. Caracterização molecular da Hemoglobina S In: 27º Semana científica do HCPA, 2007, Porto Alegre.
Revista HCPA. , 2007. p.249 - 249
- TREMÉA R, SESSI, Samile, VIEIRA R B, BIASI L, ORO J, SBARDELOTTO, Fernanda Hall, MOTTIN E, SERAFIN P M, SCHWANZ M, MANFREDINI, V.
16. Detecção do dano de DNA leucocitário causado por extratos de *Achyrocline satureioides* In: IX Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2007
IX Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2007.
- ORO J, MOTTIN E, SESSI, Samile, VIEIRA R B, BIASI L, SBARDELOTTO, Fernanda Hall, SERAFIN P M, TREMÉA R, SCHWANZ M, MANFREDINI, V.
17. Efeito genotóxico de extratos aquosos de *Mikania laevigata* no teste Cometa, *in vitro* In: IX Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2007, Erechim.
IX Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2007.
- LAZZARETTI, Luisa, BACCIN A C, MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, BENFATO, Mara Silveira
18. Estresse Oxidativo na anemia por deficiência de ferro em indivíduos idosos In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Porto Alegre.
XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. , 2007. p.492 - 492
- BACCIN A C, MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, LAZZARETTI, Luisa, BENFATO, Mara Silveira
19. Estresse oxidativo na anemia por deficiência de ferro em indivíduos idosos In: IX Reunião Anual do PPGBCM, 2007, Porto Alegre.

IX Reunião Anual do PPGBCM. , 2007.

- BIASI L, MOTTIN E, SBARDELOTTO, Fernanda Hall, ORO J, SERAFIN P M, VIEIRA R B, TREMÉA R, SESSI, Samile, SCHWANZ M, MANFREDINI, V.
20. Genotoxicidade in vitro de *Matricaria chamomilla* In: IX Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2007, Erechim.
IX Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2007.
- LAZZARETTI, Luisa, MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., BACCIN A C, BENFATO, Mara Silveira
21. O efeito do ácido lipóico nos níveis de malondialdeído e carbonil nos indivíduos falciformes e traço falciforme In: 27ª Semana científica do HCPA, 2007, Porto Alegre.
Revista HCPA. , 2007. v.27. p.212 - 213
- BACCIN A C, MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, MARTINS, Vanessa Duarte, BENFATO, Mara Silveira
22. Oxidative stress in older patients with iron deficiency anaemia (IDA) In: Free Radicals in Montevideo 2007, 2007, Montevideo.
Free Radicals in Montevideo 2007. , 2007. p.15 - 15
- STUMPF J, MANFREDINI, V.
23. Perfil dos casos de Hanseníase na Região do Alto Uruguai, RS In: IX Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2007, Erechim.
IX Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2007.
- MANFREDINI, V., STUMPF J, COFFERRI N C
24. Perfil dos casos de Hanseníase na Região do Alto Uruguai RS In: 27ª Semana científica do HCPA, 2007, Porto Alegre.
Revista HCPA. , 2007. v.27. p.11 - 12
- MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, LAZZARETTI, Luisa, GRIEBELER, Isabel, BENFATO, Mara Silveira
25. Serum concentrations of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in Patients with Sickle Cell Disease In: IX Reunião Anual do PPGBCM, 2007, Porto Alegre.
IX Reunião Anual do PPGBCM. , 2007.
- MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, BACCIN A C, MARTINS, Vanessa Duarte, BENFATO, Mara Silveira
26. Terapia farmacológica na Anemia Falciforme e suas Perspectivas: uma revisão In: IX Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2007, Erechim.
IX Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2007.
- SERAFIN P M, STUMPF J, NUNES V T, MANFREDINI, V.
27. Tratamento farmacológico da Hanseníase e seus estados reacionais In: IX Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2007, Erechim.
IX Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2007.
- SIMON, Daniele Paula, MYLIUS, Luciane C, MANFREDINI, V.
28. Alterações hematológicas e morfológicas em amostras de fluidos biológicos de trabalhadores supostamente contaminados por metais em uma empresa do distrito industrial de Erechim, RS In: Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2006, Erechim.

- Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos.** , 2006. p.35 - 35
- LAZZARETTI, Luisa, GRIEBELER, Isabel, MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara S
29. Anemia Falciforme: educação para melhor qualidade de vida In: 7º Salão de Extensão da UFRGS, 2006, Porto Alegre.
Anais do 7 Salão de Extensão da UFRGS. , 2006. p.208 - 208
- MANFREDINI, V., BUFFON, Andréia, NOAL, Bruno Antonio, CAPA, Daniela dos Santos, MYLIUS, Luciane C
30. Avaliação das amostras cervicais coletadas em Unidades Básicas de Saúde - UBS da grande Porto Alegre/RS. In: 7º Salão de Extensão da UFRGS, 2006, Porto Alegre.
Anais do 7 Salão de Extensão da UFRGS. , 2006. p.220 - 220
- ALBA, Marília Paula Dall', POLIDORO, Luciani, TOTTI, Carla Caprini, MOREIRA, Dariele Alves, MANFREDINI, V.
31. Avaliação do dano oxidativo em proteínas eritrocitárias e plasmáticas de indivíduos traço (HbAS) e falciformes (HbSS) In: Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2006, Erechim.
Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2006. p.30 - 30
- VASCONSELOS, Sandra Mary, GOULART M O F, SILVA M A M, BENFATO, Mara Silveira, MANFREDINI, V., FONTES G, OLIVEIRA
32. Avaliação do sistema enzimático antioxidante em sangue de portadores de hipertensão arterial sistêmica primária In: 61º Congresso Brasileiro de Cardiologia e XXII Congresso Sul Americano de Cardiologia, 2006, Recife.
Arquivos Brasileiros de Cardiologia. , 2006. v.87. p.165 - 165
- POLIDORO, Luciani, TOTTI, Carla Caprini, MOREIRA, Dariele Alves, ALBA, Marília Dall, MANFREDINI, V.
33. Correlação laboratorial entre hemoglobina glicada e glicemia de jejum In: Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2006, Erechim.
Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2006. p.05 - 05
- MANFREDINI, V., GRIEBELER, Isabel, LAZZARETTI, Luisa, SANTIN, Ana Paula, CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine Comparsi, BENFATO, Mara da S
34. Determinação do perfil de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) em indivíduos traço e falciformes In: 26º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre.
Revista HCPA. , 2006. v.26. p.230 - 230
- MANFREDINI, V., GRIEBELER, Isabel, LAZZARETTI, Luisa, SANTIN, Ana Paula, CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine Comparsi, BENFATO, Mara Silveira
35. Elevada oxidação de proteínas plasmáticas em pacientes homozigotos para Anemia Falciforme In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia HEMO 2006, 2006, Recife.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2006. v.28. p.22 - 22
- MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, GRIEBELER, Isabel, PERALBA, Maria Do Carmo Ruaro, BENFATO, Mara da S
- 36.

- Elevated Malonaldehyde (MDA) in sickled erythrocytes as indicative by the lipid peroxidation in Sickle Cell Anemia In: Sbbq, 2006, Águas de Lindóia.
Anais da XXVI Reunião Anual da SBBq. , 2006. p.57 - 57
- MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, GRIEBELER, Isabel, SANTIN, Ana Paula, WAGNER, Sandrine Comparsi, CASTRO, Simone, PERALBA, Maria Do Carmo Ruaro, BENFATO, Mara S
37. Elevated Malonaldehyde (MDA) in sickled erythrocytes as indicative by the lipid peroxidation in sickle cell anemia In: 26º Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2006, Porto Alegre.
Revista HCPA. , 2006. v.26. p.230 - 230
- MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, GRIEBELER, Isabel, BENFATO, Mara Silveira
38. Elevated malonaldehyde (MDA) in sickled erythrocytes as indicative by the lipid peroxidation in sickle cell anemia In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia HEMO 2006, 2006, Recife.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2006. v.28. p.22 - 22
- LAZZARETTI, Luisa, MANFREDINI, V., GRIEBELER, Isabel, SANTIN, Ana Paula, CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine Comparsi, ROSSETTO Simone
39. Envolvimento de processo inflamatório e ferro em pacientes com anemia falciforme (HbSS) In: XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2006, Porto Alegre.
XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2006. p.570 - 570
- LAZZARETTI, Luisa, MANFREDINI, V., GRIEBELER, Isabel, SANTIN, Ana Paula, CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine Comparsi, ROSSETTO Simone, BENFATO, Mara S
40. Envolvimento do processo inflamatório e ferro em pacientes falciformes (HbSS) In: VIII Reunião do PPGBCM, 2006, Porto Alegre.
VIII Reunião do PPGBCM. , 2006. p.52 - 52
- GRIEBELER, Isabel, MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, SANTIN, Ana Paula, CASTRO, Simone, BENFATO, Mara S
41. Pacientes homozigotos (HbSS) para a anemia falciforme possuem elevada oxidação em proteínas plasmáticas In: VIII Reunião do PPGBCM, 2006, Porto Alegre.
VIII Reunião do PPGBCM. , 2006. p.41 - 41
- GRIEBELER, Isabel, MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, SANTIN, Ana Paula, CASTRO, Simone, BENFATO, Mara Silveira
42. Pacientes homozigotos (HbSS) para a anemia falciforme possuem elevada oxidação em proteínas plasmáticas In: XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2006, Porto Alegre.
XVIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2006. p.359 - 359
- MOREIRA, Dariele Alves, ALBA, Marília Paula Dall', TOTTI, Carla Caprini,
43. POLIDORO, Luciani, MANFREDINI, V.
 Prevalência e fatores associados à ocorrência de meningite bacteriana na Região do

- Alto Uruguai, RS In: Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2006, Erechim.
Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2006. p.31 - 31
- TOTTI, Carla Caprini, MOREIRA, Dariele Alves, POLIDORO, Luciani, ALBA, Marília Paula Dall', MANFREDINI, V.
44. Prevalência e fatores associados à ocorrência de meningite viral entre adultos jovens na Região do Alto Uruguai, RS In: Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos, 2006, Erechim.
Anais da VIII Jornada de Estudos Farmacêuticos. , 2006. p.32 - 32
- SCHOSSLER, Patricia, WUNSCH, Diego, NUNES, José e S, MARTINS, Vanesa Duarte, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara da S, CARAMÃO, Elina B, ZINI, Cláudia A
45. Caracterização do óleo volátil de *Baccharis punctulata* e investigação de sua atividade antioxidante In: III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2005, Campinas.
Documentos, IAC. , 2005. v.77. p.62 - 62
- WUNSCH, Diego, NUNES, José e S, Schoessler, Patricia, LAZZARETTI, Luisa, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara da S, CARAMÃO, Elina B, ZINI, Cláudia A
46. Caracterização do óleo volátil de *Eupatorium laevigatum* e investigação de sua atividade antioxidante In: III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 2005, Campinas.
Documentos, IAC. , 2005. v.77. p.66 - 66
- SCHMEIDER, Guilherme Leal, WURSCH, Diego, NUNES, Jose Eduardo, Schoessler, Patricia, LAZZARETTI, Luisa, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara S, CARAMÃO, Elina Bastos, ZINI, Claudia
47. Caracterização dos óleos voláteis de *Eupatorium laevigatum* e *Baccharis pudunculata* juntamente com a investigação de sua atividade antioxidante In: XVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2005, Porto Alegre.
XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS. , 2005. p.49 - 49
- MANFREDINI, V., GRIEBELER, Isabel, LAZZARETTI, Luisa, WEBER, Raquel, SANTIN, Ana Paula, CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine Comparsi, BENFATO, Mara da S
48. Determinação do perfil de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) em indivíduos traço e falciformes In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2005, Rio de Janeiro.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. , 2005. v.27. p.15 - 15
- MANFREDINI, V., GRIEBELER, Isabel, LAZZARETTI, Luisa, SANTIN, Ana Paula, WEBER, Raquel, CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine Comparsi, BENFATO, Mara da S
49. Determinação do perfil de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) em indivíduos traço e falciformes In: VII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2005, Porto Alegre.
VII Reunião do PPGBCM. , 2005. p.54 - 54
50. GRIEBELER, Isabel, MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, SANTIN, Ana

- Paula, WEBER, Raquel, CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine, BENFATO, Mara S
 Pacientes com Anemia Falciforme apresentam alta atividade da Glutathione Peroxidase In: XVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2005, Porto Alegre.
XVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2005. p.339 - 339
- LAZZARETTI, Luisa, MANFREDINI, V., GRIEBELER, Isabel, SANTIN, Ana Paula, WEBER, Raquel, CASTRO, Simone, WAGNER, Sandrine, BENFATO, Mara da S
51. Pacientes falciformes (HbSS) apresentam níveis significativamente aumentados de vitamina C no soro In: XVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2005, Porto Alegre.
XVII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2005. p.593 - 593
- MANFREDINI, V., LAZZARETTI, Luisa, WEBER, Raquel, SANTIN, Ana Paula, WAGNER, Sandrine Comparsi, CASTRO, Simone, BENFATO, Mara da S
 Trait sickle cell patients (Hb AS) have elevated levels of catalase In: IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2005, Águas de Lindóia.
52. **Satelite Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology.** , 2005. p.118 - 118
- MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, BENFATO, Mara Silveira
 Adaptative response to enhanced basal oxidative damage in sod mutants from *S. cerevisiae* In: XXXIII Reunião Anual da SBBq, 2004, Caxambu.
53. **ANAIS DA XXXIII REUNIÃO ANUAL DA SBBq.** , 2004.
- MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., JORNADA, Denise, SILVA, Andréia Loviane, ZINI, Cláudia, BENFATO, Mara Silveira
54. Atividade antioxidante do óleo volátil de *Baccharis Punctulata* In: XVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2004, PORTO ALEGRE.
XVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2004. p.396 - 396
- MANFREDINI, V., BENFATO, Mara Silveira
55. A indução da glutathione peroxidase (GPx) protege o duplo mutante *sod1sod2* contra danos oxidativos em *S. cerevisiae* In: Caderno de Farmácia
Caderno de Farmácia. Porto Alegre: 2003. v.19. p.46 - 46
- MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, SAFFI, Jenifer, HENRIQUES, João Antonio Pegas, PERALBA, Maria Do Carmo Ruaro, BENFATO, Mara Silveira
56. Ativação de defesas antioxidantes protege os mutantes *sod* de *S. cerevisiae* de dano intracelular In: 49º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2003, ÁGUAS DE LINDÓIA-SP.
ANAIS DO 49 CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA.2003. p.1241 - 1241
- MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, HENRIQUES, João Antonio Pegas, PERALBA, Maria Do Carmo Ruaro, BENFATO, Mara Silveira
57. Dano em lipídio e proteína acionam diferentes mecanismos de defesa em mutantes *sod* de *Saccharomyces cerevisiae* In: V Reunião Anual do Programa de Pós-

- Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2003, Porto Alegre.
V Reunião do PPGBCM., 2003. p.37 - 37
- MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, SAFFI, Jenifer, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, HENRIQUES, João Antonio Pegas, BENFATO, Mara S
58. Double *sod1sod2* mutant have elevated lipid peroxidation and iron levels In: 4 International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, 2003, Florianópolis.
Genetics and Molecular Biology. Florianópolis -SC: , 2003. v.26. p.183 - 183
- MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara Silveira
Níveis elevados de catalase em mutantes *sod* de *S. cerevisiae* em condições de alta
59. aeração In: XV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2003, PORTO ALEGRE.
XV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2003. p.534 - 534
- MANFREDINI, V., SAFFI, Jenifer, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, BENFATO, Mara Silveira
60. Atividade da catalase em mutantes *sod* em *S. cerevisiae* In: XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, 2002, Porto Alegre.
ANAIS DO XI CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR. , 2002. p.113 - 113
- ROEHS, Rafael, LENZI, Cassius Frosi, MANFREDINI, V., BENFATO, Mara Silveira, HENRIQUES, João Antonio Pegas, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, SAFFI, Jenifer
61. Glutathione levels of SOD deficient *S. cerevisiae* strains after H₂O₂ treatment In: XI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, 2002, Porto Alegre.
ANAIS DO XI CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR. , 2002. p.172 - 172
- MANFREDINI, V., SAFFI, Jenifer, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, HENRIQUES, João Antonio Pegas, BENFATO, Mara Silveira
62. Glutathione peroxidase (GPx) protect the *sod1sod2* mutant in *Saccharomyces cerevisiae* In: XXXI Reunião Anual da SBBq, 2002, Caxambu.
ANAIS DA XXXI REUNIÃO ANUAL DA SBBq. , 2002. p.227 - 227
- MARTINS, Vanessa Duarte, MANFREDINI, V., HENRIQUES, João Antonio Pegas, BENFATO, Mara Silveira
63. Indução da Catalase nos mutantes *sod* de *Saccharomyces cerevisiae* em condições de alta aeração In: XIV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2002, Porto Alegre.
XIV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2002. p.417 - 417
- MANFREDINI, V., SAFFI, Jenifer, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, BENFATO, Mara Silveira
64. Resistência do mutante *sod2* de *S. cerevisiae* ao tratamento com Hidroperóxido de T-BOOH In: XIV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2002, Porto Alegre.
XIV SALÃO DE INICIAÇÃO DA UFRGS. , 2002. p.418 - 418
65. MANFREDINI, V., SAFFI, Jenifer, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, BENFATO,

Mara S

Atividade da Catalase em mutantes *sod* de *Saccharomyces cerevisiae* In: XIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS, 2001, PORTO ALEGRE - RS.

XIII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS. , 2001. p.354 - 354

MANFREDINI, V., ROEHS, Rafael, LENZI, Cassius Frosi, SAFFI, Jenifer, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, BENFATO, Mara S

66. Inter-relação entre as diferentes defesas antioxidativas em *Saccharomyces cerevisiae* In: MUTAGÊNESE 2001, NOVOS HORIZONTES NA PROTEÇÃO .A VIDA, 2001, GRAMADO - RS.

ANAIS DO CONGRESSO MUTAGÊNESE 2001. , 2001. p.86 - 86

MANFREDINI, V., ROEHS, Rafael, LENZI, Cassius Frosi, SAFFI, Jenifer, RAMOS, Ana Ligia Lia de Paula, BENFATO, Mara Silveira

67. Inter-relação entre as diferentes defesas antioxidativas em *Saccharomyces cerevisiae* In: III Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2001, Porto Alegre.

III Reunião do PPGBCM. , 2001. p.46 - 46

MANFREDINI, V., HAESER, A., VIVIAN, L., CARVALHO, N., SILVA, S., PAZ, A., PAIXAO, D., SILVA, C., SILVA, K. L.

68. Enteroparasitoses em escolares da periferia de Cachoeirinha-RS In: XII SALAO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UFRGS, 2000, PORTO ALEGRE - RS.

XII SALAO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UFRGS. , 2000. p.50 - 50

Produção Técnica

Demais produções técnicas

MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, BENFATO, Mara S

1. **Anemia falciforme: um problema de saúde pública**, 2006. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

MANFREDINI, V., MARTINS, Vanessa Duarte, BENFATO, Mara S

2. **Dietoterapia na Anemia Falciforme**, 2006. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e Supervisões concluídas



(Orientações de teses e dissertações coincidentes com informações na base CAPES, a partir do ano de 1996)

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

Joana Stumpf. **Tratamento farmacológico da Hanseníase e seus estados**

1. **reacionais**. 2007. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
2. Natiele Carine Coffferri. **Análise dos níveis séricos de ferro total e ferritina em**

- pré-adolescentes de entidades sociais do Município de Erechim/RS.** 2006. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
3. Marília Paula Dall Alba. **Avaliação do dano oxidativo em proteínas eritrocitárias e plasmáticas de indivíduos traço (HbAS) e falciforme (HbSS).** 2006. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 4. Luciani Polidoro. **Correlação entre hemoglobina glicada e glicemia de jejum de pacientes com Diabetes Melitus.** 2006. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 5. Dariele Alves Moreira. **Prevalência e fatores associados à ocorrência de Meningite Bacteriana na Região do Alto Uruguai, RS.** 2006. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 6. Carla Caprini Totti. **Prevalência e fatores associados à ocorrência de Meningite Viral entre adultos jovens na Região do Alto Uruguai, RS.** 2006. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 7. Daniele Paula Simon. **Alterações Hematológicas e Morfocitológicas em Amostras de Fluidos Biológicos de Trabalhadores Supostamente Contaminados por Metais em uma Empresa do Distrito Industrial na Cidade de Erechim (RS).** 2005. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
 8. Caciano Elonir Rosa. **Avaliação do perfil antioxidante do extrato clorofórmico das plantas *Valeriana glechomifolia* e *Valeriana tajuensis*.** 2005. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Orientação de outra natureza

1. Lidiana Biasi. **Monitoria da disciplina de Biofísica para o Curso de Farmácia e Fisioterapia.** 2007. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
2. Roberta Treméa. **Monitoria da disciplina de Biofísica para o Curso de Farmácia e Fisioterapia.** 2007. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
3. Aline Rempel. **Monitoria da disciplina de Fisiologia Geral para o Curso de Farmácia.** 2007. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
4. Graziela Dartora. **Monitoria da disciplina de Fisiologia Geral para o Curso de Farmácia.** 2007. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
5. Andressa Tanise Vooss. **Monitoria da disciplina de Fisiologia Geral para o Curso de Farmácia.** 2007. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade

Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

6. Graziela Dartora. **Monitoria da disciplina de Genética Básica aplicada à Farmácia para o Curso de Farmácia.** 2007. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
7. Aline Rempel. **Monitoria da disciplina de Genética Básica aplicada à Farmácia para o Curso de Farmácia.** 2007. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
8. Natiele Carine Coffferri. **Monotoria da disciplina de Genética Molecular em Análises Clínicas para o Curso de Farmácia.** 2007. Orientação de outra natureza (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
9. Samile Fernanda Sesse. **Monitoria da disciplina de Fisiologia Geral para o Curso de Farmácia.** 2006. Orientação de outra natureza - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
10. Fernanda Hall Sbardelotto. **Monitoria da disciplina de Fisiologia Geral para o Curso de Farmácia.** 2006. Orientação de outra natureza - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
11. Mônica Peliser. **Monitoria da disciplina de Fisiologia Geral para o Curso de Farmácia.** 2005. Orientação de outra natureza - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
12. Carlise Taufer. **Monitoria da disciplina de Fisiologia Geral para o Curso de Farmácia.** 2005. Orientação de outra natureza - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Orientações e Supervisões em andamento



(Orientações de teses e dissertações coincidentes com informações na base CAPES, a partir do ano de 1996)

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Jaíne Bruschi. **Alterações na hemostasia em pacientes com Anemia Falciforme.** 2007. Monografia (Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia) - Universidade de Passo Fundo
2. Talita Zanatta. **Comparação entre métodos laboratoriais no diagnóstico de Doenças Falciformes.** 2007. Monografia (Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia) - Universidade de Passo Fundo

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Fernanda Hall Sbardelotto. **Análise das alterações hematológicas em mulheres com câncer de mama tratadas com quimioterapia.** 2007. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

- Samile Fernanda Sesse. **Análise hematológica e bioquímica de pacientes com insuficiência renal crônica**. 2007. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
- Eduardo Mottin. **Deteção de dano no DNA leucocitário causado por extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia***. 2007. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
- Josiane Oro. **Genotoxicidade *in vitro* de *Mikania laevigata***. 2007. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
- Mirian Kuhn. **Perspectivas no tratamento farmacológico da Leucemia Mielóide Aguda**. 2007. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
- Rita de Cássia Ródio. **Prevalência de infecções cérvico-vaginais em mulheres detectadas através da coloração de Papanicolaou**. 2007. Curso (Farmácia Bioquímica Clínica) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 04/12/2007 às 13:12:16.

