



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

Tese de Doutorado

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE
MOLÉCULAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE
OXIDATIVO NA DOENÇA FALCIFORME:
ASSOCIAÇÃO COM DADOS HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E FENOTÍPICOS**

JOELMA FIGUEIREDO MENEZES

Salvador – Bahia - Brasil
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE MOLÉCULAS ASSOCIADAS
AO ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA FALCIFORME: ASSOCIAÇÃO COM
DADOS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FENOTÍPICOS

JOELMA FIGUEIREDO MENEZES

Orientadora: Profa. Dra. MARILDA DE SOUZA GONÇALVES

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia
como requisito para obtenção
do Grau de Doutor em Patologia
Experimental

Salvador – Bahia - Brasil

2010

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M541e Menezes, Figueiredo Joelma
Estudo de polimorfismos em genes de moléculas associadas ao estresse oxidativo na
doença falciforme: associação com dados hematológicos, bioquímicos e fenotípicos.
[manuscrito] / Joelma Figueiredo Menezes. - 2010.
248f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia)

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo
Moniz, 2010.

Orientadora: Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves.

1. Doença falciforme. 2. *Anemia falciforme*. 3. *Polimorfismo*. 4. Haplótipos. 5.
Glutathione S-transferase. 6. Paraoxonase. 7. Hemocromatose I. Título.

CDU 616.15:631.528.1

**“ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE MOLÉCULAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE
OXIDATIVO NA DOENÇA FALCIFORME: ASSOCIAÇÃO COM DADOS HEMATOLÓGICOS
BIOQUÍMICOS E FENOTÍPICOS.”**

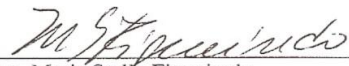
JOELMA FIGUEIREDO MENEZES

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



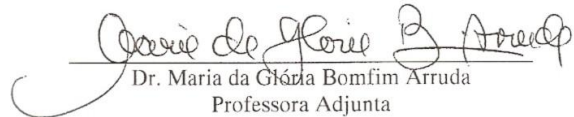
Dr. Paulo Roberto Santana de Melo
Professor Adjunto
UESC



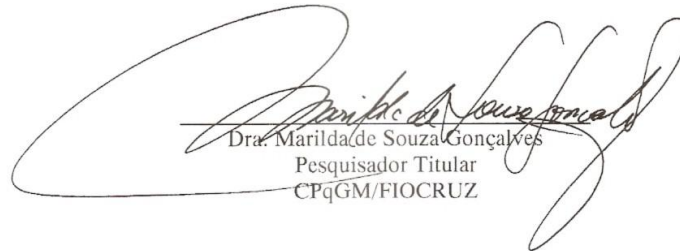
Dra. Maria Stella Figueiredo
Professora Associada
UNIFESP



Dra. Maria Lourdes Farre Vallve
Assistente de Pesquisa
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Maria da Glória Bomfim Arruda
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ

“Confio, em teu poder, e em tua
bondade, em Ti confio com filialidade.
Confio cegamente em toda a situação,
Mãe, no teu Filho e na tua Proteção”

Pe. José Kentenich

AGRADECIMENTOS

- ◆ A Deus pelo dom da vida e por permitir realizar meus sonhos;
- ◆ A minha família, meu pai Valmir, minha querida, amada e eterna avó Albertina, meus irmãos Jaqueline, Jacson e Jorgemir e meu noivo Gersoney pelo apoio, paciência e por acreditar no meu potencial;
- ◆ A minha orientadora e amiga Marilda de Souza Gonçalves, pela confiança, orientação, amizade, carinho, compreensão e por todos os conhecimentos transmitidos. Dedicção ilimitada;
- ◆ Ao Professor Mitermayer Galvão dos Reis, pela colaboração dispensada como chefe do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, proporcionando a realização dos experimentos;
- ◆ Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Patologia FIOCRUZ / UFBA, pela dedicação e atenção dispensadas;
- ◆ Aos colegas do LPBM, LPA e Parasitologia pelos momentos compartilhados ao longo dos anos;
- ◆ Aos colegas de equipe Elisângela Adorno, Cynara Barbosa, Cyntia Cajado, Luciano César, Nadja Gonçalves, Magda Seixas, Wendel Vilas Boas, Bruno Cerqueira, José Pereira, Silvana Paz, Ana Paula Menezes, Marcos Dourado, Elder Damasceno pela amizade e apoio;
- ◆ Às colegas de equipe Larissa Rocha e Magda Oliveira Seixas pelo apoio na fase de coleta das amostras e de coleta de dados;
- ◆ Aos funcionários do Laboratório de Pesquisas em Anemia ATGC da Faculdade de Farmácia / UFBA. Mari Ney Tavares, Jean Tadeu, e às

estudantes Geisa e Raira pelo auxílio na realização das Técnicas de HPLC;

- ◆ Aos funcionários do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) / FIOCRUZ, pela compreensão e amizade dispensados;
- ◆ Aos funcionários da Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ, especialmente a Ana Fiscina Sampaio e Adelvani de Araújo, pela organização das referências bibliográficas;
- ◆ A Fundação de hematologia e hemoterapia da Bahia (HEMOBA), em especial às médicas hematologistas Valma Lopes, Ângela Zanette, Isa Lyra e Larissa Rocha pela disponibilização dos prontuários médicos e à equipe de enfermagem e apoio do ambulatório, pela ajuda na coleta de dados e das amostras de sangue;
- ◆ Às professoras de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFBA Neci Matos e Márcia Teixeira pelo apoio e compreensão e aos estudantes Carlos Adriano e Joelma Nascimento pelo apoio e ajuda nos momentos difíceis;
- ◆ Aos portadores de doença falciforme e seus responsáveis, que concordaram em participar deste trabalho.

RESUMO

ESTUDO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE MOLÉCULAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA FALCIFORME: ASSOCIAÇÃO COM DADOS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FENOTÍPICOS.

JOELMA FIGUEIREDO MENEZES

Introdução. Indivíduos com doença falciforme (DF) apresentam estresse oxidativo (EO) constante, que é decorrente da deficiência nos sistemas antioxidantes, caracterizados pela produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) de origem multifatorial, principalmente geradas pelo processo hemolítico. **Objetivo.** Investigar polimorfismos relacionados ao estresse oxidativo nos genes *HFE* da hemocromatose hereditária (c.282C>Y, c.63H>D e c.65S>C); *haptoglobina* (*HP*), *glutathione S-transferase* (*GST*) (*GSTT1* e *GSTM1*) e *paraoxonase* (*PON1*) (c.55L>M e c.192Q>R), associando-os aos dados hematológicos e bioquímicos, aos níveis séricos de vitamina C, paraoxonase 1 e receptor de transferrina e histórico clínico de pacientes com doença falciforme. **Casística e Métodos.** A casística foi composta por 153 indivíduos com DF (HbSS e HbSC) e 196 crianças saudáveis. O perfil de hemoglobinas foi determinado por HPLC. Os polimorfismos nos genes *HFE*, *HP*, *GST*, *PON1*, a presença da talassemia alfa 3,7Kb e 4,2Kb e dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta foram investigados por PCR e PCR-RFLP. A avaliação do perfil lipídico, hepático, função renal, inflamatório e metabolismo do ferro foram realizadas por técnicas espectrofotométricas. Os níveis séricos de vitamina C, receptor de transferrina solúvel e hemeoxigenase 1 total foram detectados por ELISA. **Resultados.** O estudo de polimorfismos no gene da *GST* demonstrou que o genótipo *Mu nulo* foi o mais frequente em ambos os grupos estudados; a análise hematológica, nos indivíduos HbSS revelou diferença significativa para os parâmetros de leucócitos ($p=0,0452$), de segmentados neutrófilos ($p=0,0224$) e o evento de STA ($p=0,0423$); nos indivíduos com DF foram encontradas diferenças para a uréia ($p=0,0288$) e ferritina ($p=0,0316$). No estudo do gene da *Haptoglobina* nos indivíduos com DF encontrou-se diferença significativa para contagem de reticulócitos ($p=0,0167$), ferritina sérica ($p=0,0493$); contagem de linfócitos típicos ($p=0,0422$) e LDH ($p=0,0181$); nos HbSS encontrou-se diferença para creatinina ($p=0,0178$) e ALT ($p=0,0127$). Para o gene *HFE* foi encontrada diferença significativa entre os alelos selvagem e mutante para o polimorfismo c.63H>D e contagem de plaquetas ($p=0,0311$) em indivíduos com DF; para o polimorfismo c.65S>C observou-se diferenças estatisticamente significativas para hemoglobina ($p=0,0044$) e hematócrito ($p=0,0078$). Nos HbSC para o polimorfismo c.63H>D observou-se entre os alelos selvagem e mutante diferenças significativas com o VCM ($p=0,0032$), HCM ($p=0,0010$) e linfócitos típicos ($p=0,0242$). Entre os indivíduos HbSS observou-se diferença significativa entre os alelos estudados e plaquetas ($p=0,0078$). Para a mutação c.65S>C observou-se diferenças significativas para os parâmetros de hemoglobina ($p=0,0265$) e hematócrito ($p=0,0407$) nos indivíduos HbSS e hemoglobina ($p=0,0051$) e hematócrito ($p=0,0060$) nos indivíduos HbSC. A análise do histórico clínico dos indivíduos com DF e o polimorfismo c.63H>D demonstrou diferença significativa para esplenomegalia, OR=3,38 (0,93 -12,22) e $p=0,0402$. Nos indivíduos HbSS foi encontrada diferença significativa entre os alelos c.63H>D e infecção, com OR=0,29 (0,07 -1,18) e $p=0,0455$. Para o gene *PON1*, a avaliação da atividade da PON1 nos indivíduos DF entre os alelos selvagem e mutante revelou diferença estatisticamente significativa, tendo o alelo selvagem maior atividade da PON1 que alelo mutante; para o polimorfismo *PON1*c.192Q>R observou-se entre os alelos selvagem e mutante diferenças significativas para as variáveis bioquímicas VLDL-C ($p=0,0267$) e triglicérides ($p=0,0127$). Nos HbSC verificou-se diferença estatística significativa para o *PON1*c.192Q>R e concentração de hemoglobina ($p=0,0459$), hematócrito ($p=0,0225$) e contagem de linfócitos típicos ($p=0,0364$). Para o *PON1*c.55L>M observou-se diferença significativa com a idade ($p=0,0139$), plaquetas ($p=0,0109$), creatinina ($p=0,0329$) e PCR ($p=0,0141$). Observou-se associação entre atividade da PON1 e esplenectomia ($p=0,001$); para hemeoxigenase e ferro sérico ($p=0,023$); e para vitamina C observamos correlação com

colesterol HDL ($p=0,037$). Há correlação entre glutatona e vitamina C ($p=0,035$). **Conclusões:** Os polimorfismos estudados podem estar agindo sinergicamente com a hemoglobina variante S e assim influenciar na gravidade da doença, necessitando de outros estudos para validar estes resultados, uma vez que algumas destas investigações foram realizadas pela primeira vez neste grupo de indivíduos.

Palavras chaves: Doença falciforme, anemia falciforme, polimorfismos, Haplotipos, glutatona S-transferase, Paraoxonase; Hemocromatose.

ABSTRACT

STUDY OF GENES POLYMORPHISMS IN MOLECULES ASSOCIATED WITH OXIDATIVE STRESS IN SICKLE CELL DISEASE: ASSOCIATION WITH DATA HEMATOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND PHENOTYPE. JOELMA FIGUEIREDO MENEZES.

Introduction: Patients with sickle cell disease (SCD) has continued oxidative stress (OS), which is resulting from ineffective antioxidant systems, characterized by production of reactive oxygen species (ROS) of multifactorial origin, mainly generated by the hemolytic process. **Objective:** To investigate polymorphism related to oxidative stress in hereditary hemochromatosis *HFE* gene (c.282C>Y, c.63H>D c.65S and D>C), *haptoglobin* (*HP*), *glutathione S-transferase* (*GST*) (*GSTT1* and *GSTM1*) and *paraoxonase* (*PON1*) (c.55L>M and c.192Q>R), in association with the hematological and biochemical data, serum levels of vitamin C, paraoxonase 1, transferrin receptor and clinical manifestations of SCD patients. **Methods.** The sample included 153 individuals with SCD (HbSS and HbSC) and 196 healthy children. The profile of hemoglobin was determined by HPLC. The *HFE* gene polymorphisms, *HP*, *GST*, *PON1*, the presence of alpha thalassemia ^{3.7 Kb}, ^{4.2 Kb} and haplotypes of the beta gene cluster were investigated by PCR and PCR-RFLP. The lipid profile, liver, renal function, inflammation and iron metabolism was performed by spectrophotometric techniques. Serum levels of vitamin C, soluble transferrin receptor and total hemeoxygenase were investigated by ELISA. **Results:** The *GST Mu null* genotype was more frequent in both groups and both polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. In the HbSS observed significant differences in the parameters of leukocytes ($p = 0.0452$) and segmented neutrophils ($p = 0.0224$) and event STA ($p = 0.0423$). Individuals with SCD had differences for urea ($p = 0.0288$) and ferritin ($p = 0.0316$). Evaluating the *Haptoglobin* gene in individuals with SCD found a significant difference for reticulocyte count ($p = 0.0167$), serum ferritin ($p = 0.0493$); typical lymphocyte count ($p = 0.0422$) and LDH ($p = 0.0181$); in the HbSS were found differences for creatinine ($p = 0.0178$) and ALT ($p = 0.0127$). For the *HFE* gene was found significant differences were observed between wild and mutant alleles for the polymorphism c.63H> D and platelet count ($p = 0.0311$) in individuals with SCD; for polymorphism c.65S> C were differences were statistically significant for hemoglobin ($p = 0.0044$) and hematocrit ($p = 0.0078$). In the HBSC observed significant differences in MCV ($p = 0.0032$), MCH ($p = 0.0010$) and typical lymphocytes ($p = 0.0242$). Among subjects HbSS were observed significant differences between alleles and platelets ($p = 0.0078$). For mutation c.65S> C showed significant differences in the parameters of hemoglobin ($p = 0.0265$) and hematocrit ($p = 0.0407$) in HbSS individuals, and hemoglobin ($p = 0.0051$) and hematocrit ($p = 0.0060$) in subjects HbSC. The analysis of the clinical history of individuals with SCD and polymorphism c.63H> D there was a significant difference for splenomegaly, OR = 3.38 (0.93 -12.22) and $p = 0.0402$. In HbSS individuals significant difference was found between alleles c.63H> D and infection, with OR = 0.29 (0.07 -1.18) $p = 0.0455$. For the *PON1* gene, The activity assessment of *PON1* in the individuals DF with wild and mutant genotypes showed statistically significant differences, the wild-type allele showed higher *PON1* activity than the mutant allele; for the biochemical parameters to polymorphism *PON1*c.192Q> R and the values of VLDL-C ($p = 0.0267$) and triglycerides ($p = 0.0127$). In HbSC there was a statistically significant difference for *PON1*c.192Q> R and hemoglobin ($p = 0.0459$), hematocrit ($p = 0.0225$) and typical lymphocyte count ($p = 0.0364$). For *PON1*c.55L> M there was significant difference with age ($p = 0.0139$), platelets ($p = 0.0109$), creatinine ($p = 0.0329$) and CRP ($p = 0.0141$). There was an association between *PON1* activity and splenectomy ($p = 0.001$) for hemeoxygenase and serum iron ($p = 0.023$), and vitamin C showed a correlation with HDL cholesterol ($p = 0.037$). There is a correlation between glutathione and vitamin C ($p = 0.035$) **Conclusions:** The polymorphisms could be acting synergistically with this hemoglobin variant S, and influence the severity of disease, have been necessary further studies to validate these

results, since some of these investigations were performed for the first time in this group of individuals.

Keywords: Sickle cell disease, sickle cell disease, polymorphisms, haplotypes, glutathione S-transferase, Paraoxonase; hemochromatosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

A1ATS	Alfa 1-antitripsina
AF	Anemia falciforme
ALT	Alanina aminotransferase
ASLO	Anti-streptolisina O
AST	Aspartato aminotransferase
AVC	Acidente vascular cerebral
Ben	Haplótipo Benin
Cadeia L	Cadeia leve
Cadeias H	Cadeia pesada
Cam	Haplótipo Camarões
CAR	Haplótipo Bantu
DF	Doença falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Acido etilenodiaminotetracético sódico
ELISA	Imuno-ensaio enzimático
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Ferro ferroso
Fe ³⁺	Ferro ferrico
GCS	γ - Glutamilcisteína sintetase
GST	Glutathiona S-transferase
<i>GSTM1</i>	Gene Mu da Glutathiona S-transferase
HAMP	Polipeptídeo hepcidina
Hb	Hemoglobina

Hb AS	Heterozigoto para Hb S
Hb D	Hemoglobina D
Hb E	Hemoglobina E
Hb SC	Hemoglobinopatia SC
HbA1	Hemoglobina A1 do adulto
HbA2	Hemoglobina A2 do adulto
HbAC	Heterozigoto para Hb C
HbC	Hemoglobina C
HbCC	Doença da hemoglobina C
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Hemoglobinopatia SS
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HFE	Proteína HFE
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HJV	Proteína hemojuvelina
HO-1	Hemeoxigenase-1
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
HS-40	Sítios hipersensíveis à DNase I
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-6	Interleucina 6
LCR	Região controladora do Locus
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
NF κ β	Fator transcricional Kappa beta

ON	Óxido nítrico
ONS	Óxido nítrico Sintase
O_2^-	Íon superóxido
O_2	Oxigênio moléculas
Paraoxon	O,O-dietil-O-pnitrofenol fosfato
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PCR	Proteína C reativa
PON1	Paraoxonase-1
<i>primers</i>	Seqüência dos oligonucleotídeos sintéticos
Saudi	Haplótipo Saudi
SE	Sequestro esplênico
Sen	Haplótipo Senegal
SLC40A1	Gene ferroportina
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRF2	Receptor de transferrina 2
VCAM	Molécula de adesão vascular
Vit C	Vitamina C

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Tabela 01. Seqüência dos oligonucleotídeos sintéticos (<i>primers</i>), enzimas de restrição e fragmentos gerados após a PCR, utilizados na estratégia de investigação dos polimorfismos gênicos, talassemia e haplótipos da globina β investigados.	88
Tabela 02: Características laboratoriais dos pacientes com DF e controles.....	96
Tabela 03: Análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos nos indivíduos HbSS e HbSC.	98
Tabela 04: Análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos entre os indivíduos HbSS e controles.	99
Tabela 05: Análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos nos indivíduos HbSC e controle.....	100
Tabela 06: Análise dos valores médios para os marcadores bioquímicos nos indivíduos HbSS e controles.	101
Tabela 07: Análise dos valores médios para os marcadores bioquímicos nos indivíduos HbSC e controles.	102
Tabela 08: Análise dos valores médios para os marcadores bioquímicos nos indivíduos HbSS e HbSC.	103
Tabela 09: Distribuição dos <i>haplótipos</i> ligados ao grupo de genes da globina β em indivíduos com DF de acordo com a presença de talassemia.	106

Tabela 10: Histórico das características clínicas apresentadas pelos indivíduos com DF.	111
Tabela 11: Distribuição da freqüência dos polimorfismos nos genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> da <i>Glutathione S-transferase</i> no grupo de indivíduos com DF e controles.....	112
Tabela 12: Análise dos dados hematológicos entre os alelos mutante para o gene da <i>glutathione S-transferase</i> em indivíduos com DF e controles.....	113
Tabela 13: Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSS e HbSC portadores dos alelos mutantes para o gene da <i>glutathione S-transferase</i>	115
Tabela 14: Distribuição do tipo de <i>haplótipo</i> ligado ao grupo de genes da globina β^S nos indivíduos com DF de acordo com o alelo selvagem e mutante para o gene da <i>GST</i>	117
Tabela 15: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas do gene da <i>Hp</i> em Indivíduos com DF e controles	118
Tabela 16: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas de subtipos específicos para o gene <i>Hp</i> em indivíduos com DF e controles.	119
Tabela 17: Distribuição das freqüências genotípicas e alélicas em grupos de alelos específicos para o gene da <i>Hp</i> em indivíduos com DF e controles.	119
Tabela 18: Freqüências genotípicas e alélicas para os polimorfismos c.282C>Y, c.63H>D e c.65S>C no gene da <i>HFE</i> em indivíduos com DF e controles.....	127
Tabela 19: Freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos <i>PON1</i> c.192Q>R e c.55L>M em indivíduos com DF e os controles.	133

Tabela 20: Níveis médios da atividade da <i>PON1</i> nos diferentes genótipos para os polimorfismos c.192Q>R e c.55L>M em indivíduos com DF e controles.	134
Tabela 21: Análise do histórico clínico nos indivíduos com DF em relação aos percentis 25 e 75 para os valores de contagem de reticulócitos.	142
Tabela 22: Análise do histórico de eventos clínicos nos indivíduos com DF em relação aos percentis 25 e 75% para contagem de leucócitos.	143
Tabela 23: Análise do histórico clínico nos indivíduos com DF em relação aos percentis 25 e 75% para os valores de ferritina.	144
Tabela 24: Modelos de análise multivariada tendo hospitalização como variável dependente.	148
Tabela 25: Modelos de análise multivariada tendo litíase biliar como variável dependente.....	149
Tabela 26: Modelos de análise multivariada tendo pneumonia como variável dependente.	149
Tabela 27: Modelos de análise multivariada tendo seqüestro esplênico como variável dependente.	150
Tabela 28: Modelos de análise multivariada tendo infecção como variável dependente.	151
Tabela 29: Modelos de análise multivariada tendo uso de transfusão sangüínea como variável dependente.....	151

LISTA DE FIGURAS

1.0 A molécula de hemoglobina A1. Cada cadeia da hemoglobina possui em seu interior o grupo heme que contém o átomo de ferro. Adaptado do Manual de oficina prática de genética , genoma e biotecnologia, 2004.	30
2.0 Representação esquemática da expressão dos genes da globina e principais sítios de produção durante os diferentes períodos do desenvolvimento ontogênico humano. Adaptado de STEINBERG, 2001.	31
3.0 Representação esquemática da organização do complexo de genes das globinas alfa e beta. HS-40: região controladora no grupo de genes alfa (HS- <i>High Sensibility</i>); LCR: região controladora do locus, no grupo de genes beta (LCR – <i>Locus control Region</i>). HS-1: sítio hipersensível da LCR localizado a 10 Kb do gene ϵ (<i>épsilon</i>). Adaptado de SCHECHTER, 2008.	33
4.0 Figura 04. Frequências do gene β^S em diferentes regiões do Brasil. Adaptado de CANÇADO & JESUS, 2007.	39
5.0 A- Distribuição geográfica dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S na África e regiões do Oriente Médio. B- Sequências de polimorfismos gênicos localizados no cromossomo 11, com o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição. Adaptado de Stuart & Nagel, 2004.	50
6.0 Contribuição da hemólise para a fisiopatologia da anemia falciforme pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico. Adaptado de KATO <i>et al.</i> , 2006.	52

7.0 Representação esquemática do metabolismo do ferro e dos genes envolvidos na gênese da Hemocromatose hereditária.	59
8.0 Representação esquemática do mecanismo de regulação da hemoglobina livre no plasma.	64
9.0 Representação esquemática das diferenças estruturais entre os fenótipos de Haptoglobina (Behring Diagnostics, Liederbach, Germany).	65
10.0 Paraoxonase 1 sérica associada ao HDL- C é a segunda linha de defesa, após os antioxidantes, contra a peroxidação lipídica de lipoproteínas (LDL-C e HDL-C), AVIRAM <i>et al.</i> , 2009.	70
11.0 Desenho experimental do estudo	83
12.0 Distribuição dos <i>haplótipos</i> ligados ao grupo de genes da globina β^S em indivíduos com HbSS e HbSC.	104
13.0 Frequência de talassemia $\alpha^{3,7Kb \text{ e } 4,2 Kb}$ em indivíduos com DF.	105
14.0 Figura 13. Análise dos dados hematológicos nos indivíduos com DF e alelos selvagem e mutante para a talassemia alfa $^{3,7 Kb \text{ e } 4,2 Kb}$. A) Valores de VCM e alfa talassemia; B) Valores de HCM e alfa talassemia ; C) Valores médios da concentração de HbS e alfa talassemia; D) Contagem de eosinófilos e alfa talassemia.	108
Figura 15. Análise dos dados bioquímicos entre os indivíduos com DF com os alelos selvagem e mutante para a talassemia alfa $^{3,7 Kb \text{ e } 4,2 Kb}$. A) Valores médios de colesterol VLDL e alfa talassemia; B) Valores médios de triglicerídeos e alfa	

talassemia; C) Valores médios de AST e alfa talassemia; D) Valores médios de ALT e alfa talassemia.	109
16.0 Análise dos dados hematológicos entre os <i>haplótipos</i> CAR/BEN e CAR/CAR e CAR/CAR e BEN/BEN ligados ao grupo de genes da globina β em indivíduos com DF. A) Análise da contagem de linfócitos típicos e haplótipos CAR/BEN e CAR/CAR; B) análise da contagem de plaquetas e haplótipo CAR/CAR e BEN/BEN; C) Análise da concentração de HbF e e haplótipo CAR/CAR e BEN/BEN; D) Análise da concentração de HbS e haplótipo CAR/CAR e BEN/BEN.	110
17.0 Análise dos níveis séricos de AST os haplótipos CAR/BEN e CAR/CAR ligados ao grupo de genes da globina β^S em indivíduos com DF.	110
18.0 Análise da contagem global de leucócitos e de segmentados neutrófilos em indivíduos HbSS portadores dos alelos selvagem e mutante para o gene da <i>GST</i>	116
19.0 Análise das variáveis bioquímicas em indivíduos com DF e portadores dos alelos selvagem e mutante para o gene da <i>Glutathione S-transferase</i> . A: Níveis séricos de uréia; B: Níveis séricos de ferritina; e em C: Níveis séricos de Proteína C reativa em indivíduos HbSS.	116
20.0 Análise da percentagem de reticulócitos e diferentes genótipos no gene da <i>Hp</i> em indivíduos com DF.	120
21.0 Análise dos níveis séricos médios de LDH e diferentes genótipos no gene da <i>Hp</i> em indivíduos com DF.	121

22.0 Análise da percentagem de reticulócitos e diferentes alelos para o gene da <i>Hp</i> em indivíduos com DF.	122
23.0 Análise dos níveis médios de creatinina e diferentes alelos para o gene da <i>Hp</i> em indivíduos com DF.	122
24.0 Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSS portadores de diferentes genótipos para os alelos do gene da <i>haptoglobina</i> . A: Análise com a contagem de linfócitos típicos e <i>Hp</i> ; B: Análise com a percentagem de reticulócitos e <i>Hp</i>	123
25.0 Análise dos níveis séricos de creatinina em indivíduos HbSS portadores de diferentes alelos para o gene da <i>Hp</i>	124
26.0 Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSC com diferentes alelos do gene da <i>haptoglobina</i> . A: Análise da contagem de linfócitos típicos e <i>Hp</i> ; B: Análise da concentração de hemoglobina e <i>Hp</i> ; C: Análise do hematócrito e <i>HP</i> ; D: Análise da contagem de plaquetas e <i>Hp</i>	125
27.0 Análise dos dados bioquímicos em indivíduos HbSC e diferentes genótipos do gene da <i>Hp</i> . Análise dos níveis da PCR e genótipo no gene <i>HP</i>	126
28.0 Análise dos dados hematológico de plaquetas e genótipos para o polimorfismo gênico c.63H>D no gene <i>HFE</i> nos grupos estudados: DF, HbSS, HbSC e controles.	128
29.0 Análise dos dados hematológico nos indivíduos com DF e genótipos selvagem e mutante para o polimorfismo c.65S>C. A) Análise dos valores médios da concentração de hemoglobina nos genótipos selvagem e mutante para o gene	

<i>HFE</i> ; B) Análise da percentagem do hematócrito nos genótipos selvagem e mutante para o gene <i>HFE</i>	129
30.0 Análise dos dados hematológico e genótipos para o polimorfismo c.63H>D em indivíduos HbSC. A) A análise do VCM e <i>HFE</i> ; B: Análise da contagem de linfócitos típicos e <i>HFE</i> ; C: Análise do HCM e <i>HFE</i>	130
31.0 Análise dos dados hematológicos para as variáveis hemoglobina e hematócrito e genótipos para o polimorfismo <i>HFE</i> c.65S>C em indivíduos HbSS.	131
32.0 Análise dos dados hematológicos para as variáveis hemoglobina e hematócrito e genótipos para o polimorfismo c.65S>C em indivíduos com HbSC.	131
33.0 Análise dos dados bioquímicos em indivíduos HbSS e HbSC. A) Análise dos níveis séricos de proteínas totais em indivíduos HbSS; B) Ferro sérico em indivíduos HbSC para o polimorfismo <i>HFE</i> c.63H>D.	132
34.0 Análise da atividade da <i>PON1</i> nos indivíduos com DF e controles.	135
35.0 Análise da atividade média da <i>PON1</i> nos diferentes genótipos para os polimorfismos c.192Q>R e c.55L>M nos indivíduos com DF e controles	135
36.0 Análise da atividade da <i>PON1</i> nos indivíduos com DF e controles portadores dos alelos selvagem e mutante para os polimorfismos <i>PON1</i> c.55L>M e c.192Q>R.	135

37.0 Análise dos níveis séricos de colesterol VLDL e triglicédeos em indivíduos com DF e portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo <i>PON1</i> c.192Q>R.	136
38.0 Análise da atividade da <i>PON1</i> nos indivíduos HbSS e portadores dos alelos selvagem e mutante para mutação c.192Q>R no gene da <i>PON1</i>	137
39.0 Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSC portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo <i>PON1</i> c.192Q>R . A) Concentração média de hemoglobina; B) Valores médios de hematócrito; C) Contagem de linfócitos típicos. * Teste de Mann-Whitney.	138
40.0 Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSC portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo <i>PON1</i> m c.55L>M.	139
41.0 Análise dos dados bioquímicos em indivíduos HbSC portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo <i>PON1</i> m c.55L>M.	141
42.0 Análise da contagem de plaquetas em indivíduos HbSS portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo <i>PON1</i> c.55L>M.	140
43.0 Análise dos níveis séricos de variáveis bioquímicos nos indivíduos com HbSC e portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo <i>PON1</i> c.55L>M. A: Análise dos níveis séricos de creatinina; B: Análise dos níveis séricos de Bilirrubina direta; C: Análise dos nível séricos de albumina.	141
44.0 Correlação entre os diferentes genótipos no gene da <i>HP</i> e a atividade da <i>PON1</i> em indivíduos DF.1) Genótipo2-2; 2) Genótipo 2-F; 3) Genótipo 2-S; 4) Genótipo SS; 5) Genótipo SF e 6) Genótipo FF.	145

45.0 Correlação entre atividade da paraoxonase e a variável globulina sérica e entre hemeoxigenase e atividade da paraoxonase com ferro sérico em indivíduos com DF.	145
46.0 Análise do histórico clínico dos indivíduos com DF e as dosagens de atividade da paraoxonase e Receptor de transferrina	146
47.0 Análise dos níveis séricos de vitamina C nos grupos selvagem e mutante para a GST em indivíduos DF.	147

LISTA DE QUADROS

1.0 Alterações moleculares relacionadas à fisiopatologia da hemocromatose hereditária (HH).	59
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
δ	Delta
E	Épsilon
Z	Zeta
Γ	Gama
$\overset{G}{\gamma}$	Gama G
$\overset{A}{\gamma}$	Gama A
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE SÍMBOLOS

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	A molécula de hemoglobina	30
1.2	Hemoglobinopatias	33
1.2.1	Hemoglobinopatia SC	35
1.2.2	Hemoglobinopatia SS	36
1.3	Anemia Falciforme	37
1.4	Epidemiologia da hemoglobina S	38
1.5	Manifestações clínicas da anemia falciforme	40
1.6	Fatores moduladores da anemia falciforme	45
1.6.1	Talassemia alfa	46
1.6.2	Hemoglobina fetal	47
1.6.3	Haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S	48
1.7	Óxido nítrico	51
1.7.1	O estado inflamatório na anemia falciforme	53
1.8	Estresse oxidativo	54
1.9	Hemocromatose hereditária	57
2.0	Haptoglobina	62
2.1	<i>Glutathione S-transferase</i>	66
2.2	Paraoxonase	69
2.3	Hemeoxigenase	71
3.0	OBJETIVOS	74
3.1	Objetivo geral	75
3.2	Objetivos específicos	75
4.0	JUSTIFICATIVA	78
5.0	CASUÍSTICA	81
6.0	MÉTODOS	84
6.1	Coleta das amostras de sangue	85
6.2	Análises hematológicas e de hemoglobinas	85
6.2.1	Celularidade	85
6.2.2	Confirmação do perfil de hemoglobinas	86
6.3	Análise molecular	86
6.3.1	Extração de DNA	86
6.3.2	Investigação dos polimorfismos gênicos	87
6.4	Análises bioquímicas	90
6.5	Determinação da vitamina C	90
6.6	Determinação da atividade da paraoxonase	91
6.7	Determinação do receptor de transferrina solúvel	91
6.8	Determinação da Hemeoxigenase 1 Total	92
6.9	Análises estatísticas	92
7.0	RESULTADOS	94
7.1	Caracterização hematológica e bioquímica dos pacientes com DF	95

7.2	Características clínicas dos pacientes com DF	111
7.3	Investigação de polimorfismos em genes de moléculas associadas ao estresse oxidativo	112
7.3.1	Polimorfismos no gene da Glutathione S-transferase	112
7.3.2	Haptoglobina	118
7.3.3	Polimorfismos c.282C>Y e c.63H>D no gene HFE da hemocromatose hereditária	127
7.3.4	Gene da paraoxonase. Polimorfismos c.192Q>R e c. 55L>M	132
8.0	DISCUSSÃO	152
8.1	Polimorfismos c.282C>Y e c.63H>D no gene HFE da hemocromatose hereditária	160
8.2	Polimorfismos no gene da haptoglobina	161
8.3	Polimorfismos no gene da <i>GST</i>	163
8.4	Polimorfismos c.192Q>R e c. 55L>M no gene da paraoxonase.	165
9.0	CONCLUSÕES	170
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
	APÊNDICES	
	ANEXOS	

INTRODUÇÃO

1.1. A MOLÉCULA DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular composta por quatro subunidades formadas pela porção proteica (globina) associada ao grupo prostético denominado heme, caracterizado pela presença do átomo de ferro ligado a protoporfirina IX (Figura 01). A hemoglobina é responsável pela absorção, transporte e distribuição do oxigênio para os diversos tecidos do organismo e pelo transporte de parte do CO₂ (ANTONARAKIS,1985; WEATHERALL & PROVAN, 2000; LEHNINGER & COX, 2006).

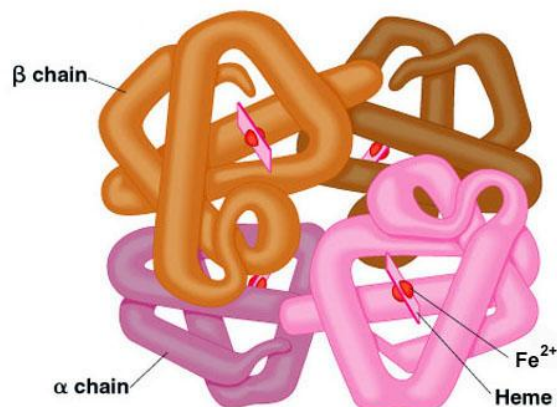


Figura 01. A molécula de hemoglobina A1. Cada cadeia de hemoglobina possui em seu interior um radical heme que contém um átomo de ferro. [HTTP://themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org)

As cadeias globínicas podem ser de seis tipos, sendo denominadas pelas letras gregas α (alfa), β (beta), δ (delta), ε (épsilon), ζ (zeta) e γ (gama) e agrupadas duas a duas de acordo com o tipo de hemoglobina. A síntese de cada

cadeia é controlada por genes distintos, que são expressos sequencialmente durante o desenvolvimento ontogênico normal do indivíduo adulto (Figura 02). Os genes do grupo α (α e ζ) estão agrupados no braço curto do cromossomo 16 (16p 13.3) e os genes do grupo β (β , δ , ϵ , γ) estão localizados no braço curto do cromossomo 11 (11p 15.5) (ZAGO *et al.*, 2004; WENNING & SONATI, 2007; SONATI & COSTA, 2008).

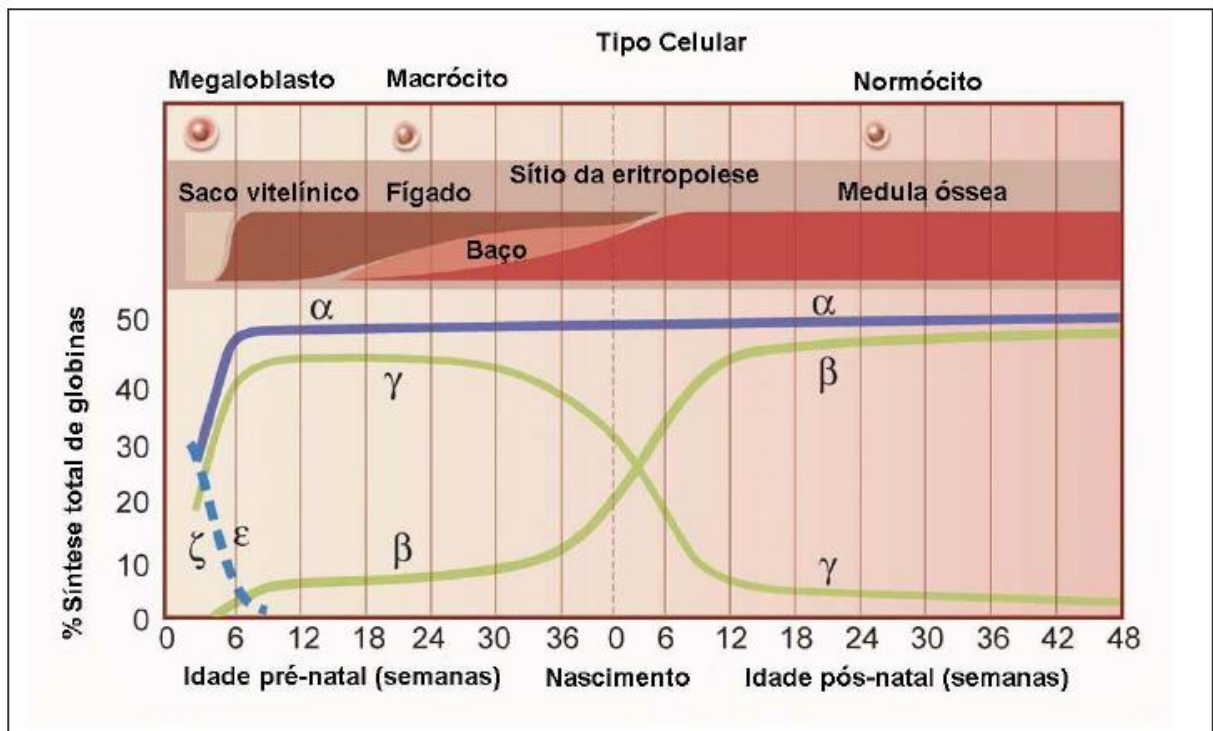


Figura 02. Representação esquemática da expressão dos genes da globina e principais sítios de produção durante os diferentes períodos do desenvolvimento ontogênico humano. Adaptado de STEINBERG, 2001.

A regulação da expressão dos genes da globina envolve mecanismos de ativação e desativação ainda não completamente esclarecidos; a interação de fatores transcricionais; a participação de sequências regulatórias denominadas de

região controladora do Locus (*LCR*) do grupo de genes β e formados por sítios hipersensíveis à DNase I (HS-40) no grupo de genes α ; sequências *cis* que atuam na regulação da transcrição e fatores trans eritróides ou não-eritróides (Figura 03) (STEINBERG, 1995; NAGEL & STEINBERG, 2001; STAMATOYANNOPOULOS, 2005).

Durante o desenvolvimento ontogênico humano são identificados diferentes tipos de Hb. No período embionário observamos a presença das Hbs Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\gamma_2\zeta_2$); a Hb fetal (HbF) ($\alpha_2\gamma_2$) é a predominante no período fetal, sendo encontrada em pequenas concentrações (<2%) na vida adulta. Além da HbF, as hemoglobinas A1 ($\alpha_2\beta_2$) e a A2 ($\alpha_2\delta_2$) estão presentes na vida adulta (NAGEL & STEINBERG, 2001) (Figura 03).

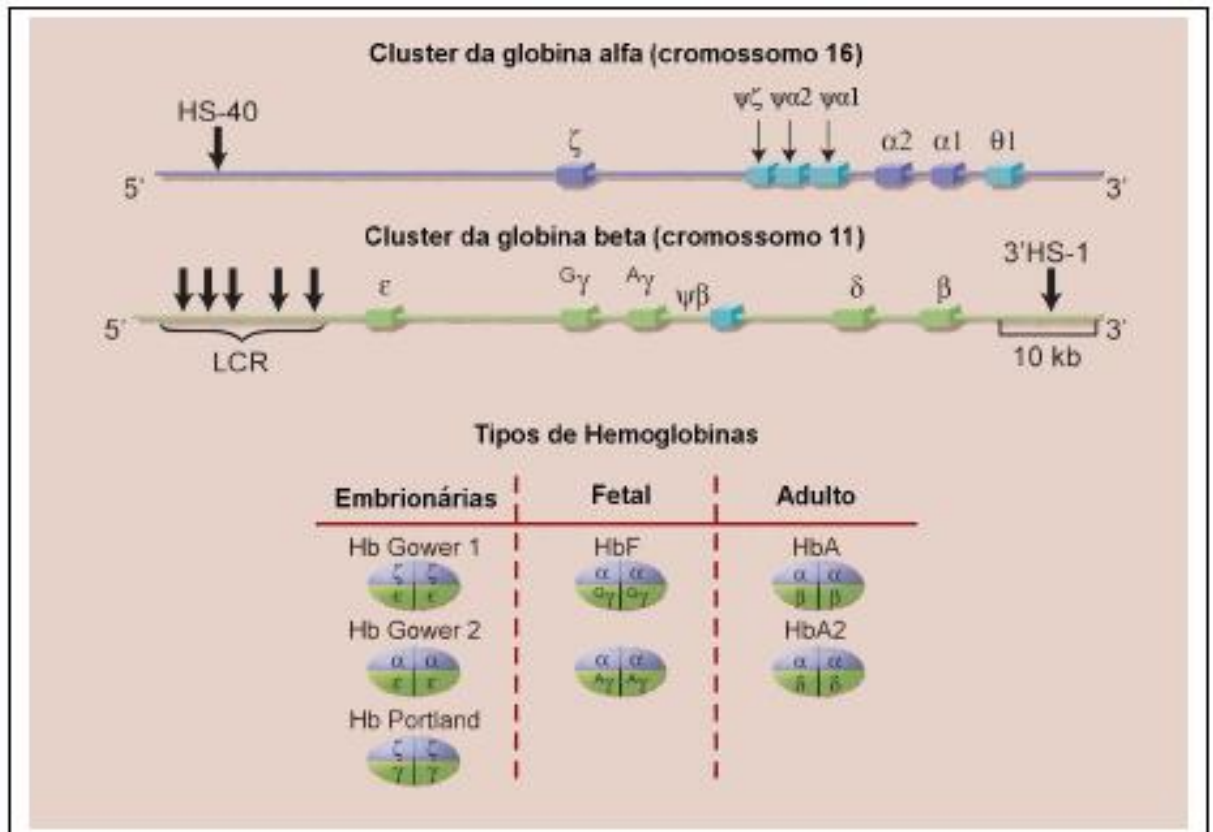


Figura 03. Representação esquemática da organização do complexo de genes das globinas alfa e beta. HS-40: região controladora no grupo de genes alfa (HS-*High Sensibility*); LCR(LCR – *Locus Control Region*): região controladora de locus, no grupo de genes beta. HS-1: sítio hipersensível do LCR localizado a 10 Kb do gene ϵ (*épsilon*). Adaptado de SCHECHTER, 2008.

1.2. HEMOGLOBINOPATIAS

As hemoglobinopatias compreendem um grupo de doenças genéticas caracterizadas por alterações na porção protéica da molécula de Hb, sendo classificadas em estruturais ou de síntese. As hemoglobinopatias estruturais são decorrentes da presença de mutação pontual, inserções e deleções de nucleotídeos que ocorrem em regiões codificantes dos genes da globina, levando

à substituição de aminoácidos na cadeia polipeptídica (BUNN,1997; Costa & SONATI, 2007).

As hemoglobinopatias de síntese, denominadas talassemias, são decorrentes da ausência ou redução de um ou mais tipo de cadeia da globina α , β , γ ou δ , desequilibrando as suas quantidades relativas, sendo as talassemias α e β as mais comuns, uma vez que compõem as hemoglobinas presentes na vida adulta (BUNN, 1997; SONATI & COSTA, 2007). Nas síndromes talassêmicas as cadeias produzidas em quantidades normais podem formar tetrâmeros que precipitam e lesam a membrana do eritrócito, promovendo a sua destruição prematura. A hemoglobinizacão deficiente resulta em hipocromia e microcitose dos eritrócitos, que são sinais característicos desse grupo de doenças (THOMPSON *et al.*, 1991; SHAH, 2004; WENNING & SONATI, 2007).

Foram descritas mais de 1200 mutações nos genes da globina, entre as variantes estruturais mais frequentemente encontradas estão as Hb S (HbB; glu6val), C (HbB; glu6lys), D (HbB;glu121gln) e E (HbB;lys26glu) (SILVA & YAMAGUCHI, 2007), sendo que a HbS, seguida da HbC são as mais frequentes na população brasileira (ZAGO, 1986; SANTOS, 2008)

A distribuição das hemoglobinopatias variantes varia de acordo com as populações estudadas, sendo que a miscigenação racial característica da população brasileira é um fator que deve ser levado em consideração quando se analisa a prevalência das doenças falciforme (DF) (HUTZ & SALZANO, 1983; BRANDELISE *et al.*, 2004)

1.2.1. Hemoglobinopatia SC

A Hb C é decorrente da mutação pontual GAG>AAG no gene da globina β , que leva a substituição do ácido glutâmico por lisina; esta variante da hemoglobina proporciona a formação de cristais intraeritrocitários (COSTA, 2001; ZAGO, 2001). A doença da hemoglobina C (HbCC) é caracterizada pela homozigose da Hb C, que apresenta quadro clínico de hemólise crônica e hepatoesplenomegalia; os indivíduos heterozigotos HbAC possuem o traço C (ZAGO, 2002; RAMALHO,2003).

A hemoglobina C pode formar heterozigoto duplo com outras Hb variantes como a HbS, esta não participa da formação do polímero de HbS quando desoxigenada, por isso os indivíduos com HbSC têm evolução clínica menos grave que os indivíduos com anemia falciforme (AF). Estes indivíduos apresentam quase todas as complicações clínicas da AF, tais como susceptibilidade a infecções e crises de vaso-oclusão, sendo que o comprometimento oftalmológico pode ser até mais frequente na HbSC do que na AF (EMBURY *et al.*, 1994; ZAGO *et al.*, 2001).

Dentre os indivíduos com DF as alterações fundoscópicas oculares são mais frequentes em indivíduos com HbSC do que nos AF, sendo que a causa não esta completamente elucidada (BISOL *et al.*, 2000). Existe a hipótese de que essas alterações ocorram devido ao aumento da viscosidade sanguínea, uma vez que nos indivíduos com AF a anemia é mais grave, tendo um efeito protetor contra eventos vaso-oclusivos no olho; já os indivíduos HbSC apresentam anemia moderada, com viscosidade sanguínea elevada, quando comparados aos AF, o

que favoreceria o evento vaso-oclusivo retiniano recorrente e suas consequências, como isquemia, neovascularização, hemorragia vítrea, proliferação fibrovascular e descolamento de retina (BISOL *et al.*, 2000).

A HbC em heterozigose apresenta prevalência de 3% entre afro-americanos e a doença por hemoglobina C (homozigoto) em 1/6.000 ((NAGEL & STEINBERG, 2001). No Brasil a HbC é a segunda hemoglobina variante mais comum, Azevedo e colaboradores em 1980 estudando crianças em idade escolar na Bahia encontraram a frequência de 2,2 a 5,2% para a HbC; Adorno e colaboradores (2005) descreveram a frequência de 6,5% para HbC estudando recém-nascidos da Maternidade Pública Tsylla Balbino em Salvador na Bahia.

1.2.2. Hemoglobinopatia S

A Hb S é resultado da mutação pontual no sexto códon do gene da globina β , $GAG > GTG$, o que leva à substituição do ácido glutâmico por valina. A Hb S apresenta estabilidade e solubilidade diferente quando submetida a concentrações baixas de oxigênio, tendendo a se polimerizar e formar feixes, o que leva à deformação e enrijecimento da membrana do eritrócito, compreendendo o fenômeno de falcização (BACKES *et al.*, 2005). Os indivíduos homozigotos para a hemoglobina S- (HbSS) possuem a AF, que é caracterizada por 80% ou mais de HbS e presença de anemia hemolítica grave com manifestações clínicas heterogêneas; os heterozigotos possuem o traço

falciforme ou HbAS, com 20 a 45% de HbS, sendo assintomáticos (WEATHERALL & PROVAN, 2000; ZAGO, 2002).

A doença falciforme (DF) é o termo utilizado para definir o grupo de doenças que tem como característica comum a presença da hemoglobina variante S. As DFs incluem a anemia falciforme (HbSS) e as situações em que a HbS se combina com outras hemoglobinas variantes e de síntese, como ocorre com a S-beta talassemia (S/ β tal), a doença SC, doença SD e a HbS-persistência hereditária de Hb fetal (S/PHHF) (ZAGO *et al.*, 2001).

1.3. ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é uma doença genética com herança autossômica recessiva caracterizada pela homozigose da hemoglobina S. A cria uma projeção hidrofóbica nos tetrâmeros de HbS após a desoxigenação. A interação dos tetrâmeros resulta na formação de polímeros ou fibra de HbS nos eritrócitos, que se tornam rígidos e passam a apresentar a forma de foice (BUNN & FORGET, 1986; WU *et al.*, 2006; ALABDULAALI, 2007).

O fenômeno de falcização é reversível, porém depois de repetidos eventos, o eritrócito perde a flexibilidade, tornando-se irreversivelmente rígido e distorcido (foice). Os eritrócitos irreversivelmente falcizados apresentam alterações nas proteínas de membrana, interação ativada com o endotélio vascular, plaquetas, leucócitos, fatores da coagulação e citocinas, fatores que contribuem para a obstrução vascular e isquemia e conseqüentemente para a ocorrência de crises

dolorosas e hemólise intra e extravascular (BUNN, 1997; NOGUCH *et al.*, 2003; MONTALEMBERT, 2008; PLAT, 2008).

1.4. EPIDEMIOLOGIA DA HEMOGLOBINA S

A hemoglobina S é mundialmente distribuída apresentando frequência elevada na África, principalmente na região Centro-Occidental, Sul e Atlântico-Occidental com frequência gênica de 0,12 a 0,14 no Congo e 0,1 no Senegal (WANG & LUKENS, 1998); também é encontrada em países do Mediterrâneo, na Arábia Saudita e Índia. Na América Latina e Estados Unidos cerca de 8% dos descendentes de negros é portador da HbS, estimando-se a incidência de 1/625 nascidos com doença falciforme nos Estados Unidos (COSTA, 2001).

A distribuição da HbS é heterogênea entre os estados brasileiros. No Sul e Sudeste do Brasil observam-se frequências menores que no Nordeste. Ramalho em 1986 estudando a população negra de São Paulo descreveu a frequência de 6,6% para os heterozigotos HbAS. Brandelise, em 2004, ao realizar a triagem neonatal em Campinas - SP, descreveu a incidência de 0,02% para DF do tipo HbSS e HbSC. A frequência de 0,09% para os heterozigotos AS foi descrita em doadores de sangue descendentes de italianos da região Sul (LISOT & SILLA, 2004). No Nordeste brasileiro observa-se prevalência elevada para a AF. Em Natal, Rio Grande do Norte, Araújo e col., em 2004, descreveram a frequência de 1,5% para indivíduos AS e a incidência de 0,05% para a AF em recém-nascidos.

A Bahia apresenta a frequência brasileira mais elevada para a HbS. Azevedo e colaboradores (1980) estudando crianças em idade pré-escolar descreveram a frequência de 7,4% para indivíduos AS; Adorno e col. (2005) observaram ao estudarem recém-nascidos, a frequência de 9,8% para o genótipo AS; a incidência de 0,9% para a doença SC e de 0,2% para AF.

Cançado e Jesus (2007) compilaram os dados epidemiológicos fornecidos pelo Ministério da Saúde referentes à DF, onde se observou número maior de indivíduos heterozigotos nas regiões onde o tráfico de escravos foi mais intenso (Figura 04).

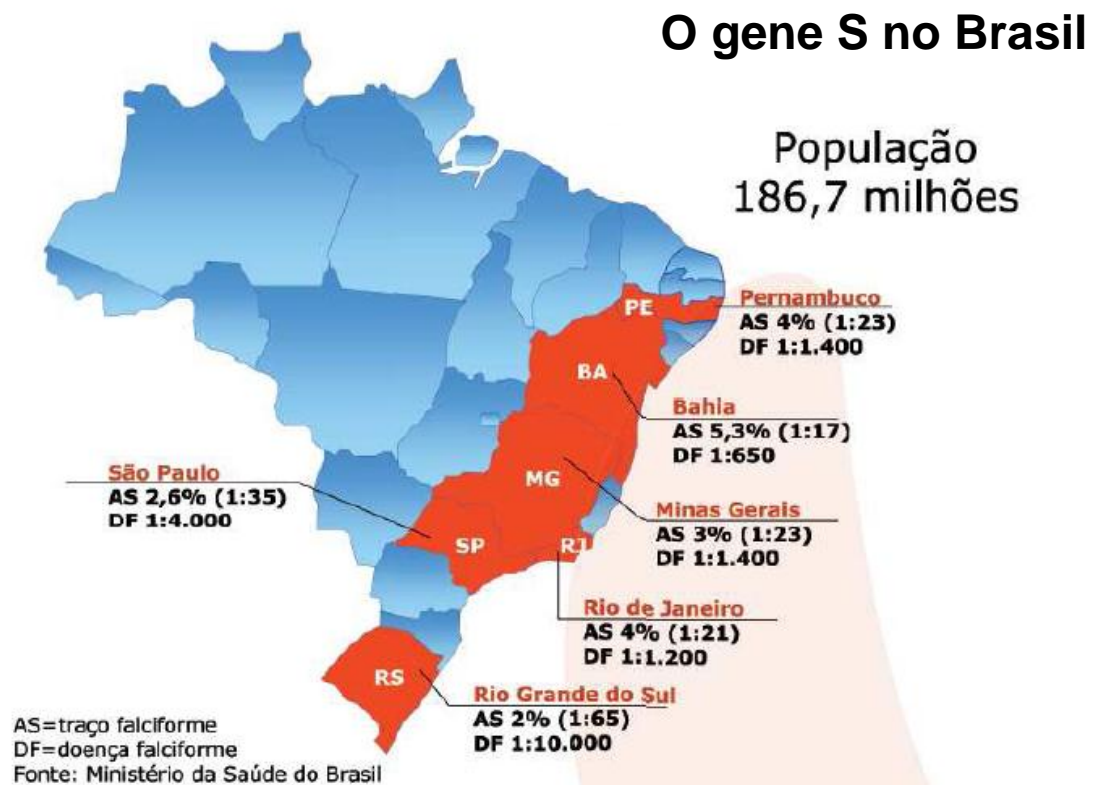


Figura 04. Frequências do gene β^S em diferentes regiões do Brasil. Adaptado de CANÇADO & JESUS, 2007. DF = Doença falciforme; AS = Heterozigotos AS

1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NA ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é caracterizada por manifestações clínicas heterogêneas, com anemia hemolítica grave, retardo no crescimento e desenvolvimento e lesões em diversos órgãos, como consequência de episódios intermitentes de vaso-occlusão que levam ao dano tecidual por isquemia e reperfusão e ao grau variável de hemólise (EMBURY & VICHINSKY, 2000; BUCHANAN *et al.*, 2004; BENDER & HOBBS, 2009).

As hemácias de indivíduos com AF, quando submetidas a condições de baixa tensão de oxigênio (O_2), são mais sensíveis a formação de polímeros intraeritrocitário de HbS, o que leva a rigidez do glóbulo, distorção, dano na membrana e hemólise (BUNN, 1997; NOGUCHI *et al.*, 2003). A vaso-occlusão ocorre principalmente em vasos de pequeno calibre, onde o fluxo sanguíneo é lento e a tensão de O_2 e pH está diminuída. Vários fatores estão associados a ocorrência da vaso-occlusão, incluindo a concentração de HbS, desidratação celular, a rigidez do eritrócito, elevação da viscosidade sanguínea, ativação de plaquetas, leucócitos e de células endoteliais e ao desequilíbrio do tônus vascular, com redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e elevação de endotelina (STUART & NAGEL, 2004).

O estado inflamatório crônico presente em indivíduos com AF é representado pelo nível sérico elevado de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias, tais como Interleucina -1β (IL- 1β), IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), com aumento da expressão de moléculas de adesão (molécula de adesão intercelular – ICAM; molécula de adesão vascular – VCAM, integrinas e P-selectina) e

aumento de biomarcadores de inflamação, como a proteína C reativa (PCR), favorecendo a vaso-oclusão e conseqüentemente o dano orgânico crônico (HEBBEL & VERCELLOTTI, 1997; GLADWIN *et al.*, 2003).

A anemia falciforme tem sido analisada atualmente no contexto de dois subfenótipos que se superpõem: um relacionado à hemólise, disfunção endotelial e vasculopatia proliferativa e outro relacionado à viscosidade-vaso-oclusão e falcização (KATO *et al.*, 2007). A co-herança da talassemia alfa tende a reduzir a hemólise e elevar os níveis de Hb, com isso diminui a prevalência de disfunção endotelial relacionada à hemólise e conseqüentemente aumenta a prevalência de fenômenos vaso-oclusivos relacionados a viscosidade (KATO *et al.*, 2006).

A anemia hemolítica e a biodisponibilidade reduzida de NO desenvolvem um papel importante na propensão a adquirir o subfenótipo hemolítico de hipertensão pulmonar, AVC, priapismo e úlcera de perna, podendo apresentar também anemia crônica, icterícia, predisposição a crise aplástica e colelitíase. Já os indivíduos com AF e subfenótipo de vaso-oclusão apresentam complicações relacionadas ao dano tecidual por isquemia e reperfusão que levam a dor e dano agudo ou crônico em sistemas orgânicos (medula óssea, baço, fígado, cérebro, pulmões e outros), como a crise dolorosa, síndrome torácica aguda (STA), dactilite e a osteonecrose (BENDER & HOBBS, 2009).

As crises de dor são as causas mais frequentes de morbidade na AF, como conseqüência da vaso-oclusão e isquemia tecidual, sendo que em crianças estas ocorrem mais frequentemente nas extremidades e em adultos na região da cabeça, tórax e abdome (BENDER & HOBBS, 2009).

A dactilite (dor e inchaço nos pés e mãos) é a manifestação clínica mais precoce da AF, ocorrendo nos primeiros anos de vida, considerado um indicador de maior fator de risco de gravidade da doença (MILLER *et al.*, 2000).

A síndrome torácica aguda é uma forma aguda de dano pulmonar, sendo causa frequente de mortalidade em adultos jovens com AF (BAKANAY *et al.*, 2005). A síndrome torácica aguda é caracterizada pela presença de infiltrado pulmonar, febre, dor no peito, tosse e leucocitose, com progressão rápida, desenvolvendo-se frequentemente em dois ou três dias após o episódio de crise vaso-oclusiva. A presença de valores persistentemente elevados de leucócitos, concentração média de hemoglobina, a idade pediátrica e concentração diminuída de HbF são considerados fatores de risco para o desenvolvimento da STA, bem como, vários eventos como infecção (pneumonia, pneumonia por micoplasma, *Chlamydia pneumoniae*, e viral), infarto pulmonar, embolia e lesão inflamatória podem levar a STA (VICHINSKY *et al.*, 2000; OHENE-FREMPONG & STEINBERG, 2001, STUART & NAGEL, 2004)

O acidente vascular cerebral (AVC) é uma complicação grave da AF, que está associada à taxa elevada de mortalidade (BENDER & HOBBS, 2009); ocorre em cerca de 10% das crianças com AF e possui frequência maior entre os dois e nove anos de idade. Vinte e dois por cento de indivíduos com AF desenvolvem infartos silenciosos, e este evento tem sido associado a deficiência neuro cognitiva e ao risco de AVC (MILLER *et al.*, 2001; PEGELOW *et al.*, 2002).

A velocidade elevada de fluxo sanguíneo no Doppler transcraniano (DTC) tem sido identificada como fator de risco para o AVC em crianças com AF (BENDER & HOBBS, 2009). O acidente vascular cerebral isquêmico é mais comum em crianças e adultos, já o AVC hemorrágico é mais frequente entre os 20 e 29 anos (OHENE-FREMPONG *et al.*, 1998). Alguns biomarcadores estão relacionados ao risco de desenvolver AVC, como concentrações diminuídas de Hb e HbF, contagem elevada de leucócitos, pressão sanguínea sistólica elevada, ocorrência prévia de AVC isquêmico e STA (BUCHANAN *et al.*, 2004; STUART & NAGEL, 2004). O acidente vascular cerebral tem associação com os subfenótipos de vaso-oclusão e hemólise (BENDER & HOBBS, 2009).

A hipertensão pulmonar é uma complicação presente na AF e em outros tipos de anemias hemolíticas, sendo reconhecido como fator de risco para mortalidade, afetando cerca de 20 – 40% de indivíduos com AF (GLADWIN *et al.*, 2004; ATAGA *et al.*, 2006). Como fator de risco temos o estado de intensa hemólise (KATO *et al.*, 2006), sendo que a hipertensão pulmonar na AF é resultado do tônus vascular anormal devido a deficiência de NO em consequência da hemólise (KATO *et al.*, 2007).

O priapismo é caracterizado pela ereção peniana involuntária dolorosa e ocorre em homens jovens com AF, geralmente no período da manhã, após a ereção normal ocorre a estase sanguínea nos corpos cavernoso e esponjoso, há diminuição da pressão de O₂, acidose e consequente polimerização da Hb S na área peniana (COSTA *et al.*, 2001; OHENE-FREMPONG *et al.*, 2001), com

ocorrência de episódios agudos com ereção dolorosa por várias horas ou crônicos com ereções reversíveis que persistem por várias semanas (COSTA, 2001).

Os indivíduos com AF apresentam susceptibilidade elevada para o desenvolvimento de infecções. O mecanismo envolvido nesta susceptibilidade ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que os indivíduos com AF apresentam disfunção esplênica já nos primeiros meses de vida, o que dificulta a opsonização de bactérias encapsuladas. Desta forma, crianças na primeira infância apresentam o risco de desenvolver septicemia e meningite por *Streptococcus pneumoniae* e por outros microorganismos encapsulados como *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenza* (BENDER & HOBBS, 2009). Outros fatores têm sido associados à susceptibilidade à infecção, como deficiências na via alternativa do complemento, de opsoninas séricas e alterações funcionais nos leucócitos (OHENE- FREMPONG & STEINBERG, 2001; GARY, 2003).

Outros agentes bacterianos podem causar infecções em indivíduos com AF, são eles a *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp, *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* (DI NUZZO & FONSECA, 2004). A causa mais comum de óbito entre crianças com AF é a sepse por *S. pneumoniae*, com risco importante nos primeiros três anos de vida. Após o início do uso profilático de penicilina e das vacinas especiais, a prevalência dessas infecções tem decrescido na AF (ADAMKIEWICZ *et al.*, 2003).

O sequestro esplênico (SE) é uma complicação que acomete o baço e ocorre em 10 a 30% dos indivíduos com AF, mais comumente entre os seis meses e cinco anos de vida, sendo caracterizado pelo aumento do baço, diminuição da concentração de Hb ($\leq 2,0$ g/dL em relação ao nível basal), que sempre está acompanhada do aumento de reticulócitos. As crianças com SE apresentam dor abdominal, náuseas e vômitos e podem evoluir rapidamente para óbito por anemia e choque hipovolêmico (STUART & NAGEL, 2004; BENDER & HOBBS, 2009).

A úlcera maleolar tem prevalência de 5 a 10% em adultos jovens. Sugere-se que a rigidez dos eritrócitos contendo HbS dificulta a circulação sanguínea nos capilares da derme, porém a fisiopatologia desta manifestação não está completamente esclarecida. Alguns fatores parecem contribuir para o desenvolvimento da úlcera maleolar, como o clima tropical, a anemia, problemas circulatórios e infecção local. As concentrações elevadas de HbF parecem proteger os indivíduos com AF desta manifestação clínica (OHENE-FREMPONG & STEINBERG, 2001; STUART & NAGEL, 2004).

1.6. FATORES MODULADORES DA ANEMIA FALCIFORME

Nos indivíduos com AF há fatores genéticos que são considerados moduladores da gravidade da doença por influenciarem os níveis intra-eritrocitário de HbS, entre eles encontram-se a talassemia α , a concentração de hemoglobina

fetal e o tipo de haplótipo ligado ao grupo de genes da globina β^S (ZAGO *et al.*, 2007).

1.6.1. Talassemia alfa

A talassemia α é uma hemoglobinopatia de síntese, onde ocorre a diminuição ou ausência das cadeias α , devido a deleções ou mutações nos genes responsáveis pela síntese destas cadeias. A presença da talassemia α em indivíduos com AF reduz a disponibilidade desta cadeia reduzindo sua incorporação na molécula de HbS, com redução de sua concentração. Esses indivíduos têm taxa menor de hemólise, concentração elevada de Hb e expectativa maior de vida quando comparado com indivíduos com AF que não apresentam talassemia, com eritrócitos menos desidratados e mais flexíveis (FOGLIETTA *et al.*, 1996; STEINBERG, 2001; STEINBERG, 2005).

Os indivíduos normais apresentam quatro genes que codificam as cadeias α , a talassemia α pode ser decorrente de deleções ou mutações pontuais nos genes α^1 e /ou α^2 . A talassemia α^+ é representada pela perda de um dos genes α em pelo menos um dos cromossomos ($-\alpha/\alpha$) e na talassemia α^0 há a perda de dois genes α no mesmo cromossomo ($--/\alpha$) (FOGLIETTA *et al.*, 1996; CANÇADO, 2006). Os eventos de recombinação gênica (*crossing over* desigual) que ocorrem durante a meiose podem levar a deleção de um cromossomo α ($-\alpha$) e triplicação no outro ($\alpha\alpha\alpha$) devido à similaridade entre os genes α . Dois tipos de deleção são mais frequentes na talassemia α^2 , a de 3,7 kilobases (Kb) e a de 4,2 Kb (THOMPSON *et al.*, 2004). A deleção de 3,7 kb é encontrada no mundo inteiro, sendo a mais prevalente no África, Índia, no Nepal, na Sardenha e em

muitas outras populações, como as do Mediterrâneo, China e outras da Ásia Oriental. A deleção α 4.2 Kb também tem distribuição mundial, apesar de ser mais comumente encontrada na Índia, Melanésia, Tailândia e outras populações do sudeste asiático (HUISMAN *et al.*, 1997; WEATHERALL *et al.*, 2001)

A incidência da talassemia α é elevada na Ásia, Oriente Médio, Oceania, Mediterrâneo e África (FOGLIETTA *et al.*, 1996). A talassemia α 3,7Kb é a mais frequente, sendo que no Brasil foi descrita uma frequência de 20 a 25% na população negra do sudeste por Sonati e col. (1991); na Bahia, Albuquerque (2002) descreveu a frequência de 19,3% para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ e 0,51% para talassemia $\alpha_2^{4,2Kb}$ em gestantes baianas; Couto e col. (2003) estudando gestantes com perfil de Hb AC e AA, encontraram a frequência de 23% para a talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$.

1.6.2. Hemoglobina fetal

A hemoglobina fetal (HbF) é formada pelas cadeias globínicas γ^A e γ^G que diferem quanto ao aminoácido presente na posição 136, podendo ser alanina ou glicina. A proporção de cadeias γ^G ou γ^A é constante durante o desenvolvimento fetal, com cerca de 75% de γ^G e 25% de γ^A . Entretanto, no adulto a quantidade de cadeias γ da HbF é composta principalmente de 60% de γ^A versus 40% de γ^G (JENSEN *et al.*, 1982).

A contribuição das cadeias γ^G e γ^A da HbF na prevenção do processo de falcização parece ser diferente. A presença da alanina em substituição a glicina

na posição 136 da cadeia polipeptídica interfere com a interação entre a cadeia γ e a cadeia β^S devido à flexibilidade reduzida da cadeia γ^A . Logo, a γ^A é menos efetiva que a γ^G na prevenção da polimerização da cadeia β^S (BHAUMIK, 1994; STUART & NAGEL, 2004).

A HbF é considerada como fator modulador de prognóstico importante para a AF, sendo que a presença de alelos que determinem elevações ligeiras nos níveis de HbF está associada a manifestações clínicas mais brandas da doença, com redução das crises de dor e internações (ZAGO *et al.*, 2001; ZAGO & PINTO, 2007). A hemoglobina fetal forma o híbrido assimétrico com a hemoglobina S ($\alpha_2\beta^S\gamma$), sendo que este interage com os sítios de estabilização dos polímeros de HbS desoxigenada, inibindo a sua formação (STUART & NAGEL, 2004).

1.6.3. Haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S

Outro fator modulador da AF é a presença de haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S , que são definidos como a associação não randômica de vários sítios para endonucleases de restrição localizados ao longo do grupo de genes da globina β^S (STEINBERG, 1995). Os haplótipos estão classificados em cinco diferentes tipos de acordo a região geográfica de origem (Figura 05), o Benin (Ben) descrito na África Ocidental; o Banto ou República Centro Africana (Car) na África Oriental e Centro-Sul; o Senegal (Sen) na África Atlântico Ocidental; o Índia-Arábia Saudita (Saudi) na Índia e Península Arábica Oriental e o Camarões (Cam) na Costa Ocidental Africana (Sutton *et al.*, 1989). (Figura 05).

O tipo do haplótipo tem sido frequentemente relacionado às concentrações de HbF e ao quadro clínico apresentado pelos indivíduos com AF. O haplótipo Sen está associado a concentrações elevadas de HbF (>15%) e ao curso clínico menos grave; o haplótipo Saudi a concentrações elevadas de HbF e ao curso clínico heterogêneo; o Ben a concentrações de HbF entre 5 e 15% e ao curso clínico intermediário; o Car está associado a níveis diminuídos de HbF (<5%) com curso clínico mais grave (STUART & NAGEL,2004). A associação de fatores genéticos, ambientais e sócio-econômicos é demonstrada por exercer influência no curso clínico da doença falciforme (PAGNIER *et al.*, 1984; POWARS, 1991; EMBURY *et al.*, 1994).

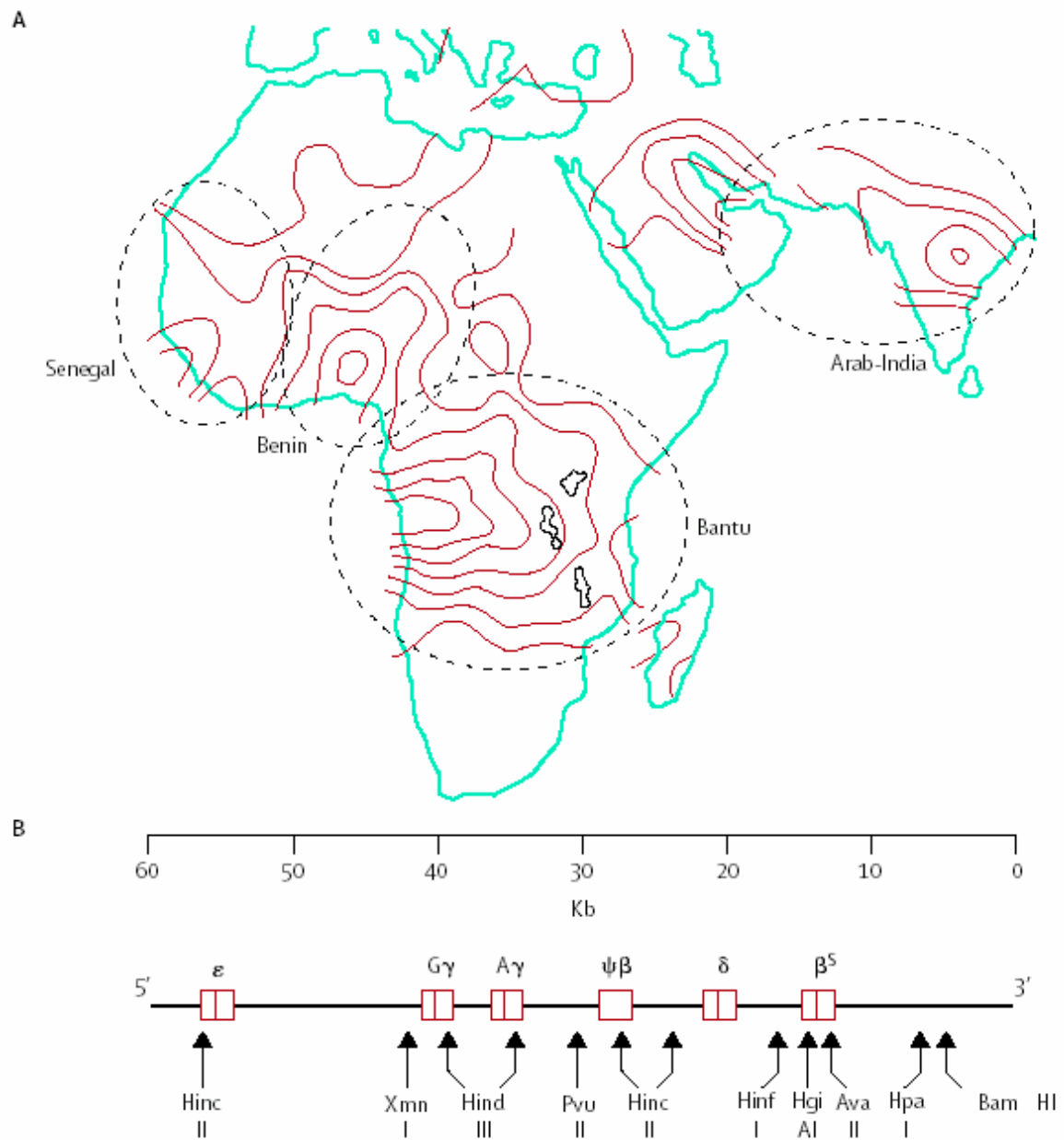


Figura 05. A- Distribuição geográfica dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β^S na África e regiões do Oriente Médio. B- Sequências de polimorfismos gênicos localizados no cromossomo 11, com o padrão de clivagem para diferentes endonucleases de restrição. Adaptado de Stuart & Nagel, 2004.

1.7. ÓXIDO NÍTRICO

Os indivíduos com AF apresentam disfunção vascular com depleção nos níveis de NO (YETIK-ANACAK & CATRAVAS, 2006), sendo que o fluxo sanguíneo dependente de NO é prejudicado em pacientes com AF (EBERHARDT *et al.*, 2003; GLADWIN *et al.*, 2003). Estudos sugerem que indivíduos com DF apresentam diminuição das reservas de NO e que os níveis plasmáticos da L-arginina, precursor do NO também se encontram diminuídos, principalmente, durante as crises vaso-oclusivas e na STA, com variação inversamente proporcional aos sintomas de dor (ENWONWU *et al.*, 1990; MORRIS *et al.*, 2000).

O óxido nítrico é produzido pelo endotélio vascular, sendo um radical livre e vasodilatador potente que regula a homeostasia vascular (MONCADA & HIGGS, 1993; YETIK-ANACAK & CATRAVAS, 2006; WOOD *et al.*, 2008). A hemoglobina livre no plasma reage rapidamente com o NO, diminuindo seus níveis séricos (REITER *et al.*, 2002). Durante a hemólise há o aumento no consumo de NO e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que contribuem para a inibição da vasodilatação (ROTHER, 2005) (Figura 06). Simultaneamente à liberação da hemoglobina, há a liberação da arginase eritrocitária, enzima que converte arginina, substrato da NO Sintase (NOS), a ornitina, limitando a biodisponibilidade de arginina para a NOS (MORRIS *et al.*, 2005). A disfunção vascular na AF pode ser atribuída ao consumo do NO pela hemoglobina livre, bem como a ativação da transcrição de moléculas de adesão

(V-CAM e E-selectina) e da endotelina -1 que é um vasoconstrictor potente (MORRIS, 2008) (Figura 06).

O fenômeno de falcização e os eventos de vaso-oclusão estão diretamente associados à patogênese da AF, sendo conduzidos em parte por episódios repetidos de danos por reperfusão isquêmica. O estado inflamatório intenso e crônico é a característica que diferencia a AF de outras Síndromes hemolíticas crônicas e que prediz a gravidade da doença (HEBBEL, 1997; KAUL & HEBBEL, 2000; OSAROGIAGBON *et al.*, 2000; STUART & SETTY, 2001).

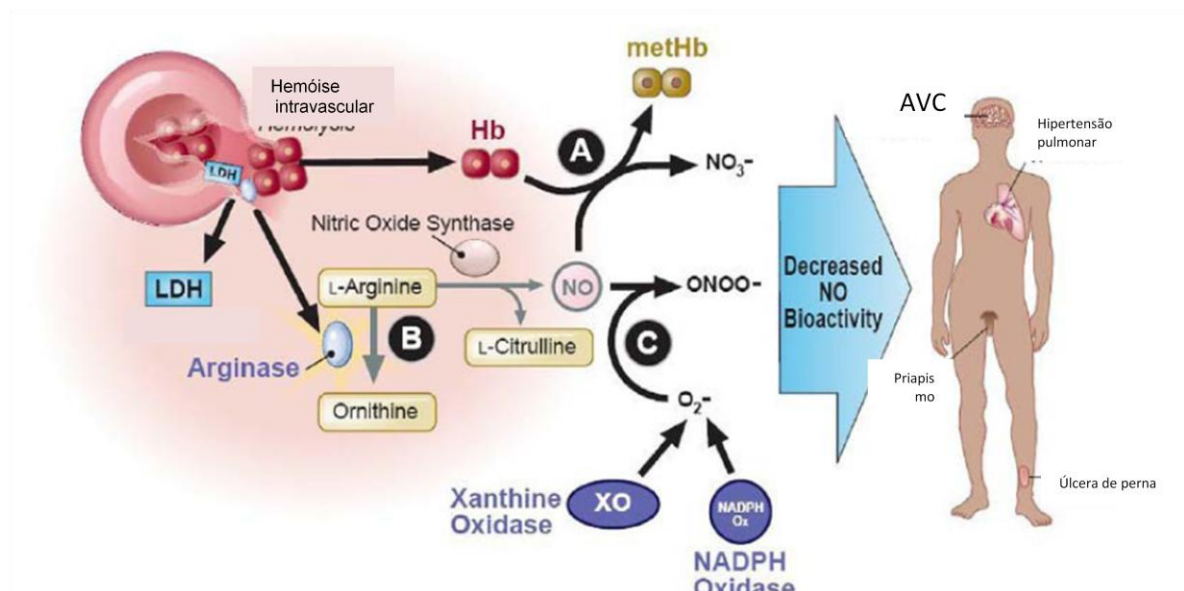


Figura 06. Contribuição da hemólise para a fisiopatologia da anemia falciforme pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico. Adaptado de KATO *et al.*, 2006.

1.7.1. O estado inflamatório na anemia falciforme

A patogênese da AF tem sido atribuída à passagem dos eritrócitos falcizados pelos vasos, o que leva a diminuição no fluxo sanguíneo em decorrência do empilhamento das hemácias em foice ou ao aumento da adesão das hemácias às células endoteliais, ao mesmo tempo em que desencadeia os fenômenos inflamatórios, alterações de coagulação e mobilização de células inflamatórias agudas (granulócitos) e crônicas (monócitos), favorecendo desta forma a ocorrência de eventos de vaso-oclusão (ZAGO *et al.*, 2007). O fenômeno de falcização das hemácias é bem discutido na literatura científica, e há evidências que vários eventos inflamatórios estejam envolvidos neste processo, incluindo o aumento nos níveis de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias (IL1 β , IL4, IL6, TNF α); o aumento na expressão de moléculas relacionadas à adesão celular (ICAM, VCAM, Integrinas e P-selectinas); a adesão ao endotélio de neutrófilos polimorfonucleares ativados; a participação das plaquetas ativadas e a presença de biomarcadores inflamatórios, como a proteína C reativa e prostaglandinas. Estes fatores contribuem para a ocorrência de vaso-oclusão e lesão crônica de órgãos, favorecendo a produção aumentada de EROs (FRANCIS & HAYWOOD, 1992; HEBBEL, 1997; ASLAN *et al.*, 2000; GLADWIN *et al.*, 2003).

1.8. ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é uma condição que se estabelece quando há desequilíbrio entre a produção e inativação de espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas em reações metabólicas, sendo que a inativação das EROs é feita por um sistema de defesa antioxidante orgânico enzimático e/ou não enzimático (BECKMAN & AMES, 1997; VALDIVIA, 2006). As espécies reativas de oxigênio incluem radicais livres e não livres, tais como radicais hidroxil, superóxido e peróxido de hidrogênio, que são gerados fisiologicamente durante a reação de transferência de elétrons na mitocôndria, menos frequentemente no retículo endoplasmático, peroxissoma e membrana nuclear e plasmática em células aeróbicas, sendo produzidas também em doenças humanas causadas por bactérias, vírus, Rickettsia, parasitas, na hepatite viral e tóxica e na fagocitose. No plasma humano a proporção entre as formas reduzidas e oxidadas é de 95:5 em indivíduos saudáveis, sendo que o aumento significativo de formas oxidadas caracteriza o EO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os radicais livres incluem moléculas que apresentam elétron desemparelhado na última orbita, a exemplo do ânion superóxido (O_2^-) ou radical hidroxil (OH \cdot) e outras moléculas como H_2O_2 que não é um radical livre, mas tem papel importante no processo de EO. Outra molécula é o peroxinitrito (ONOO \cdot), derivado do ON, sendo uma molécula potencialmente citotóxica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O aumento da produção de EROs na AF tem sido atribuído a presença das hemácias falcizadas. Lancaster (2002) afirma haver o aumento na formação de

O_2^- e outras EROs, bem como de produtos da peroxidação lipídica nessas células, quando comparadas a células normais. Os eritrócitos falcizados, por estarem sob constante estresse oxidativo, liberam produtos de degradação da HbS, complexos de Fe^{2+} e Fe^{3+} , que atacam a membrana eritrocitária e catalisam a peroxidação lipídica (BECKER *et al.*, 2004). A possibilidade da hemoglobina oxigenada se auto-oxidar está relacionada à instabilidade da HbS e a presença do íon ferro férrico que permite o acesso de água e íons no núcleo hidrofóbico da Hb originando radicais superóxido (O_2^-) e desencadeando o processo de oxidação da hemoglobina (WAGENER *et al.*, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A auto-oxidação da hemoglobina oxigenada está relacionada à possibilidade do ferro, componente do heme, apresentar um elétron desemparelhado, o que permite o acesso de água e íons que reagem com o ferro férrico dando origem a radicais superóxido (O_2^-) e desencadeando o processo de oxidação da hemoglobina (WAGENER *et al.*, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Normalmente em eventos biológicos uma pequena quantidade de hemoglobina sofre auto-oxidação espontânea, porém os sistemas antioxidantes se encarregam de neutralizar as EROs geradas (DAS & ESSMAN, 1990; WINTERBOUM, 1990). O processo oxidativo da hemoglobina aumenta a geração de EROs nos eritrócitos de pacientes com AF causando dano celular (WAGENER *et al.*, 2001).

Os danos resultantes das EROs são minimizados por um processo bioquímico eficiente e mecanismos de defesa antioxidantes endógenos, constituídos por enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutatona (PETERHANS, 1997; STEHBENS, 2003). A bilirrubina, principal componente dos pigmentos

biliares, é o produto final da destruição da porção "heme" da hemoglobina e outras hemeproteínas. Diversos estudos têm demonstrado a propriedade antioxidante da bilirrubina em indivíduos com AF, onde existe a combinação do EO iniciado pelo heme, um componente fisiológico da hemoglobina e hiperbilirrubinemia (DAILLY *et al.*, 1998; BARREIROS *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo pode ter papel importante na patogênese de doenças virais como hepatites e HIV (PIETTE & LEGRAND-POELS, 1994; ISRAEL & GOUGEROT-POCIDALO, 1997). Um dos mecanismos envolvidos na doença pelo HIV é que as EROs sinergizam com citocinas pró-inflamatórias ativando o fator transcricional NF κ β e induzindo HIV em células de linhagem monocítica, com potencialização da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da replicação viral (ISRAEL *et al.*, 1989; CHAUDRI & CLARK, 1989; GOUGEROT-POCIDALO *et al.*, 1989).

Os indivíduos com DF produzem mais espécies oxidantes tipo peróxido de hidrogênio e superóxido e também apresentam deficiência nos sistemas antioxidantes, sendo que a produção de EROs na DF é multifatorial (ASLAN & FREEMAN, 2002). Existem várias vias que podem contribuir para a produção aumentada de EROs em indivíduos com DF, a primeira via descrita é a da atividade da xantina oxidase presente em grandes quantidades no endotélio de pacientes com DF; outra via implica na participação da NADPH oxidase com

produção de superóxido e conseqüentemente na disfunção vascular em modelos murinos de AF e a terceira via implica na participação de EROs causando dano à membrana das hemácias, desnaturaçãõ da hemoglobina e interação do Fe^{3+} com a membrana das hemácias levando a peroxidação lipídica, inativação de enzimas das membranas e dano ao DNA. Cada um desses mecanismos pode contribuir para o aumento da produção de superóxido em indivíduos com DF causando consumo de NO e disfunção vascular (ASLAN *et al.*, 2000).

1.9. A HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

A hemocromatose hereditária está associada a mutações em múltiplos genes, sendo a do tipo 1a é considerada uma desordem autossômica recessiva causada por mutações no gene *HFE*, constituindo-se no subtipo mais importante em prevalência e em efeitos à saúde (SIMON *et al.*, 1980; FEDER *et al.*, 1996). Devido ao acúmulo progressivo de ferro os efeitos da doença só aparecem na 4^o e 5^o décadas de vida (CONTE, 2000).

O ferro (Fe) é um elemento químico que contribui para a formação de EROs, sendo um dos principais constituintes da crosta terrestre e podendo ser encontrado na forma reduzida (Fe^{+2}) ou oxidada (Fe^{+3}), características que permitem sua utilização em processos fisiológicos humanos (AISEN, 1982;

PIETRANGELO, 2002). Além disso, o Fe exerce papel importante em numerosas funções celulares, sendo requerido no transporte de elétrons na cadeia respiratória, síntese do grupamento heme, de proteínas contendo ferro e enxofre e no reparo do DNA (ROY & ANDREWS, 2001; HENTZE *et al.*, 2004). O ferro possui absorção estritamente regulada, sendo a descamação do epitélio intestinal sua principal via de eliminação efetiva do excesso de ferro (BOTHWELL & MAcPHAIL, 1998).

A sobrecarga de ferro é uma condição que se estabelece quando a quantidade de ferro absorvida ultrapassa a capacidade de neutralização celular, logo este elemento fica livre e serve de catalisador para diversas reações. Essa condição se instala de forma lenta e gradativa, geralmente se manifesta a partir da terceira e quarta década de vida, a exceção da sobrecarga juvenil. A sobrecarga de ferro pode ser decorrente de defeito genético primário em moléculas envolvidas no processo de homeostasia do ferro, a exemplo dos genes *HFE*, *Hemojuvelina* (*HJV*), *Hepcidina* (*HAMP*), no gene do *Receptor de Transferrina 2* (*TFR2*) e no gene da *Ferroportina* (*SLC40A1*) (Quadro 01), ou ser secundária a doenças congênitas ou adquiridas que cursam com anemia hemolítica e/ou eritropoese ineficaz que necessitam de transfusões de hemácias (CANÇADO, 2007; GROTTO, 2008, SANTOS *et al.*, 2010) (Figura 07).

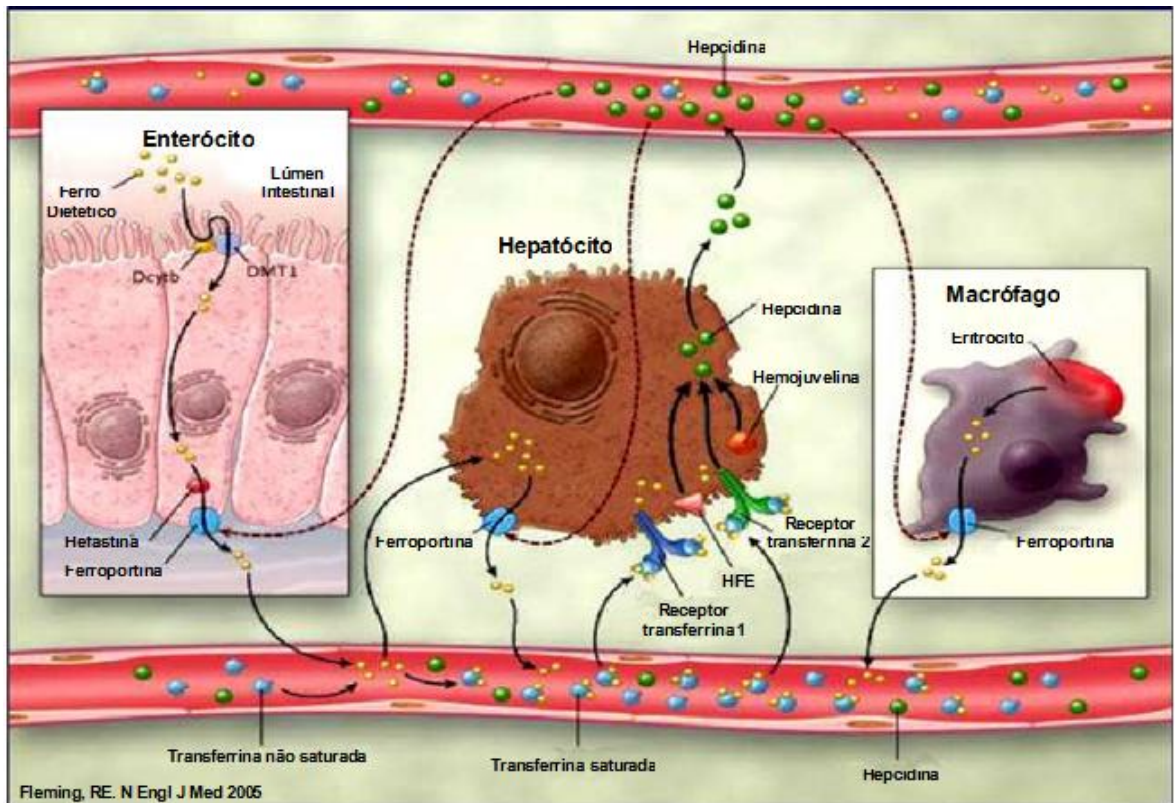


Figura 07. Representação esquemática do metabolismo do ferro e dos genes envolvidos na gênese da Hemocromatose hereditária. (Fleming RE. N Engl J Med 2005).

Quadro 01. Alterações moleculares relacionadas à fisiopatologia da hemocromatose hereditária (HH)

Tipos de HH	Gene	Referências
1	<i>HFE</i>	FEDER <i>et al.</i> , 1996
2A	<i>HJV</i>	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2004
2B	<i>HAMP</i>	Park <i>et al.</i> , 2001

3	<i>TFR2</i>	Kawabata <i>et al.</i> , 1999
4	<i>SLC40A1</i>	Donovan <i>et al.</i> , 2000

HFE: codifica a proteína HFE; *HJV*: codifica a proteína hemojuvelina; *HAMP*: codifica o polipeptídeo hepcidina; *TFR2*: codifica a proteína TFR2; e *SLC40A1*: codifica a proteína ferroportina. Adaptado de Santos *et al.*, 2009.

A maioria dos indivíduos com hemocromatose tipo 1 possui a homozigose para a mutação c.282C>Y no gene *HFE*. Os indivíduos que apresentam a mutação c.282C>Y têm fenótipo variado e somente alguns homozigotos apresentam sobrecarga de ferro, fato que reforça a hipótese de penetrância incompleta. Outras mutações têm sido descritas, a c.63H>D e c.65S>C (FEDER *et al.*, 1996; BACON *et al.*, 1999), sendo que a presença destas mutações parecem não representar risco maior para o desenvolvimento de sobrecarga de ferro, mesmo em homozigose. Entretanto, a mutação c.282C>Y em heterozigose ou associada outras doenças como hepatites virais, talassemia β , porfiria entre outras, parece desempenhar papel importante na predisposição à sobrecarga de ferro (CONTE, 2000; FEDER *et al.*, 1996). Outras mutações raras têm sido encontradas em heterozigose com a c.282C>Y (BARTON *et al.*, 1995; PHILLIPS *et al.*, 2000).

O ferro presente no plasma encontra-se ligado a transferrina, e o aproveitamento deste ferro pelas células do fígado e eritróides, por exemplo, ocorre por endocitose mediada por receptores de transferrina (HALLIDAY *et*

al., 1994; ANDREWS, 1999). O ferro é armazenado no organismo para que ocorra proteção quanto à toxicidade da sua forma livre e manutenção do estoque de reserva. O ferro pode ser armazenado sob a forma de ferritina ou hemossiderina presente no sistema retículo endotelial das células da medula óssea, baço e fígado, no parênquima hepático e nos músculos esqueléticos (CHIATTONE, 1988, GROTTTO,2008).

A ferritina apresenta-se sob a forma de concha esférica contendo aproximadamente 4500 átomos de íons na forma de micelas de hidróxido férrico. Os genes da *ferritina* são expressos em todas as células, mas a expressão diferencial dos genes das cadeias *H* e *L* em diferentes tecidos sugere a presença de uma regulação rigorosa, influenciada pelo status do ferro e pelas proteínas responsivas ao ferro (IRP) (HARFORD *et al.*, 1994).

Quando em excesso, o ferro, é altamente tóxico para o homem; por ser um elemento de transição e apresentar elétrons desemparelhados é um excelente catalisador, participando da geração de EROs. Neste caso, pode conduzir ao EO e ao dano celular, como a peroxidação de lipídios, com lesão das membranas das organelas intracelulares, aumento da fibrogênese e mutações no DNA (HENLE & LINN, 1997; SULLIVAN, 2000; PIETRANGELO, 2002).

2.0. HAPTOGLOBINA

A haptoglobina (Hp) é uma α_2 – sialoglicoproteína, com estrutura tetramérica composta por duas cadeias α e duas β ligadas por pontes dissulfeto, sendo expresso nos hepatócitos (ROBSON *et al.*, 1969). A molécula da haptoglobina foi descrita pela primeira vez em 1938 por Polonovski & Jayle, e, em 1955, Smithies descreveu sua heterogeneidade molecular com três fenótipos para o gene *Hp*, que são determinados geneticamente por dois alelos *Hp1* e um *Hp2*, que são *Hp 1-1*, *Hp 2-1* and *Hp 2-2* (YANO *et al.*, 1998; LANGLOIS & DELANGHE, 1996). Dois loci estão envolvidos na síntese da Hp: *Hpa* e *Hpb*. O gene da *Hpa* está localizado no braço longo do cromossomo 16 - 16q22, apresentando três alelos estruturais; *Hp^{1F}*, *Hp^{1S}* e *Hp²*. O produto gênico do *Hp^{1F}* e *Hp^{1S}* difere apenas por um aminoácido, sendo a lisina na posição 54 da cadeia α 1F e ácido glutâmico na cadeia α 1S, resultado de uma mutação pontual no alelo *Hp¹* original (SMITHIES *et al.*, 1962; SCHULTZE *et al.*, 1966; BOWMAN, 1993). O alelo *Hpa²* existe somente em humanos e é originário da fusão dos alelos *Hp^{1F}* e *Hp^{1S}* (BOWMAN & KUROSUKY, 1982; BOWMAN, 1993). A Hp é uma proteína plasmática que se liga à hemoglobina livre, sendo bem estabelecida como marcador biológico de hemólise intravascular (NIELSEN *et al.*, 2006).

A hemoglobina livre promove o acúmulo de radical hidroxila e de EROs, pois o ferro (Fe^{2+}) pode gerar radicais hidroxila extremamente reativos na presença de peróxido de hidrogênio (Reação de Fenton) (SADRZADEH *et al.*, 1984; GUTTERIDGE, 1995), sendo que a habilidade em reduzir o dano celular provocado por radicais livres induzidos pela hemoglobina é haptoglobina fenótipo Hp dependente (JAVID, 1965; GUTTERIDGE, 1987).

A haptoglobina é uma proteína de fase aguda e atua como agente bacteriostático; está envolvida em processos inflamatórios, infecciosos e malignos, possuindo propriedades imunoregulatórias, de forma que atua como inibidor da síntese de prostaglandina e angiogênese, protegendo a célula contra processos oxidativos (LANGLOIS & DELANGHE, 1996). A haptoglobina se liga avidamente a hemoglobina (Hb) livre na circulação durante a hemólise fisiológica e patológica e facilita o metabolismo rápido da Hb da circulação para o fígado (DRAIN *et al.*, 2001, NIELSEN *et al.*, 2006); ela também forma um complexo solúvel com a hemoglobina que reduz a perda de hemoglobina e ferro, pois o complexo Hb-Hpt não é filtrado pelo glomérulo, sendo transportado para o fígado (WOBETO *et al.*, 2008) (Figura 08).

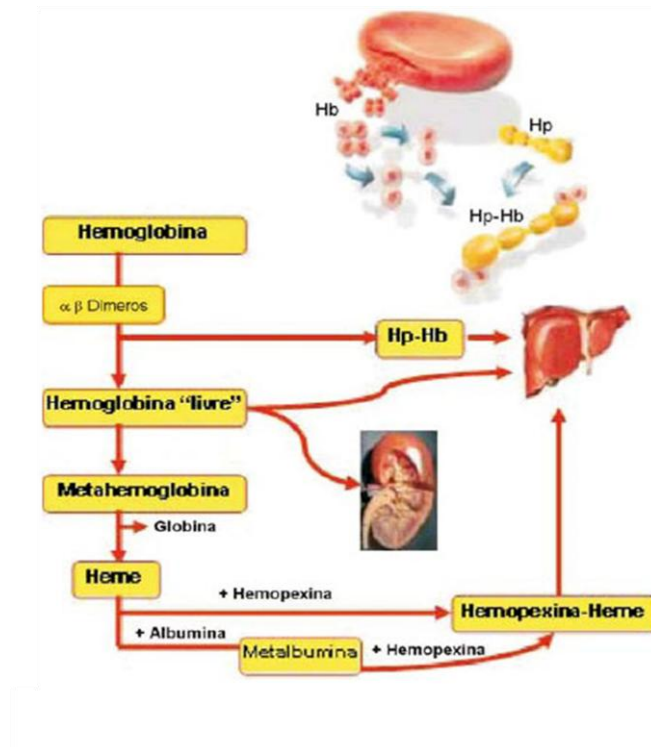


Figura 08. Representação esquemática do mecanismo de regulação da hemoglobina livre no plasma (CARVALHO *et al.*, 2007).

Os três fenótipos de Hp apresentam características bioquímicas, biofísicas e funcionais diferentes que são vistas nas capacidades antioxidantes e imunomoduladora distintas (GUETTAR, *et al.*, 2007). A função protetora antioxidante da Hp é fenótipo-dependente; os indivíduos com o fenótipo Hp 2-2 apresentam a capacidade diminuída de ligação com Hb, o que resulta em dano renal intenso e níveis elevados de ferro sérico (LANGLOIS & DELANGHE, 1996). Estudos têm demonstrado que o fenótipo Hp 1-1 confere proteção maior contra o dano oxidativo *in vitro*, provavelmente essa diferença seja devido ao tamanho das proteínas (LANGE, 1992; KODA *et al.*, 1998) (Figura 09); o fenótipo Hp 2-2 remove o íon ferro para o espaço extravascular mais lentamente, devido ao tamanho da molécula, que o fenótipo Hp1-1. Conseqüentemente,

indivíduos com genótipo Hp2-2 permanecem com a Hb na circulação por tempo maior que os Hp 1-1; o ferro favorece a geração de EROs, as quais podem causar peroxidação lipídica das membranas celulares; oxidar partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), favorecendo o dano vascular das células endoteliais e levar a níveis mais elevados de estresse oxidativo (FRANK *et al.*, 2001).

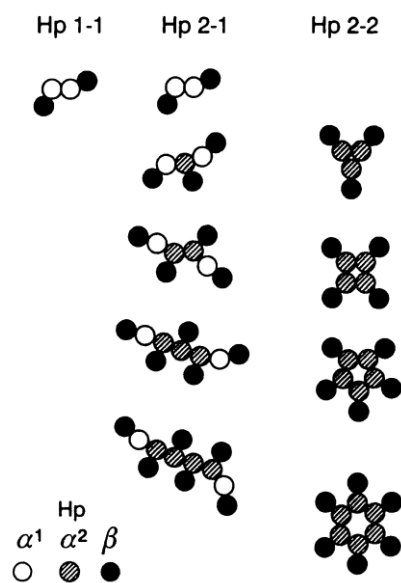


Figura 09. Representação esquemática das diferenças estruturais entre os fenótipos de Haptoglobina (Behring Diagnostics, Liederbach, Germany).

A haptoglobina também desempenha outras funções além da antioxidante e imunomoduladora, tais como a de inibir a síntese de prostaglandinas, apresentar efeito na angiogênese, podendo contribuir para a patogênese da aterosclerose (Van Vlierberghe *et al.*, 2004). Estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de obter maiores informações sobre o papel de polimorfismos no gene da *Haptoglobina* como fator de risco para doenças cardiovasculares,

bem como a relação entre os diversos fenótipos de Hp e os níveis séricos de triglicérides e colesterol total e frações (HDL – lipopartícula de alta densidade e LDL - lipopartícula de baixa densidade) (Van Vlierberghe *et al.*, 2004).

2.1. A GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A glutatona S-Transferase (γ - Glutamil – cisteinil – glicina; GSH) é a proteína mais abundante em células animais, concentra-se em sua maioria no citossol, podendo ser encontrada também em organelas como mitocôndrias, matriz nuclear e peroxissomo (LU, 2000). Sua concentração extracelular é relativamente baixa, exceto no ácido biliar onde pode alcançar concentrações maiores que 10 mmol/L (JONES, 2002; GRIFFITH, 1999). Algumas condições como má nutrição protéica, estresse oxidativo e muitas condições patológicas podem causar redução na concentração celular de GSH (LU, 2000; GRIFFITH, 1999).

A síntese da glutatona ocorre a partir do glutamato, cisteína e glicina catalizada por duas enzimas a γ - Glutamilcisteína sintetase (GCS) e GSH sintetase, em todo tipo celular, sendo o fígado o maior produtor e exportador de GSH (GRIFFITH, 1999). Alguns fatores podem afetar a transcrição ou a atividade da GCS. O estresse oxidativo, estresse nitrosativo, citocinas inflamatórias, câncer, quimioterapia para tratamento do câncer, radiação ionizante, choque térmico, inibição da atividade da GCS, depleção ou

conjugação do GSH, prostaglandina A₂, metais pesados, antioxidantes e insulina aumentam a transcrição ou atividade de GCS em uma variedade de células, enquanto que dietas deficientes em proteínas, a dexametasona, eritropoetina e TGF - β , hiperglicemia e fosforilação da GCS diminuem a transcrição ou atividade da GCS (LU, 2000; JONES, 2002).

A glutathiona participa de muitos eventos celulares, tais como, a eliminação de radicais livres e outras EROs; reage com vários metabólitos fisiológicos eletrofílicos, como estrógeno, prostaglandinas, leucotrienos e melanina e com xenobióticos; a GSH se conjuga com NO, sendo ambos importantes para a atividade hepática, indicando seu papel na regulação de lipídios, glicose e utilização de aminoácidos; a GSH serve de substrato para a formaldeído dehidrogenase, que é requerida para conversão de prostaglandina H₂ (FANG *et al.*, 2002; TOWNSEND, 2003). A glutathiona apresenta versatilidade regulatória e metabólica, sendo que a sua deficiência contribui para o estresse oxidativo, apresentando papel importante na patogênese de muitas doenças (WU *et al.*, 2003). Há diferentes genes como *Alpha* (A), *mu* (M), *pi* (P) e *theta* (T) que podem expressar diferentes isoformas da molécula de glutathiona. Os genes *GSTT1* e *GSTM1* podem apresentar genótipos nulos, decorrentes de deleções, e resulta em ausência de atividade enzimática (MANNERVICK, 1985; BOLUFER, 2007; VICARI, 2007). Vicari (2007) relatou frequências diferentes para os polimorfismos nos genes *GST* os quais variam com os diferentes grupos étnicos, com descrição de frequências diversas em populações, como italianos,

japoneses, espanhóis, franceses, ingleses, africanos e brasileiros (HATAGIMA, 2000).

O gene *mu* da GST é descrito como ausente em cerca de 30 a 50 % dos indivíduos de acordo com grupo étnico (LOSI-GUEMBAROVSKI, 2001). London e col (1995), bem como, Cotton e col. (1999) realizaram estudos para avaliar o polimorfismo no gene *GSTM1* em indivíduos saudáveis, representantes de vários grupos étnicos e demonstraram frequências de 23 e 41% entre afro-americanos e negros, respectivamente; frequências de 23 - 48% em africanos; 33- 66 % em asiáticos e 57% em caucasianos (LONDON et al., 1995, COTTON *et al.*, 1999). A distribuição do genótipo nulo para *GSTM1* foi mais frequente em indivíduos caucasianos (55,4%) que em mulatos (41,4%) e negros (32,0 %) em São Paulo. Gattás e col. (2004) descreveram a frequência de 35,7% para o gene *GSTM1* ao estudarem trabalhadores da zona rural da Bahia.

A glutathione S-Transferase desempenha papel importante na defesa antioxidante e na regulação de eventos celulares. A deficiência da GST contribui para o aumento do EO, na geração de EROs, contribuindo para a patogênese de diversas doenças como Alzheimer, doença de Parkinson, doença falciforme, câncer, infecção por HIV, fibrose cística e diabetes (WU, 2004).

2.2. PARAOXONASE

A paraoxonase (PON) sérica é uma glicoproteína sintetizada no fígado e que circula associada à porção ApoA-I do colesterol HDL. Os genes da *PON* estão localizados no braço curto do cromossomo 7 (7q21-q22) e compreendem os genes *PON1*, *PON2* e *PON3* e a variabilidade da atividade enzimática está relacionada a presença de polimorfismos gênicos (MACKNESS *et al.*, 1996). A paraoxonase pode hidrolizar metabolitos oxon de vários inseticidas (parathion, diazinon, chloepyriphos) e gases neurotóxicos (Sarin, soman) (BROOMFIELD, 1992). A paraoxonase tem mostrado desempenhar papel importante no metabolismo dos lipídios, na doença cardiovascular e na artereosclerose (HEINECKE & LUSIS, 1998). A PON apresenta propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, sendo que a PON1 hidrolisa lipídios oxidados do colesterol LDL, de lesões ateroscleróticas e macrófagos, prevenindo a inicialização e progressão da lesão aterosclerótica (MACKNESS *et al.*, 1993; AVIRAM *et al.*, 2000; FUHRMAN *et al.*, 2002) (Figura 10).

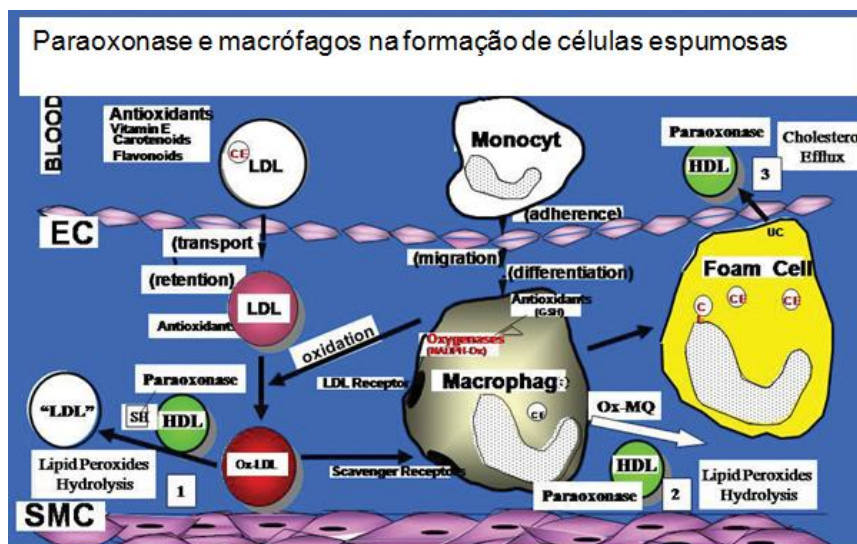


Figura 10. Paraoxonase 1 sérica associada ao HDL- C é a segunda linha de defesa, após os antioxidantes, contra a peroxidação lipídica de lipoproteínas (LDL-C e HDL-C), AVIRAM *et al.*, 2009.

Os polimorfismos gênicos na região promotora e em regiões codificantes do gene da *PON1* influenciam na ocorrência de variações nos níveis séricos da enzima e na sua atividade em humanos (COLE *et al.*, 2003), sendo que vários fatores podem afetar a atividade da PON1, tais como dieta, estilo de vida, o uso de drogas, gravidez e menopausa (COLE *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2005). Até o presente momento foram identificados dois polimorfismos na região codificadora do gene da *PON1* (GARIN *et al.*, 1997), o primeiro na posição 55, onde há a substituição da leucina por metionina (L/M; leucina/metionina), o PON1 55 M/L; e o segundo na posição 192, onde há a substituição de glutamina por arginina (Q/R; glutamina/ arginina), *PON1* 192R/Q. A presença desses polimorfismos gênicos leva a codificação de duas isoformas diferentes quanto a habilidade hidrolítica, assim podemos ter enzimas com diferentes habilidades antiorganofosfato e antioxidantes (KARBAN *et al.*, 2007).

A frequência dos polimorfismos na *PON1* varia entre as populações humanas (HUMBERT *et al.*, 1993). O gene *PON2* tem dois polimorfismos o 148 G>A (glycina/ arginina) e o 311 C>S (cysteina/ serina). Variações genéticas no gene da *PON3* não têm sido relatadas (HUMBERT *et al.*, 1993; MOCHIZUKI *et al.*, 1998; LEVIEV & JAMES, 2000). Estudos epidemiológicos em humanos têm demonstrado que polimorfismos no gene da *PON 1* estão correlacionados com variações nos níveis plasmáticos de lipoproteínas e ao risco de aterosclerose e doença coronariana (WHEELER *et al.*, 2004).

2.3. HEMEOXIGENASE-1

A hemeoxigenase-1 (HO-1) é uma enzima que atua no catabolismo do heme transformando-o em biliverdina, com liberação de ferro e monóxido de carbono. A HO-1 corresponde a isoforma indutível da HO, que é expressa no fígado, baço, pâncreas, intestino, rins, coração, retina, próstata, pulmão, pele, cérebro, cordão espinhal, células do músculo liso e nas células endoteliais, sendo que sua expressão ocorre em decorrência de estímulos provenientes da oxidação do LDL colesterol, heme, peróxido de hidrogênio, citocinas, endotoxinas, metais pesados, radiação UV, ON, hipóxia e fatores de crescimento (Fator de crescimento derivado de plaquetas- PDGF, fator de crescimento tumoral beta - TGF- β) (EXNER *et al.*,2004). O gene da *HO-1* aparece como um dos candidatos a fator hereditário que influencia a susceptibilidade de indivíduos a desenvolver

várias doenças; o produto do gene *HO-1* parece ser um fator protetor novo com efeito antiinflamatório, antioxidante e antiproliferativo (TULIS *et al.*, 2001; DUCKERS *et al.*, 2001).

A deficiência genética da HO-1 provoca anemia e hepatomegalia em camundongos *knock-out* para a HO-1, sendo que estas características clínicas também têm sido vistas em humanos com deficiência de HO-1 (YACHIE *et al.*, 1999). A regulação positiva da HO-1 protege contra uma variedade de condições fisiopatológicas, tais como inflamação e crises de falcização (RYTER *et al.*, 2006; BELCHER *et al.*, 2006).

Polimorfismos na região promotora do gene *HO-1* têm sido associados com a susceptibilidade a várias doenças, pois estão correlacionados a concentrações da molécula e também determinam o nível de expressão do gene *HO-1* (EXNER *et al.*, 2004). A presença de polimorfismos de repetição dos alelos curto de GT na região promotora do gene *HO-1* (<25 repetições) causa níveis elevados de indução do gene *HO-1* em resposta ao estresse oxidativo (YAMADA *et al.*, 2000). EXNER e col. (2004) ao realizarem estudo de associação genética demonstraram prevalência diminuída de enfisema relacionado ao hábito de fumar, aterosclerose e diabetes entre os indivíduos que apresentavam polimorfismo de repetição dos alelos curto de GT (<25 repetições) no gene *HO-1*.

A avaliação de moléculas que podem ser consideradas como marcadores de risco relacionados ao estresse oxidativo em pacientes com DF apresenta grande importância, uma vez que possibilitará um entendimento maior sobre o EO e a sua influência no curso clínico desses indivíduos, contribuindo para ampliar o conhecimento da fisiopatologia da doença. Cumpre ressaltar que

durante os eventos de vaso-oclusão surgem áreas de isquemia/reperfusão, e que nos períodos de reperfusão há aumento de produção de EORs, tais como: superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e peroxi-nitrito. Assim, o presente estudo visa obter informações adicionais sobre possíveis associações entre biomarcadores relacionados ao EO e o perfil bioquímico, hematológico e fenotípico apresentado por pacientes com doença falciforme do estado da Bahia.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar polimorfismos relacionados ao estresse oxidativo nos genes *HFE* da hemocromatose hereditária (c.282C>Y, c.63H>D e c.65S>C); *haptoglobina*, *glutathione S-transferase* (*GSTT1* e *GSTM1*) e *paraoxonase* (*PON1* – c.55L>M e c.192Q>R), associando-os ao perfil hematológico, bioquímico, aos níveis séricos de vitamina C, paraoxonase 1 e receptor de transferrina e fenotípico de pacientes com doença falciforme.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os dados hematológicos;
- Avaliar o perfil bioquímico relacionado ao perfil hepático, lipídico, renal, inflamatório e do metabolismo do ferro;
- Avaliar os níveis séricos de receptor de transferrina solúvel, hemeoxigenase e vitamina C;
- Avaliar a atividade da paraoxonase;
- Investigar os haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta S;
- Investigar a prevalência da talassemia $\alpha 2^{3.7 \text{ Kb}}$;
- Investigar os polimorfismos c.282C>Y, c.63H>D e c.65S>C no gene *HFE* da hemocromatose hereditária; os polimorfismos c.55L>M e c.192Q>R no gene

PON1 da paraoxonase; os polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* no gene da *GST* e no gene da *Haptoglobina*;

- Avaliar a associação dos dados obtidos à história clínica dos pacientes.

JUSTIFICATIVA

4. JUSTIFICATIVA

A hemoglobina tem como função principal o transporte de oxigênio para os tecidos, sendo que a auto-oxidação da hemoglobina é um evento inevitável e estima-se que cerca de 3% de oxihemoglobina seja oxidada a metahemoglobina, com geração diária e concomitante do ânion superóxido (SHENG *et al.*, 1998). Os eritrócitos contendo a HbS exibem auto-oxidação acelerada quando submetidos a condições fisiopatológicas variadas, que incluem a inflamação, hipóxia, doenças auto-imunes, deficiência nos sistemas antioxidantes, com produção acelerada de EORs e tendência a redução dos mecanismos antioxidantes celulares (CHAN *et al.*, 1999).

O processo oxidativo da HbS na DF aumenta a geração de EORs nos eritrócitos, causando dano celular (WAGENER *et al.*, 2001). As EORs geradas são prejudiciais as células endoteliais, contribuindo para a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas teciduais e de membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HUSAIN, 1987; BEGUM & TERAQ, 2002).

O estado inflamatório intenso e crônico presente na DF é a principal característica que a diferencia das outras Síndromes hemolíticas crônicas e que prediz a gravidade da doença. No estabelecimento da vasculopatia falciforme, a HbS, a presença de leucócitos ativados e a ativação das células endoteliais são fatores que contribuem para a lesão crônica a órgãos e para a produção aumentada de EROs (GLADWIM *et al.*, 2003; Zago *et al.*, 2007).

A avaliação de marcadores moleculares envolvidos no estresse celular apresentado por indivíduos com DF pode auxiliar no prognóstico clínico. Além disso, a investigação de polimorfismos funcionais em moléculas envolvidas nos

sistemas antioxidantes desses indivíduos possibilita o entendimento maior da influência desses elementos no estabelecimento do estresse oxidativo.

O presente estudo investigou polimorfismos nos genes da *Glutathione S-transferase*, *Hemocromatose Hereditária*, *Haptoglobina* e *Paraoxonase 1*, além de biomarcadores bioquímicos e hematológicos envolvidos no processo oxidativo celular, com a proposta de investigar a hipótese de possíveis contribuições destes genes e suas variações no estado de estresse oxidativo; na geração de EROs e no agravamento da DF, além de ampliar o entendimento da fisiopatologia da doença e a identificação de fatores de risco, que possam ser avaliados como prováveis alvos terapêuticos.

CASUÍSTICA

5. CASUÍSTICA

No presente trabalho foi realizado um estudo de corte transversal e de caso-controle. O grupo dos casos foi composto por 153 pacientes pediátricos com idade de 0 a 17 anos e diagnóstico de DF, os pacientes eram acompanhados no ambulatório de Hematologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA). Nesse grupo foram incluídos indivíduos com doença falciforme (HbSS e HbSC), que se encontravam em estado estável da doença, com ausência de infecção e que concordaram em participar do estudo, após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e resposta ao questionário sócio-demográfico e de inquérito epidemiológico. Foram excluídos do estudo indivíduos que se recusaram a assinar o TCLE, os que não responderam ao questionário; os que estavam fazendo uso de hidroxiuréia; os que fizeram uso de hemocomponentes no período < 90 dias ou apresentavam infecções. A obtenção dos dados clínicos foi realizada pela busca ativa dos prontuários médicos dos pacientes. Os casos foram pareados com os controles sadios de acordo com a idade e sexo.

O grupo controle foi constituído por 196 indivíduos em idade pediátrica triados no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Farmácia da UFBA (FAR/UFBA). Foram incluídos indivíduos com perfil normal de hemoglobinas (HbAA), que apresentaram ausência de infecção no momento da coleta, que concordaram em participar do estudo após a assinatura do TCLE e que responderam ao questionário demográfico. Foram excluídos os indivíduos que se recusaram a assinar o TCLE e a responder o questionário demográfico; aqueles com doenças infecciosas, portadores de outras hemoglobinopatias e pacientes que realizaram uso recente de hemocomponentes (<120 dias).

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ/BA (CPqGM/FIOCRUZ) (CAAE N° 0035.0.225.000-06).

As amostras de sangue foram coletadas e encaminhadas ao laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFBA (LACTFAR – UFBA) para a realização das análises hematológicas, bioquímicas, confirmação do perfil de hemoglobina e análises moleculares; as amostras foram também processadas no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do CPqGM/ FIOCRUZ, onde se realizou algumas análises moleculares e ensaios imuno-enzimáticos (ELISA) (Figura 11).

Uma vez que o presente estudo analisou diversos polimorfismos gênicos, que apresentam frequências diferentes, o cálculo amostral levou em consideração o polimorfismo de menor frequência na população geral que foi c.65S>C no gene *HFE*, apresenta a frequência de 1,5% (MILMAN *et al.*, 2005). Foi considerado o erro amostral de 5% e nível de confiança de 95% no universo de 5000 indivíduos, sendo que o N mínimo calculado foi de 72 indivíduos da população geral.

Todos os experimentos realizados seguiram as normas de Biossegurança de acordo com a Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005, seguindo as normas técnicas existentes no Manual de Procedimentos para a manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes da Fiocruz (Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ – Ministério da Saúde, 2005).

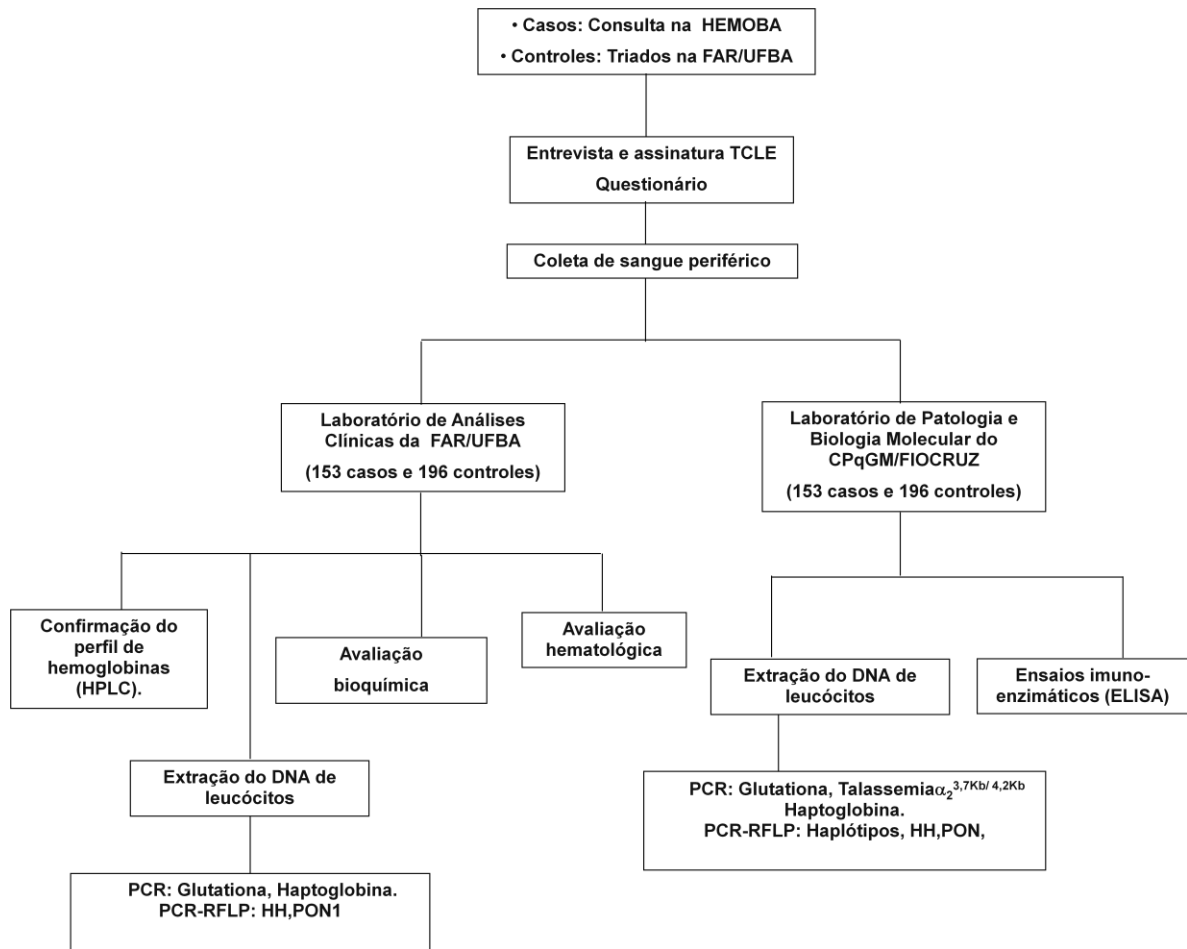


Figura 11. Fluxograma das principais etapas de realização do estudo.

MÉTODOS

6. MÉTODOS

6.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletados aproximadamente dez ml de sangue venoso em tubo a vácuo, utilizando-se materiais descartáveis. Cinco ml em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético sódico) na concentração de $1,5\pm 0,25$ mg/ml (LEWIS *et al.*, 2006) e cinco ml sem aditivo para coleta de soro. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao LACTFAR-UFBA onde foram realizadas as análises hematológicas, separação de soro e análises bioquímicas. A confirmação do perfil de hemoglobinas foi realizada no Laboratório de Pesquisa em anemias da FAR/UFBA. A extração do DNA genômico (ácido desoxirribonucléico) e as análises moleculares para investigação dos polimorfismos gênicos foram realizadas no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM/FIOCRUZ – Laboratório de Patologia e Biologia Molecular e na FAR/UFBA. Todo o material foi armazenado em freezer a -20° e a -70°C até a realização das análises.

6.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E DE HEMOGLOBINAS

6.2.1 Celularidade

A determinação dos valores hematológicos e índices hematimétricos foi realizada em contador eletrônico de células *CELL – DYN 3700* (Santa Clara, USA). A análise morfológica dos eritrócitos foi realizada por observação microscópica dos esfregaços sanguíneos corados pelo corante Wright e para a contagem de reticulócitos utilizou-se o corante supra- vital azul de cresil brilhante, sendo realizada a sua correção quando necessário (LEWIS *et al.*, 2006).

6.2.2 CONFIRMAÇÃO DO PERFIL DE HEMOGLOBINAS

A confirmação do perfil de hemoglobinas, assim como a sua quantificação, foi realizada por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), no equipamento automatizado da Bio-Rad *Variant* (Califórnia, USA), pelo princípio de troca iônica.

6.3 ANÁLISE MOLECULAR

6.3.1 Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos a partir de 200 µl de sangue total, utilizando-se o *FlexiGene DNA Kit* da QIAGEN (Uniscience do Brasil), seguindo-se as recomendações do fabricante.

A integridade do DNA foi verificada por corrida eletroforética em gel de agarose a 1 % utilizando-se tampão TAE 1X (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). O corante azul-de-bromofenol / xilenocianol / sacarose (0,25% / 0,25% / 40%) foi utilizado para acompanhamento visual das amostras de DNA durante a corrida eletroforética e o brometo de etídio 0,002% para visualização sob iluminação ultravioleta.

6.3.2 Investigação dos polimorfismos gênicos

A investigação dos polimorfismos nos genes da *Hemocromatose hereditária* (*c.282C>Y*; *c.63H>D* e *c.65S>C*), *Haptoglobina*, *Glutathione S-transferase* (*GSTM1* e *GSTT1*) e *Paraoxonase* (*PON1*); determinação da talassemia alfa 3,7Kb e 4,2Kb e haplótipos ligados ao grupo de genes da globina beta foram realizadas de acordo com a seguinte sequência:

- Aplicação da técnica de Reação em cadeia da Polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos para a investigação de cada polimorfismo (Tabela 01);
- Análise dos fragmentos obtidos na amplificação por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0% e visualização sob luz ultravioleta;
- Para a investigação de polimorfismos no gene da *HFE* e *Paraoxonase1* foi realizada a digestão dos fragmentos amplificados na reação de PCR, utilizando enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo (PCR-RFLP), seguida da análise dos fragmentos em gel de poliacrilamida a 8%, usando o azul de bromofenol/xilenocianol/sacarose (0,25%/0,25%/40%), com visualização dos fragmentos pelo brometo de etídio e observação sob iluminação ultravioleta;

Tabela 01. Sequências dos oligonucleotídeos sintéticos (*primers*), enzimas de restrição e fragmentos gerados após a PCR utilizados na investigação dos polimorfismos gênicos, talassemia e haplótipos da globina β investigados.

Genes/ Polimorfismos	PRIMERS 5' – 3'	FRAGMENTO (pb)	ENZIMA DE RESTRIÇÃO	REF.
Hemocromatose Hereditária				
HFE c. 282C>Y	D: CAAGTGCCTCCTTTGGTGAAGGTGACACAT R: CTCAGgCACTCCTCTCAACC	390	<i>Rsa I</i>	Mura et al.,1999
HFE c. 63H>D	D: ACATggTTAAggCCTgTTgC R: gCCACATCTggCTTgAAATT	200	<i>Mbo I</i>	Mura et al.,1999
HFE c.65S>C	D: ACATggTTAAggCCTgTTgC R: gCCACATCTggCTTgAAATT	200	<i>Hinf I</i>	Mura et al.,1999
Haptoglobina				
Hp REAÇÃO 2	D: CAggAgTAT ACA CCT TAA AT R: TTACTACTggTAgCgAACCGA	935	—	Yano et al., 1998
Hp REAÇÃO 1S	D: TTATCCACTgCTTCTCATTg R: gCAATgATgTCACggATATC	1200	—	Yano et al., 1998
Hp REAÇÃO 1F	D: CAggAgTATACACCTTAA ATg R: AATTTAAAATTggCATTTCCgCC	1400	—	Yano et al., 1998
Glutathione S-transferase				
GST c.GSTM1⁻	D: gAACTCCCTgAAAAGCTAAAgC R: gTTgggCTCAAATATACggTgg	271	—	Arruda et al., 2003
GST c. GSTT1⁻	D: TTCCTTACTggTCCTCACATCTC R: TCACCggATCATggCCAgCA	480	—	Arruda et al., 2003
GLOBINA β	D: gCC AAggAC AggTACggCTgTCATC R: CCCTTCCTATgACATgAACTTAACCAT	700	—	Arruda et al., 2003
Paraoxonase				
PON1 c.55L>M	D: gAA gAg TgA TgT ATA gCCCCA g	170	<i>CviA II</i>	Adkins et al.,

	R: TTTAATCCAgACCTAATgAAAgCC			1993
PON1 c.192Q>R	D: AT TgTTgCTgTgggACCTgA g	99	<i>Alw I</i>	Adkins et al., 1993
	R: CACgCTAAACCCAAATACATC			

Haplótipo βS

SÍTIO γG	D: AAgTgTggAgTgTgCACATg	780	<i>Hind III</i>	Sutton et al., 1989
	R: TgCTgCTAATgCTTCATTACAA			
SÍTIO γA	D: TgCTgCTAATgCTTCACAA	760	<i>Hind III</i>	Sutton et al., 1989
	R: TAAATgAggATgCACACA			
SÍTIO ψ^β	D: gAACAgAAgTTgAgATAgAgA	701	<i>Hinc II</i>	Sutton et al., 1989
	R: ACTCAgTTgTCTTgTgggCT			
SÍTIO 3' ψ^β	D: TCTgCATTTgACTCTgTTagC	590	<i>Hinc II</i>	Sutton et al., 1989
	R: ggACCCTAACTgATATAACTA			

Talassemia alfa

Tal^{3,7Kb/4,2Kb}	LIS1-F GTCGTCACTGGCAGCGTAGATC	LIS: 2503		Chong et al., 2000
Multiplex	LIS1-R GATTCCAGGTTGTAGACGGACTG	-α3.7jxn: 2022/2029		
	a2/3.7-F CCCCTCGCCAAGTCCACCC			
	3.7/20.5-R AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	α2 gene: 1800		
	a2/3.7-F CCCCTCGCCAAGTCCACCC			
	a2-R AGACCAGGAAGGGCCGGTG	-α4.2jxn: 1628		
	4.2-F GGTtTACCCATGTGGTGCCTC			
	4.2-R CCCGTTGGATCTTCTCATTtTCCC			

D = Direto; R = Reverso; Hp= Haptoglobina; Tal= talassemia

6.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Foram realizadas determinações séricas para avaliar o perfil hepático, lipídico, função renal, metabolismo do ferro e perfil inflamatório dos indivíduos estudados. As análises foram realizadas no equipamento automatizado *A25 System* (*BioSystems SA* Barcelona, Espanha). Para a avaliação do perfil lipídico foram estimados os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e suas frações, a lipoproteína plasmática de alta densidade (HDL-C), a lipoproteína plasmática de baixa densidade (LDL-C) e a fração lipoproteína plasmática de muito baixa densidade (VLDL-C). A função hepática foi avaliada pela análise da bilirrubina total e frações, proteínas totais e as frações albumina e globulinas, transaminases aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT); na avaliação da função renal foram analisados os parâmetros de uréia e creatinina e na avaliação do metabolismo do ferro foram analisados o ferro sérico e ferritina que foi analisada no *Access 2 Immunoassay system X2* (Beckman Coulter, Fullerton, CA). A proteína C reativa (PCR), a alfa 1-antitripsina e anti-estreptolisina-O (ASLO) foram analisados no *Image 800 system* (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

6.5 DETERMINAÇÃO DA VITAMINA C

Os níveis séricos de vitamina C foram determinados utilizando o kit *Ascorbic Acid assay Kit*, (BioVision, California), que desenvolve reação colorimétrica, onde o catalizador do kit oxida o ácido ascórbico e o produto da oxidação reage com a sonda de ácido ascórbico gerando cor e fluorescência. A leitura é feita em 570 nm de densidade óptica e o teste pode detectar concentrações de 0,01 a 10 nmol de

ácido ascórbico. O protocolo de reação foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

6.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PARAOXONASE

Para determinar a atividade da Paraoxonase¹ se processou a reação com 25 µL do soro e 500 µL de tampão de reação [Tris/HCl 100 mmol/L, pH 8,0 + CaCl₂ 2 mmol/L + Paraoxon a 5,0 mmol/L (O,O-dietil-O-pnitrofenol fosfato)], Sigma Chemical Co., U.K (Abbott *et al.*, 1995), a leitura é imediata. O paraoxon é clivado em paranitrofenol e ácido acético, a atividade sérica da paraoxonase corresponde a quantidade de paranitrofenol em milimol/min/mL. A atividade foi determinada a 25°C em no espectrofotômetro SpectraMax, (USA) a 405 nm.

6.7 DETERMINAÇÃO DO RECEPTOR DE TRANSFERRINA SOLÚVEL

O Receptor de transferrina solúvel foi estimado pela técnica de imuno-ensaio enzimático (ELISA) utilizando o *Quantikine TM IVDTM Soluble Transferrin Receptor* ELISA da R&D System Inc (Mineapolis,USA). O protocolo de reação foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

6.8 DETERMINAÇÃO DA HEMEOXIGENASE 1 TOTAL

A Hemeoxigenase 1 total foi estimada pelo kit utilizando o Kit HO-1 DuoSet IC ELISA (Mineapolis, USA). O anticorpo de captura foi imobilizado na placa e este se liga a HO-1/HMOX1; após a lavagem, o material não ligado é eliminado e a detecção da reação é feita pela pesquisa de anticorpo específico marcado para HO-1/HMOX1. A reação é revelada utilizando Streptavidina. O protocolo de reação foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

6.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas EPI INFO versão 6.04, SPSS versão 9.0 e o GraphPad versão 5.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos para as análises realizadas.

A análise de normalidade da distribuição das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A partir desta informação foram utilizados testes paramétricos ANOVA ou não-paramétricos de Kruskal-Wallis, sendo os resultados confirmados pelo pós-teste de Bonferroni.

O teste paramétrico ANOVA foi utilizado para a análise da distribuição de médias de variáveis quantitativas ou numéricas, com distribuição normal dentro de categorias. Além disso, verificando se é provável haver uma diferença entre as médias dos valores, buscou-se dentre as médias apresentadas diferenças significativas conduzidas de múltiplas comparações de médias pelo teste post-hoc de Bonferroni. O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para as distribuições fora do normal.

A análise de variáveis qualitativas ou categóricas de três ou mais grupos foi realizada pelo teste não paramétrico do Qui-quadrado (χ^2), devidamente corrigido pelos testes de Mantel-Haenszel e Yates. Nas análises de valores inferiores a quatro, estas foram realizadas pelo teste exato de Fisher. Os intervalos de confiança em 95% e a razão de prevalência foram calculados para essas variáveis. As análises de correlação foram realizadas pelos coeficientes de Pearson's para os dados de distribuição contínua e os coeficientes de Kendall's tau-b e Spearman para os dados categorizados.

Os testes de Mann-Whitney e o teste T independente foram utilizados para a análise de duas variáveis numéricas, na comparação de dois grupos de valores dentro de uma mesma variável, levando-se em consideração a distribuição de cada variável.

As análises multivariadas foram realizadas com base nos valores do teste F avaliando os níveis de confiança para os testes de Pillai's Trace, Wilkis' Lambda, hotelling's Trace e Roy's Largest Root, após a criação de modelos apresentando variáveis dependentes associadas com a história clínica dos pacientes e variáveis independentes caracterizadas como fatores de risco, estabelecidas por um processo de criação de variáveis categóricas múltiplas. A análise de regressão linear foi realizada tendo como base o valor de F e os níveis de significância para o teste de hipóteses nulas.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 CARACTERIZAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS PACIENTES COM DF

Foram investigados 153 indivíduos com DF com idade média de $9,25 \pm 4,06$, sendo 82 (53,9%) do sexo masculino e 71 (46,1%) do feminino. O grupo controle foi constituído por 196 crianças com idade média de $9,310 \pm 3,47$, sendo 99 (50,5%) do sexo masculino e 97 (49,5%) do feminino. A análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos nos grupos de indivíduos com doença falciforme (DF) e controles mostrou diferenças estatisticamente significativas para as variáveis estudadas (Tabela 02).

O perfil bioquímico correspondeu ao perfil lipídico: colesterol total e frações (HDL-C, LDL-C e VLDL-C) e triglicerídeos; perfil hepático: AST, ALT, proteínas totais e frações (albumina e globulinas); avaliação renal: uréia e creatinina; marcadores de inflamação: PCR, ASLO e alfa 1- antitripsina; metabolismo do ferro: ferro sérico e ferritina. Na análise entre os valores médios para os parâmetros bioquímicos no grupo DF e controles observou-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros analisados, exceto para as variáveis proteínas totais e albumina. (Tabela 02).

Tabela 02: Características laboratoriais dos pacientes com DF e controles.

	Pacientes DF		Controle		Valor de p**	VR
	N	Média ± Desvio padrão	N	Média ± Desvio padrão		
Idade (anos)	153	9,250±4,060	196	9,310±3,470	0,9611	
Sexo						
Masculino (%)	82	53,9	99	50,5		
Feminino (%)	71	46,1	97	49,5		
Hemoglobinas (%)						
AA	--		196	100		A1:95-98 A2:1,5-4,0
SS	101	67,8*				
SC	47	31,5*				
SD	01	0,7*				
Hemoglobina, %						
Fetal	152	7,51 ± 6,20	196	0,51 ± 0,65	0,000**	HbF: Até 2,0
Hemólise						
Hemácias, milhões/mL	153	3,2311 ± 0,9664	196	4,7184 ± 0,3760	0,000**	H: 4,5-6,1 M: 4,0-5,4
Hemoglobina (g/dL)	153	8,9247 ± 2,005	196	12,7240 ± 1,0828	0,000**	H:12,8-17,8 M:11,3-16,3
Hematócrito (%)	153	27,6019 ± 6,2038	196	38,2123 ± 2,8752	0,000**	H: 40-54 M: 35-49
VCM (fl)	153	87,5234 ± 10,8127	196	81,1701 ± 5,1897	0,000*	80- 98
HCM (pg)	153	28,3494 ± 3,7510	196	27,0279 ± 2,0011	0,000*	27- 32
CHCM (%)	153	32,3597 ± 0, 9868	196	33,2221 ± 1,1093	0,000**	31-35
Reticulócitos (%)	153	7,4039 ± 4,7826	174	0,8680 ± 0,2712	0,000**	0,5- 1,5
LDH, U/L	152	866,047 ± 505,156	176	388,296 ± 137,980	0,000**	100- 190
Leucócitos						
Leucócitos (10⁹/ L)	153	13081,8182 ± 5744,8295	196	6965,1282 ± 2138,9405	0,000**	4.000- 10.000
Neutrófilos (10⁹/ L)	153	6055,915± 3705,747	196	3349± 2247,024	0,000**	2.500- 7.500
Monócitos (10⁹/ L)	153	810,288± 485,027	196	512,964± 377,572	0,000**	120- 1.000
Linfócitos típicos (10⁹/ L)	153	5061,935± 2361,512	196	2723,001± 820,095	0,000**	720- 4.800
Plaquetas						
Plaquetas (10⁹/ L)	153	405,5390 ± 158,2528	196	303,2194 ± 67,9722	0,000*	150- 450

Metabolismo lipídico							
Colesterol total,	152	121,047 ± 26,416	186	161,957 ± 35,943	0.000**	2-19 A: <170 >20 A: < 200	
mg/dL							
HDL colesterol,	152	35,338 ± 12,448	184	47,381 ± 13,650	0.000**	Até 10 A: ≥ 40 >11 A: ≥ 35	
mg/dL							
LDL colesterol,	152	64,716 ± 22,317	183	97,079 ± 33,478	0.001**	2-19 A: <110 >20 A: < 130	
mg/dL							
VLDL colesterol,	152	20,912 ± 9,967	184	17,482 ± 9,684	0.002**	< 40	
mg/dL							
Triglicerídeos,	151	104,456 ± 49,857	183	87,122 ± 48,263	0.002**	< 10 A: Até 100 10-19 A: Até 130 >20 A: Até 199	
mg/dL							
Hemólise e comprometimento hepático							
AST, U/L	153	48,662 ± 25,631	181	31,659 ± 10,964	0.000**	Até 42	
Bilirrubina total ,	152	2,787 ± 1,766	175	0,507 ± 0,217	0.000**	Até 1,3	
mg/dL							
Bilirrubina direta,	152	0,676 ± 0,487	174	0,250 ± 0,082	0.000**	Até 0,4	
mg/dL							
Bilirrubina indireta,	152	2,111 ± 1,588	174	0,256 ± 0,192	0.000**	Até 0,9	
mg/dL							
Hepático							
ALT, U/L	153	28,243 ± 21,433	180	17,737 ± 7,008	0.000**	Até 41	
Proteínas totais,	152	7,327 ± 0,855	177	7,289 ± 0,629	0.542**	6,0- 8,0	
g/dL							
Albumina, g/dL	152	4,045 ± 0,663	177	4,189 ± 0,576	0.173**	3,5- 5,5	
Globulina, g/dL	152	3,282 ± 0,783	177	3,100 ± 0,624	0.053**	2,3- 3,5	
Renal							
Uréia, mg/dL	151	17,737 ± 6,442	180	21,537 ± 5,893	0.000**	15- 40	
Creatinina, mg/dL	152	0,478 ± 0,179	178	0,532 ± 0,182	0.008**	0,4- 1,3	
Inflamação							
Ferro, mcg/dL	127	125,332 ± 120,622	177	73,627 ± 41,006	0.000**	H: 65-175 M: 50- 170 2 a 12 A: 22-135	
Ferritina, ng/dL	153	317,703 ± 364,949	177	38,184 ± 27,108	0.000**	H: 23,9- 335,2 M: 11- 305,8	
PCR mg/L	152	7,049 ± 12,000	193	4,238 ± 18,110	0.000**	< 6,0	
Alfa 1-antitripsina	152	153,769 ± 45,665	192	135,889 ± 42,453	0.000**	80- 200	
mg/dL							

*Teste t; ** Teste de Mann-Whitney, VR: Valor de referência

A confirmação do perfil de hemoglobinas foi realizada nos pacientes com DF na frequência de 67,8% (101) para o genótipo HbSS, de 31,5% (47) para o HbSC e 0,7 % (01) para o HbSD. A análise dos dados hematológicos nos indivíduos HbSS e HbSC mostrou diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros analisados, exceto para a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (Tabela 03).

Tabela 03: Análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos nos indivíduos HbSS e HbSC.

Dados hematológicos	HbSS N=101 Média ± Desvio padrão	HbSC N=47 Média ± Desvio padrão	Valor de p
Hemácias, milhões/mL	2,705 ± 0,577	4,331 ± 0,578	0,000*
Hemoglobina (g/dL)	7,850 ± 1,262	11,251 ± 1,303	0,000*
Hematócrito (%)	24,230 ± 3,859	34,909 ± 3,760	0,000*
VCM (fl)	90,929 ± 10,263	80,721 ± 7,498	0,000*
HCM (pg)	29,497 ± 3,598	26,013 ± 2,460	0,000**
CHCM (%)	32,413 ± 1,005	32,447 ± 1,094	0,270*
Leucócitos (10⁹/ L)	14797,030 ± 4990,600	9353,191 ± 5599,218	0,000*
Neutrófilo (10⁹/ L)	6691,861 ± 3530,146	4729,383 ± 3912,953	0,003*
Monócito (10⁹/ L)	926,703 ± 449,436	530,681 ± 455,721	0,000*
Linfócito típico (10⁹/ L)	5936,208 ± 2077,285	3332,447 ± 1998,009	0,000*
Reticulócitos (%)	9,303 ± 4,746	3,744 ± 2,412	0,000**
Plaquetas (10⁹/ L)	444,297 ± 131,361	320,872 ± 185,464	0,000**

*ANOVA ; ** Kruskal -Wallis

A análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos nos indivíduos HbSS e controles esta descrita na tabela 04, onde foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos parâmetros analisados, exceto para o CHCM. A tabela 05 mostra a análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos nos indivíduos HbSC e controles.

Tabela 04: Análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos entre os indivíduos HbSS e controles.

	HbSS N=101 Média ± Desvio padrão	Controles N=196 Média ± Desvio padrão	Valor de p
Hemácias, milhões/mL	2,705 ± 0,577	4,7184 ± 0,3760	0,000**
Hemoglobina (g/dL)	7,850 ± 1,262	12,7240 ± 1,0828	0,000**
Hematócrito (%)	24,230 ± 3,859	38,2123 ± 2,8752	0,000**
VCM (fl)	90,929 ± 10,263	81,1701 ± 5,1897	0,000*
HCM (pg)	29,497 ± 3,598	27,0279 ± 2,0011	0,000*
CHCM (%)	32,413 ± 1,005	33,2221 ± 1,1093	0,759**
Leucócitos (10⁹/ L)	14797,030 ± 4990,600	6965,1282 ± 2138,9405	0,000**
Neutrófilos (10⁹/ L)	6691,861 ± 3530,146	3349 ± 2247,024	0,000**
Monócitos (10⁹/ L)	926,703 ± 449,436	512,964 ± 377,572	0,000**
Linfócitos típicos (10⁹/ L)	5936,208 ± 2077,285	2723,001 ± 820,095	0,000**
Reticulócitos (%)	9,303 ± 4,746	0,8680 ± 0,2712	0,000**
Plaquetas (10⁹/ L)	444,297 ± 131,361	303,2194 ± 67,9722	0,000*

*Teste t; ** Teste de Mann-Whitney

Tabela 05: Análise dos dados hematológicos e índices hematimétricos nos indivíduos HbSC e controle.

Dados hemtológicos	HbSC N=47 Média ± Desvio padrão	Controles N=196 Média ± Desvio padrão	Valor de p
Hemácias, milhões/mL	4,331 ± 0,578	4,7184 ± 0,3760	0,000**
Hemoglobina (g/dL)	11,251 ± 1,303	12,7240 ± 1,0828	0,000**
Hematócrito (%)	34,909 ± 3,760	38,2123 ± 2,8752	0,000**
VCM (fl)	80,721 ± 7,498	81,1701 ± 5,1897	0,956*
HCM (pg)	26,013 ± 2,460	27,0279 ± 2,0011	0,059*
CHCM (%)	32,447 ± 1,094	33,2221 ± 1,1093	0,603**
Leucócitos (10⁹/ L)	9353,191 ± 5599,218	6965,1282 ± 2138,9405	0,020**
Neutrófilos (10⁹/ L)	4729,383± 3912,953	3349± 2247,024	0,034**
Monócitos (10⁹/ L)	530,681± 455,721	512,964± 377,572	0,000**
Linfócitos típicos (10⁹/ L)	3332,447± 1998,009	2723,001± 820,095	0,000**
Reticulócitos (%)	3,744 ± 2,412	0,8680 ± 0,2712	0,013**
Plaquetas (10⁹/ L)	320,872 ± 185,464	303,2194 ± 67,9722	0,000*

*Teste t; ** Teste de Mann-Whitney

Quando se analisou o perfil bioquímico entre os grupos HbSS e controle observou-se diferenças estatisticamente significativas para vários parâmetros analisados, exceto para albumina (Tabela 06). A análise do perfil bioquímico nos indivíduos com HbSC e controle e indivíduos HbSS e HbSC, respectivamente, mostrou diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros

relacionados à hemólise, inflamação, metabolismo lipídico e metabolismo do ferro (Tabela 07 e 08).

Tabela 06: Análise dos valores médios para os marcadores bioquímicos nos indivíduos HbSS e controles.

		N	HbSS Média ± Desvio padrão	N	Grupo Controle Média ± Desvio padrão	Valor p
Colesterol total, mg/dL		101	121,317 ± 26,460	186	164.414 ± 35.943	0.000**
HDL colesterol, mg/dL		101	32,297 ± 10,038	184	47.039 ± 12.950	0.000**
LDL colesterol, mg/dL		101	67,475 ± 22,373	183	99.322 ± 33.095	0.001**
VLDL colesterol, mg/dL		101	22,485 ± 10,945	184	17.924 ± 9.796	0.002**
Triglicerídeos, mg/dL		100	112,110 ± 54,835	183	89.197 ± 48.855	0.000**
Uréia, mg/dL		100	17,356 ± 6,579	180	21.833 ± 6.068	0.000**
Creatinina, mg/dL		101	0,448 ± 0,186	178	0.557 ± 0.200	0.003**
Ferro, mcg/dL		83	136,320 ± 126,114	177	74.740 ± 40.175	0.000**
Ferritina, ng/dL		101	395,413 ± 414,651	177	38, 184 ± 25.765	0.000**
AST, U/L		101	55,723 ± 26,747	181	32.199 ± 10.499	0.000**
ALT, U/L		101	30,455 ± 24,333	180	18.389 ± 7.316	0.000**
Bilirubina total, mg/dL		101	3,331 ± 1,782	175	0.506 ± 0.218	0.000**
Bilirubina direta, mg/dL		101	0,777 ± 0,532	174	0.252 ± 0.098	0.000**
Bilirubina indireta, mg/dL		101	2,553 ± 1,641	174	0.254 ± 0.177	0.000**
Proteínas totais, g/dL		101	7,353 ± 0,939	177	7.251 ± 0.620	0.039**
Albumina, g/dL		101	4,024 ± 0,723	177	4.167 ± 0.601	0.462**
Globulina, g/dL		101	3,330 ± 0,843	177	3.084 ± 0.631	0.005**
LDH, U/L		101	1034,584 ± 501,950	176	357.511 ± 143.016	0.000**
ASLO, UI/MI		101	207,784 ± 296,649	193	134.944 ± 137.578	0.000**
PCR mg/L		101	7,626 ± 13,273	193	3.932 ± 15.814	0.000**
Alfa 1-antitripsina mg/dL		101	160,832 ± 45,345	192	136.097 ± 39.109	0.000**

** Teste de Mann-Whitney

Tabela 07: Análise dos valores médios para os marcadores bioquímicos nos indivíduos HbSC e controles.

	N	HbSC Média ± desvio padrão	N	Grupo Controle Média ± desvio padrão	Valor p
Colesterol total, mg/dL	47	121,224 ± 26,598	186	164.414 ± 35.943	0.000*
HDL colesterol, mg/dL	47	41,872 ± 14,567	184	47.039 ± 12.950	0.131**
LDL colesterol, mg/dL	47	58,787 ± 21,231	183	99.322 ± 33.095	0.001**
VLDL colesterol, mg/dL	47	17,532 ± 6,321	184	17.924 ± 9.796	0.660**
Triglicerídeos, mg/dL	47	88,170 ± 31,938	183	89.197 ± 48.855	0.477**
Uréia, mg/dL	46	18,565 ± 6,123	180	21.833 ± 6.068	0.024**
Creatinina, mg/dL	46	0,543 ± 0,141	178	0.557 ± 0.200	0.479**
Ferro, mcg/dL	47	102,530 ± 106,224	177	74.740 ± 40.175	0.382**
Ferritina, ng/dL	47	150,711 ± 100,487	177	38, 184 ± 25.765	0.000**
AST, U/L	47	33,489± 14,123	181	32.199 ± 10.499	0.706**
ALT, U/L	47	23,489 ± 14,124	180	18.389 ± 7.316	0.246**
Bilirubina total , mg/dL	47	1,619 ± 1,014	175	0.506 ± 0.218	0.000**
Bilirubina direta, mg/dL	47	0,457 ± 0,263	174	0.252 ± 0.098	0.000**
Bilirubina indireta, mg/dL	47	1,162 ± 0,923	174	0.254 ± 0.177	0.213**
Proteínas totais, g/dL	47	7,270 ± 0,645	177	7.251 ± 0.620	0.452**
Albumina, g/dL	47	4,091 ± 0,645	177	4.167 ± 0.601	0.638**
Globulina, g/dL	47	3,179 ± 0,631	177	3.084 ± 0.631	0.755**
LDH, U/L	47	503,872 ± 273,115	176	357.511 ± 143.016	0.000**
ASLO, UI/MI	46	163,561 ± 261,643	193	134.944 ± 137.578	0.000**
PCR mg/L	46	5,783 ± 8,563	193	3.932 ± 15.814	0.003**
Alfa 1-antitripsina mg/dL	46	138,261 ± 42,876	192	136.097 ± 39.109	0.462**

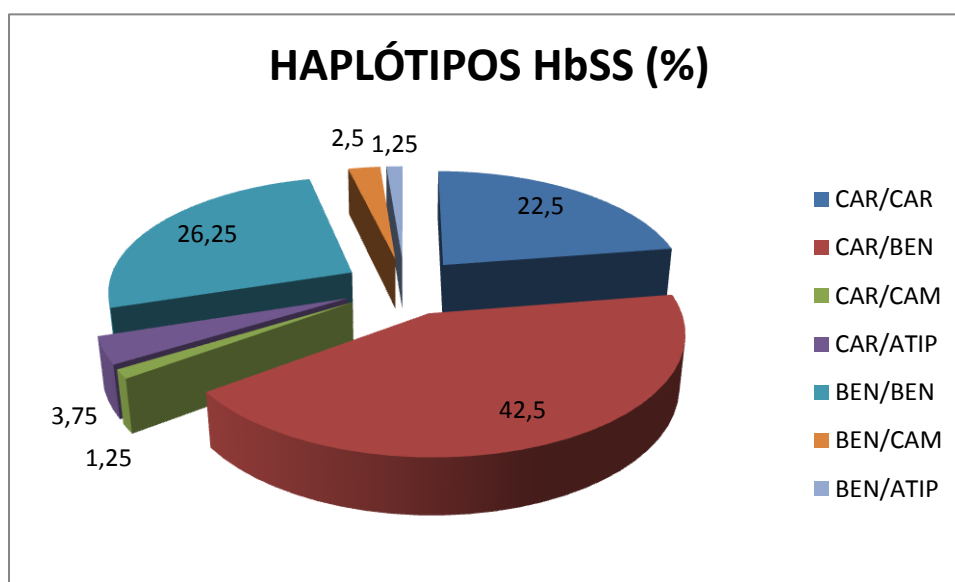
** Teste de Mann-Whitney

Tabela 08: Análise dos valores médios para os marcadores bioquímicos nos indivíduos HbSS e HbSC.

	HbSS		HbSC		Valor p
	N	Média ± desvio padrão	N	Média ± desvio padrão	
Colesterol total, mg/dL	101	121,317 ± 26,460	47	120,468 ± 26,590	0,856*
HDL colesterol, mg/dL	101	32,297 ± 10,038	47	41,872 ± 14,567	0,000**
LDL colesterol, mg/dL	101	67,475 ± 22,373	47	58,787 ± 21,231	0,027*
VLDL colesterol, mg/dL	101	22,485 ± 10,945	47	17,532 ± 6,321	0,011**
Triglicerídeos, mg/dL	100	112,110 ± 54,835	47	88,170 ± 31,938	0,016**
Uréia, mg/dL	100	17,356 ± 6,579	46	18,565 ± 6,123	0,227*
Creatinina, mg/dL	101	0,448 ± 0,186	46	0,543 ± 0,141	0,000**
Ferro, mcg/dL	83	136,320 ± 126,114	40	102,530 ± 106,224	0,058*
Ferritina, ng/dL	101	395,413 ± 414,651	47	150,711 ± 100,487	0,000**
AST, U/L	101	55,723 ± 26,747	47	33,489 ± 14,123	0,000**
ALT, dL)U/L	101	30,455 ± 24,333	47	23,489 ± 12,124	0,090**
Bilirubina total, mg/dL	101	3,331 ± 1,782	47	1,619 ± 1,014	0,000**
Bilirubina direta, mg/dL	101	0,777 ± 0,532	47	0,457 ± 0,263	0,000**
Bilirubina indireta, mg/dL	101	2,553 ± 1,641	47	1,162 ± 0,923	0,0000*
Proteínas totais, g/dL	101	7,353 ± 0,939	47	7,270 ± 0,645	0,025**
Albumina, g/dL	101	4,024 ± 0,723	47	4,091 ± 0,513	0,727**
Globulina, g/dL	101	3,330 ± 0,843	47	3,179 ± 0,631	0,045**
LDH, U/L	101	1034,584 ± 501,950	47	503,872 ± 273,115	0,000**
ASLO, UI/MI	101	207,784 ± 296,649	46	163,561 ± 261,643	0,015**
PCR mg/L	101	7,626 ± 13,273	46	5,783 ± 8,563	0,203**
Alfa 1-antitripsina mg/dL	101	160,832 ± 45,345	46	138,261 ± 42,876	0,0051*

*ANOVA; ** Kruskal-Wallis

A distribuição dos haplótipos ligados ao grupo de genes da globina β nos indivíduos com HbSS e HbSC esta demonstrada na figura 12 e a distribuição de talassemia alfa ^{3,7kb e 4,2 kb} na figura 13. A distribuição dos *haplótipos* ligados ao grupo de genes da globina β em indivíduos com DF de acordo com a presença de talassemia α esta descrita na tabela 09.



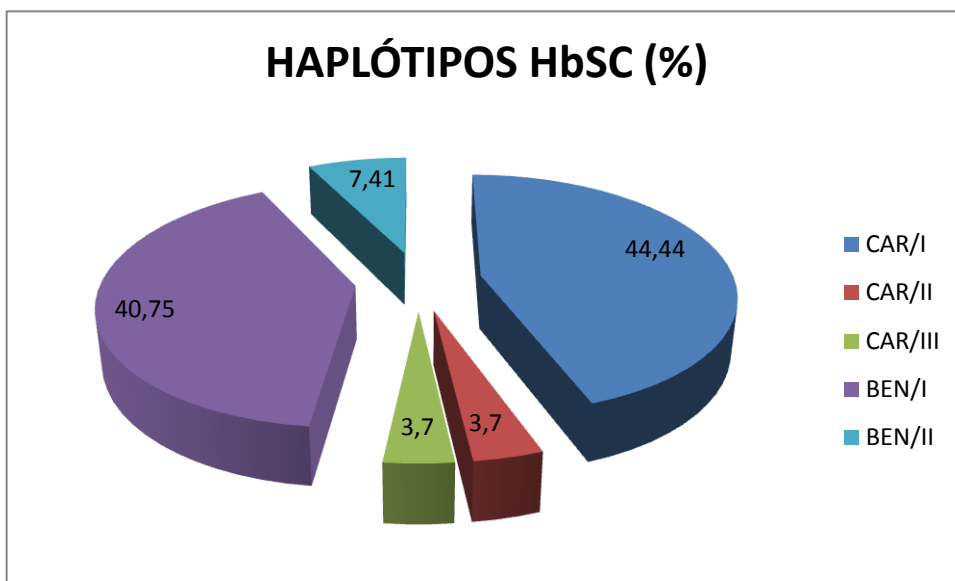


Figura 12. Distribuição dos *haplótipos* ligados ao grupo de genes da globina β^S em indivíduos com HbSS e HbSC.

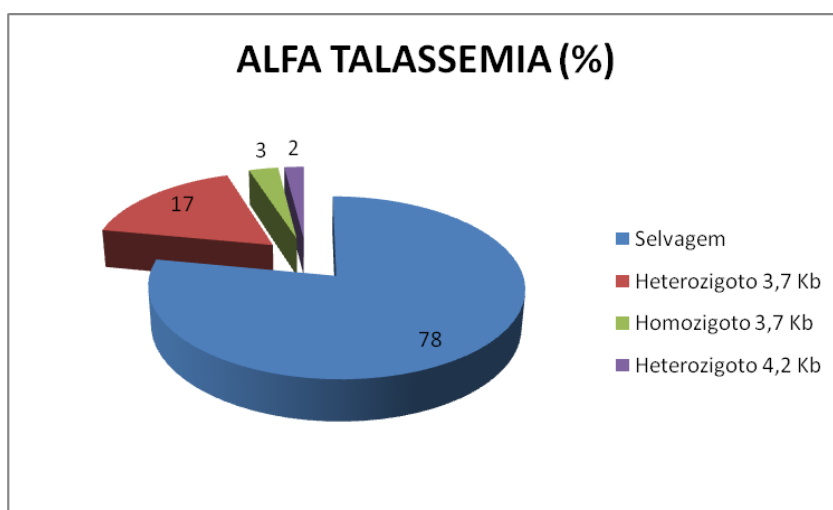


Figura 13. Frequência de talassemia $\alpha^{3,7Kb}$ e $\alpha^{4,2 Kb}$ em indivíduos com DF.

Tabela 09. Distribuição dos *haplótipos* ligados ao grupo de genes da globina β em indivíduos com DF de acordo com a presença de talassemia α .

Tipo do Haplótipo	Talassemia α		Total	Valor de p
	Ausência	Presença		
	N (%)	N (%)		
Pacientes HbSS				
CAR/CAR	14 (24,2)	03 (15,8)	17	NS
CAR/ BEN	24 (41,4)	09 (47,4)	33	NS
CAR/CAM	01 (1,7)	02 (10,5)	03	NS
CAR/ATIP	15 (25,9)	05 (26,3)	20	NS
BEN/ BEN	02 (03,4)	00 (00)	02	NS
BEN/ CAM	01 (1,7)	00 (00)	01	NS
BEN/ ATIP	01 (1,7)	00 (00)	01	NS
Total	58 (100)	19 (100)	78	
Pacientes HbSC				
CAR/ I	09 (39,1)	02 (67)	11	NS
CAR/ II	01 (4,3)	00 (---)	01	NS
CAR/ III	01 (4,3)	00 (--)	01	NS
BEN/ I	10 (43,6)	01 (33)	11	NS
BEN/ II	02 (8,7)	00 (--)	02	NS
Total	23 (100)	03 (100)	26	

NS=Não significante

Foi realizada a análise dos dados hematológicos nos indivíduos com DF e alelos selvagem e mutante para a talassemia alfa^{3,7Kb e 4,2Kb}, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os valores de VCM (p=0,006), HCM (0,006), contagem de bastonetes (0,015), eosinófilo (p=0,005) e com a concentração de HbS (p=0,012). (Figura 14). Quanto aos dados bioquímicos observou-se nos indivíduos com DF diferenças estatisticamente significativas para as variáveis colesterol VLDL (p=0,005), triglicerídeos (p=0,017), AST (p=0,026) e ALT (0,002) (Figura 15).

A análise da história clínica dos indivíduos com DF portadores dos alelos selvagens e mutantes para a talassemia alfa^{3,7 Kb e 4,2 Kb} mostrou diferenças estatisticamente significativas para o evento de seqüestro esplênico p=0,0035, razão de prevalência de 5,37 (1,58 – 18,40), sendo a maior freqüência em indivíduos com idade ≤ a cinco anos de idade.

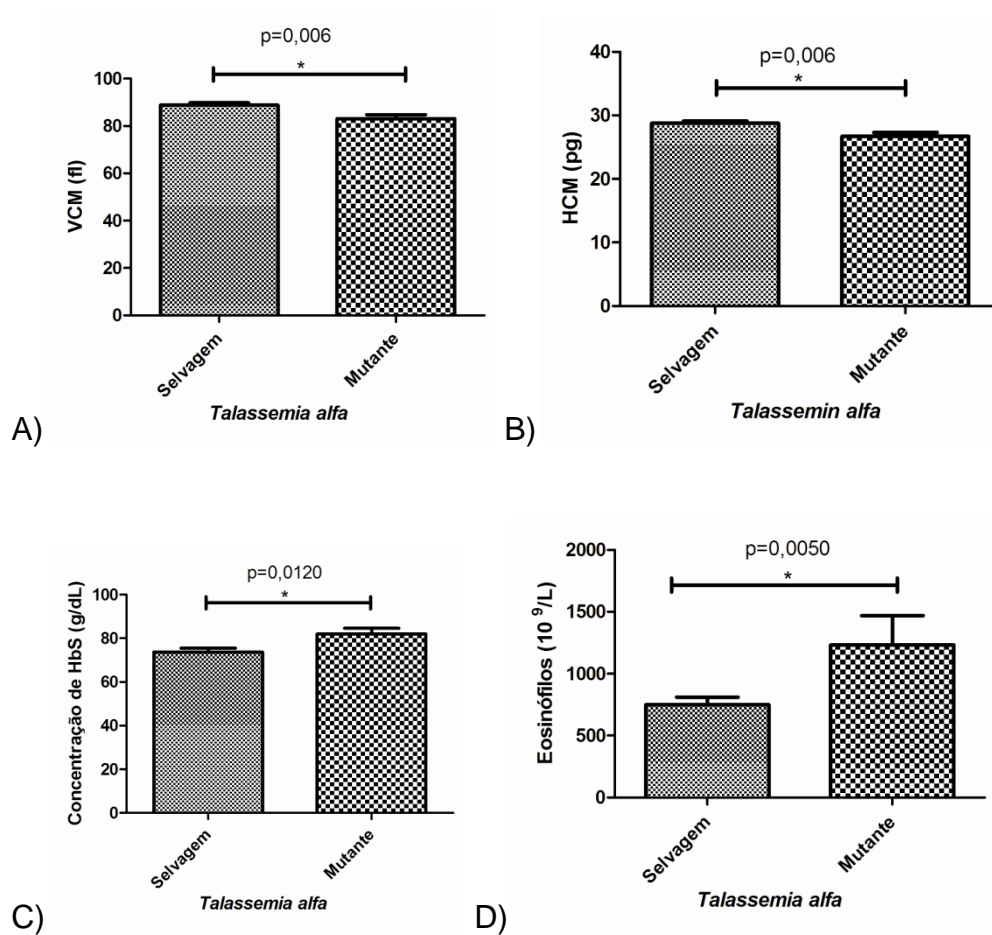


Figura 14. Análise dos dados hematológicos nos indivíduos com DF e alelos selvagem e mutante para a talassemia alfa ^{3,7 Kb e 4,2 Kb}. A) Valores de VCM e alfa talassemia, *ANOVA; B) Valores de HCM e alfa talassemia, *ANOVA ; C) Valores médios da concentração de HbS e alfa talassemia, * Kruskal-Wallis; D) Contagem de eosinófilos e alfa talassemia. * Kruskal-Wallis

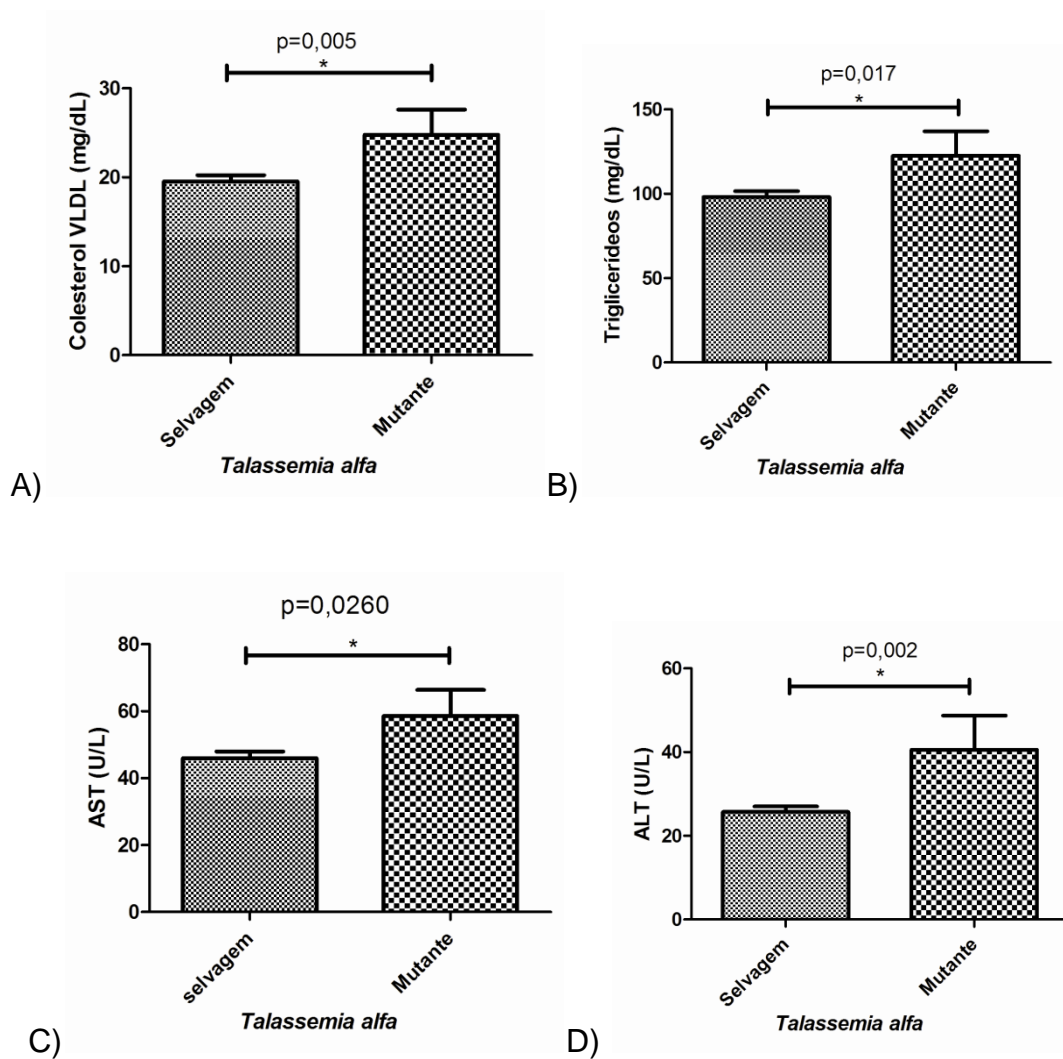


Figura 15. Análise dos dados bioquímicos entre os indivíduos com DF com os alelos selvagem e mutante para a talassemia alfa^{3,7 Kb e 4,2 Kb}. A) Valores médios de colesterol VLDL e alfa talassemia; B) Valores médios de triglicérides e alfa talassemia; C) Valores médios de AST e alfa talassemia; D) Valores médios de ALT e alfa talassemia. * Kruskal-Wallis

A análise dos dados hematológicos nos haplótipos CAR/BEN e CAR/CAR ligados ao grupo de genes da globina β^S em indivíduos com DF revelou diferenças estatisticamente significativas para as variáveis linfócitos típicos ($p=0,013$) e concentração de HbF ($p=0,035$) (Figura 16), e na análise dos dados

bioquímicos revelou diferença estatisticamente significativa entre os haplótipos CAR/BEN e CAR/CAR e a variável AST ($p=0,011$) (Figura 17)

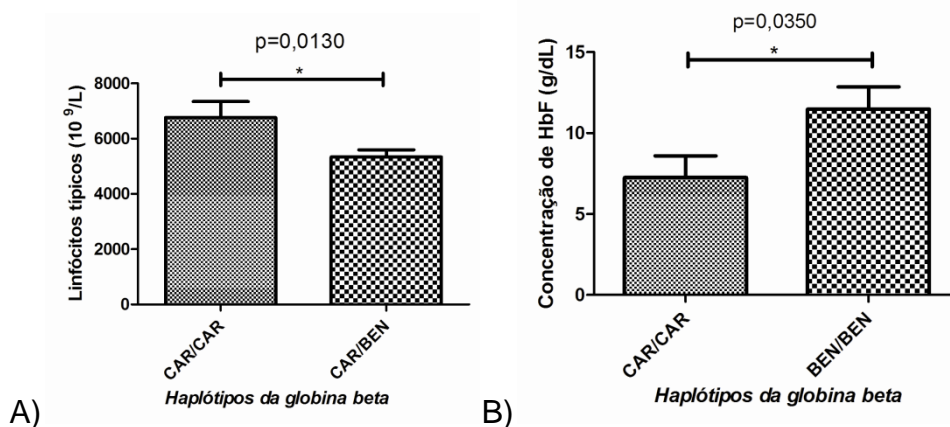


Figura 16. Análise dos dados hematológicos entre os *haplótipos* CAR/BEN e CAR/CAR e CAR/CAR e BEN/BEN ligados ao grupo de genes da globina β em indivíduos com DF. A) Análise da contagem de linfócitos típicos e *haplótipos* CAR/CAR e CAR/BEN, * Kruskal-Wallis; B) Análise da concentração de HbF e *haplótipos* CAR/CAR e BEN/ BEN, * Kruskal-Wallis.

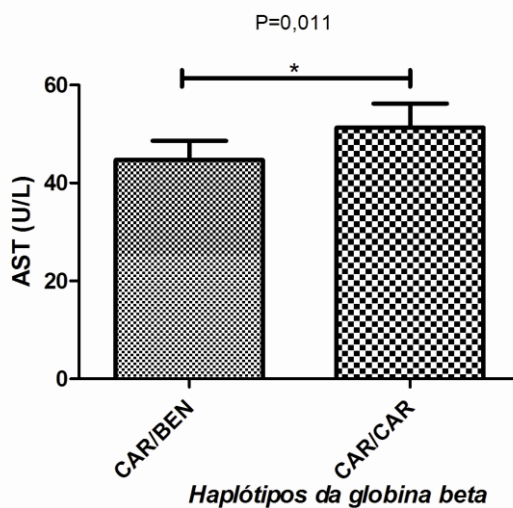


Figura 17. Análise dos níveis séricos de AST nos *haplótipos* CAR/BEN e CAR/CAR ligados ao grupo de genes da globina β em indivíduos com DF. * Kruskal-Wallis

7.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM DF

Os dados clínicos dos pacientes com DF estão descritos na tabela 10, sendo que foram encontradas diferenças significantes para o uso de transfusão sangüínea, internação, pneumonia e seqüestro esplênico quando se comparou os grupos de indivíduos HbSS e HbSC.

Tabela 10. Histórico das características clínicas apresentadas pelos indivíduos com DF.

Dados clínicos	N	HbSS N (%)	HbSC N (%)	Valor de p	RP	IC
STA	11/138	08/94 (8,51)	03/44 (6,82)	0,5123**	1,27	0,29 – 7,81
Transfusão sangüínea	73/138	64/94 (68,08)	09/44 (20,45)	< 0,001*	8,30	3,33 – 21,87
Internação	112/138	82/94 (87,23)	30/44 (68,18)	0,0149*	3,19	1,21 – 8,43
Infecção	64/113	47/77 (61,04)	17/36 (47,22)	0,2391*	1,75	0,73 – 4,20
Úlcera de perna	02/138	01/94 (1,06)	01/44 (2,27)	0,5376	0,46	0,01 – 37,13
Crise de dor	111/139	79/95 (83,15)	32/44 (72,73)	0,2306*	1,85	0,71 – 4,70
Pneumonia	74/138	62/94 (65,96)	12/44 (27,27)	< 0,001*	5,17	2,21 – 12,45
Priapismo	05/67	04/45 (8,89)	01/19 (5,26)	0,5315**	1,76	0,16 – 91,22
Sequestro esplênico	18/137	17/94 (18,08)	01/43 (2,32)	0,0237**	9,27	1,34 -396,58‡
AVC	08/138	07/94 (7,45)	01/44 (2,27)	0,2117**	3,46	0,42 – 159,50
VO	118/144	80/95 (8,42)	34/44 (77,27)	0,0,6197*	1,38	0,51- 3,59

* χ^2 ; ** Teste exato de Fisher; STA= Síndrome torácica aguda; AVC= Acidente vascular cerebral; VO= Vaso-oclusão; RP= Razão de prevalência; IC=Intervalo de confiança; ‡ Dados não acurados.

7.3 INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE MOLÉCULAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO

7.3.1 Polimorfismos no gene da *Glutathione S-transferase*

De acordo com a distribuição dos polimorfismos no gene da *GST*, os genes *GSTT1* e *GSTM1*, o genótipo *Mu nulo* foi o mais freqüente em ambos os grupos estudados (Tabela 11), sendo que em ambos polimorfismos a distribuição gênica e alélica estão em equilíbrio de Hardy Weinberg.

Tabela 11. Distribuição da freqüência dos polimorfismos nos genes *GSTT1* e *GSTM1* da *Glutathione S-transferase* no grupo de indivíduos com DF e controles.

Gene <i>GST</i>	Pacientes DF N(%)	Freqüência Genotípica	Freqüência Alélica	Controles DF N(%)	Freqüência Genotípica	Freqüência Alélica
<i>Mu</i>						
<i>GSTM1</i> ⁺	56 (49,6)	0,496	0,721	111 (63,1)	0,631	0,784
<i>GSTM1</i> ⁻	06 (5,3)	0,053	0,279	11 (6,2)	0,062	0,216
<i>GSTM1</i> ⁺ / <i>GSTM1</i> ⁺	51 (45,1)	0,451		54 (30,7)	0,307	
<i>Theta</i>						
<i>GSTT1</i> ⁺	56 (76,7)	0,767	0,842	111 (82,2)	0,822	0,870
<i>GSTT1</i> ⁻	06 (8,2)	0,082	0,158	11 (8,2)	0,082	0,130
<i>GSTT1</i> ⁺ / <i>GSTT1</i> ⁻	11 (15,1)	0,151		13 (9,6)	0,096	

Os indivíduos que apresentaram polimorfismo nos genes *GSTM1* e *GSTT1* da *GST* foram agrupados formando o grupo *GST* mutante e os que não apresentaram polimorfismos nestes genes formaram o grupo selvagem. A comparação dos dados hematológicos nos grupos mutante de indivíduos com DF

e controle demonstrou diferença estatisticamente significativa em alguns parâmetros do eritrograma e do leucograma (Tabela 12).

Tabela 12. Análise dos dados hematológicos entre os alelos mutante para o gene da *glutathione S-transferase* em indivíduos com DF e controles.

Dados Hematológicos	DF <i>GST</i> mutante N=68 Média ± Desvio padrão	Controles <i>GST</i> mutante N=78 Média ± Desvio padrão	Valor de p
Idade (anos)	9,627 ± 4,203	8,661 ± 3,193	0,626 **
Sexo			
masculino (%)	14 (43,8%)	19 (45,2%)	
feminino(%)	18 (56,2%)	23 (54,8%)	
Hemoglobina (g/dL)	9,072 ± 2,033	12,792 ± 1,062	0,000**
Hematocrito (%)	28,185 ± 6,294	38,351 ± 2,881	0,000**
VCM (fl)	88,113 ± 11,111	80,824 ± 4,788	0,000*
HCM (pg)	28,402 ± 3765	26,963 ± 1,868	0,4931*
CHCM (%)	32,201 ± 0,993	33,338 ± 0,762	0,5667**
Leucócitos (10 ⁹ /L)	12.564,706 ± 5233,011	7.095,238± 2047,455	0,000**
Neutrófilos (10 ⁹ /L)	5769,926 ± 3627,900	3330,578 ± 1642,665	0,000**
Monócito (10 ⁹ /L)	775,029 ± 444,788	502,392± 166,902	0,000**
Linfócitos típicos (10 ⁹ /L)	4957,279 ± 2189,638	2788,206 ± 780,677	0000**
Reticulócitos (%)	7,402 ± 4,580	0,840 ± 0,247	0,000**
Plaquetas (10 ⁹ /L)	403,632 ± 171,098	303,889 ±71,085	0,000*

*Test t; ** Teste de Mann-Whitney

A análise dos dados hematológicos nos indivíduos HbSS portadores dos alelos selvagem e mutante para o gene *GST* mostrou diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros de leucócitos ($p=0,0452$) e de segmentados neutrófilos ($p=0,0224$); para os demais parâmetros não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 18).

Quando se analisou os dados hematológicos nos indivíduos HbSS e HbSC possuidores do alelo mutante para o gene da *GST*, observou-se diferenças estatisticamente significativa para a maioria das variáveis investigadas, exceto para idade e para o índice hematimétrico CHCM (Tabela 13).

Ao analisar os dados bioquímicos em indivíduos com DF portadores dos alelos selvagem e mutante para o gene da *GST* observou-se diferença estatisticamente significativa para a uréia ($p=0,0288$) e ferritina ($p=0,0316$) (Figura 19). Ao comparar os dados bioquímicos entre indivíduos HbSS portadores dos alelos selvagem e mutante para o gene *GST* observou-se diferenças estatisticamente significativas para a PCR, ($p=0,0167$) (Figura 19). Não se observou diferença estatisticamente significativa quando se analisou as variáveis bioquímicas nos indivíduos HbSC portadores dos alelos selvagem e mutante.

Tabela 13. Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSS e HbSC portadores dos alelos mutantes para o gene da *glutathione S-transferase*.

Dados Hematológicos	HbSS mutante N=46 Média ± Desvio padrão	HbSC mutante N=22 Média ± Desvio padrão	Valor de p
Idade (anos)	9,271 ± 3,805	10,625 ± 4,612	0,1365*
Sexo			
masculino N(%)	29 (63%)	17 (37%)	
feminino N(%)	31 (67%)	15 (33%)	
Hemoglobina (g/dL)	7,902 ± 1,297	11,209 ± 1,318	0,000*
Hematocrito (%)	24,423 ± 3,911	34,909 ± 3,887	0,000*
VCM (fl)	91,940 ± 10,325	80,125 ± 6,975	0,000**
HCM (pg)	29,782 ± 3,623	25,722 ± 2,096	0,000**
CHCM (%)	32,362 ± 0,994	32,112 ± 0,969	0,2509*
Leucócitos (10⁹/L)	13746,667 ± 3557,921	9900,000 ± 6364,012	0,000**
Neutrófilos (10⁹/L)	5817,367 ± 2462,355	5081,281 ± 4460,654	0,0124**
Monócito (10⁹/L)	862,767 ± 349,802	578,406 ± 521,540	0,000**
Linfócitos típicos (10⁹/L)	5801,033 ± 1773,093	3586,000 ± 2281,851	0,000**
Reticulócitos (%)	9,442 ± 4,424	3,632 ± 2,377	0,000**
Plaquetas (10⁹/L)	434,183 ± 140,894	341,469 ± 199,158	0,0001**

*ANOVA; ** Kruskal-Wallis

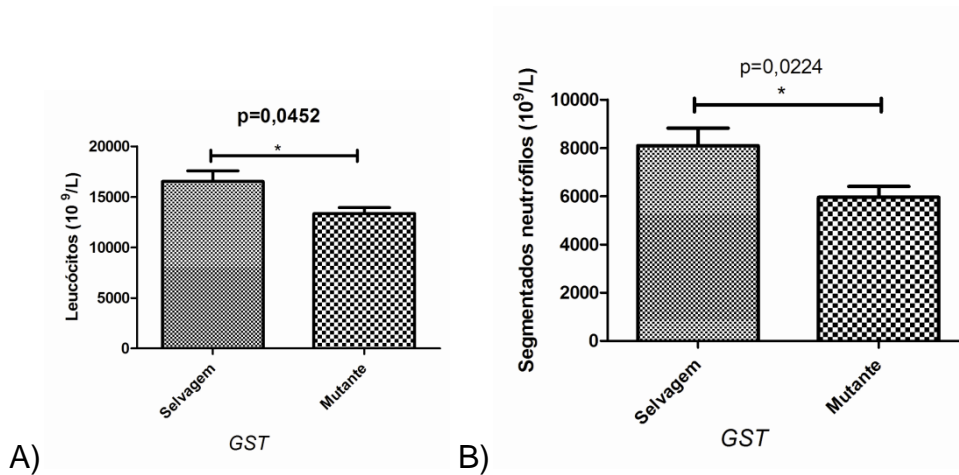


Figura 18. Análise da contagem global de leucócitos e de segmentados neutrófilos em indivíduos HbSS portadores dos alelos selvagem e mutante para o gene da *GST*. * Kruskal-Wallis

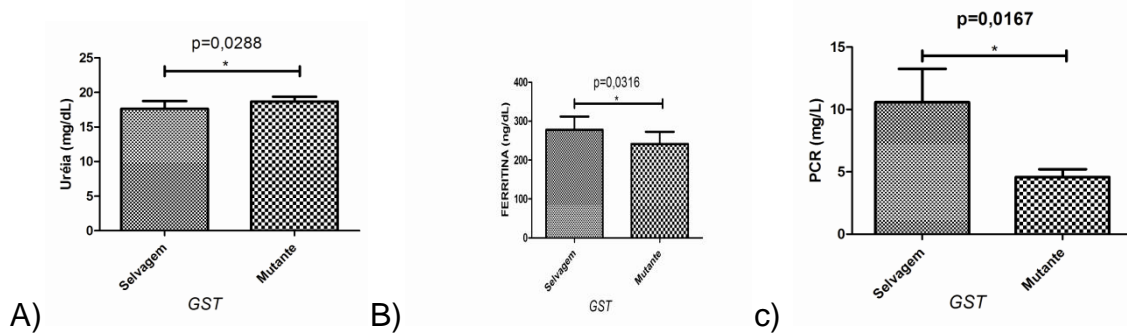


Figura 19. Análise das variáveis bioquímicas em indivíduos com DF e portadores dos alelos selvagem e mutante para o gene da *Glutathione S-transferase*. A: Níveis séricos de uréia; B: Níveis séricos de ferritina; e em C: Níveis séricos de Proteína C reativa em indivíduos HbSS. * Kruskal-Wallis

A análise do tipo de haplótipos ligado ao grupo de genes da globina β nos indivíduos com DF portadores dos alelos selvagem e mutante para o gene da *GST* mostrou frequência maior para o haplótipo CAR/BEN seguido do CAR/CAR (Tabela 14). Não se observou diferença estatisticamente significativa entre a talassemia alfa ^{3,7 Kb e 4,2 Kb} e os alelos selvagem e mutante para o gene *GST* nos indivíduos com DF.

Tabela 14. Distribuição do tipo de *haplótipo* ligado ao grupo de genes da globina β^S nos indivíduos com DF de acordo com o alelo selvagem e mutante para o gene da *GST*.

Tipo do Haplótipo	GST Mutante N (%)	GST Selvagem N (%)	Total	Valor de p
HbSS				NS
CAR/CAR	11 (64,7)	06 (35,3)	17	NS
CAR/ BEN	16 (48,5)	17 (51,5)	33	NS
CAR/CAM	01 (100)	—	01	NS
CAR/ATIP	01 (50,0)	01 (50,0)	02	NS
BEN/ BEN	10 (50,0)	10 (50,0)	20	NS
BEN/ CAM	01 (100)	—	01	NS
BEN/ ATIP	—	01 (100)	01	NS
TOTAL	40	35	75	
HbSC				
CAR/ I	07 (70,0)	03 (30,0)	10	NS
CAR/ II	—	01 (100)	01	NS
CAR/ III	01 (100)	—	01	NS
BEN/ I	05 (32,2)	04 (67,8)	19	NS
BEN/ II	02 (00,0)	—	02	NS
TOTAL	15	08	23	

NS= Não significativo

7.3.2 HAPTOGLOBINA

A distribuição dos polimorfismos no gene da *Hp* nos indivíduos com DF e grupo controle está descrita na tabela 15, agrupando os alelos 1S, 1F e 2 em três genótipos. As freqüências genótípicas e alélicas dos polimorfismos no gene da *HP* nos indivíduos com DF e controles, estão descritas nas tabelas 16 e 17. As freqüências alélicas para o gene da *Hp* para os alelos 1 e 2 não estão em equilíbrio de Hardy Weinberg.

Tabela 15. Distribuição das freqüências genótípicas e alélicas do gene da *Hp* em indivíduos com DF e controles.

	DF N (%)	Freqüência genotípica	Controles N (%)	Freqüência genotípica	χ^2 p	Freqüência alélica (DF)	Freqüência alélica (Controles)	χ^2 p
Haptoglobin 1-1	74 (55,6)	0,556	73 (39,0)	0,390	7,97 0,0048	0,718	0,561	15,62 0,0001
Haptoglobin 2-2	16 (12,0)	0,121	50 (26,8)	0,268	9,39 0,0022	0,282	0,439	
Haptoglobin 1-2	43 (32,3)	0,323	64 (34,2)	0,342	0,05 0,8152			
Total	133 (100)		187 (100)					

Tabela 16. Distribuição das freqüências genóticas e alélicas de subtipos específicos para o gene *Hp* em indivíduos com DF e controles.

Hp Alelos	DF N (%)	Controles N (%)	RP (IC)	Valor p
1S	94 (35,34)	93 (24,73)	1,66 (1,16-2,38)	0,0047*
1F	97 (36,46)	119 (31,65)	1,24 (0,88-1,75)	0,2349*
2	75 (28,20)	164 (43,62)	0,51 (0,36-0,72)	0,0001*
Total	266	376		

Hp Genótipos	DF N (%)	Controle N (%)	RP (IC)	Valor p
Hp2-2	16 (12,0)	50 (26,6)	0,38 (0,19-0,72)	0,0024*
Hp2-1F	17 (12,8)	35 (18,6)	0,64 (0,32-1,24)	0,2135*
Hp2-1S	26 (19,5)	29 (15,4)	1,33 (0,71-2,49)	0,4148*
Hp1S-1S	17 (12,8)	22 (11,7)	1,11 (0,53-2,29)	0,9058*
Hp1S-1F	34 (25,6)	20 (10,6)	2,88 (1,51-5,58)	0,0007*
Hp 1F-1F	23 (17,3)	32 (17,0)	1,02 (0,54-1,91)	0,9309*
Total	133	188		

RP=Razão de prevalência; IC= Intervalo de confiança; * χ^2

Tabela 17. Distribuição das freqüências genóticas e alélicas em grupos de alelos específicos para o gene da *Hp* em indivíduos com DF e controles.

Hp Alelos	Hp Genótipos	DF N (%)	Controles N (%)	RP (IC)	Valor p*
1S	Hp1S-1S				
	Hp1S-1F	77 (36,67)	71 (26,10)	1,64 (1,09-2,47)	0,0167
	Hp2-1S				
1F	Hp1F-1F	74 (35,24)	87 (31,98)	1,16 (0,78-1,72)	
	Hp1S-1F				
	Hp2-1F				
2	Hp2-2	59 (28,09)	114 (41,92)	0,54 (0,36-0,81)	0,0024
	Hp2-1S				
	Hp2-1F				

RP=Razão de prevalência; IC= Intervalo de confiança; * χ^2

A análise das características hematológicas nos indivíduos com DF e portadores de diferentes genótipos para o gene da *Hp* mostrou diferença estatisticamente significativa para a contagem de reticulócitos ($p=0,0167$); na análise das variáveis bioquímicas observou-se diferença estatisticamente significativa para os níveis séricos LDH ($p= 0,0437$), com valores mais elevados para o genótipo Hp1-2 (figuras 20 e 21). A análise dos indivíduos com DF com diferentes genótipos da *HP* e as características clínica não mostrou diferenças estatísticas.

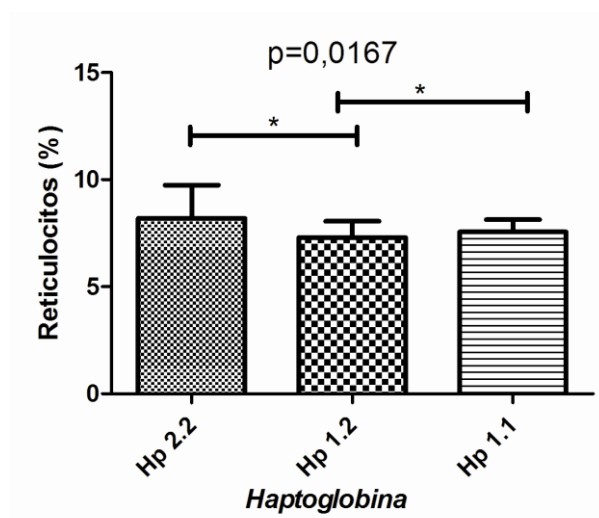


Figura 20. Análise da porcentagem de reticulócitos e diferentes genótipos no gene da *Hp* em indivíduos com DF. * ANOVA

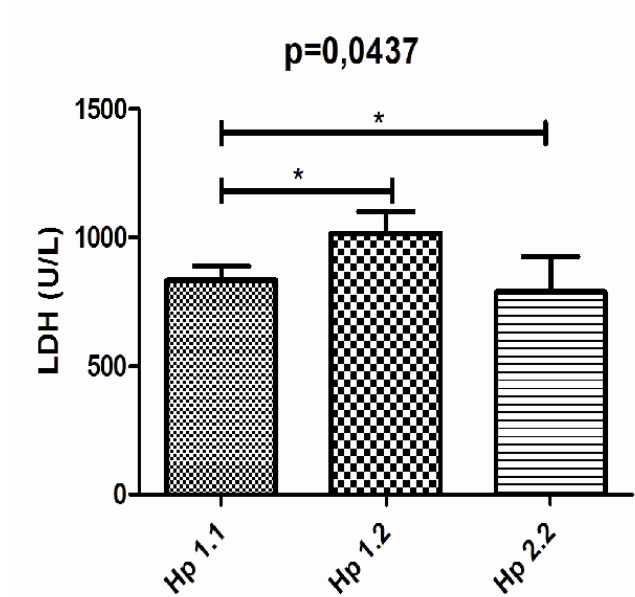


Figura 21. Análise dos níveis séricos médios de LDH e diferentes genótipos no gene da *Hp* em indivíduos com DF.* ANOVA

A análise dos dados hematológicos e dos alelos 2, 1S e 1F do gene da *Hp* entre os indivíduos com DF mostrou diferença estatisticamente significativa para a contagem de reticulócitos ($p=0,0042$) entre os alelos 1S e 1F (Figura 22); na análise das características bioquímicas foi observada diferença estatisticamente significativa entre os alelos 2 e 1F ($p=0,0433$), e entre os alelos 1S e 1F ($p=0,0387$) para a variável creatinina (Figura 23). A análise da história clínica mostrou diferença estatística para o evento de crises de dor ($p=0,0450$), $RP=3,43$ (IC: 1,01 – 11,85).

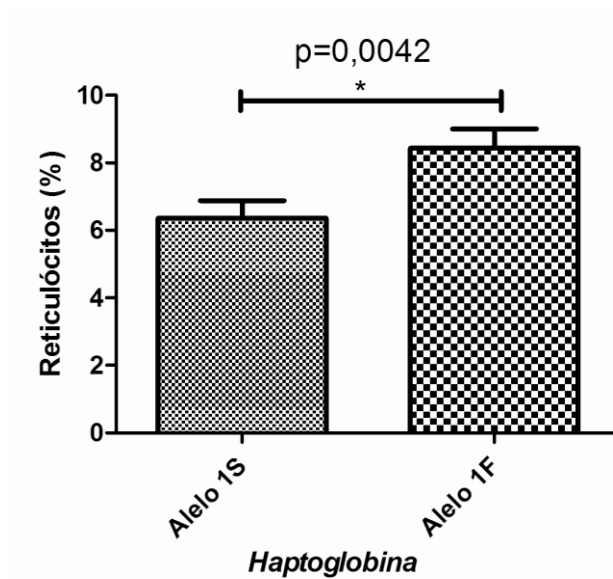


Figura 22. Análise da percentagem de reticulócitos e diferentes alelos para o gene da *Hp* em indivíduos com DF. * Kruskal-Wallis

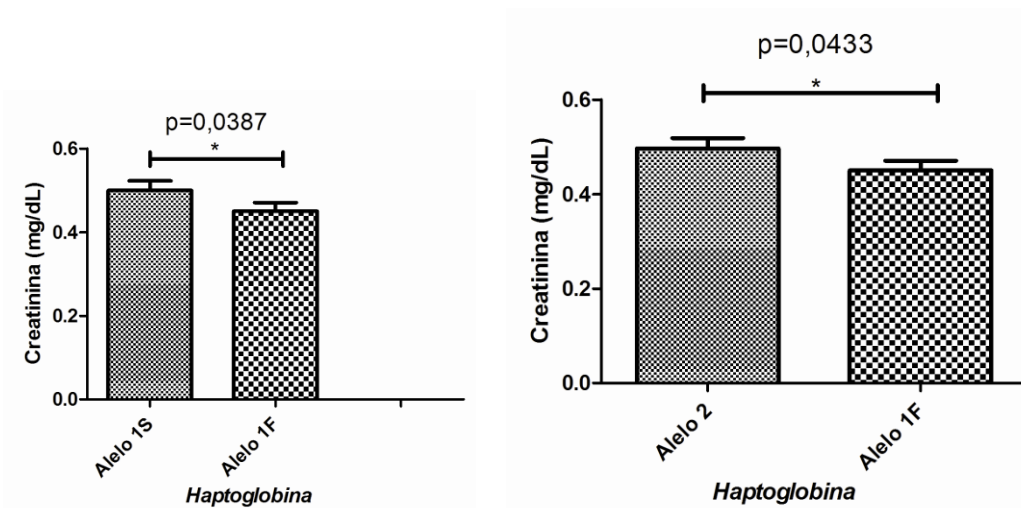


Figura 23. Análise dos níveis médios de creatinina e diferentes alelos para o gene da *Hp* em indivíduos com DF. * Kruskal-Wallis

A análise dos dados hematológicos e dos genótipos Hp1-1, Hp1-2 e Hp 2-2 entre os indivíduos HbSS mostrou diferença estatisticamente significativa para a contagem de linfócitos típicos ($p=0,0392$). A análise entre os alelos 2, 1S e 1F do gene da *Hp* nos indivíduos HbSS mostrou diferença estatisticamente significativa para a contagem de reticulócitos ($p=0,0039$) entre os alelos 1S e 1F (Figura 24); quanto as características bioquímicas observou-se diferença estatisticamente significativa para os níveis séricos de creatinina ($p=0,0275$) entre os alelos 2 e 1F e entre os alelos 1S e 1F ($p=0,0260$) (Figura 25). A análise da história clínica mostrou diferença estatisticamente significativa para o uso de transfusão sanguínea entre os indivíduos com os alelos 2 e 1S ($p=0,0432$), RP=3,50 (IC:1,02 – 12,25).

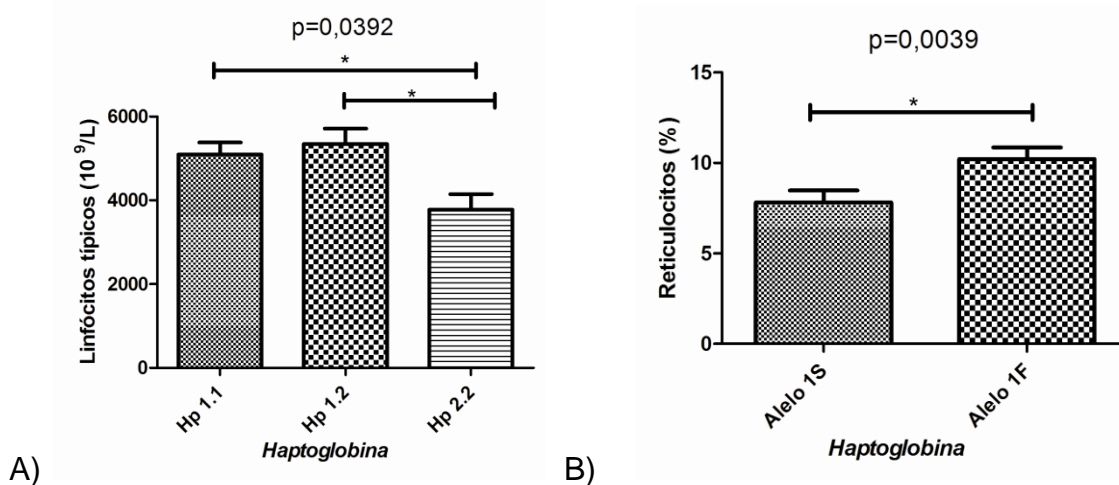


Figura 24. Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSS portadores de diferentes genótipos para os alelos do gene da *haptoglobina*. A) Análise com a contagem de linfócitos típicos e *Hp*; B) Análise com a percentagem de reticulócitos e *Hp*. * Kruskal-Wallis

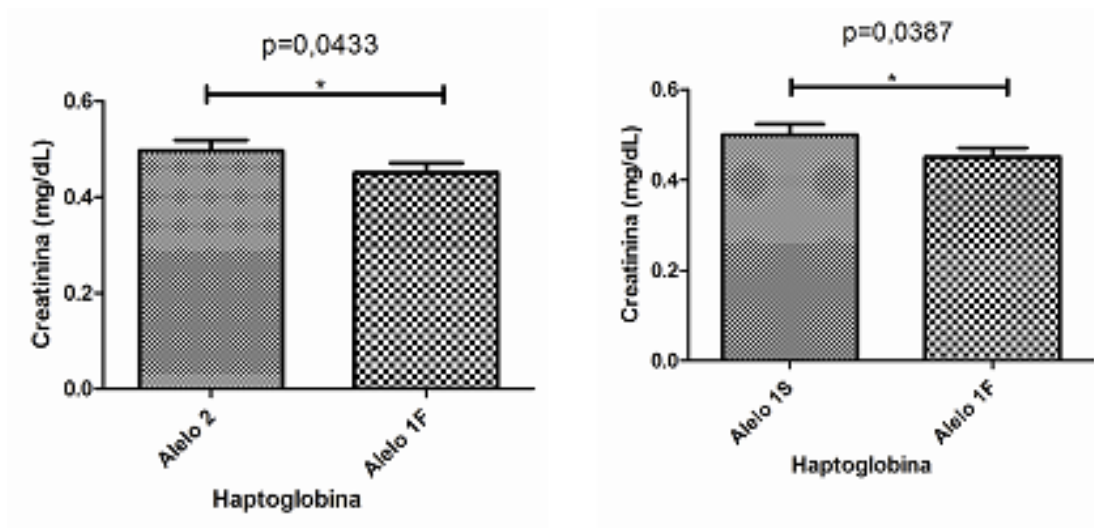


Figura 25. Análise dos níveis séricos de creatinina em indivíduos HbSS portadores de diferentes alelos para o gene da *Hp*. *ANOVA

A análise dos dados hematológicos entre os diferentes alelos 2, 1S e 1F do gene da *Hp* nos indivíduos HbSC mostrou diferença estatisticamente significativa para as concentrações de hemoglobina ($p=0,0111$) entre os alelos 2 e 1F e entre os alelos 1S e 1F ($p=0,0138$); para os valores de hematócrito ($p=0,0064$) entre os alelos 2 e 1F e entre os alelos 1S e 1F ($p=0,0173$); contagem de linfócitos típicos ($p=0,039$) entre os alelos 1S e 1F e número de plaquetas ($p=0,0084$) entre os alelos 1S e 1F (Figura 26).

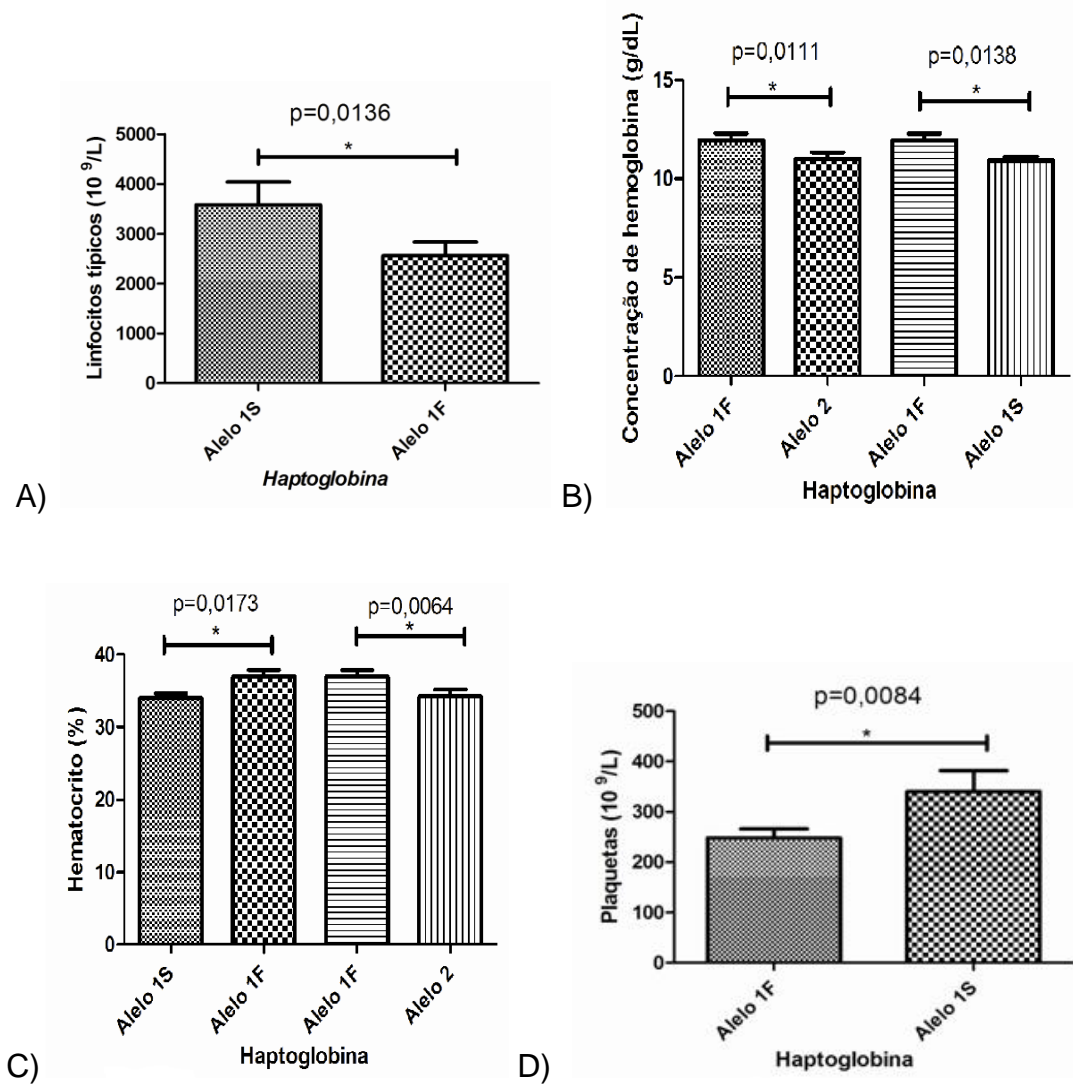


Figura 26. Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSC com diferentes alelos do gene da *haptoglobina*. A) Análise da contagem de linfócitos típicos e *Hp*, * Kruskal-Wallis; B) Análise da concentração de hemoglobina e *Hp*, * Kruskal-Wallis; C) Análise do hematócrito e *HP*, * Kruskal-Wallis; D) Análise da contagem de plaquetas e *Hp*, *ANOVA.

A avaliação bioquímica revelou diferença estatisticamente significativa entre os genótipos da haptoglobina e a PCR ($p=0,0430$) (Figura 27).

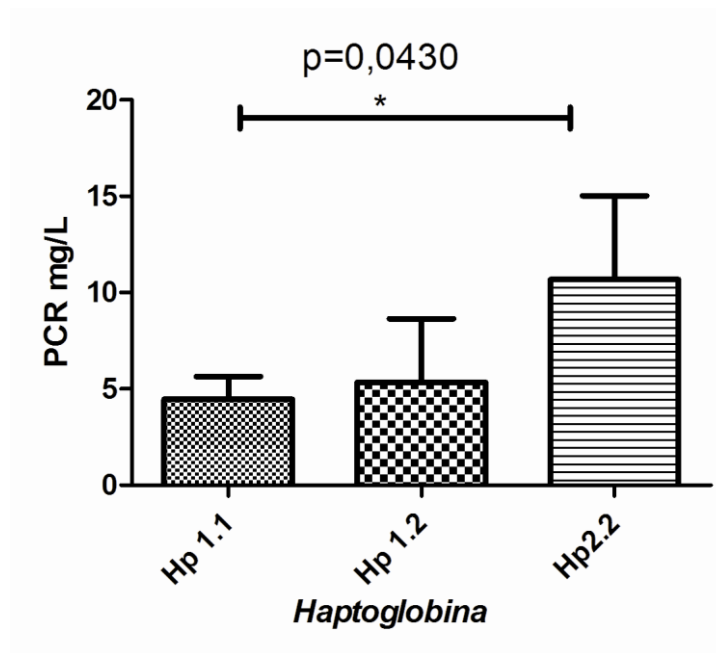


Figura 27. Análise dos dados bioquímicos em indivíduos HbSC e diferentes genótipos do gene da *Hp*. Análise dos níveis da PCR e genótipo no gene *HP*. *Kruskal-Wallis.

A análise da história clínica entre os indivíduos com DF portadores do genótipo1 (Hp1-1) e genótipo 2 (Hp 2-2 + Hp 1-2) não apresentou diferença estatisticamente significativa para os eventos clínicos analisados.

A análise entre os diferentes genótipos para o gene da *Hp* e a presença de α talassemia nos indivíduos com DF não demonstrou diferença estatisticamente significativa; o mesmo foi observado quando analisamos a associação entre os diferentes genótipos para o gene da *Hp* e os haplótipos ligados ao grupo de gene da globina β .

7.3.3 POLIMORFISMOS C.282C>Y, C.63H>D E C.65S>C NO GENE *HFE* DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA

A distribuição dos polimorfismos no gene *HFE* da hemocromatose hereditária e suas respectivas freqüências alélicas e genotípicas esta descrita na tabela 18. As freqüências dos alelos para o gene da *HFE* nos diferentes polimorfismos estudados encontram-se em equilíbrio de Hardy Weinberg.

Tabela 18 Freqüências genotípicas e alélicas para os polimorfismos c.282C>Y, c.63H>D e c.65S>C no gene da *HFE* em indivíduos com DF e controles.

	DF N (%)	Freqüência genotípica	Freqüência Alélica	Controles N (%)	Freqüência genotípica	Freqüência Alélica
Mutação c,282C>Y						
WT/WT	128 (99,23)	0,992	0,996	191 (99,5)	0,995	0,997
C282Y/WT	01 (0,77)	0,008	0,004	01 (0,50)	0,005	0,003
Total	129 (100)			192 (100)		
Mutação c, 63H>D						
	N (%)			N (%)		
WT/WT	109 (84,5)	0,845	0,919	169 (88)	0,880	0,940
H63D/WT	20 (15,5)	0,149	0,081	23 (12)	0,120	0,060
Total	129 (100)			19 (100)		
Mutação c,65S>C						
	N (%)			N (%)		
WT/WT	127 (96,9)	0,969	0,985	191 (97,9)	0,979	0,990
S65C/WT	04 (3,1)	0,031	0,015	04 (2,1)	0,020	0,010
Total	131 (100)			195 (100)		

A análise dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo c.63H>D nos indivíduos com DF, HbSS, HbSC e controles mostrou diferença estatisticamente significativa para a contagem de plaquetas ($p=0,0311$) (Figura 28); para o polimorfismo c.65S>C mostrou diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros de hemoglobina ($p=0,0044$) e hematócrito ($p=0,0078$) no mesmo grupo de indivíduos(Figura 29).

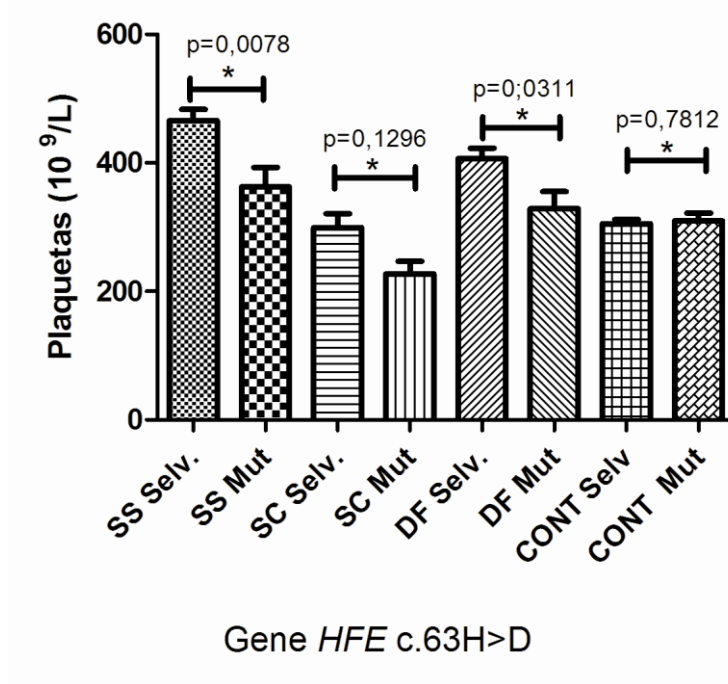


Figura 28. Análise dos dados hematológico de plaquetas e genótipos para o polimorfismo gênico c.63H>D no gene *HFE* nos grupos estudados: DF, HbSS, HbSC e controles. * ANOVA

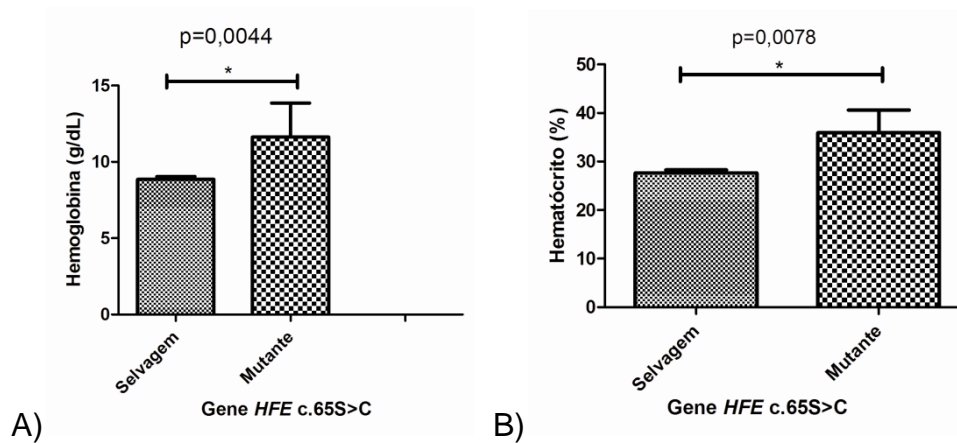
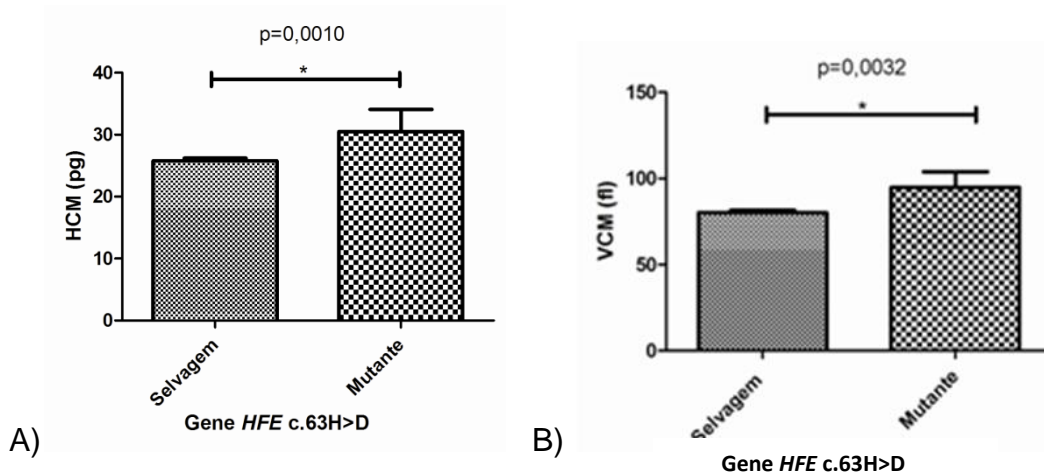


Figura 29. Análise dos dados hematológico nos indivíduos com DF e genótipos selvagem e mutante para o polimorfismo c.65S>C. A) Análise dos valores médios da concentração de hemoglobina nos genótipos selvagem e mutante para o gene *HFE*; B) Análise da percentagem do hematócrito nos genótipos selvagem e mutante para o gene *HFE*. * ANOVA

Quando se analisou os grupos separadamente observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os alelos selvagem e mutante para o polimorfismo c.63H>D e o VCM ($p=0,0032$), HCM ($p=0,0010$) e linfócitos típicos ($p=0,0242$) nos HbSC (Figura 30).



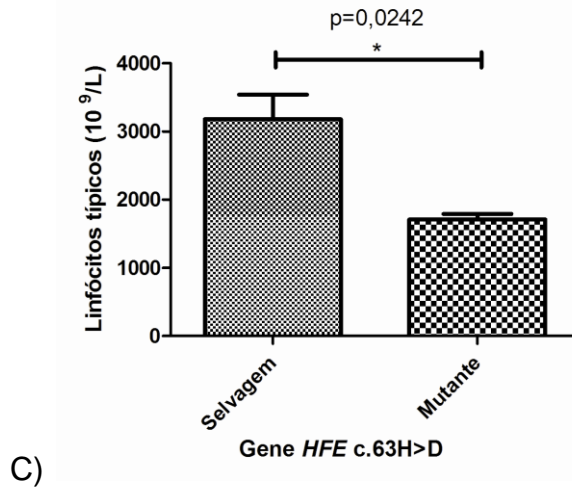


Figura 30. Análise dos dados hematológico e genótipos para o polimorfismo c.63H>D em indivíduos HbSC. A) A análise do HCM e *HFE*; B) Análise do VCM e *HFE*; C) Análise da contagem de linfócitos típicos e *HFE*. * ANOVA

Para o polimorfismo *HFE* c.65S>C observou-se diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros de hemoglobina ($p=0,0265$) e hematócrito ($p=0,0407$) nos indivíduos HbSS; o mesmo padrão de diferença estatística foi visto no grupo de indivíduos HbSC para as variáveis hemoglobina ($p=0,0051$) e hematócrito ($p=0,0060$) (Figura 31 e 32).

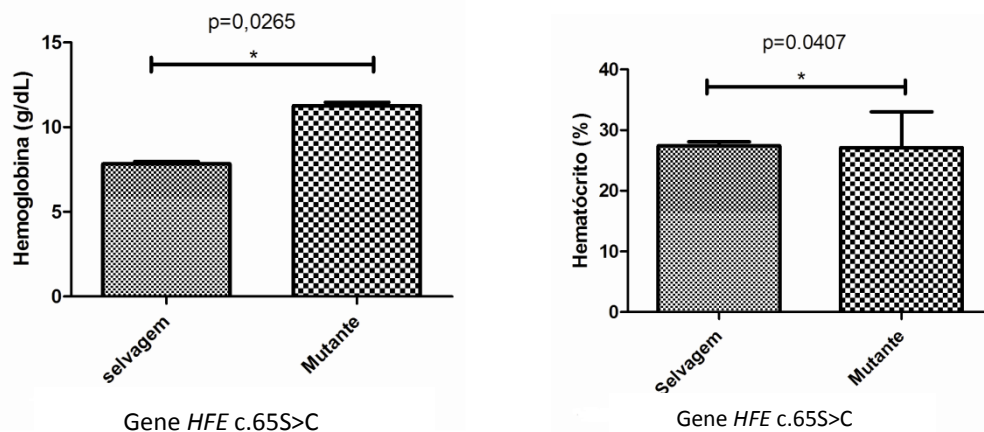


Figura 31. Análise dos dados hematológicos para as variáveis hemoglobina e hematócrito e genótipos para o polimorfismo *HFE* c.65S>C em indivíduos HbSS. * ANOVA

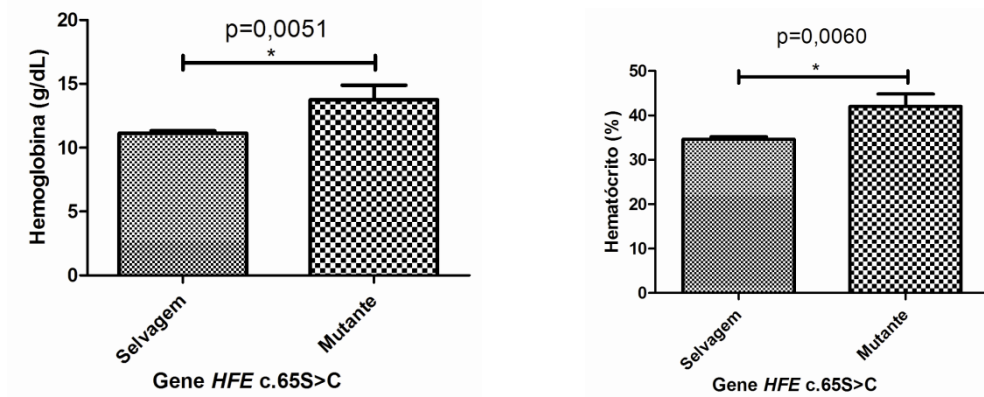


Figura 32. Análise dos dados hematológicos para as variáveis hemoglobina e hematócrito e genótipos para o polimorfismo c.65S>C em indivíduos com HbSC. * ANOVA

A análise dos dados bioquímicos nos indivíduos com DF nos diferentes genótipos selvagem e mutante para as mutações *HFE* c.63H>D e c.65S>C não mostrou diferença estatisticamente significativa para os parâmetros analisados. A análise dos grupos separadamente mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *HFE* c.63H>D e a variável proteínas totais ($p=0,0396$) nos indivíduos HbSS; entre os indivíduos HbSC observou-se diferença estatisticamente significativa entre os níveis de ferro sérico ($p= 0,0383$) e os alelos estudados (Figura 33).

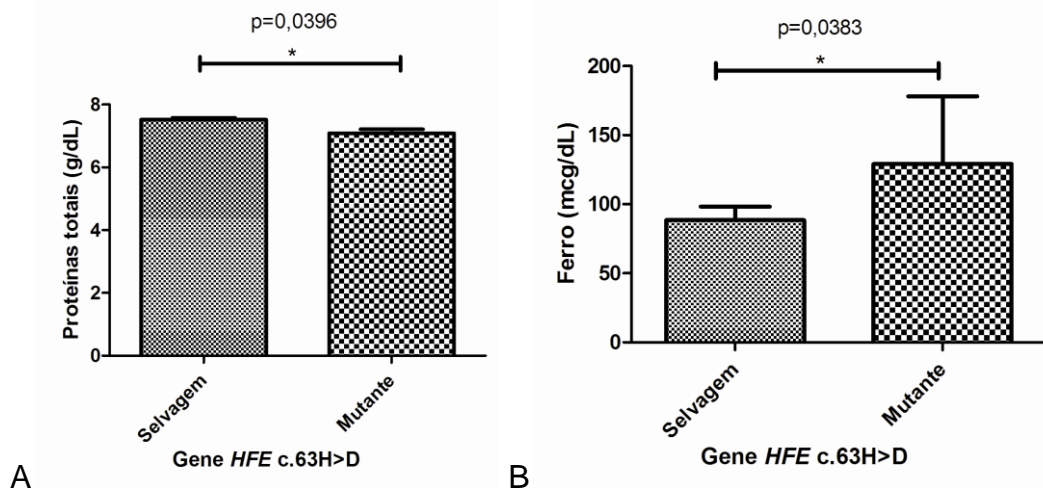


Figura 33. Análise dos dados bioquímicos em indivíduos HbSS e HbSC A) Análise dos níveis de proteínas totais em indivíduos HbSS; B) Ferro sérico em indivíduos HbSC para o polimorfismo *HFE* c.63H>D. * ANOVA

7.3.4 Gene da *Paraoxonase*

Polimorfismos c.192Q>R e c.55L>M no gene da *Paraoxonase1*

A distribuição da frequência dos polimorfismos c.192Q>R e c.55L>M no gene da *PON1* está descrita na tabela 19. Para o polimorfismo *PON1* c.192Q>R foi encontrada a frequência alélica de 0,380 para o alelo R e 0,620 para o alelo Q no grupo dos indivíduos com DF; nos controles foi encontrada frequência de 0,453 para o alelo R e 0,547 para o alelo Q. Para o polimorfismo *PON1* c.55L>M foi encontrada a frequência de 0,912 para o alelo L nos indivíduos com DF e 0,088 para o alelo M, nos controles foi encontrada frequência de 0,846 para o alelo L e 0,154 para o alelo M. As frequências alélicas para o gene *PON1* para os alelos L e M não estão em equilíbrio de Hardy Weinberg.

A atividade média da *Paraoxonase 1* no grupo de indivíduos com DF foi de $27,026 \pm 24,827$ paranitrofenol milimol/min/mL, nos indivíduos do grupo controle a atividade média encontrada foi de $13,613 \pm 9,865$ paranitrofenol milimol/min/mL (Figura 34). A análise da atividade média da *PON1* nos diferentes genótipos para cada polimorfismo da *PON1* estudado nos indivíduos com DF e controles esta descrita na tabela 20 e representada na figura 35.

A análise da atividade da *PON1* entre os grupos selvagem e mutante para os polimorfismos c.192Q>R e c.55L>M nos indivíduos DF mostrou diferença estatisticamente significativa para ambos com $p=0,0164$ para o polimorfismo *PON1* c.192Q>R e $p=0,0328$ para o polimorfismos *PON1* c.55L>M (Figura 36)

Tabela 19. Freqüências genotípicas e alélicas dos polimorfismos *PON1* c.192Q>R e c.55L>M em indivíduos com DF e os controles.

Polimorfismo <i>PON1</i>	DF N (%)	Freqüência a Genotípica	Freqüência a Alélica	Controles N (%)	Freqüência a genotípica	Freqüência a Alélica
c.192Q>R						
QQ	49(36,8)	0,368	0,620	50(27,3)	0,273	0,547
RR	17(12,9)	0,128	0,380	33(18,0)	0,180	0,453
RQ	67(50,3)	0,503		100(54,6)	0,547	
Total	133(100)			183(100)		
	N (%)			N (%)		
c.55L>M						
LL	108(83,1)	0,831	0,912	137(74,0)	0,740	0,846
MM	01(0,8)	0,008	0,088	09(4,9)	0,049	0,154
LM	21(16,2)	0,161		39(21,1)	0,211	

Total	130(100)	185(100)
--------------	----------	----------

Tabela 20. Níveis médios da atividade da PON1 nos diferentes genótipos para os polimorfismos c.192Q>R e c.55L>M em indivíduos com DF e controles.

Polimorfismo PON1	Atividade da PON1		Valor p
c.192Q>R	DF	Controles	
QQ	37,286± 3,854	12,458± 10,173	0,109* *
RR	11,447± 8,489	11,546± 7,561	0,144* *
RQ	24,364± 8,517	14,704± 10,477	0,027* *
c.55L>M			
LL	30,351± 27,204	14,643± 9,571	0,002* *
MM	14,330± 0,000	29,470± 17,409	0,252* *
LM	15,569± 7,841	6,971± 17,409	0,176* *

** Test Mann-Whitney

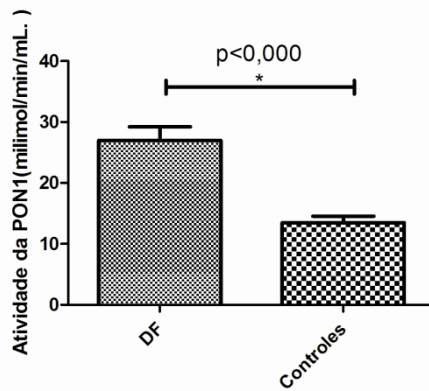


Figura 34. Análise da atividade da *PON1* nos indivíduos com DF e controles. * Teste de Mann-Whitney.

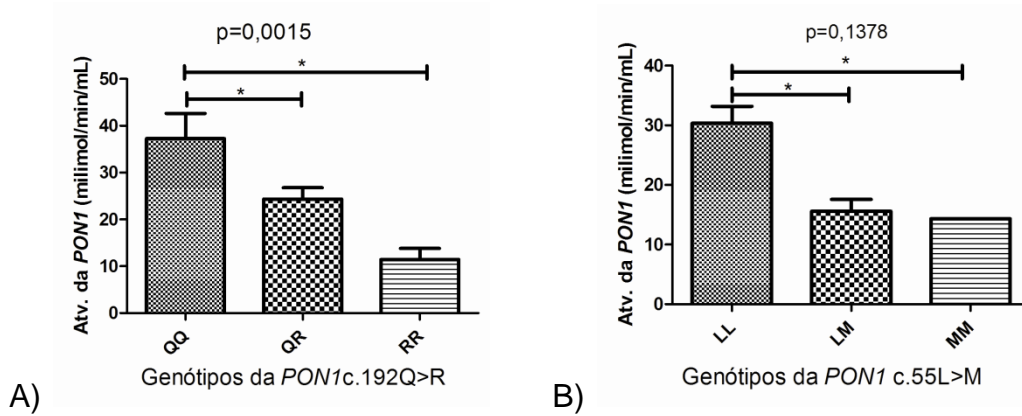


Figura 35. Representação gráfica da atividade média da *PON1* nos diferentes genótipos para os polimorfismos *PON1*c.192Q>R e *PON1*c.55L>M nos indivíduos com DF e *Kruskal-Wallis.

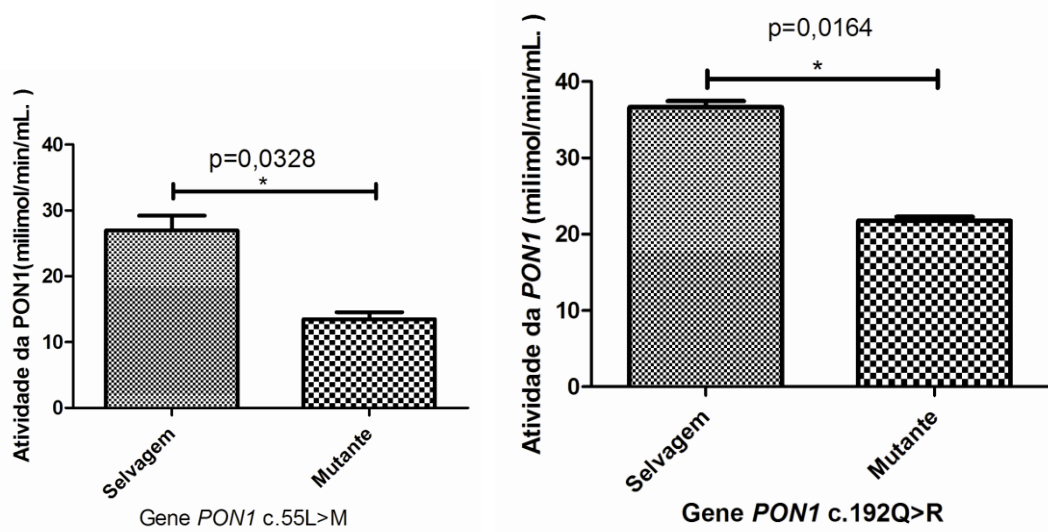


Figura 36. Análise da atividade da *PON1* nos indivíduos com DF entre os alelos selvagem e mutante para os polimorfismos *PON1* c.55L>M e c.192Q>R. * ANOVA; ** Kruskal-Wallis, respectivamente.

A análise das características hematológicas nos indivíduos com DF e portadores dos alelos selvagem e mutante para os polimorfismos *PON1* c.192Q>R e c.55L>M não mostrou diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros analisados.

A análise das características bioquímicas nos indivíduos com DF e portadores de diferentes alelos para o polimorfismos *PON1* c.192Q>R mostrou diferenças estatisticamente significativas para as variáveis colesterol VLDL ($p=0,0267$) e triglicérides ($p=0,0127$) (Figura 37).

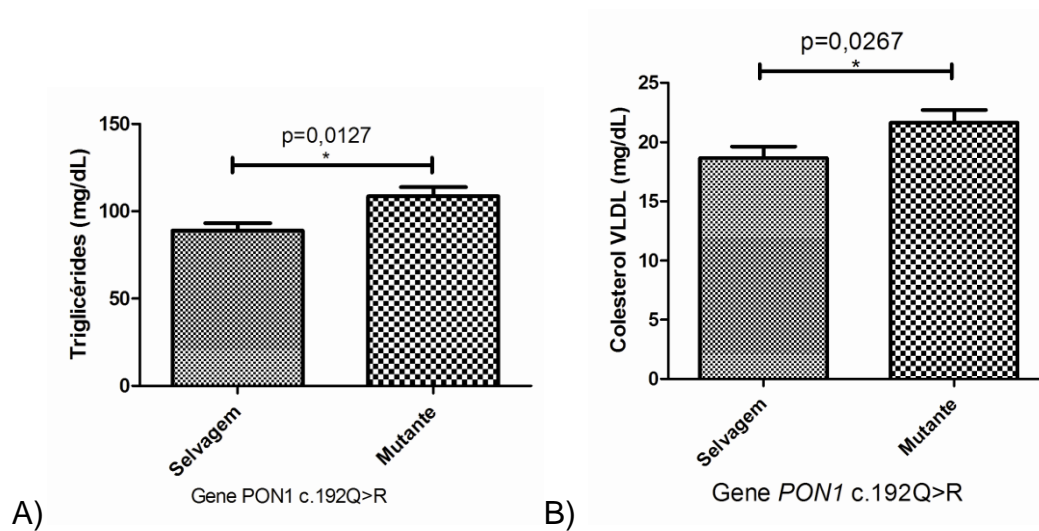


Figura 37. Análise dos níveis séricos de colesterol VLDL e triglicérides em indivíduos com DF e portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismos *PON1* c.192Q>R. * Kruskal-Wallis

A análise dos dados da história clínica dos indivíduos com DF e portadores dos alelos selvagem e mutante para os polimorfismos *PON1* c.192Q>R e c.55L>M no gene da *PON1* não demonstrou diferenças estatisticamente significativas.

Ao avaliar a atividade da Paraoxonase 1 nos indivíduos HbSS portadores dos diferentes alelos do polimorfismos *PON1* c.192Q>R verificou-se que atividade menor nos indivíduos com o alelo mutante, cujo valor médio de atividade foi 21,135 milimol/min/mL quando comparada ao grupo com o alelo selvagem que foi de 42,754 milimol/min/mL ($p=0,0061$) (Figura 38). Não houve diferença significativa quando comparados os dados da história clínica dos indivíduos HbSS e os diferentes alelos do polimorfismo *PON1* c.192Q>R.

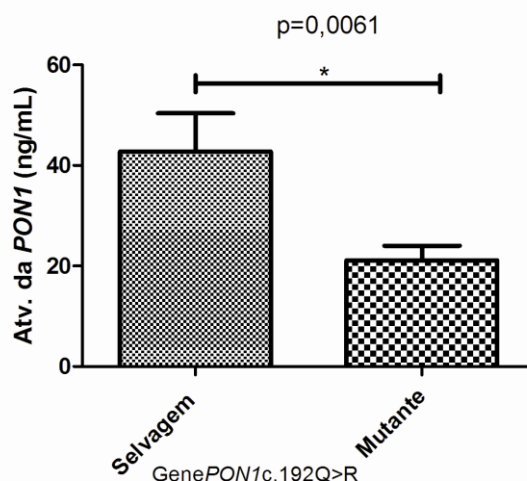


Figura 38. Análise da atividade da PON1 nos indivíduos HbSS e portadores dos alelos selvagem e mutante para mutação c.192Q>R no gene da *PON1*. * Kruskal-Wallis

A análise dos dados hematológicos nos indivíduos HbSC portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *PON1* c.192Q>R mostrou diferenças estatisticamente significativas para os níveis de hemoglobina ($p=0,0459$), hematócrito ($p=0,0225$) e contagem de linfócitos típicos ($p=0,0364$) (Figura 39). A análise do perfil bioquímico nos indivíduos HbSC portadores dos

alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *PON1* c.192Q>R não mostrou diferença estatística significativa para as variáveis analisadas; também não foram observadas diferenças na análise da história clínica e polimorfismo na *PON1*.

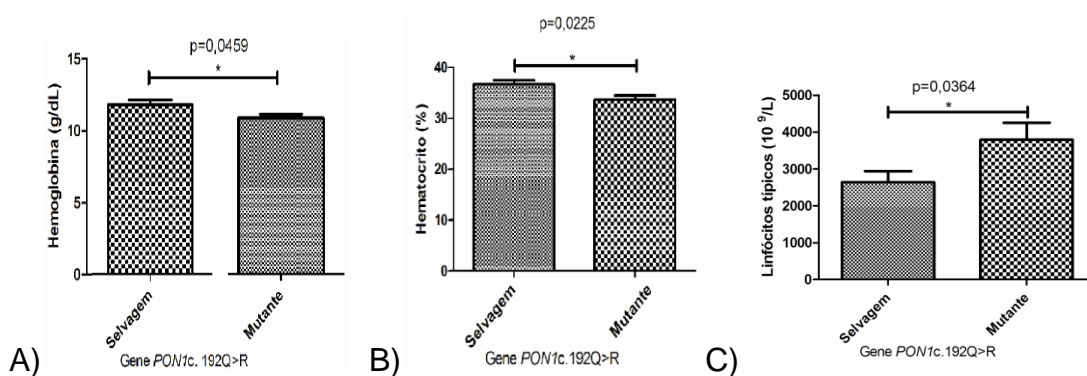


Figura 39. Análise dos dados hematológicos em indivíduos HbSC portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *PON1*c.192Q>R . A) Concentração média de hemoglobina; B) Valores médios de hematócrito; C) Contagem de linfócitos típicos. * Kruskal-Wallis

A análise dos dados hematológicos nos indivíduos com DF e portadores dos alelos selvagem e mutante do polimorfismo *PON1*c.55L>M mostrou diferenças estatisticamente significativas para a contagem de plaquetas ($p=0,0109$) (Figura 40). Quanto ao perfil bioquímico destes indivíduos observou-se diferenças estatisticamente significativas para os níveis séricos de creatinina ($p=0,0329$) e PCR ($p=0,0141$) (Figura 41). Não se observou diferença estatisticamente significativa para os dados da história clínica analisados.

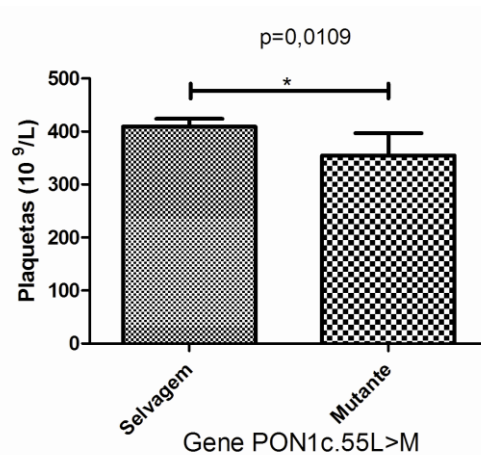


Figura 40. Análise dos dados hematológicos em indivíduos DF portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *PON1m* c.55L>M. * Kruskal-Wallis.

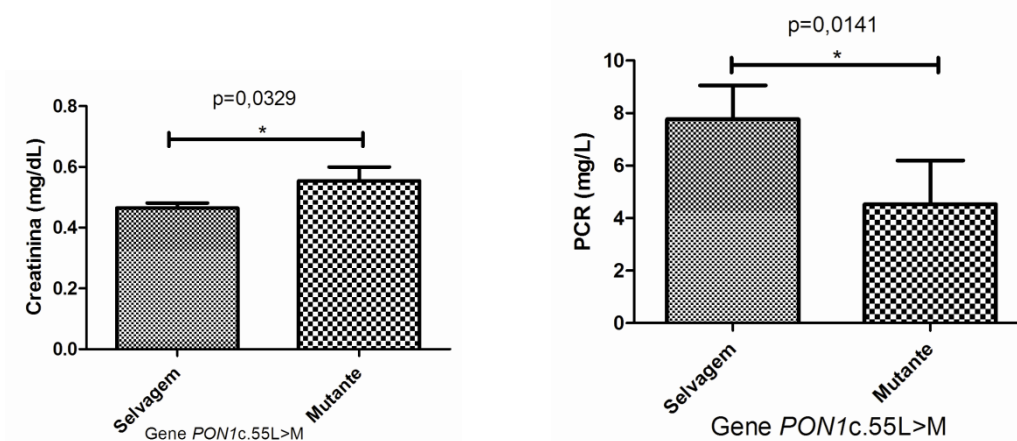


Figura 41. Análise dos dados bioquímicos em indivíduos DF portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *PON1* c.55L>M. * Kruskal-Wallis

A análise dos dados hematológicos nos indivíduos HbSS portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *PON1m* c.55L>M mostrou diferença estatisticamente significativa para a contagem de plaquetas $p=0,0420$ (Figura 42). Entre os indivíduos HbSC observou-se diferenças estatisticamente significativas para a idade ($p=0,0194$) e o índice hematimétrico CHCM ($p=0,0431$). A análise dos dados bioquímicos dos indivíduos HbSC portadores do polimorfismo *PON1m*

c.55L>M mostrou diferença estatisticamente significativa para os níveis séricos de creatinina, bilirrubina direta e albumina sérica (Figura 43). Não se observou diferenças estatisticamente significativas para os dados da história clínica e os portadores do polimorfismo.

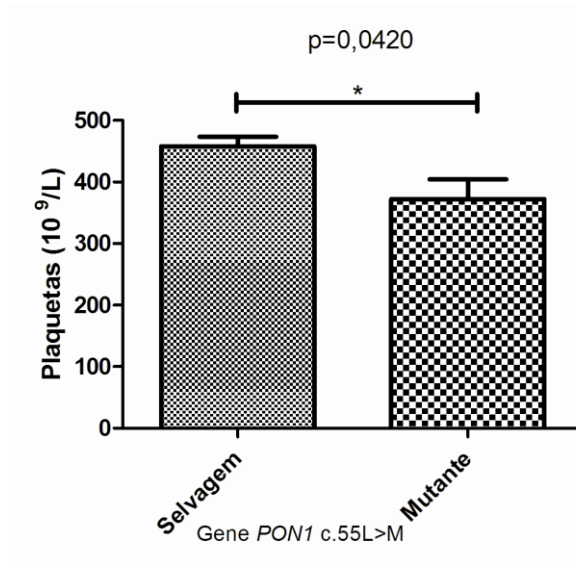


Figura 42. Análise da contagem de plaquetas em indivíduos HbSS portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *PON1* c.55L>M. *Kruskal-Wallis

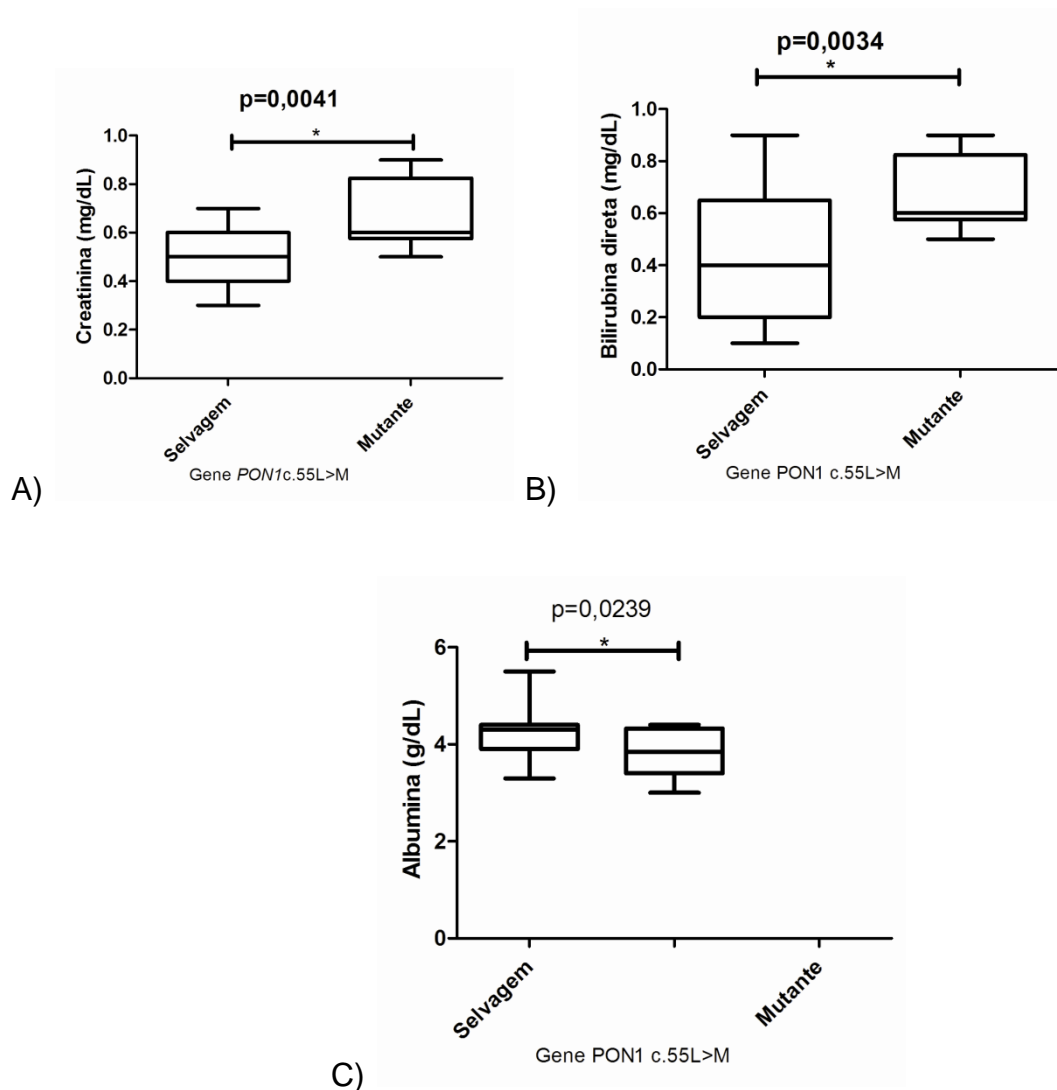


Figura 43. Análise dos níveis séricos de variáveis bioquímicas nos indivíduos com HbSC e portadores dos alelos selvagem e mutante para o polimorfismo *PON1* c.55L>M. A) Análise dos níveis séricos de creatinina; B) Análise dos níveis séricos de Bilirrubina direta; C) Análise dos nível séricos de albumina. * ANOVA

A avaliação da frequência de eventos clínicos nos indivíduos com DF considerando os percentis 25 e 75 para reticulócitos revelou diferenças estatisticamente significativas para o uso de transfusão sangüínea, ocorrência de pneumonia e seqüestro esplênico, sendo que os indivíduos com contagem de

reticulócitos no percentil 75% realizaram mais transfusões, tiveram mais episódios de pneumonia e de seqüestro esplênico (Tabela 21).

Tabela 21. Análise do histórico clínico nos indivíduos com DF em relação aos percentis 25 e 75 para os valores de contagem de reticulócitos.

	N	Reticulócitos <3,1500 N(%)	Reticulócitos >11,2250 N(%)	Valor de p	RP	IC
Síndrome torácica aguda	08/76	04 (50)	04 (50)	0,4867**	1,34	0,25 – 7,23
Transfusão sangüínea	43/76	18 (42)	25(58)	0,0065**	4,34	1,43 – 13,58
Internação	63/76	33 (52)	30 (48)	0,1580**	3,03	0,66 – 15,67
Infecção	39/62	19 (13,8)	20 (86,2)	0,3188**	1,97	0,60 – 6,64
Crises de dor	59/76	31 (52)	28 (48)	0,2960**	2,17	0,60 – 8,25
Pneumonia	46/76	21 (46)	25(54)	0,0321**	3,27	1,08 – 10,15
Sequestro esplênico	09/76	02 (22)	07(78)	0,0355 *	5,52	0,92 – 42,57
Acidente vascular cerebral	06/76	04 (67)	02 (33)	0,4712 *	0,63	0,07 – 4,47
Vaso-oclusão	59/76	31 (528)	28 (49)	0,2960*	2,17	0,60 – 8,25

* χ^2 ; ** Teste exato de Fisher; RP= Razão de prevalência; IC = Intervalo de confiança

Considerando os percentis 25 e 75% para contagem de leucócitos encontrou-se diferença estatisticamente significativas para o uso de transfusão sangüínea, ocorrência de pneumonia, crises de dor, evento de vaso-oclusão e infecção, sendo que os indivíduos com contagem de leucócitos no percentil 75% apresentaram freqüência maior desses eventos clínicos (Tabela 22).

Tabela 22. Análise do histórico de eventos clínicos nos indivíduos com DF em relação aos percentis 25 e 75% para contagem de leucócitos.

Eventos clínicos	N	Leucócitos <9475,00 N(%)	Leucócitos >15650,00 N(%)	Valor de p	RP	IC
Síndrome torácica aguda	05/69	01 (20)	04 (80)	0,1873 **	4,26	0,40 – 107,65
Transfusão sangüínea	32/69	07 (22)	25(78)	0,0000*	9,64	2,79 – 35,05
Internação	56/69	22 (39)	34 (61)	0,0017*	18,55	2,17 – 415,94‡
Infecção	31/54	11 (35,5)	20 (64,5)	0,0118*	5,15	1,35 – 20,58
Crises de dor	54/69	22 (41)	32 (59)	0,0165*	5,82	1,28 – 30,07
Pneumonia	37/69	12 (33)	25(68)	0,0056*	5,82	1,47 – 14,68
Sequestro esplênico	09/68	03 (22)	06(78)	0,2689 **	5,82	0,40 – 11,86
Vaso-oclusão	55/69	23 (42)	32 (58)	0,0311*	00232	1,11 – 26,58

* χ^2 ; ** Teste exato de Fisher; RP= Razão de prevalência; IC = Intervalo de confiança;‡ Não acurado

Considerando os percentis 25 e 75% para a concentração de HbS, observou-se diferenças estatisticamente significativas para a ocorrência de pneumonia ($p=0,0073$) em indivíduos com DF, sendo que não se encontrou diferença estatisticamente significativa para as outras variáveis analisadas. Os dados de percentil 25 e 75 para ferritina estão na tabela 23, sendo que se encontrou diferenças estatisticamente significativas para o uso de transfusão de sangue, internações e pneumonia.

Tabela 23. Análise do histórico clínico nos indivíduos com DF em relação aos percentis 25 e 75% para os valores de ferritina.

Eventos clínicos	N	Ferritina <94,90 (%)	Ferritina >399,38 N(%)	Valor de p	RP	IC
Síndrome torácica aguda	05/67	01 (20)	04 (80)	0,1873**	4,27	0,40 – 108,07
Transfusão sanguínea	32/67	08 (25)	24(75)	0,0004*	7,50	2,22 – 26,41
Internação	54/67	21 (39)	33 (61)	0,0016*	18,86	2,19 – 424,13
Infecção	30/56	13 (43)	17 (57)	0,0016*	1,12	0,34 – 3,73
Crises de dor	54/68	23 (43)	31 (57)	0,1044*	3,37	0,81 – 14,98
Pneumonia	33/67	10 (30)	23 (70)	0,0049*	4,81	1,51 – 15,76
Sequestro esplênico	11/67	02 (18)	09(82)	0,0542*	5,58	0,96 – 41,97
Acidente vascular cerebral	05/67	01 (20)	04 (80)	0,1873 **	4,27	0,40 – 108,07
Vaso-oclusão	54/68	23 (42)	31 (58)	0, 1044*	3,37	0,81 – 14,98

* χ^2 ; ** Teste exato de Fisher; RP= Razão de prevalência; IC = Intervalo de confiança

Realizou-se a dosagem sérica de algumas moléculas envolvidas no estresse oxidativo em indivíduos com DF e encontrou-se níveis médios de Vitamina C de $81,151 \pm 38,397$ nmol/L; para receptor de transferrina foi de $81,151 \pm 38,397$ ng/mL e para a hemeoxigenase foi de $88,423 \pm 57,109$ pg/mL.

A análise de correlação entre os polimorfismos estudados e a atividade da PON1 demonstrou diferença estatisticamente significativa com os diferentes alelos para o gene da *Hp* e com o polimorfismo c. 192Q>R (Figura 44).

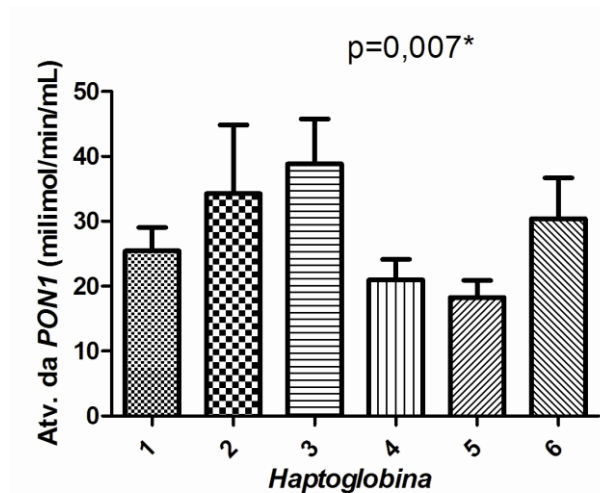


Figura 44. Correlação entre os diferentes genótipos no gene da *HP* e a atividade da *PON1* em indivíduos DF. 1) Genótipo 2-2; 2) Genótipo 2-F; 3) Genótipo 2-S; 4) Genótipo SS; 5) Genótipo SF e 6) Genótipo FF. * Kruskal-Wallis H.

Ao analisar a correlação da atividade da *PON1* e as variáveis bioquímicas estudadas se observou diferença estatisticamente significativa com a globulina sérica e com ferro sérico, também observou-se correlação entre a hemeoxigenase e ferro sérico (Figura 45).

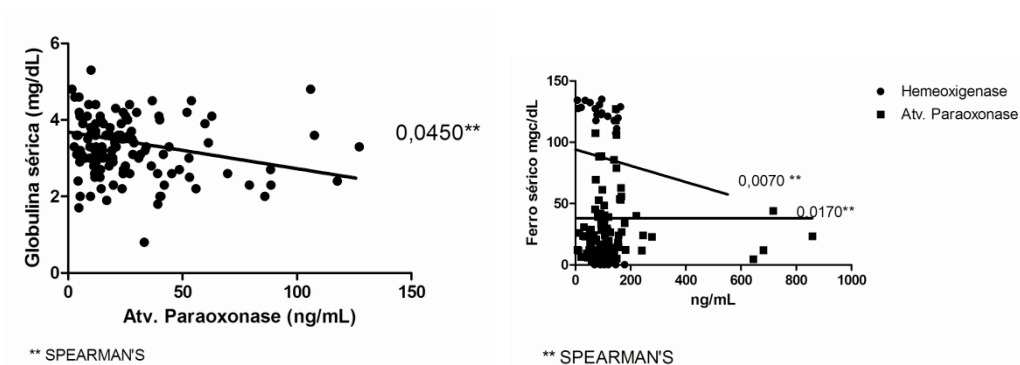


Figura 45. Correlação entre atividade da paraoxonase e a variável globulina sérica e entre hemeoxigenase e atividade da paraoxonase com ferro sérico em indivíduos com DF.

A análise do histórico clínico dos indivíduos com DF e a correlação com a atividade da paraoxonase mostrou diferença estatisticamente significativa para o AVC, esplenectomia (Figura 46).

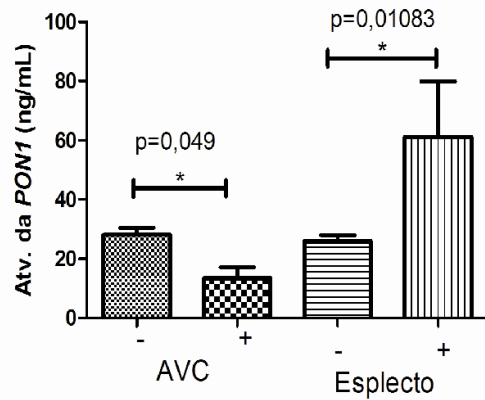


Figura 46. Análise do histórico clínico dos indivíduos com DF e a dosagem de atividade da paraoxonase. * Kruskal-Wallis

A análise de correlação entre os polimorfismos estudados e os níveis séricos de vitamina C demonstrou diferença estatisticamente significativa com a GST nos grupos selvagem e mutante ($p=0,0388$) (Figura 47).

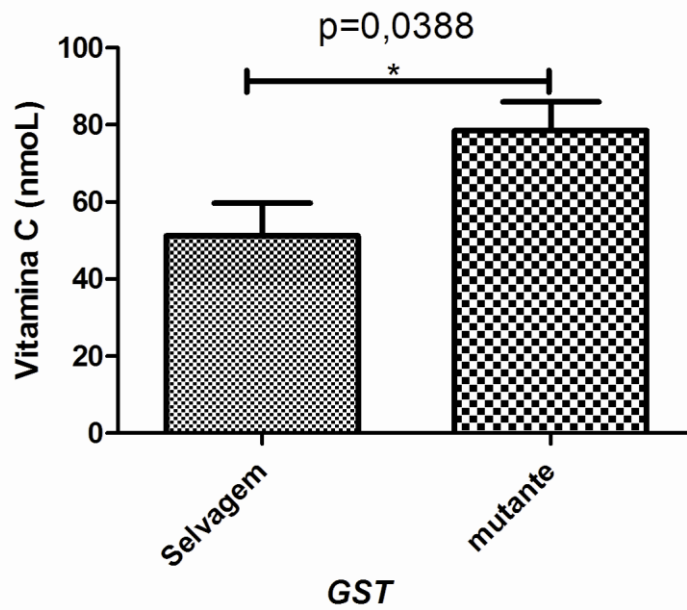


Figura 47. Análise dos níveis séricos de vitamina C nos grupos selvagem e mutante para a *GST* em indivíduos DF. * kruskal-Wallis

As tabelas de 24 a 29 demonstram modelos de análise multivariada tendo como variável dependente hospitalização, ocorrência de pneumonia, sequestro esplênico, uso de transfusão sanguínea, litíase biliar e episódios de infecção, respectivamente.

Tabela 24. Modelos de análise multivariada tendo hospitalização como variável dependente.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	Valor p	R	RP	IC Mínimo 95%	IC Máximo 95%
Modelo 1							
Hb	1.38	1.13	0.22	-	3.98	0.43	36.71
Ht	-0.76	1.17	0.51	-	0.46	0.046	4.66
HbS	1.55	0.76	0.04	0.1947	4.74	1.06	21.05
Modelo 2							
Glutaciona	-0.1299	0.4951	0.7930	-	0.0688	0.3328	2.3175
LDH	-0.1304	0.5528	0.8135	-	0.0557	0.2971	2.5934
HbS	1.3082	0.5361	0.0147	0.1869	5.9555	1.2937	10.5785
Modelo 3							
Atv PON	0.5109	0.5543	0.3567	-	0.8496	0.5624	4.9399
Hm	-0.3999	0.5208	0.4425	-	0.5898	0.2416	1.8603
Linf. Típ	2.2614	0.7910	0.0043	0.2303	8.1733	2.0362	45.2285
Modelo 4							
Atv PON	0.8816	0.5966	0.1395	0.0427	2.1833	0.7499	7.7749
Glutaciona	0.0316	0.5326	0.9526	-	0.0035	0.3634	2.9315
HbS	1.6689	0.5405	0.0020	0.2740	9.5358	1.8398	15.3053

RP= Razão de prevalência; IC= Intervalo de confiança

Tabela 25. Modelos de análise multivariada tendo litíase biliar como variável dependente.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	Valor p	R	RP	IC Mínimo 95%	IC Máximo 95%
Modelo 1							
Glutaciona	0.2616	0.4368	0.5492	-	0.3588	0.5519	3.0577
Atv. PON	-0.4953	0.4441	0.2647	-	1.2441	0.2552	1.4551
Leucócitos	1.2459	0.4412	0.0047	0.2096	7.9765	1.4642	8.2530

RP= Razão de prevalência; IC= Intervalo de confiança

Tabela 26. Modelos de análise multivariada tendo pneumonia como variável dependente.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	Valor p	R	RP	IC Mínimo 95%	IC Máximo 95%
Modelo 1							
Glutaciona	-0.4124	0.4336	0.3416	-	0.9045	0.2830	1.5488
Ferro	0.2258	0.4671	0.6287	-	0.2338	0.5018	3.1308
Ferritina	1.5211	0.6049	0.0119	0.1801	5.0241	1.3986	14.9804
Modelo 2							
Glutaciona	-0.4253	0.4192	0.3103	-	1.0293	0.2874	1.4863
LDH	0.4623	0.4699	0.3252	-	0.9679	0.6321	3.9875
HbS	1.8317	0.4945	0.0002	0.2764	13.7227	2.3692	16.4583
Modelo 3							
Glutaciona	- 0.4454	0.3880	0.2510	-	1.3179	0.2994	1.3703
HDL Col	-0.4361	0.3897	0.2631	-	1.2525	0.3013	1.2877
Ferritina	1.0266	0.4746	0.0305	0.1294	4.6785	1.1011	7.0767
Modelo 4							
Glutaciona	- 0.3992	0.4580	0.3834	-	0.7597	0.2734	1.6461
Atv PON	0.9509	0.4898	0.0522	0.1161	3.7681	0.9908	6.7596
HbS	1.7720	0.4864	0.0003	0.2931	13.2697	2.2673	15.2623

RP= Razão de prevalência; IC= Intervalo de confiança

Tabela 27. Modelos de análise multivariada tendo seqüestro esplênico como variável dependente.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	Valor p	R	RP	IC Mínimo 95%	IC Máximo 95%
Modelo 1							
Glutationa	-0.3817	0.4492	0.3955	-	0.7219	0.2830	1.6467
Hematocrito	0.3041	0.4823	0.5284	-	0.3975	0.5266	3.4885
Hemoglobina	1.3751	0.6135	0.0250	0.1564	5.0241	1.1885	13.1643
Modelo 2							
Glutationa	-0.4388	0.4198	0.2958	-	1.0929	0.2832	1.4680
LDH	-0.3042	0.4617	0.5100	-	0.4340	0.2984	1.8236
HbS	1.7533	0.4840	0.0003	0.2692	13.1225	2.2360	14.9082
Modelo3							
Glutationa	0.0824	0.5900	0.8890	-	0.0195	0.3417	3.4510
Ferro	-0.5909	0.6679	0.3763	-	0.7827	0.1496	2.0507
Ferritina	1.4703	0.6158	0.0170	0.2109	5.7007	1.3013	14.5439
Modelo 4							
Atv. PON	-0.9263	0.7090	0.1914	-	1.7070	0.0987	1.5892
Glutationa	0.3470	0.6127	0.5712	-	0.3206	0.4257	4.7014
HbS	2.2557	1.0684	0.0348	0.1762	4.4573	1.1754	77.4604 [‡]

RP= Razão de prevalência; IC= Intervalo de confiança; ‡ Dados não acurados

Tabela 28. Modelos de análise multivariada tendo infecção como variável dependente.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	Valor p	R	RP	IC Mínimo 95%	IC Máximo 95%
Modelo 1							
Glutaciona	0.5001	0.5006	0.3177	-	0.9982	0.6182	4.3985
Atv. PON	0.1659	0.5026	0.7413	-	0.1089	0.4408	3.1611
Leucócitos	1.5196	0.5088	0.0028	0.2499	8.9196	1.6860	12.3902
Modelo 2							
Atv. PON	0.0736	0.4511	0.8704	-	0.0266	0.4446	2.6059
Hm	-0.3893	0.4528	0.3899	-	0.7391	0.2789	1.6458
Leucócitos	1.1632	0.4549	0.0106	0.1832	6.5386	1.3121	7.8051

RP= Razão de prevalência; IC= Intervalo de confiança

Tabela 29. Modelos de análise multivariada tendo uso de transfusão sanguínea como variável dependente.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	Valor p	R	RP	IC Mínimo 95%	IC Máximo 95%
Modelo 1							
Glutaciona	-0.1940	0.4270	0.6496	-	0.2065	0.3567	1.9020
LDH	0.3086	0.4733	0.5143	-	0.4252	0.5385	3.4428
HbS	2.0151	0.4995	0.0001	0.3053	16.2726	2.8180	19.9691
Modelo 2							
Glutaciona	0.2616	0.4368	0.5492	-	0.3588	0.5519	3.0577
Atv. PON	-0.4953	0.4441	0.2647	-	1.2441	0.2552	1.4551
Leucócitos	1.2459	0.4412	0.0047	0.2096	7.9765	1.4642	8.2530
Modelo 3							
Atv. PON	-0.4809	0.4795	0.3160	-	1.0054	0.2415	1.5826
Glutaciona	0.1311	0.4644	0.7777	-	0.0797	0.4588	2.8327
HbS	2.0188	0.4874	0.0000	0.3403	17.1555	2.8965	19.5723

RP= Razão de prevalência; IC= Intervalo de confiança

DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

As espécies reativas de oxigênio e sua participação nas manifestações clínicas apresentadas por pacientes com DF têm sido bastante estudadas (WALTER *et al.*, 2006; ASLAN & FREEMAN, 2007). O aumento de agentes oxidantes é decorrente, entre outros fatores, do metabolismo do ferro, do aumento da hemólise intravascular e da auto-oxidação da HbS, que contribuem para a liberação de hemoglobina e ferro livre no vaso, além de mobilizar intensamente a participação de moléculas como a haptoglobina e a hemeoxigenase (REITER *et al.*, 2002; FRENETTE & ATWEH, 2007).

A geração de ERO também tem sido correlacionada ao aumento do consumo de óxido nítrico (NO) (ASLAN *et al.*, 2007), fato que pode reduzir ainda mais, nos indivíduos com DF, a capacidade anti-oxidante (GLADWIN *et al.*, 2003). Os mecanismos antioxidantes do organismo são mantidos pela obtenção de antioxidantes provenientes da dieta, como é o caso da vitamina E, C, A e pela participação ativa de várias enzimas que atuam neutralizando os efeitos da oxidação (SESS *et al.*, 1992; CHRISTEN *et al.*, 1997; BLANCHI & ANTUNES, 1999; JIANG & AMES, 2003; KASSAB-CHEKIR *et al.*, 2003). Dessa forma, neste estudo, investigou-se a possível associação de genes de moléculas que possuem participação ativa nos mecanismos oxidativos celulares, de maneira que possamos correlacionar às variações inerentes a herança genética do indivíduo a uma provável atuação de fatores que podem alterar o prognóstico clínico desses indivíduos.

Os resultados obtidos e relacionados à caracterização hematológica e bioquímica dos indivíduos com DF que compuseram a casuística deste estudo reforçaram o estado alterado destes marcadores nos pacientes estudados, quando comparados ao grupo de indivíduos controles, assim como na comparação dos tipos de DF investigados (ISICHEI, 1980; STUART & NAGEL, 2004). Entretanto, a ausência de alterações em marcadores associados ao dano hepático, tais como as dosagens de proteínas totais, albumina e globulina, chama a atenção para a preservação deste órgão nos indivíduos com DF ainda em idade pediátrica (ISICHEI, 1980; OHENE-FREMPONG & STEINBERG, 2001).

As diferenças relativas aos dados hematológicos e índices hematimétricos apresentadas neste estudo confirmam as variações do estado anêmico entre os diferentes tipos de DF e ressaltam o papel dos leucócitos e de seus tipos específicos, como neutrófilos, monócitos e linfócitos, tanto nos indivíduos HbSS como nos HbSC, demonstrando uma possível associação entre o aumento destas células e a sua ativação, apesar da escassez de informações acerca desta relação nas populações celulares na DF HbSC (OKPALA, 2004; ASHLEY *et al.*, 2006).

Os valores de uréia e creatinina descritos neste estudo refletem a taxa de filtração glomerular normalmente associada a indivíduos jovens com AF, uma vez que o fluxo plasmático efetivo renal (FPER) é elevado, e mesmo quando medido com precisão, a taxa de filtração glomerular (TFG) está aumentada, fato que está associado aos níveis dentro do normal dos valores de

uréia e creatinina dos pacientes investigados, principalmente pelo fato de serem crianças (ALLON *et al.*, 1988). Além disso, pacientes com DF têm diminuição da fração de filtração renal indicando que o aumento substancial do FPER excede o aumento da TFG. Ambos TFG e FPER apresentam declínio para valores normais durante a adolescência e caem para níveis subnormais com a idade dos pacientes HbSS (HATCH *et al.*, 1970; ATAGA & ORRINGER, 2000). Devido ao aumento na taxa de secreção de creatinina pelo túbulo proximal, pacientes HbSS podem realmente ter um impacto significativo na deterioração da função renal com o tempo, antes mesmo de ser detectado pelas medidas clínicas tradicionais (ATAGA, & ORRINGER, 2000).

As concentrações de LDH dos pacientes investigados confirmam o seu papel como marcador de hemólise, principalmente nos indivíduos HbSS, chamando atenção para a sua participação na resistência ao NO associada à hemólise e a uma provável importância como fator cooperativo no estabelecimento de determinadas manifestações clínicas, como o priapismo, úlceras de perna e hipertensão pulmonar, além do risco de óbito entre os indivíduos com DF, de acordo com relato de Kato e cols. (2006).

Os resultados do presente estudo descrevem concentrações de colesterol total e frações (HDL-C e LDL-C) menores que as encontradas no grupo controle, sendo os dados concordantes com estudos anteriores realizados em pacientes HbSS. As diferenças encontradas e relativas ao metabolismo dos lipídios neste estudo já foram ressaltadas em trabalhos do nosso grupo e por outros autores e

reforçam a hipótese da participação do colesterol HDL e moléculas associadas na resposta antiinflamatória, antioxidante, anticoagulante e pró-fibrinolítica (ELHAZMI, 1987; OFOROFUO, 1994; RAHIMI, 2006; NOFER *et al.*, 2002; ECKARDSTEIN *et al.*, 2008; SEIXAS *et al.*, 2010).

A doença falciforme é reconhecida como uma doença inflamatória crônica (BELCHER *et al.*, 2003; JISON *et al.*, 2004). O estresse oxidativo é um potencial indutor de estado inflamatório e muitos marcadores têm sido sugeridos como bons preditores de prognóstico para as doenças inflamatórias, como a PCR, ácido siálico, LDH, ICAM, VCAM, alfa1 antitripsina, haptoglobina e outros (ZULET *et al.*, 2007). Os dados obtidos para os parâmetros relacionados com a hemólise (LDH) e inflamação (PCR, ferritina) estão concordantes com dados da literatura. A PCR é produzida pelo fígado e tem sido considerado marcador de inflamação sistêmica, podendo estar elevada em processos inflamatórios e infecciosos. Krishnan e cols. (2010) encontraram associação forte entre os níveis de PCR e hospitalização em indivíduos pediátricos com DF e associaram estes fatores a presença de crises de dor e eventos vaso-oclusivos. A alfa antitripsina -1 é uma proteína sintetizada no fígado, cuja função é inibir proteases neutrofílicas, cujos níveis estão aumentados nos processos inflamatórios (NOFER *et al.*, 2002).

Os pacientes com DF apresentam diferentes graus de intensidade de anemia e características clínicas heterogêneas (BUNN, 1997; WEATHERALL & PROVAN, 2000). No presente estudo as manifestações clínicas mais frequentes

foram a vaso-oclusão, seguida de internação, crises de dor, infecção, uso de hemocomponentes, sequestro esplênico, STA, priapismo e AVC.

Os episódios de vaso-oclusão são característicos da DF, gerando dor isquêmica de intensidade variável, com recorrência imprevisível; estes episódios são responsáveis pelas internações (REES *et al.*, 2003). A dor faz parte das manifestações clínicas da DF e pode ser aguda ou crônica. Os episódios agudos são comumente caracterizados por STA, colecistite, priapismo, sequestro esplênico e crise vaso-oclusiva e os crônicos por artropatias, necrose asséptica, úlcera de perna e Síndromes neuropáticas (OHENE-FREMPONG & STEINBERG, 2001; *National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institutes. Division of Blood Diseases and Research*, 2002).

No presente estudo as principais causas de internação incluem a pneumonia, crises de dor e infecção; estes resultados concordam com estudos anteriores (SEIXAS *et al.*, 2010). A oclusão da microcirculação, bem como a infecção são fatores importantes que estimulam a produção de citocinas, proteínas de fase aguda e o estresse oxidativo, fatores que contribuem para a patogênese da DF (ZAGO & PINTO, 2007).

No presente estudo a talassemia $\alpha 2^{3,7Kb}$ foi descrita na frequência de 17% nos indivíduos com DF, com o encontro de associações estatisticamente significativas entre os dados hematológicos com valores diminuídos de VCM,

HCM, concentração de HbS e contagem de eosinófilos, sendo que entre as avaliações bioquímicas, encontraram-se valores mais elevados para o colesterol VLDL, triglicerídeos, AST e ALT. Com relação ao histórico clínico descreveu-se diferenças estatisticamente significativas para os eventos de sequestro esplênico nos indivíduos com idade menor que 5 anos.

Adorno e cols. (2005) observaram correlação entre a presença da talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ e alterações nos valores de Ht, VCM e HCM e valores elevados de Hm e Hb em recém-nascidos de uma maternidade pública de Salvador/BA. Entretanto, apesar dos estudos terem sido desenvolvidos na mesma população, o presente estudo foi desenvolvido em crianças com DF, que são bem diferentes da população estudada pelos autores.

A talassemia $\alpha_2^{3,7Kb}$ quando associada à DF melhora o seu curso clínico, uma vez que diminui a concentração intraeritrocitária da HbS, com redução do grau de hemólise (ADAMS *et al.*, 1994); observações semelhantes também foram referidas por Kato e cols. (2006), que associaram os níveis diminuídos de hemólise e a concentração aumentada de hemoglobina nos pacientes com o subfenótipo clínico e com prevalência diminuída de hemólise e disfunção endotelial, e o aumento da viscosidade sanguínea aos eventos vaso-oclusivos. Os dados relativos às alterações hematológicas descritos no presente estudo reforçam a hipótese do subfenótipo vaso-oclusivo, mas sugerem a provável existência de um subfenótipo associado à resposta inflamatória e a disfunção em órgãos, uma vez que os portadores da talassemia apresentaram valores elevados de marcadores lipídicos e de enzimas relacionadas a danos hepáticos e em multiórgãos.

No presente estudo o genótipo CAR/BEN foi o predominante, sendo seguido pelo genótipo BEN/BEN e CAR/CAR. Lyra e cols. (2005) estudaram indivíduos HbSS de duas cidades brasileiras (São Paulo e Salvador) e observaram frequência elevada para os genótipos CAR/BEN seguido pelo CAR/CAR. Souza (2007) encontrou resultados semelhantes ao estudar crianças HbSS em estado estável e em crise álgica na cidade de Salvador/Bahia, corroborando com o resultados deste estudo. Adorno e cols. (2005) realizaram estudo de corte transversal desenvolvido em indivíduos com DF da mesma população deste estudo, corroborando com os achados apresentados, confirmando o genótipo CAR/BEN, seguido pelo BEN/BEN e CAR/CAR, como os mais frequentes.

Os haplótipos ligados ao alelo β^S têm sido relacionados às concentrações variadas de HbF e à ocorrência de determinadas complicações clínicas (POWARS, 1991; FIGUEIREDO *et al.*, 1996; NAGEL & STEINBERG, 2001). Apesar dos resultados do presente estudo confirmarem a presença de concentrações de HbF mais elevadas nos portadores do haplótipo Benin, não se encontrou relação destes haplótipos e a presença de manifestações clínicas específicas. Entretanto, foram observadas concentrações elevadas de AST e aumento do número de linfócitos nos portadores do haplótipo CAR, fato que pode estar relacionado ao aumento de hemólise e a provável ativação linfocitária nestes indivíduos. Foi encontrado o aumento de plaquetas nos portadores do haplótipo BEN, sugerindo uma ativação plaquetária nesses pacientes, apesar destes resultados não terem precedentes na literatura, devendo ser confirmados por experimentos de biologia celular e de fenotipagem.

8.1 Polimorfismos c.282C>Y, c.63H>D e c.65S>C no gene *HFE* da hemocromatose hereditária

A Hemocromatose hereditária é uma doença genética que leva ao acúmulo progressivo de ferro (2005). Muitas patologias têm sido associadas com a presença de mutações relacionadas à HH e a sobrecarga de ferro tem participação na geração de EROs (PIETRANGELO, 2002). As frequências descritas para os polimorfismos c.282C>Y, c.63H>D e c.65S>C relacionados à HH estão de acordo com Santos e cols. (2010) em estudo relacionado à HH realizado em doadores de sangue afro-descendentes de São Paulo. A análise da associação entre os dados hematológicos e o polimorfismo *HFE* c.63H>D demonstrou diferença estatisticamente significativa para a contagem de plaquetas no grupo DF e nos subgrupos HbSS e HbSC.

Hannuksela e cols. (2003) estudaram a expressão e localização de proteínas *HFE*, TfR1 e TfR2 em plaquetas humanas e confirmaram a expressão das proteínas *HFE* e TfR2 na membrana plasmática de plaquetas, concluindo que a presença de polimorfismos nesses genes poderiam influenciar na contagem e ativação de plaquetas. De acordo com os resultados encontrados, a presença do polimorfismo c.63H>D sugere a diminuição na ativação das plaquetas.

A associação observada entre os dados hematológicos de VCM, HCM para o polimorfismo c.63H>D e a concentração de Hb e percentagem de Ht para o polimorfismo C.65S>C no gene *HFE* sugerem o estabelecimento do fenótipo inflamatório e vaso-oclusivo, uma vez que a presença de polimorfismos no gene *HFE* leva ao acúmulo de ferro e aumenta a geração de EROs.

8.2 Polimorfismos nos genes da *Haptoglobina*

A haptoglobina é uma α_2 -globulina que se liga à Hb livre no plasma e apresenta propriedades antioxidantes e imunoreguladoras (LANGLOIS & DELANGHE, 1996; CAMPREGHER *et al.*, 2004; WOBETO *et al.*, 2008).

O presente estudo descreveu o genótipo *Hp1-1* em frequência maior nos indivíduos com DF quando comparado ao grupo controle. Entretanto, o genótipo *Hp2-2* prevaleceu no grupo controle, demonstrando que a distribuição destes genótipos e alelos não obedece ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Carter & Worwood (2007) relataram frequência maior do genótipo *Hp1* em índios nativos da América do Sul. Ostrowski e cols. (1987) estudando pacientes HbSS negros dos EUA demonstraram frequência maior do genótipo *Hp1.1*.

Os dados do presente estudo estão de acordo com resultados anteriores realizados em populações com características étnicas semelhantes. A literatura relata que a frequência dos genes *Hp* variam com a região geográfica (SCHULTZE & HEREMANS, 1966); a frequência do alelo *Hp1* aumenta no sudoeste da Ásia para Europa e da Ásia para a América. Na América as maiores frequências foram encontradas em populações indígenas do Chile, Peru, México, Venezuela e fronteira da Venezuela brasileira e entre índios Yanomames (SUTTON *et al.*, 1960; MARINI *et al.*, 1993).

O encontro de frequência elevada para o genótipo *Hp1-1* pode ser justificado pela ocorrência de seleção natural a favor desse genótipo nos indivíduos com DF, sugerindo que a molécula da Hp 2-2, por ser uma molécula mais complexa, é menos eficiente em prevenir os danos oxidativos provenientes da Hb livre (CARTER & WORWOOD, 2007), de onde podemos concluir que os

indivíduos com DF e genótipo *Hp2-2* experimentam mais estresse oxidativo e, conseqüentemente, mais dano vascular e alterações clínicas, devendo ser selecionados ao longo da vida.

O gene da Hp é expresso nos hepatócitos e Van Vlierberghe e cols. demonstraram a relação entre os genótipos de *Hp* e sexo, sendo que o genótipo *Hp2.2* apresentou associação com níveis séricos elevados de ferro e ferritina em homens homozigotos para a mutação *HHc.282C>Y*. Entretanto, dados semelhantes não foram encontrados no presente estudo.

A enzima LDH é considerada marcador clássico de hemólise intravascular (KATO *et al.*,2006). Nos indivíduos HbSS e em doenças hereditárias dois terços da hemólise é extravascular e um terço intravascular, sendo que esta taxa é suficiente para liberar aproximadamente 10g de hemoglobina no plasma por dia (ZAGO, 2007). Os resultados do presente estudo demonstram valores elevados de LDH em indivíduos com o genótipo *Hp1-2* e *Hp2-2* quando comparados aos indivíduos com o genótipo *Hp1-1*, corroborando com o estudo de Chapelle e cols. (1982). Os valores de creatinina foram também mais elevados nos indivíduos com DF portadores dos alelos *Hp2* e *Hp1S* (CHAPELLE *et al.*, 1982).

Neste estudo, os indivíduos com DF e genótipos *Hp1-2* e *Hp2-2* apresentaram alterações na concentração de hemoglobina e número de linfócitos, bem como aumento de reticulócitos e de ferritina, sendo que os indivíduos HbSC com o genótipo *Hp2-2* apresentaram aumento da PCR. Esses dados corroboram com a menor capacidade antioxidante dos portadores do alelo 2 e suas associações com os diferentes alelos *Hp1*, uma vez que a presença deste alelo esteve relacionada ao aumento de proteínas de fase aguda (ferritina e PCR) e de

marcadores associados a hemólise, como os reticulócitos (CARTER & WORWOOD, 2007; KODA *et al.*, 1998).

8.3 Polimorfismos nos genes da GST

A Glutathione S-transferase corresponde a uma família de enzimas que possui papel importante na detoxificação de xenobióticos e de substâncias endógenas. No presente estudo o genótipo *GSTM1* nulo foi o mais freqüente, seguido pelo *GSTT1* nulo e do *GSTM1/ GSTT1* nulo em ambos os grupos estudados. A literatura relata a frequência elevada do fenótipo nulo para o gene *GSTM1*, o qual varia entre os vários grupos étnicos. Em nigerianos e indianos foram observadas frequências menores do genótipo *GSTM1* nulo, que foram maiores em chineses (HATAGIMA, 2000). Losi-Guembarovski & Cólus (2001) também relataram frequências diferentes para o genótipo *GSTM1* nulo ao estudar indivíduos saudáveis e de acordo com as características étnicas, sendo que 23-41% foram afro-americanos e negros; 33-63% asiáticos; 23-48% africanos e 57% caucasianos. Os dados do presente estudo estão de acordo com estudos prévios e as diferenças nas percentagens encontradas podem ser explicadas pela mistura racial da nossa população (GATTAS, 2004).

Valores diferenciados foram descritos para dados hematológicos e bioquímicos nos indivíduos com DF com genótipos mutantes para o gene *GST*. Entretanto, as diferenças encontradas não diferiram das análises realizadas nos grupos sem a diferenciação em genótipos, levando-nos a conclusão de que a

simples presença do genótipo para os polimorfismos no gene da *GST* não interferiram nos valores médios dos marcadores investigados. Entretanto, quando foram comparados os dados hematológicos nos indivíduos com genótipo mutante e selvagem para o gene da *GST* encontrou-se diferenças significativas para as contagens de leucócitos e segmentados neutrófilos, com valores inferiores para o grupo mutante. Dados relacionados à presença de leucopenia e sua associação com os genótipos mutantes no gene da *GST* não são frequentes na literatura. Entretanto, esses achados corroboram estudo previamente realizado pelo nosso grupo que associou a diminuição da contagem de leucócitos aos alelos mutantes para o gene da *GST* (GONCALVES *et al.*, 2010).

Com relação à análise da associação dos polimorfismos no gene da *GST* e os parâmetros bioquímicos verificou-se diferenças estatísticas, com valores diminuídos de ferritina e aumentados de uréia nos portadores dos alelos mutantes, apesar dos indivíduos HbSS terem apresentado valores menores da PCR. Os resultados descritos corroboram com os dados de diminuição dos leucócitos, uma vez que a diminuição de PCR e ferritina refletem a diminuição de processos inflamatórios, sugerindo um possível papel dos alelos mutantes na proteção de eventos inflamatórios nos indivíduos com DF. A relação entre o aumento de uréia e o genótipo selvagem pode significar uma associação com dano renal precoce, fato que poderá ser confirmado com realização de estudos posteriores.

8.4 Polimorfismos c.192Q>R e c.55L>M no gene da *Paraoxonase1*

A Paraoxonase 1 é uma enzima sintetizada pelo fígado que circula no plasma ligada às lipoproteínas do colesterol HDL, que apresenta propriedade anti-oxidante (MENDONÇA *et al.*, 2008). Dentre as proteínas presentes na molécula do colesterol HDL, a PON1 é a que apresenta atividade hidrolítica e que é considerada a responsável pela inibição da oxidação do colesterol LDL, por hidrolisar peróxidos lipídicos e evitar modificações oxidativas deste colesterol e do seu acúmulo (MACKNESS, *et al.*, 1993; KONTUSH *et al.*, 2003).

Estudos relatam que há um determinante genético responsável pela atividade antioxidante e ateroprotetora da PON1; conseqüentemente, se a atividade da PON1 está reduzida, aumenta o estresse oxidativo e o risco de desenvolver doença aterosclerótica. Dois polimorfismos gênicos, o *PON1*c.192 Q>R e o *PON1*c.55L>M têm sido implicados na variabilidade da atividade enzimática da PON1 (DAVIES *et al.*, 1996; BHATTACHARYYA *et al.*, 2008). No presente estudo os alelos mais frequentes foram o Q e o L, dados concordantes com os encontrados por Mendonça e cols. (2008) ao estudar indivíduos com doença cardiovascular de Portugal. Ao relacionar a atividade da PON1 com os alelos selvagens e mutantes para os polimorfismos estudados observou-se que indivíduos com alelo R e M (mutantes) apresentaram atividade diminuída, confirmando assim o que a literatura reporta sobre a influência dos polimorfismos na variabilidade da atividade enzimática; nossos dados estão concordantes com Mackness e cols. (1998) e Saadatmandi e cols. (2010). Lawler e cols. (2004)

encontraram atividade da PON1 diminuída em indivíduos com alelos Q e M, os dados controversos podem ser devido ao substrato no qual a PON1 atua, pois sua atividade hidrolítica varia de acordo com o substrato utilizado, segundo Mackness (1997).

O VLDL-C é uma subclasse de lipoproteína sintetizada no fígado e é responsável pelo transporte de produtos endógenos (colesterol, ésteres de colesterol, triglicerídeos e fosfolipídeos) na circulação, que recebem as apolipoproteínas E e C2 nos capilares em contato com a lipoproteína lipase (LPL); pela ação da LPL ocorre a remoção de triglicerídeos do VLDL-C, que se transforma em LDL-C. Os níveis de VLDL-C têm sido relacionados com taxa aceleradas de aterosclerose e elevação na quantidade de doenças e estados metabólicos (NOFER *et al.*, 2002).

Ao analisar o perfil bioquímico nos indivíduos com DF e nos HbSS em relação à presença do polimorfismo *PON1*c.192Q>R observou-se a associação dos portadores do alelo mutante a valores elevados de VLDL-C e triglicerídeos. O polimorfismo localizado na posição 192 do gene da *PON1* é um importante determinante da atividade dessa enzima, sendo que a isoforma que possui glutamina nessa posição tem atividade oito vezes menor que a que possui arginina. Além disso, diversos estudos têm mostrado o aumento do risco de DAC em indivíduos com atividade baixa da paraoxonase; o polimorfismo na posição 55 da *PON1* não influencia tanto na atividade enzimática quanto o da posição 192 (MACKNESS *et al.*, 1991; MACKNESS *et al.*, 1999; SAADATMANDI *et al.*, 2010).

Os achados do presente estudo corroboram com achados da literatura, sugerindo o favorecimento do estado de estresse oxidativo desses indivíduos confirmados pelos dados de associação com variáveis relacionadas ao metabolismo lipídico e de ferro e com marcadores de hemólise. A associação da atividade da paraoxonase com os polimorfismos da *Hp*, revelou valores maiores de atividade em indivíduos com genótipo 2-1, o que sugere que a herança em heterozigose do alelo 1 e 2 influencia no estado oxidante em indivíduos com DF, uma vez que no presente trabalho verificou-se que os indivíduos com genótipo 2-2 e 2-1 para a *Hp* apresentaram menor capacidade antioxidante.

Com relação a história clínica dos indivíduos com DF foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a atividade da paraoxonase e a ocorrência de AVC e os níveis de atividade da PON1 em indivíduos esplenectomizados, confirmando a atividade antioxidante da PON1.

Numerosas doenças estão associadas ao estresse oxidativo, a exemplo da HbSS e doenças cardiovasculares. No presente trabalho descreveu-se a associação do polimorfismo *PON1* c.55L>M e contagem reduzida de plaquetas, sendo que os indivíduos com genótipo mutante apresentaram contagem diminuída de plaquetas. Segundo Freedman (2008), o estresse oxidativo bem como a diminuição da capacidade antioxidante vista na doença coronariana podem também estar associados a mudanças na função plaquetária. A presença do polimorfismo *PON1*c.55L>M altera a atividade enzimática e sua função antioxidante (MACKNESS *et al.*,1997; LAWLER *et al.*, 2004) e,

consequentemente, pode favorecer o estabelecimento do estresse oxidativo em indivíduos HbSS.

A avaliação do perfil bioquímico e a presença do polimorfismo *PON1*c.55L>M nos indivíduos HbSC deste estudo demonstrou a associação dos níveis séricos elevados de creatinina e bilirrubina direta no grupo mutante, sendo que o encontro de tais resultados podem ser consequência do estresse oxidativo presente nestes indivíduos, onde, provavelmente, a capacidade antioxidante da *PON1* esta diminuída devido ao alelo mutante para o polimorfismo envolvido, fato que favorece a ocorrência de possível dano renal e hemólise.

Os modelos estabelecidos na análise multivariada demonstram como cada elemento considerado como marcador de risco, marcador hematológico ou bioquímico, participa no desenvolvimento de eventos clínicos nos indivíduos com DF, confirmando a necessidade de se estudar o perfil hematológico e bioquímico destes indivíduos, principalmente em crianças, com o intuito de prevenir complicações clínicas relacionadas ao estresse oxidativo.

A diversidade clínica e a possibilidade de instituir medidas distintas de tratamento nos pacientes com DF têm levado à busca de fatores preditivos e de possíveis moduladores da evolução clínica da doença. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com a necessidade de se buscar fatores modificadores da DF, uma vez que demonstram a importância do estudo de polimorfismos em genes de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e como esses podem influenciar no curso clínico desta doença que, como mencionado

anteriormente, é um problema social e de Saúde Pública, principalmente no estado da Bahia, onde o programa de triagem neonatal do Ministério da Saúde descreve a incidência de DF mais elevada do Brasil.

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

- ❖ A gravidade da hemólise nos indivíduos HbSS é constatada pelos resultados obtidos para os marcadores clássicos de hemólise, como reticulócitos, bilirrubinas e LDH, bem como para os marcadores de inflamação como PCR, ferritina, ASLO e alfa 1-antitripsina, confirmando assim o estado inflamatório crônico apresentado por estes pacientes;
- ❖ Os indivíduos com DF apresentaram valores diminuídos para colesterol total, HDL-C, LDL-C e níveis aumentados de VLDL-C e triglicerídeos quando comparados ao grupo controle, significando que estes pacientes apresentam subfenótipo de dislipidemia que reforça a hipótese da participação do HDL-C e moléculas associadas à resposta antiinflamatória, antioxidante, anticoagulante e pró-fibrinolítica;
- ❖ A presença de talassemia $\alpha 2^{3,7Kb}$ nos indivíduos com DF revelou associação significativa com manifestações clínicas, como esplenomegalia e sequestro esplênico fazendo-nos supor que a co-herança da talassemia favoreça o subfenótipo clínico vaso-oclusivo, mas sugerem a provável existência de um subfenótipo associado à resposta inflamatória e a disfunção em órgãos;
- ❖ O genótipo mais frequente para o grupo de genes da globina β foi o CAR/BEN seguido do genótipo BEN/BEN e do CAR/CAR, confirmando dados anteriores na mesma população;

- ❖ As manifestações clínicas mais frequentemente encontradas nos indivíduos estudados foram a vaso-oclusão, seguida de hospitalizações, crises de dor, pneumonia, uso de transfusão sanguínea, infecção, sequestro esplênico, STA e AVC, sendo que as principais causas de internação foram pneumonia, crises de dor e infecção;

- ❖ A análise de associação entre os dados hematológicos e mutação HH c.63H>D em indivíduos com DF revelou diferença estatística significativa para a contagem de plaquetas, fazendo-nos supor que a presença de polimorfismos em genes relacionados à HH podem influenciar na ativação desses elementos;

- ❖ Os indivíduos com o genótipo *Hp* 1.2 e 2.2 demonstraram valores maiores de LDH do que indivíduos com o genótipo *Hp*1.1, o que implica na capacidade antioxidante menor dos portadores do alelo 2 e suas associações com os diferentes alelos *Hp*1, uma vez que a presença deste alelo esteve relacionada ao aumento de proteínas de fase aguda (ferritina e PCR) e de marcadores associados a hemólise, como os reticulócitos;

- ❖ O genótipo *GSTM1 nulo* foi o mais frequente, seguido pelo *Teta nulo* e do *GSTM1/GSTT1 nulo* em ambos os grupos estudados;

- ❖ A análise da associação entre os polimorfismos no gene da *GST* e dados hematológicos em indivíduos HbSS revelou diferença significativa para a contagem de leucócitos e segmentados neutrófilo, com valores menores para o grupo mutante, significando que estes pacientes são mais susceptíveis a desenvolver leucopenia;
- ❖ Foi observada associação entre genótipo mutante para a *GST* e níveis de vitamina C, com valores maiores para o grupo mutante, sugerindo possível papel dos alelos mutantes na proteção de eventos inflamatórios nos indivíduos com DF;
- ❖ Os indivíduos com alelos R e M (mutantes) apresentam valores de atividade da paraoxonase diminuídos, confirmando a influência dos polimorfismos no gene da *PON1* na atividade enzimática;
- ❖ A análise do perfil bioquímico dos indivíduos com DF e HbSS em relação a presença do polimorfismo *PON1*c.192Q>R revelou associação com os níveis de VLDL-C e triglicédeos, significando que o estado de estresse oxidativo desses indivíduos está relacionado ao subfenótipo de dislipidemia com participação do HDL-C na resposta antiinflamatória e antioxidante;
- ❖ Foi observada associação entre o polimorfismo *PON1*c.55L>M e a contagem diminuída de plaquetas, sendo que os indivíduos portadores deste polimorfismo podem apresentar alteração na atividade enzimática e

na função antioxidante, sugerindo que o estresse oxidativo possa estar associado a mudanças na função plaquetária;

- ❖ A presença do polimorfismo *PON1* c.55L>M está associada aos níveis séricos de uréia, creatinina e bilirrubina direta, significando que a presença do polimorfismo diminui a capacidade antioxidante da *PON1*, favorecendo o estresse oxidativo e a ocorrência de possível dano renal e de hemólise;
- ❖ Os modelos estabelecidos na análise multivariada demonstram como cada marcador de risco participa no desenvolvimento dos eventos clínicos apresentados pelos indivíduos com DF, reforçando a necessidade de se estudar o perfil hematológico e bioquímico, além da busca de marcadores genéticos, de maneira a definir melhor os mecanismos envolvidos no estresse oxidativo exacerbado nestes pacientes.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMKIEWICZ TV, SARNAIK S, BUCHANAN GR, IYER RV, MILLER ST, PEGELOW CH, ROGERS ZR, VICHINSKY E, ELLIOTT J, FACKLAM RR, O'BRIEN KL, SCHWARTZ B, VAN BENEDEN CA, CANNON MJ, ECKMAN JR, KEYSERLING H, SULLIVAN K, WONG WY, WANG WC. Invasive pneumococcal infections in children with sickle cell disease in the era of penicillin prophylaxis, antibiotic resistance, and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination. *J Pediatr.* 143: 438–44, 2003.
2. ADAMS RJ, KUTLAR A, MCKIE V *et al.* Alpha thalassemia and stroke risk in sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 45:279-282, 1994.
3. ADKINS S, GAN KN, MODY M, LA DU BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase arylesterase. Glutamine or arginine at position 191 for the respective A or B allozymes. *Am. J. Hum. Genet.* 52:598±560, 1993.
4. ADORNO EV, COUTO FD, MOURA NETO JP, MENEZES JF, REGO M, REIS MG, GONÇALVES MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 21:292-298, 2005.
5. AISEN, P. Current concepts in iron metabolism. *Clin. Haematol.* 11:241-257. 1982.
6. ALABDULAALI MK. Sickle cell disease patients in eastern province of Saudi Arabia suffer less severe acute chest syndrome than patients with

- African haplotypes. *Annals of Thoracic Medicine*. Vol 2-issue 4, 158-162, 2007.
7. ALBUQUERQUE ABL. Talassemia α^1 e α^2 e gestação em Salvador – Bahia. 2002. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Fundação Oswaldo Cruz. Salvador.
 8. ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.* 341:1986-95, 1999.
 9. ANTONARAKIS ES, KAZAZIAN HH, ORKIN SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene cluster. *Human Genetics.* 69:1- 14, 1985.
 10. ARAÚJO MC, SERAFIM ES, DE CASTRO JR WA, DE MEDEIROS TM. Prevalence of abnormal hemoglobins in newborns in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. *Cad. Saúde Pública.* 20:123-128, 2004.
 11. ASHLEY E, MCGREADYA R, PROUXA S & NORTEN F. Malaria. *Travel Medicine & Infections Disease* 4:159-173, 2006.
 12. ASLAN M, THORNLEY-BROWN D, FREEMAN BA. Reactive species in sickle cell disease. *Ann NY Acad Sci.* 899:375–391, 2000.
 13. ASLAN M, FREEMAN BA. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunol Res.* 26(1–3):107–118, 2002.
 14. ASLAN M, FREEMAN BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med.* 43:1469-1483, 2007.

15. ATAGA KI, ORRINGER EP. Renal Abnormalities in Sickle Cell Disease. American Journal of Hematology 63:205–211, 2000.
16. ATAGA KI, MOORE CG, JONES S, OLAJIDE O, STRAYHORN D, HINDERLITER A *et al.* Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study. Br J Haematol.134 (1):109-15, 2006.
17. AVIRAM M, HARDAC E, VAYA J *et al.* Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. Circulation 101:2510-2517, 2000.
18. AZEVEDO ES. Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. Ann Human Genet. 44:55-60, 1980.
19. AZEVEDO ES, ALVES AFP, SILVA MCBO, SOUZA MGF, LIMA AMVMD, AZEVEDO WC. Distribution of abnormal hemoglobin and glucose-6-phosphato dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. Am. J. Phys. Anthropol. 53:509-512, 1980.
20. BACKES CE, MALLMANN TD, BAZZO ML, SANTOS-SILVA MC. Triagem neonatal como um problema de saúde pública. Rev Bras Hematol Hemoter. 27(1):43-7, 2005.
21. BACON, B.R.; POWELL, L.W.; ADAMS, P.C.; KRESINS, T.F.; HOFNAGLE, J.H. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. Gastroenterology 116: 193-207,1999.
22. BAKANAY SM, DAINER E, CLAIR B, *et al.*, Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. Blood,105:545–547, 2005.

23. BARREIROS ALBS, DAVID JM, DAVID JP, RAMOS JLA. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova* Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.
24. BARTON, J.C.; EDWARDS, C.Q.; BERTOLI, L.F.; SHROYER, T.W.; HUDSON, S.L. Iron overload in African Americans. *Am. J. Med.* 99: 616-623. 1995.
25. BECKER K, TILLEY L, VENNERSTROM JL, ROBERTS D, ROGERSON S, GINSBURG H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host – parasite interactions. *International Journal for Parasitology.* 34: 163-189, 2004.
26. BECKMAN KB, AMES BN. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* 272: 19633-19636, 1997.
27. BEGUM, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry* 66(2): 398-403, 2002.
28. BELCHER JD, BRYANT CJ, NGUYEN J, BOWLIN PR, KIELBIK MC, BISCHOF JC, *et al.* Transgenic sickle mice have vascular inflammation. *Blood* 101:3953-9, 2003.
29. BELCHER JD, MAHASETH H, WELCH TE, OTTERBEIN LE, HEBBEL RP, VERCELLOTTI GM. Heme oxygenase=1 is a modulator of inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. *J clin invest.* 116:808-816, 2006.
30. BENDER MA & HOBBS W. Sickle Cell Disease. *Gene Reviews.* 2009.

31. BHATTACHARYYA T, NICHOLLS SJ, TOPOL EJ, ZHANG R, YANG X, SCHMITT D, FU X, SHAO M, BRENNAN DM, ELLIS SG, BRENNAN ML, ALLAYEE H, LUSIS AJ, HAZEN SL. Relationship of Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polymorphisms and Functional Activity With Systemic Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *JAMA*. 299(11):1265-1276, 2008.
32. BHAUMIK K. Fetal hemoglobin synthesis in sickle cell anemia: some molecular considerations. *American Journal of Hematology* 46: 101-106, 1994.
33. BIANCHI MLP, ANTUNES LMG. RADICAIS LIVRES E OS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES DA DIETA. *Rev. Nutr., Campinas*, 12(2): 123-130, maio/ago., 1999.
34. BISOL T, FIOR O, ESTEVES JF, FRIDERICH JR. Influência do genótipo da hemoglobinopatia falciforme nas manifestações retinianas em pacientes de um hospital universitário. *Arq. Bras. Oftalmol.* Vol 63. Nº4 São Paulo, 2000.
35. BOLUFER P, COLLADO M, BARRAGÁN E, CERVERA J, CALASANZ MJ, COLOMER D, ROMAN-GÓMEZ J, SANZ MA. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *Haematologica/The hematology journal* 92(03), 2007.
36. BOTHWELL TH, MACPHAIL AP. Hereditary hemochromatosis: etiologic, pathologic, and clinical aspects. *Semin. Hematol.* 35: 55-71. Review. 1998.

37. BOWMAN BH, KUROSUKY A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Genet.* 12:189-261, 1982.
38. BOWMAN BH. Haptoglobin. In: BOWMAN BH, ed. *Hepatic plasma proteins.* San Diego: Academic Press 159-67, 1993.
39. BRANDELISE S, PINHEIRO V, GABETTA CS, HAMBLETON I, SERJEANT B, SERHEANT G. Newborn screening for sickle cell disease in Brazil: the Campinas experience. *Clin Lab. Haematol.* 26:15-19, 2004.
40. BRITISH NUTRITION FOUNDATION. *Iron – Nutritional and Physiological Significance. Report of the Task Force.* London: Chapman and Hall, 1995.
41. BROOMFIELD CA: A purified recombinant organophosphorus adid anhydrase protects mice against soman. *Pharmacol Toxicol.* 70:65-66, 1992.
42. BUCHANAN GR, DEBAUN MR, QUINN CT, STEINBERG MH. Sickle cell disease. *Hematology* 35-47, 2004.
43. BUNN HF & FORGET BG. *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.* W.B: Saunders, Philadelphia, PA, USA. 1986.
44. BUNN HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N. Engl J Med.* 337:762-69, 1997.
45. CAMPREGHER PV, LORAND-METZE I, GROTTO HZW, SONATI MF. Haptoglobin phenotypes in Brazilian patients with leukemia. *J Bras Patol Med Lab.* 40:307-309, 2004.

46. CANÇADO RD. Talassemias alfa. Rev. bras. hematol. hemoter. 28(2):81-87, 2006.
47. CANÇADO RD. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme . Rev. bras. hematol. hemoter. 29(3):316-326, 2007.
48. CANÇADO RD, JESUS J. A doença falciforme no Brasil. Rev Bras Hematol Hemoter. 29:204-6, 2007.
49. CARTER K, WORWOOD M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. Int. Jnl. Lab. Hem. 29:92–110, 2007.
50. CARVALHO EB; BORGES EL; CARLOS LMB; SILVA MAM; MAGALHÃES SMM; GOMES FVBAF; CARVALHO MJC; QUIXADÁ ATS; PITOMBEIRA MHS. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.29 no.2 São José do Rio Preto, 2007.
51. CHAPELLE JP, ALBERT A, SMEETS JP, HEUSGHEM C, KULBERTUS HE. Effect of the Haptoglobin Phenotype on the Size of a Myocardial Infarct. N Engl J Med 307:457-463, 1982.
52. CHAUDRI G & CLARK IA. Reactive oxygen species facilitate the in vitro and in vivo lipopolysaccharide-induced release of tumor necrosis factor. J Immunol 143:1290-7. 1989.
53. CHIATTONE, C.S. Avaliação prospectiva de variáveis hematológicas em pacientes portadores de úlcera péptica submetidos a ressecção

- gástrica. Dissertação de Mestrado – Escola Paulista de Medicina, São Paulo. 1988.
54. CHONG SS, BOEHM CD, HIGGS DR, CUTTING GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. *BLOOD* 95: 360-362, 2000.
55. CHRISTEN S, WOODALL AA, SHIGENAGA MK, SOUTHWELL-KEELY PT, DUNCAN MW, AMES BN. Gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements α -tocopherol: physiological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:3217–3222, 1997.
56. COLE TB, JAMPSA RL, WALTER NJ, ARNDT TL, RICHTER RJ, SHIH DM, TWARD A, LUSIS AJ, JACK RM, COSTA LG, FURLONG CE. Expression of paraoxonase (PON1) during development. *Pharmacogenetics*. 13:357-364, 2003.
57. CONTE, V.P. Hemocromatose hereditária. *Rev. Bras. Med.* 57: 553-564. 2000.
58. COSTA FF. Anemia Falciforme. In: ZAGO MA, FALÇÃO RP, PASQUINI R. *Hematologia, Fundamentos e Prática*. 1 ed, São Paulo: Atheneu, cap 7, p. 289-308, 2001.
59. COSTA LG, VITALONE A, COLE TB, FURLONG CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol*. 69:541-550, 2005.
60. COSTA FF, SONATI MF. Hemoglobina: estrutura, síntese e transporte de oxigênio. In: Covas DT, Langhi Junior DM, Boordin JO, editors.

- Hemoterapia: Fundamentos e prática . São Paulo: Atheneu. P. 27-33, 2007.
61. COSTA FF & SONATI MF. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. *Jornal de Pedistrias* – Vol. 84, Nº 4 (Supl), 2008.
62. COTTON, S.C.; SHARP, L.J.; BROCKTON, N. Glutathione S transferase polymorphisms and colorectal cancer. *American Journal of Epidemiology* p.1-18, 1999.
63. COUTO FD, ALBUQUERQUE AB, ADORNO EV, MOURA NETO JP, ABBEHUSEN LF, OLIVEIRA JL, *et al.* Alpha thalassaemia 2, 3.7 Kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. *Clin Lab Haematol.* 25:29-34, 2003.
64. DAILLY E, URIEN S, *et al.* Role of bilirubin in the regulation of the total peroxy radical trapping antioxidant activity of plasma in sickle cell disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 248:303-06, 1998.
65. DAS DK & ESSMAN WB. Oxygen radicals systems events and diseases processes. Karges Publ. Basel 196p, 1990.
66. DAVIES H.G., RICHTER, R.J., KEIFER, M., BROOMFIELD, C.A., SOWALLA, J. & FURLONG, C.E. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genetics* 14:334- 336, 1996.
67. DI NUZZO DVP, FONSECA S. Anemia falciforme e infecções. *J Ped* 80(5):347-354, 2004.

68. DONOVAN A, BROWNLIE A, ZHOU Y, SHEPARD J, PRATT SJ, MOYNIHAN J, *et al.* Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 403 (6771):776-81, 2000.
69. DRAIN J, BISHOP JR, HAJDUK SL. Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to trypanosomes. *J Biol Chem*. 276:30254-30260, 2001.
70. DUITTS AJ, RODRIGUEZ T, SCHNOG J-J B. Serum levels of angiogenic factors indicate a pro-angiogenic state in adults with sickle cell disease on behalf of the CURAMA Study Group* *British Journal of Haematology* 134:116–119, 2006.
71. DUKERS HJ, BOEHM M, TRUE AL, NABEL GJ, NABEL EG. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat. Med*. 7:693-698, 2001.
72. EBERHARDT RT, MCMAHON L, DUFFY SJ, STEINBERG MH, PERRINE SP, LOSCALZO J, *et al.* Sickle cell anemia is associated with reduced nitric oxide bioactivity in peripheral conduit and resistance vessels. *Am J Hematol* 74(2):104–111, 2003.
73. EL-HAZMI MAF, JABBAR FA, WARSY AS. Cholesterol and triglyceride level in patients with sickle cell anemia. *Scand J Clin Lab Invest*. 47: 351-354, 1987.
74. EMBURY SH, HEBBEL RP, MOHANDAS N, STEINBERG MH. *Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice*. Raven Press, New York, 1994.

75. EMBURY SH, VICHINSKY EP. Sickle cell disease. In HOFFMAN R, BENZ EJ, SHATTIL SJ, FURIE B, CIHEN HJ, SILBERSTEIN LE, McGLACE P, editors. Hematology. Basic principles and practice. New York: Churchill Livingstone; P 522. 2000.
76. ENWONWU CO, XU XX, TURNER E. Nitrogen metabolism in sickle cell anemia: free amino acids in plasma and urine. Am J Med Sci. 300(6):366–371, 1990.
77. EXNER, M., MINAR, E., WAGNER, O., and SCHILLINGER, M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. Free Radic. Biol.Med. 37:1097–1104, 2004.
78. FANG, Y. Z., YANG, S. & WU, G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 18:872-879.214.
79. FEDER, J.N.; GNIRKE, A. *et al.* A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. Nat. Genet. 13: 399-408. 1996.
80. FIGUEIREDO MS, KERBAUY J, GONÇALVES MS, ARRUDA VR, SAAD ST, SONATI MF *et al.* Effect of alpha-thalassemia and beta-globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. Am J Hematol. 53:72-6, 1996.
81. FOGLIETTA E, DEIDDA G, GRAZIANE B, MODIANO G, BIANCO I. Detection of α -glibin gene disorders by a simple PCR methodology. Haematologica 84:387-396, 1996.

82. FRANCIS RB Jr & HAYWOOD LJ. Elevated immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 in sickle cell disease. *J Natl Med Assoc.* 84:611-615. 1992.
83. FRANK MM, LACHE O, ENAV BI, SZAFRANEK T, LEVY NS AND RICKLIS RM. Structure-function analysis of antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 98:3693-3698, 2001.
84. FREEDMAN JE. Oxidative Stress and Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:s11-s16, 2008.
85. FRENETTE PS, ATWEH GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J Clin Invest.* 117(4):850-8, 2007.
86. FUHRMAN B, VOLKOVA N, AVIRAM M: Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: Protective role of antioxidants and paraoxonase. *Atherosclerosis.* 161:307-316, 2002.
87. GARIN MC, JAMES RW, DUSSOIX P, BLANCHE H, PASSA P, FROGUEL P, RUIZ J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest.* 99:62–66, 1997.
88. GARY D.O. Prevention of invasive pneumococcal infection in sickle cell disease on the threshold of a new era of successes? *J. Pediatr,* 143:438, 2003.

89. GATTÁS GJF, KATO M, SOARES-VIEIRA JA, SIRAQUEL MS, KOHLER P, GOMES L, REGO MAV, BYDLOWSKI SP. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37: 451-458, 2004.
90. GLADWIN MT, SCHECHTER AN, OGNIBENE FP, COLES WA, REITER CD, SCHENKE WH, *et al.* Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation*. 107(2):271–278, 2003.
91. GLADWIN MT, SACHDEV V, JISON ML, SHIZUKUDA Y, PLEHN JF, MINTER K, BROWN B, COLES WA, NICHOLS JS, ERNST I, HUNTER LA, BLACKWELDER WC, SCHECHTER AN, RODGERS GP, CASTRO O, OGNIBENE FP. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 350: 886–95, 2004.
92. GONÇALVES MS, MOURA NETO JP, SOUZA CL, MELO P, REIS MG. Evaluating glutathione S-transferase (GST) null genotypes (GSTT1 and GSTM1) as a potential biomarker of predisposition for developing leucopenia. *Int J Lab Hematol*. 32:49-56, 2010.
93. GOUGEROT-POCIDALO MA, ROCHE Y, FAY M, PERIANIN A, BAILLY S. Oxidative injury amplifies interleukin-1 activity produced by human monocytes. *Int J Immunopharmacol* 11:961-9, 1989.
94. GRIFFITH OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med*. 27:922-935, 1999.
95. GROTTO HZW . Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 30(5):390-397, 2008.

96. GUETTA J, STRAUSS M, LEVY NS, FAHOUM L AND LEVY AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 191:48-53, 2007.
97. GUTTERIDGE JMC. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 917:219-23, 1987.
98. GUTTERIDGE JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarker of tissue damage. *Clin Chem.* 41:1819-28, 1995.
99. HALLIDAY, J.W.; RAMM, G. A.; POWELL, L.W.; WORWOOD, M. Cellular iron processing and storage: the role of ferritin. In: BROCK, J.H.; HALLIDAY, J.W.; PIPPARD, M.J.; POWELL, L.W. *Iron metabolism in health and disease.* London: W. B. Saunders. p.98-121. 1994.
100. HALLIWELL B & GUTTERIDGE JMC. *Free radicals in biology and medicine.* third ed. Oxford Univ. Press, Oxford. 1999.
101. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free radicals in Biology and Medicine* 3rd Ed, Oxford University Press, NY, 2007.
102. HANNUKSELA J, PARPARKKILA S, WAHEED A, BRITTON RS, FLEMING RE, BACON BR, SLY WS. Human platelets express hemochromatosis protein (HFE) and transferrin receptor 2. *European Journal of Haematology* 70(4): 201-206, 2003.
103. HARFORD, J.B.; ROUAULT, T.A.; KAUSNER, R.D. The control of cellular iron homeostasis. In: BROCK, J.H.; HALLIDAY, J.W.; PIPPARD, M.J.;

- POWELL, L.W. Iron metabolism in health and disease. London: W. B. Saunders. p.123-149, 1994.
- 104.HATAGIMA A, KLAUTAU-GUIMARÃES MN, SILVA FP, CABELLO H. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. Genet. Mol. Biol. Vol23 no.4 São Paulo. 2000.
- 105.HATCH FEJR, AZAR SH, AINSWORTH TE, NARDO JM, CULBERTSON JW. Renal circulatory studies in young adults with sickle cell anemia. J Lab Clin Med 76:632–640, 1970.
- 106.HEBBEL RP. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. J Clin Invest. 100:S83-86, 1997.
- 107.HEBBEL RP, VERCELLOTTI GM. The endothelial biology of sickle cell disease. J Lab Clin Med. 129:288-293, 1997.
- 108.HEINECKE JW, LUSIS AJ. Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? Am J Hum Genet. 62:20-24, 1998.
- 109.HENLE, E.S.; LINN, S. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 172:19095-8, 1997.
- 110.HENTZE MW, MUCKENTHALER MU, ANDREWS NC: Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. Cell 117:285–297, 2004.
- 111.HUISMAN THJ, CARVER MFH AND BAYSAL E. A Syllabus of Thalassemia Mutations. The Sickle Cell Anemia Foundation, Augusta, 1997.

112. HUMBER R, ADLER DA, DISTECHE CM, HASSETT C, OMIECINSKI CJ, FURLONG CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet.*, 3:73-76, 1993.
113. HUTZ, M.H., SALZANO, F.M. Sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brasil: demographic, clinical and laboratorial data. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 16:219-226, 1983.
114. ISICHEI UP. Liver function and the diagnosis significance of biochemical changes in the blood of African children with sickle cell disease. *J Clin Pathol.* 33: 626-630, 1980.
115. ISRAEL N, GOUGEROT-POCIDALO MA. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. *CMLS* 53:864-70, 1997.
116. ISRAEL N, HAZAN U *et al.* Tumor necrosis factor stimulates transcription of HIV- 1 in human T lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J Immunol* 143:3956-60, 1989.
117. JAVID J. The effect of haptoglobin-polymer size on hemoglobin binding capacity. *Vox Sang* 10:320-5, 1965.
118. JENSEN M, ATTEMBERG H, SCHNEIDER CH & WALTER JU. The developmental change in the γ G and γ A globin proportions in hemoglobin F. *European Journal of Pediatrics* 138: 311-314, 1982.
119. JIANG Q, AMES BN. Gamma-tocopherol, but not alphanatocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB Journal.* 17:816–822, 2003.

120. JISON ML, MUNSON PJ, BARB JJ, SUFFREDINI AF, TALWAR S, LOGUN C, RAGHAVACHARI N, BEIGEL JH, SHELFHAMER JH, DANNER RL, GLADWIN MT. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *BLOOD* 104: 270-280, 2004.
121. JONES DP. Redox potential of GDH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* 348:93-112, 2002.
122. KARBAN A, CORINA H, ELIAKIM R, WATERMAN M, NESHER S, BARNETT-GRINESS O, SHAMIR R. Paraoxonase (PON 1) 192R allele carriage is associated with reduced risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 52:2707- 2715, 2007.
123. KATO GJ, GLADWIN MT, STEINBERG MH. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* 21(1):37-47, 2006.
124. KATO GJ, MCGOWAN V, MACHADO RF, *et al.* Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood* 107:2279-2285, 2006.
125. KAUL DK, HEBBEL RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest* 106:411-20, 2000.

126. KODA Y, SOEJIMA M, YOSHIOKA N AND KIMURA H .The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaploglobinemia. *Am J Hum Genet* 62:245-252, 1998.
127. KASSAB-CHEKIR A, LARADI S, FERCHICHI S, HAJ KHELIL A, FEKI M, AMRI F, SELMI H, BEJAOU M, MILED A. Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clinica Chimica Acta*. 338:79–86.
128. KAWABATA H, YANG R, HIRAMA T, VUONG PT, KAWANO S, GOMBART AF, *et al*. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *J Biol Chem*. 274(30):20826-32, 1999.
129. KONTUSH A, CHANTEPIE S, AND CHAPMAN MJX. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1881–1888, 2003.
130. LANCASTER JR. Reaping of nitric oxide by sickle cell disease. *PNAS* 99:552, 2002.
131. LANGE V. Der Haptoglobin Polymorphisms-nicht nur eine genetische Markierungshilfe. (Review) *Anthropol Anz* 50:281-302, 1992.
132. LANGLOIS MR, DELANGHE JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 42:1589-600, 1996.
133. LAWLOR DA, DAY IN, GAUNT TR, HINKS LJ, BRIGGS PJ, KIESSLING M, TIMPSON N, SMITH GD, EBRAHIM S. The association of the PON1 Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British

- Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis. *BMC Genet.* 5:17, 2004.
134. LEHNINGER, AL, COX N. Princípios de Bioquímica. 4 ed. Savier Ed., 2006.
135. LEVIEV I, JAMES RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase *PON1* gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 20:516-521, 2000.
136. LEWIS SM, BRAIN BJ, BATES I. Dacie and Lewis practical haematology, 10^a ed., cap.04, p.60-69, 2006.
137. LISOT CL , SILLA LM. Screening for hemoglobinopathies in blood donors from Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil: prevalence in a Italian colony. *Cad Saúde Publica*, 20:1595-16601, 2004.
138. LONDON, S.J *et al.* Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and lung cancer risk among African-American and Caucasians in Los Angeles County, California. *Journal of the National Cancer Institute* 87:1246-1253, 1995.
139. LOSI-GUEMBAROVSKI, R. Estimativa da frequência dos indivíduos portadores do gene GSTM-1 na Região Norte do Paraná. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2001.
140. LOSI-GUEMBAROVSKI R, CÓLUS IMS. Glutathione S-transferase M1 (GSTM_1): ethnic distribution and relation with cancer *Semina: Ci. Biol. Saúde*, Londrina, 22:3-9, jan./dez. 2001.

141. LU SC. Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell Regul.* 36:95-116, 2000.
142. MACKNESS MI, ARROL S, DURRINGTON PN. Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286:152–154, 1991.
143. MACKNESS MI, ARROL S, ABBOTT C *et al.*: Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraonase. *Atherosclerosis* 104:129-135, 1993.
144. MACKNESS B, MACKNESS MI, DURRINGTON PN, CONNELLY PW, HEGELE RA. Paraonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7:69-76, 1996.
145. MACKNESS MI, ARROL S, MACKNESS B, DURRINGTON PN. The alloenzymes of paraonase determine the effectiveness of high density lipoprotein in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet* 349:851-852, 1997.
146. MACKNESS, B., MACKNESS, M. I., ARROL, S., TURKIE, W. AND DURRINGTON, P. N. Effect of the human serum paraonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 423: 57-60, 1998.
147. MANNERVICK B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol.* 57:357-417, 1985.

148. MARIANNE JENSBY NIELSEN & SOREN KRAGH MOESTRUP. Receptor Targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. BLOOD 114(4), 2009.
149. MARINI E, MORAL P, PETRALANDA I, PACHECO M, SANDIUMENGE T, SUCCA V, VIVES S AND VONA G. Serum protein markers in the Piaroa Indians of Amazonia (Venezuela). Hum Hered 43:232-238, 1993.
150. MENDONÇA MI, REIS RP, FREITAS AI, SOUSA AC, PEREIRA A, FARIA P, GOMES S, SILVA B, SANTOS N, SERRÃO M, ORNELAS I, FREITAS S, ARAÚJO JJ, BREHM A, CARDOSO AA. Polimorfismos do Gene da Paraoxonase Humana e Risco de Doença Coronária. Rev Port Cardiol 27 (12): 1539-1555, 2008.
151. MILLER ST, SLEEPER LA, PEGELOW CH, ENOS LE, WANG WC, WEINER SJ, *et al.* Prediction of adverse outcomes in children with sickle cell disease. N Engl J Med, 342:83-9, 2000.
152. MILLER ST, WRIGHT E, ABBOUD M, BERMAN B, FILES B, SCHER CD, STYLES L, ADAMS RJ. STOP Investigators; Impact of chronic transfusion on incidence of pain and acute Chest syndrome during the Stroke Prevention Trial (STOP) in sickle-cell anemia. J Pediatr. 139: 785–9, 2001.
153. MOCHIZUKI H, SCHERER SW, XI T, NICKLE DC, MAJER M, HUIZENGA JJ, TSSU LC, PROCHAZKA M: Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphism in the coding sequence. Gene 213:149-157, 1998.

154. MONCADA S & HIGGS A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329:2002-2012, 1993.
155. MONTALEMBERT M. Management of sickle cell disease. *BMJ* 337:a1397, 2008.
156. MORRIS CR, KATO GJ, POLJAKOVIC M, *et al.* Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension and mortality in sickle cell disease. *JAMA.* 294:81-90, 2005.
157. MORRIS CR, SUH JH, HAGAR W, *et al.* Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* 140:104-112, 2008.
158. MURA C, RAGUENES O, FÉREC C. HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 93:2502–2505, 1999.
159. NAGEL RL, STEINBERG MH: HEMOGLOBIN SC DISEASE AND HBC DISORDERS. IN: STEINBERG MH, FORGET BG, HIGGS DR, NAGEL RL (ed.). *Disorders of Hemoglobin. Genetic, Pathophysiology, and Clinical Management.* Cambridge University Press, New York, pp 756-766, 2001.
160. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. The management of sickle. Revised june 2002 (Fourth edition).
161. NIELSEN MJ, PETERSEN SV, JACOBSEN C, OXVIG C, REES D, MOLLER HJ and MOESTRUP SK. Haptoglobin-related protein is high-affinity hemoglobin binding plasma protein. *Blood* 108:2846-2849, 2006.

162. NIELSEN MJ, MOESTRUP SK. Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. *Blood* 114:764-771, 2009.
163. NOFER JR, KEHREL B, FOBKER M, LEVKAU B, ASSMANN G, VON ECKARDSTEIN A: HDL arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 161:1-16, 2002.
164. NOGUCHI CT, HALEY JD, ABRAHAM DJ, SCHECHTER NA. Inhibition of sickle hemoglobin polymerization as a basis for therapeutic approaches to sickle cell anemia. In: ABRAHAM DJ, ed *Burger's Medicinal Chemistry*. Vol III. New York, NK:Wiley and Sons. 113-79. 2003.
165. OFOROFUO IA, ADEDEJI MO. Effect of sickle-cell gene expression on plasma cholesterol in a Nigerian population. *Clin? Biochein.* 27: 505-508, 1994.
166. OHENE-FREMPONG K, WEINER SJ, SLEEPER LA *et al.* Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 91:288-294, 1998.
167. OHENE-FREMPONG K, STEINBERG MH. Clinical Aspects of sickle cell anemia in adults and children. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, In Pathophysiology, and Clinical Management*. New York: Cambridge University Press 611-670, 2001.

168. OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. *Blood Reviews* 18:65–73, 2004.
169. OSAROGIAGBON UR, CHOONG S, BELCHER JD, VERCELLOTTI GM, PALLER MS, HEBBEL RP. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood* 96:314-20, 2000.
170. OSTROWSKI S, TRAVISJ C, TALLEYE, L. The association of Hp 1 and sickle cell disease. *Hun?*. *Hrt-ed.* 37:193-195, 1987.
171. PAGNIER J, MEAR JG, DUNDA-BELKHADJA O, REGO KE, BELDJORD C, NAGEL RL & LABIE D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 81:1771-1773, 1984.
172. PETERHANS E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. *Biol. Trace Elem. Res.*56:107-16, 1997.
173. PEGELOW CH, MACKLIN EA, MOSER FG, WANG WC, BELLO JA, MILLER ST, VICHINSKY EP, DEBAUN MR, GUARINI L, ZIMMERMAN RA, YOUNKIN DP, GALLAGHER DM, KINNEY TR. Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. *Blood* 99: 3014–8, 2002.
174. PIETRANGELO, A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G403-G414, 2002.

175. PIETTE J, LEGRAND-POELS S HIV-1 reactivation after an oxidative stress mediated by different reactive oxygen species. *Chem Biol Interact.* 91:79-89, 1994.
176. PLAT OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med* 358(13):1362-9, 2008.
177. POWARS DR. β^S -Gene cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical and hematologic features. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 5: 475-493, 1991.
178. PAPANIKOLAOU G, SAMUELS ME, LUDWIG EH, MACDONALD ML, FRANCHINI PL, DUBE MP, et al. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 36: 77-82, 2004.
179. POLONOVSKI M, JAYLE MF. Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'action peroxydasique de l'hémoglobine. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales* 129:457-460,1938.
180. PARK CH, VALORE EV, WARING AJ, GANZ T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276(11):7806-10, 2001.
181. RAHIMI Z, MERAT A, HAGHSHENASS M, MADANI H, REZAEI M, NAGEL RL. Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL-cholesterol in sickle cell trait. *Clin Chim Acta* 365(1-2):217-20, 2006.

182. RAMALHO AS. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1986.
183. RAMALHO AS, MAGNA LA, PAIVA-E-SILVA RB. A portaria no 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. *Cad Saúde Pública* 19:1195-9, 2003.
184. REES DC. Guideline: Guidelines for the management of the acute painful crisis in sickle cell diseases. *Br. J. Haematol.* 120(5):744-752, 2003.
185. REITER C, WANG X, TANUS-SANTOS J, *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. *Nat Med* 8:1383-1389, 2002.
186. REPETTO M, REIDES C, GOMEZ ML, COSTA M, GRIEMBERG G, LLESUY S. Oxidative stress in blood of HIV patients. *Clin Chim Acta* 255:107-17, 1996.
187. ROBSON EB, POLANI PE, DART SJ, JACOBS PA, RENWICK JH. Probable assignment of the alpha locus of haptoglobin to chromosome 16 in man. *Nature* 223(5211):1163–1165, 1969.
188. ROTHER RP, BELL L, HILLMEN P, GLADWIN MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *JAMA* 293:1653-1662, 2005.

189. ROY CN, ANDREWS NC: Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers. *Hum Mol Genet* 10:2181–2186, 2001.
190. RYTER SW, ALAM J, CHOI AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86:583-650, 2006.
191. SAADATMANDI CB, RIMBACH G, SCHRADER C, KOFLER BM, ARMAH CK, MINIHAINE AM. Determinants of paraoxonase activity in healthy adults. *Mol Nutr Food Res* 54:1-9, 2010.
192. SADRZADEH SMH, GRAF E, PANTER SS, HALLAWAY PE, EATON JW. Hemoglobin: a biologic Fenton reagent. *J Biol Chem* 259:14354-14356, 1984.
193. SANTOS MV. Anemias hemolíticas: diagnóstico diferencial, doença falciforme e talassemias. In: CARNEIRO JDA. *Hematologia pediátrica*. 1ª ed. São Paulo: Manole. 64-79, 2008.
194. SANTOS PCJL, CANCELO RD, TERADA C T, GUERRA-SHINOHARA EM. Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. vol.31, n.3, pp. 192-202, 2009.
195. SANTOS PCJL, CANÇADO, TERADA CT, ROSTELATO S, GONZALES I, HIRATA RDC, HIRATA MH, CHIATTONE CS AND GUERRA-SHINOHARA EM. HFE gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res* 43(1) 107-114, 2010.

196. SCHECHTER NA. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 112(10): 3927 – 3938, 2008.
197. SCHULTZE HE, HEREMANS JF, eds. *Molecular biology of human proteins, Vol. 1: nature and metabolism of extracellular proteins.* Amsterdam: Elsevier. 384-402, 1966.
198. SEBASTIANI P, NOLAN VG, BALDWIN CT, et al. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. *Blood* 110:2727-27635, 2007.
199. SEIXAS MO, ROCHA LC, CARVALHO MB, MENEZES JF, LYRA IM, NASCIMENTO VML, COUTO RD, ATTA AM, REIS MG, GONCALVES MS. Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease *Lipids in Health and Disease* 9:91, 2010.
<http://www.lipidworld.com/content/9/1/91>.
200. SESS D, CARBONNEAU MA, THOMAS MJ, DUMON MF, PEUCHANT E, PERROMAT A, LE BRAS M, CLERC M. First observations on the main plasma parameters of oxidative stress in homozygous sickle cell disease. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 85:174–179, 1992.
201. SHAH A. Thalassemia syndromes. *Indian J Med Sci* 58:445-9, 2004.
202. SILVA, KR, YAMAGUCHI MU. Os benefícios da inclusão das hemoglobinopatias na triagem neonatal. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama*,. 11(1):67-73, 2007.

203. SIMON, M.; ALEXANDRE, J.L.; FAUCHET, R.; GENETET, B.; BOUREL, M. The genetics of haemochromatosis. *Prog. Med. Genet.* 4:135-168, 1980.
204. SKALAR AH, CAMPBELL H, CARUANA RJ, et al. A population study of renal Function in sickle cell anemia. *Int J Artif Organs* 13:231-236, 1990.
205. SKALAR AH, PEREZ JC, HARP RJ, CARUANA LRJ. Acute renal failure in sickle cell anemia. *Int J Artif Organs* 13:347-351,1990.
206. SMITHIES O. Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemistry* 61:629-641, 1955.
207. SMITHIES O, CONNELL GE, DIXON GH. Inheritance of haptoglobin subtypes. *Am J Hum Genet* 14:14-21, 1962.
208. SONATI MF, FARAH SB, RAMALHO AS, COSTA FF. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin* 15:309-11, 1991.
209. SONATI MF, COSTA FF. Genética das doenças hematológicas: as hemoglobinopatias hereditárias. *Jornal de Pediatria* 84:S40-51,2008.
210. STAMATOYANNOPOULOS G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* 33(3):259-71, 2005.
211. STEHBENS WE. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol. Pathol.* 75:256-76, 2003.

212. STEINBERG MH. Genetic modulation of sickle cell anemia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 209:1-13, 1995.
213. STEINBERG, MH. Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. Hemoglobin 25: 195-211, 2001.
214. STEINBERG MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. Br J Haematol 129:465-481, 2005.
215. STUAR MJ & SETTY BN. Curr. Opin. Hematol. 8:111-22, 2001.
216. STUART MJ, NAGEL RL. Sickle cell disease. Lancet 364:1343-1360, 2004.
217. SULLIVAN, J.L. The iron hypothesis: claim vs. Hypothesis. Vascular Medicine 5:127-128, 2000.
218. SUTTON M, BOUHASSI EE and NAGEL RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta – like globin gene cluster haplotypes. Am J Hematol 32:66-69, 1989.
219. THOMPSON, M.W.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Genetics in Medicine, 6. ed., USA: Saunders Ed., 2004.
220. TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. & TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. Biomed. Pharmacother. 57:145-155, 2003.
221. TULIS DA; DURANTE W; PEYTON KJ; EVANS AJ; SCHAFER AI. Heme oxygenase-1 attenuates vascular remodeling followin balloon injury in rat carotid arteries. Atherosclerosis 155:113-122, 2001.

222. VALDIVIA PA, ZENTENO-SAVIN T, GARDNER SC, AGUIRRE A. Basic oxidative stress metabolites in eastern Pacific Green turtles (*Chelonia mydas agassizii*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* xx (2006) xxx-xxx.
223. VAN VLIERBERGHE H, LANGLOIS M AND DELANGHE J. Haptoglobin polymorphism and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta* 345:35-42, 2004.
224. VICARI P, DUCH CR, SHIMMOTO MMA, NOGUTI MAE, FIGUEIREDO MS. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 and theta 1 in patients with acquired aplastic anemia: A Brailian experience. *Rev. Bras. Hematol hemoter* 29(4): 344-345, 2007.
225. VICHINSKY EP, NEUMAYR LD, EARLES AN, WILLIAMS R, LENNETTE ET, Dean D, *et al.* Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Syndrome Study Group. *N Engl J Med* 342(25):1855-65, 2000.
226. VILLAGRA J, SHIVA S, HUNTER LA, *et al.* Platelet activation in patients with Sickle cell disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric Oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* 110:2166-2172, 2007.
227. VON ECKARDSTEIN A. HDL – a difficult friend. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms | Cardiology* 5:3–4, 2008.

228. WAGENER FADTG, ABRAHAM NG, KOOYK YV, WITTE T, FIGDOR CG.
Heme induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences* 22:52-54, 2001.
229. WALTER PB, FUNG EB, KILLILEA DW, et al. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with β -thalassemia or sickle cell disease. *Br J Haematol* 135:254-263, 2006.
230. WANG CW, LUKENS JN. Sickle cell anemia and others sickling syndromes. In: LEE GR, FOERSTER J, LUKENS JN, PARASKEVAS F, GREER JP, RODGERS GM. *Wintrobe's clinical hematology*. 10Th. Ed. Baltimore: Williams & Wilkins, cap 51, p.1346-1404, 1998.
231. WEATHERALL DJ, PROVAN AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet* 355:1169-75, 2000.
232. WEATHERALL DJ, CLEGG JB, HIGGS DR and WOOD WG. The hemoglobinopathies. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet *al*, Valle D and Sly WS, eds.). McGraw Hill, New York 4571-4636, 2001.
233. WENNING MR, SONATI MF. Hemoglobinopatias hereditárias. In: Lopes AC, editor. *Diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Manole; 2007.
234. WHEELER JG, KEAVNEY BD, WATKINS H, COLLINS R, DANESH J. Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 363:689-695, 2004.

235. WINTERBOURN CC. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias. The unstable hemoglobins. *Seminars in Hematology* 27: 41-50, 1990.
236. WOBETO VPA, ZACCARIOTTO TR, SONATI MF. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance.(Review) *Genetics and Molecular Biology* 31(3): 602-620, 2008.
237. WOOD KC, HSU LL, GLADWIN MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 44:1506-1528, 2008.
238. WU G, *et al.* Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.*134(3):489-92, 2004.
239. WU LC, SUN CW, RYAN TM, PAWLIK KM, REN J, TOWNES TM. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. *BLOOD* 108:4, 2006.
240. YACHIE A, NIIDA Y, WADA T *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103:129-135, 1999.
241. YAMADA N, YAMAYA M, OKINAGA S *et al.* Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am j hum genet* 66:187-195, 2000.
242. YANO A, YAMAMOTO Y, MIYAISHI S, ISHIZU H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. *Acta Med Okayama* 52(4):173-81, 1998.

243. YETIK-ANACAK G & CATRAVAS JD. Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol* 45:268-276, 2006.
244. ZAGO MA, WOOD WG, CLEGG JB, WEATHERALL DJ, O'SULLIVAN M, GUNSON H. Genetic control of F cells in human adults. *Blood* 53(5):977-86, 1979.
245. ZAGO, M.A. Hemoglobinopatias: prevalência e variabilidade. *Rev Paul Med.* 104:300-4, 1986.
246. ZAGO MA. Anemia falciforme e doenças falciformes. In: Hamann E, Tauil P, organizadores. Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população afro-descendente. Brasília: Secretaria de Políticas da Saúde, Ministério da Saúde. 13-35, 2001.
247. ZAGO MA. Defeitos hereditários das hemoglobinas. 5. In: ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R, editores. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu. p.279-87, 2001.
248. ZAGO MA. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes 1ª ed. Brasília: ANVISA. p. 9-11: Considerações gerais, 2002.
249. ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R, editors. Hematologia: fundamentos e PRÁTICA. São Paulo: Editora Atheneu , 1081p, 2004.
250. ZAGO MA & PINTO ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 29(3):201-214, 2007.

251. ZULET MA, PUCHAU B, NAVARRO C, MARTÍ A, MARTÍNEZ JA.

Biomarcadores del estado inflamatorio: Nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. Nutr Hosp 22(5): 511-27, 2007.

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do estudo chamado: **“Estudo de polimorfismos em genes de moléculas associadas ao estresse oxidativo na doença falciforme: Associação com dados hematológicos, bioquímicos e fenotípicos”**, A sua participação é totalmente voluntária e a sua permissão pode ser retirada a qualquer momento, não resultando em punições.

A anemia falciforme é uma doença genética muito comum na população de Salvador, sendo que o indivíduo doente apresenta crise de dor, decorrente da oclusão das veias com as células em formato de foice, podendo também possuir infecção e outros tipos de doenças, como alteração nos olhos, rins, coração, pulmão e cérebro.

O objetivo deste trabalho é investigar as células sanguíneas e o seu conteúdo genético no sangue de indivíduos com doença falciforme, visando a identificação de marcadores ou substâncias que possam ser utilizados como prognóstico dos sintomas clínicos da doença e posteriormente servir no futuro para estudos de novas terapias e tratamentos. Tendo em vista os motivos apresentados, nós o convidamos a participar desta pesquisa.

Os registros da sua participação no estudo serão mantidos confidencialmente, sendo do conhecimento apenas da equipe participante do projeto e do médico que o acompanha. As amostras coletadas serão identificadas por código, bem como os dados individuais dos exames e testes e de prontuário, que serão do conhecimento somente

dos pesquisadores envolvidos na pesquisa. Desta forma, a sua identidade será mantida em segredo e nenhum outro grupo terá acesso às informações coletadas, tais como seguradoras, empregadores ou superiores, de acordo com a resolução Res. CNS 340/2004, item V.1.e.

A permissão para a sua participação neste estudo implicará na retirada de 5 ml de sangue, para que possamos realizar o estudo das células do sangue e do DNA. Também queremos que você concorde que as amostras colhidas sejam armazenadas e possam ser utilizadas em estudos futuros, desde que estes estudos adicionais sejam analisados por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e sigam os aspectos éticos determinados nas resoluções 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde, além de contribuírem para conhecimentos novos relacionados à doença.

Comunicamos que o sangue será colhido do braço e poderá acarretar em riscos e desconfortos, como formação de hematomas, sangramento e dor. Entretanto, a coleta de sangue será realizada por pessoal habilitado e especializado, visando diminuir estes riscos. Nas amostras coletadas serão realizados estudos das células do sangue e do DNA. A realização de coletas adicionais dependerá do médico e estará relacionada, simplesmente, ao seu acompanhamento clínico e avaliação periódica.

A sua participação no estudo não trará benefícios, mas possibilitará a busca de informações referentes à anemia falciforme, obtendo dados que poderão ser utilizados futuramente no acompanhamento dos pacientes e na implantação de políticas de saúde.

Assinatura do voluntário _____ Data ___/___/___

Nome do voluntário (letra de forma)

Endereço _____

Assinatura Testemunha 1 _____

RG _____

Assinatura Testemunha 2 _____

RG _____

Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você necessite de maiores esclarecimentos:

* Joelma Figueiredo Menezes – Responsável pelo projeto.

Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ. Fone (71) 3176-2265.

* Dra. Marilda de Souza Gonçalves - Coordenadora do projeto - Laboratório de

Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ.

Fone (71) 3176-2226.



INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO PROGNÓSTICO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM DOENÇA FALCIFORME.



QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES E CONTROLES

Nome: {NOME} _____ Sigla: {sig} _____ Telefone: () _____

Endereço: _____

Registro: {REG} _____ Nº Pront. HEMOBA: {PRON} _____ Data de Nasc.: ____/____/____

Idade: {I} _____ Gênero: {GENER} () Masculino [0] () Feminino [1]

01. Qual a sua cor? {cor} () Branca[0] () Negra[1] () Parda[2] () Amarela[3] () Indígena[4]

02. Você estuda? {EST} () NÃO [0] () SIM [1]

03. Nível de escolaridade: {NESC} () Alfabetiz.[0] () Até 4 FM[1] () Até 8 FM[2] () Até 3 MD[3]

04. Número de irmãos: {NIRM} () 0 [0] () 1 [1] () 2 [2] () 3 [3] () 4 ou + [4]

05. Familiares com DF? {FDFALC} () Nenhum[0] () Pai [1] () Mãe [2] () Irmão [3]

06. Idade primeira menstruação: {IPM} () Não menst.[0] () 09-11[1] () 12-14 [2] () 15-17 [3]

07. Já engravidou? {ENGRA} () NÃO [0] () SIM [1]

08. Está grávida? {GRA} () NÃO [0] () SIM [1]

09. Usa anticoncepcional? {ANTICO} () NÃO [0] () SIM [1]

10. Menstruação é regular? {MREG} () NÃO [0] () SIM [1]

11. Idade do 1º diagnóstico de Doença Falciforme: {ID} () <6 m [0] () 6m - 4anos [1] () 5 - 9anos [2] () 10 - 14anos [3] () 15 - 17anos [4]

12. Eletroforese de Hb {EHB} () AA[0] () SS[1] () SC[2] () SB+[3] () SB₀[4] () SD[5]

13. Haplótipo {HAPL} () Sen[0] () Car[1] () Ben[2] () Cam[3] () Sau-Ara [4] () Atip[5] () I[6] () II[7] () III[8]

14. Talassemia {TAL} () Negativo[0] () Hetero 3.7[1] () Homo 3.7[2] () Hetero 4.2[3] () Homo 4.2[4]

Mieloperoxidase {MPO} () GG[0] () AG[1] () AA[2]

Alelo mutante Mieloperoxidase ? {MUTMPO} () NÃO [0] () SIM [1]

Alfa 1 antitripsina {A1ATP} () MM[0] () MZ[1] () MS[2] () SZ[3] () SS[4] () ZZ[5]

15. Já esteve internado? {INTER} () NÃO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QINTER} () 1 [0] () 2-5 [1] () 6-10 [2] () 11 ou + [3]

Qual especialidade? {ESPEC} () Cardiologia [0] () Oftalmologia [1] () Neurologia [2] () Infectologia [3] () Pneumologia [4] () Cirurgia [5] () Angiologia [6] () Nefrologia [7] () Clínica da Dor [8] () Outras [9]

16. Já teve pneumonia? {PNEU} () NÃO [0] () SIM [1]

Se SIM, quantas vezes? {QPNEU} () 1[0] () 2-3[1] () 4-6[2] () 7 ou + [3]

Se SIM, teve febre? {FEBRE} () NÃO [0] () SIM [1]

Anormalidade no RX? {ARX} () NÃO [0] () SIM [1]

Quando internado, usou medicação? {MPNEU} () NÃO [0] () SIM [1]

Quais? {DESCMPNEU} _____

17. Teve ou tem esplenomegalia? {ESPLE} () NÃO [0] () SIM [1]
 Em que período? {PERIOESPLE} () <6m [0] () 6m-1ano [1] () 2-3a [2] () 4-5a [3] () >6a [4]
 Teve crise de seqüestro esplênico? {SEQESPLE} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, quantas vezes? {QSEQESPLE} _____
18. Faz uso profilático de Penicilina? {PROP} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, qual? {QPROP} () Penicilina V oral [0] () Penicilina benzatina [1]
 Se Sim, há quanto tempo? {QTPEN} () até 1 ano [0] () + de 1 ano a 3 anos [1]
 () + 3 anos a 5 anos [2] () + 5 anos a 7 anos [3]
 () + de 7 anos [4]
19. Já teve AVC? {AVC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, quantas vezes? {QAVC} () 1 [0] () 2 [1] () 3 [2] () 4 ou + [3]
 Se SIM, seqüelas do AVC? {SEQAVC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Já fez ressonância magnética? {RESSOMAG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Alguma alteração? {ALTRESSOMAG} () NÃO [0] () SIM [1]
20. Esplectomizado? {ESPLECTO} () NÃO [0] () SIM [1]
 Esplenectomia: {TIPOESPLECTO} () Total [0] () Parcial [1]
21. Apresenta asma? {ASMA} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QASMA} () 0 [0] () 1-3 [1] () 4-7 [2] () 8ou+ [3]
 Faz uso regular de nebulização? {NEBU} () NÃO [0] () SIM [1]
22. Tem crises de dor? {CRISDOR} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, quantas crises nos últimos 06 meses? {QCRISDOR} () 0 [0] () 1-3 [1] () 4-7 [2] () 8ou+ [3]
 Quando foi a última crise? {ULTCRISDOR} () <1mês [0] () 1-3m [1] () 4m ou+ [2]
 Usa medicação para a dor? {MDOR} () NÃO [0] () SIM [1]
 Prescrita por um médico? {PRESMDOR} () NÃO [0] () SIM [1]
 Assistido por especialista em dor? {ESPECMDOR} () NÃO [0] () SIM [1]
 Faz tratamento com hidroxiuréia? {HIDROXI} () NÃO [0] () SIM [1]
23. Faz uso de alguma medicação? {MEDIC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, qual? {DESCMEDIC} _____
 Com que freqüência? {FREQMEDIC} () Diário [0] () Dias alternados [1] () Semanal [2]
 () Quinzenal [3] () Mensal [4] () Bimestral [5] () Semestral [6]
24. Vaso-Oclusão: {VO} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QVO} _____
 Fez uso de alguma medicação? {MVO} () NÃO [0] () SIM [1]
25. Retinopatia: {RETIN} () NÃO [1] () SIM [2]
 Se SIM, fez uso de alguma medicação? {MRETIN} () NÃO [0] () SIM [1]
 Faz consultas periódicas com oftalmo? {CONSOFTAL} () NÃO [0] () SIM [1]
26. Infecções: {INFEC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {DESCINFEC} () Rinite [0] () Sinusite [1] () Otite [2]
 () Faringite [3] () Amigdalite [4] () Outros [5]
 Fez uso de alguma medicação? {MINFEC} () SIM [0] () NÃO [1]
27. Priapismo: {PRIAP} () NÃO [0] () SIM [1]
 N° de vezes: {QPRIAP} () Até 4 [0] () 05-09 [1] () 10 ou + [2]
 Fez uso de alguma medicação? {MPRIAP} () NÃO [0] () SIM [1]

28. Úlcera maleolar: {ULCMALEO} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QULCMALEO} _____
 Idade da primeira úlcera: {IDULC} () Até 4 anos [0] () 5-9 [1] () 10 ou + [2]
 Tratou a úlcera? {TRATULC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Qual tratamento? {QUALTRAT} _____
29. Síndrome torácica aguda: {SDTOR} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quantas vezes? {QSDTOR} () Até 2 [0] () 03-05 [1] () 06 ou + [2]
30. Alterações ósseas: {ALTOSSEA} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {DESCALTOSSEA} _____
31. Insuficiência Renal Aguda: {INSRENAG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quantas vezes? {QINSRENAG} () Até 2 [0] () 03-05 [1] () 06 ou + [2]
32. Insuficiência Renal Crônica: {INSRENCRO} () NÃO [0] () SIM [1]
 Idade diagnóstico: {IDINSRENCRO} () Até 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
33. Alterações cardíacas: {INSCARD} () NÃO [0] () SIM [1]
 Qual alteração? {QUALALTCA} _____
 Idade diagnóstico: {IDINSCARD} () Até 5 anos [0] () 06-11 [1] () 12 ou + [2]
 Fez eletrocardiograma? {ELETRO} () NÃO [0] () SIM [1]
 Fez ecocardiograma? {ECOCARD} () NÃO [0] () SIM [1]
34. Seqüestro hepático: {SEQHEP} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QSEQHEP} _____
35. Insuficiência respiratória: {INSRESP} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QINSRESP} _____
36. Distúrbio do sono? {DISTSONO} () NÃO [0] () SIM [1]
37. Litíase biliar: {LITIBILI} () NÃO [0] () SIM [1] Quantas vezes? {QLITIBILI} _____
38. Cirurgia: {CIRURG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {QUALCIRURG} _____
39. Se SIM, fez uso de profilaxia antibiótica? {PROFANTIB} () NÃO [0] () SIM [1]
40. Completou o calendário vacinal? {CALVAC} () NÃO [0] () SIM [1]
 Fez uso das seguintes vacinas? {USOVAC} () 7 valente [0] () 23 valente [1]
 () Meningo [2] () Haemophilus [3]
41. Faz uso de hemoderivados? {HEMODER} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, quantas vezes ao ano? {QHEMODER} _____
42. Possui outra patologia? {PATOLOG} () NÃO [0] () SIM [1]
 Quais? {DESCPATOLOG} () Hipertensão [0] () Diabetes [1] () Obesidade [2] () Outras [3]
43. Você trabalha? {TRAB} () NÃO [0] () SIM [1]
 Tipo de profissão: {QTRAB} _____
 Se SIM, manipula alguma substância química? {SUBQUIM} () NÃO [0] () SIM [1]
 Qual? {QSUBQUIM} _____ Freqüência? {FREQSUBQUI} _____
 Manipula diretamente esta subst? {MANIDIRE} () NÃO [0] () SIM [1]
44. Pratica esportes? {ESPOR} () NÃO [0] () SIM [1]
45. Faz uso de bebida alcoólica? {BEBE} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, que freqüência? {FREQBEBE} _____
46. Você fuma? {FUMA} () NÃO [0] () SIM [1]
 Se SIM, que freqüência? {FREQFUMA} _____

47. Faz uso de alguma droga? {DROGA} NÃO [0] SIM [1]
Em caso de SIM, que frequência? {FREQDROGA} _____
48. Além dos seus pais quantos membros da família ou parentes são apegados a vc? {APEG}
 01[0] 02 – 03 [1] 04 – 06[2] 07 – 10[3] nenhum[4]
49. Quantos amigos vc têm aproximadamente? {AMIGO}
 01[0] 02 – 03 [1] 04 – 06[2] 07 – 10[3] nenhum[4]
50. Com que frequência vc se reúne com seus parentes, amigos ou vizinhos? {REUNI}
 Diariamente ou quase todos os dias [0] Várias vezes na semana [1]
 Várias vezes no mês [2] Várias vezes por ano [3] Quase nunca [4]
- Data da próxima consulta no HEMOBA: ____/____/____

THE C282Y AND H63D MUTATIONS IN THE HAEMOCHROMATOSIS GENE AMONG SICKLE CELL ANEMIA PATIENTS FROM THE NORTHEAST OF BRAZIL

ESTUDO DAS MUTAÇÕES C282Y E H63D DO GENE DA HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME DO NORDESTE DO BRASIL

Joelma F. Menezes, Elisângela V. Adorno, José Pereira Moura Neto, Angela A. D. Zanette, Isa M. Lyra, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Gonçalves
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ), Salvador; Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil; Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA), Salvador, Bahia, Brasil

Hereditary haemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder. C282Y and the H63D mutations in the HFE gene have been associated to HH. AIM: To evaluate the frequencies of the C282Y and H63D mutations in sickle cell anemia patients (SS) and a reference group of newborns from Salvador, Bahia, Brazil. RESULTS: Of the 130 sickle cell anemia patients analyzed, one (1%) was heterozygous for the C282Y mutation and 22 (16.9%) were heterozygous for the H63D mutation. The reference group showed a similar allelic frequency of mutations. Among the patient group, ferritin serum levels were high in 23 (38.3%) samples. The most frequent b^s-globin gene genotypes were CAR/BEN, BEN/BEN and CAR/CAR. The mutations investigated seem to play an important role in vaso-occlusive crises (p=0.037) among sickle cell patients.

Keywords: Hereditary haemochromatosis, C282Y mutation, H63D mutation, sickle cell anemia patients.

A Hemocromatose Hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva. As mutações C282Y e H63D no gene HFE têm sido associadas à HH. Objetivo: Avaliar as frequências das mutações C282Y e H63D em pacientes com anemia falciforme (SS) e em recém-nascidos de Salvador, Bahia, Brasil. Resultados: dos 130 pacientes SS analisados, hum (1%) foi heterozigoto para a mutação C282Y e 22 (16,9%) foi heterozigoto para H63D. O grupo controle apresentou frequência alélica similar para as mutações estudadas. Entre os pacientes 23 (38,3%) apresentaram níveis séricos de ferritina elevados. Os haplótipos mais frequentes para o gene da globina b^s foram CAR/BEN, BEN/BEN e CAR/CAR. As mutações investigadas parecem ter um papel importante nas crises de vaso-oclusão (p=0,037) entre os pacientes SS.

Palavras-chave: hemocromatose hereditária, mutação C282Y, mutação H63D, anemia falciforme.

Hereditary haemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder characterized by abnormal iron absorption, resulting in an iron overload followed by an accumulation of iron in organs such as the liver, heart, pancreas and endocrine system^(8 15 19 47 41).

The haemochromatosis human gene is located very close to the HLA-A gene complex on chromosome number 6⁽²⁵⁾. The HFE gene codifies a MHC class I protein homologous, it is not an iron carrier, however, interacts with the transferrin receptor located on the cellular surface and is responsible for the regulation of transferrin iron uptake. This regulation mechanism is not completely understood however, recent research into the metabolism of iron has described the involvement of the HFE protein in the control of iron absorption⁽⁶⁾.

Feder et al.⁽⁴³⁾ described two mutations in the HFE gene which may be responsible for haemochromatosis, the mutation

G>A at nucleotide 845 (C282Y) replacing the amino acid cysteine for tyrosine at position 282 in the protein's chain and the C>G (H63D) at nucleotide 187 that replaces the amino acid histidine with aspartic acid at position 63 in the protein's chain. The C282Y mutation is very frequent among Northern European descendants (10%) but is rare or absent in African, Asian south pacific and aboriginal Australian population⁽⁴³⁾.

The homozygous state for C282Y mutation has been associated with the most severe haemochromatosis picture and it has been found in 83% of North American patients with haemochromatosis⁽²⁰⁾ and in more than 90% patients from the UK and France⁽³⁴⁾. The H63D mutation has been associated with haemochromatosis when found in heterozygosity with the C282Y mutation (C282Y/H63D)⁽⁶⁾.

African-descendant HH carriers present an increase in iron in macrophages and hepatic parenchymal cells⁽²⁴⁾. The most frequent mutations found among North European descendants have not been seen in African populations. Recent studies have shown the possibility of different mutations playing an important role in iron overload in these individuals⁽²⁴⁾. Additional HFE exon and intron mutations have been reported, such as the E168X, E168Q, V53M, V59M, S65C, G168T, G169T, G93R, I105T, T281K; but only the C282Y, H63D and S65C mutations in the HFE gene have been associated to

Recebido em 22/6/2010

Aceito em 12/8/2010

Endereço para correspondência: Profa. Marilda Souza Gonçalves, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710 Salvador, Bahia, Brazil. C-elo: mari@bahia.fiocruz.br. Financial support: CNPQ, DECT 306524/2004-0 and 409800/2006-6.

Gazeta Médica da Bahia

2010;80:3(Ago-Out):69-73

© 2010 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

an abnormal iron status^(14,32,48). Several mutations in the HFE gene have been associated with HH in different populations.

Salvador is a city in Bahia, a state located in the Northeast region of Brazil. It has a high rate of racial admixture with a strong African influence and Africans descendants make up the largest racial group in the population⁽⁵⁾. The state of Bahia has the highest prevalence of sickle cell anemia in Brazil⁽²⁾.

The disease is characterized by severe hemolytic anemia, vaso-occlusive crises and other clinical complications, such as chest acute thoracic syndrome and infections described among patients⁽⁴⁵⁾. The disease displays a phenotypic variability due to several modifying factors such as co-inheritance of α_0 -thalassemia, HbF levels and β^S -globin gene haplotypes^(18,21,44). In some cases blood transfusion therapy is administered in cases of a vascular cerebral accident and chest acute syndrome when patients have a hemoglobin (Hb) concentration lower than 5g/dL. In aplastic crises blood transfusion therapy is indicated when there is an alteration in cardiac function, with hemoglobin levels below 4 g/dL. It can also be administered in the presence of spleen sequestration crises, priapism and septicemia. However, blood transfusion therapy can contribute to adverse effects such as hyperviscosity, increase in blood volume, hemolytic reactions, hemolytic fever reactions, allergic reactions, infectious illness transmission and iron overload^(33,39,40).

The present study investigated the frequencies of the C282Y and H63D HH mutations in sickle cell anemia patients in order to establish the frequency of these mutations and evaluate if these HH mutations could be considered a disease severity marker in a group of sickle cell anemia patients.

Material and Methods

Population

We studied 130 sickle cell anemia patients non consanguineum from the *Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia* (HEMOBA) and 100 newborns from the Maternity Hospital Tsylla Balbino in Salvador, Bahia. The mean age of the sickle cell anemia patients was 19.5 (\pm 13.6), 66 males and 64 females. Of the 100 newborns, 37 were males and 53 females. Consent was obtained to allow the patients' and newborns' participation in the study. The study was approved by the Institutional Ethical Committee at the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ-BA, with protocol number 141.

Methods

The hematological analyses were performed by electronic cell counter (Coulter Count T890 – FL, USA) and the hemoglobin profile was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Variant™ II BIO-RAD – CA, United State). Five milliliters of peripheral blood and umbilical cord blood anticoagulated with EDTA were obtained from the SS patients and newborns respectively. DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using the Kit GFX™ Genomic Blood DNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech - NJ, USA).

The C282Y and H63D HH mutations were investigated by PCR-RFLP techniques. The PCR products were digested

by Rsa I and MboI restriction enzyme respectively and analyzed in an 8% polyacrilamide gel, stained by ethidium bromide and UV visualized.

The serum ferritin was estimated by electrochemiluminescence immunoassay in the Roche Elecsys 1010/2010 immunoassay analyzer (Roche Diagnostics).

The beta S- globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients were investigated by searching for endonucleases restriction sites, using the XmnI, HindIII, Hinc II, HincII, HinfI and HpaI enzymes, as previously described⁽⁴⁶⁾.

Clinical histories were collected from patient records. The statistical data analysis was carried out using EPI Info software version 6.04 and a p=0.05 was considered statistically significant.

Results

Hematological and clinical aspects of sickle cell anemia among patients were studied. Among a total of 130 SS patients, the median hemoglobin concentration (Hb) was 7.66 g/dL (\pm 1.68); the median hematocrit (Hct) 25.6% (\pm 4.9); the median cell volume (MCV) 93.5 fL (\pm 12.3); the median cell hemoglobin (MCH) 28g/dL (\pm 4.5) and the median cell hemoglobin concentration (MCHC) 29.9% (\pm 2.4).

According to the patients' clinical histories, 83/130 (63.8%) sickle cell anemia patients had been hospitalized; 73/130 (56.2%) had received blood transfusion and 30/73 (41.1%) had received up to five blood transfusions. Forty eight (36.9%) of the 130 patients had had infections, and 20/48 (41.7%) had had an inferior respiratory tract infection, followed by leg ulcers in 17/48 (35.4%) and urinary tract infection in two patients (4.2%). Comorbidities were present in 34 (26.8%) of the 130 patients; splenic sequestration was found in nine (26.5%); cerebrovascular accidents (CVA), surgery and acute chest syndrome in four (11.8%) and retinopathy in three (8.8%).

In our study the C282Y mutation had an allelic frequency of 0.025 among the reference group and 0.015 among sickle cell anemia patients; the H63D mutation had an allelic frequency of 0.080 among the reference group and 0.084 among patients. The C282Y and H63D HFE mutations frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. There were no differences among the allelic frequencies of either mutations investigated among sickle cell anemia patients and the reference group (Table 1).

Table 1. C282Y and H63D – HFE mutation distribution among sickle cell anemia patients and the reference group from Bahia, Brazil.

C282Y Mutation	Sickle cell anemia patients - N (%)	Reference group - N (%)
WT/WT	129 (99.2)	99 (99)
C282Y/WT	1 (0.77)	1 (1)
Total	130 (100)	100 (100)
H63D Mutation		
WT/WT	108 (83.1)	84 (84)
H63D/WT	22 (16.9)	16 (16)
Total	130 (100)	100 (100)

Table 2. Distribution of serum ferritin levels and gender among sickle cell anemia patients from Bahia, Brazil.

Serum Ferritin level	Genders of sickle cell anemia patients - n (%)		Total - n (%)
	Female	Male	
Normal	11 (36.6)	26 (86.7)	37 (61.7)
High	19 (63.4)	4 (13.3)	23 (38.3)
Total	30 (100)	30 (100)	60 (100)

Exact test Fisher - $p=0.0002$. Reference values: Male: 30 - 400 ng/mL; Female: 13 - 150 ng/mL.

Serum ferritin levels were evaluated among 60 sickle cell anemia patients and the female group showed the highest levels ($p=0.0002$) (Table 2).

As regards age, ten (7.7%) sickle cell anemia patients were over 40 years of age, of these five had HH mutations, three were heterozygous for H63D, one was heterozygous for C282Y mutation.

Ferritin levels were estimated in 60 (46.2%) of the 130 sickle cell anemia patients and 23/60 (38.3%) showed high serum levels; 19 (82.6%) were female and four (17.4%) were male. When the high ferritin serum levels and HH mutations in sickle cell anemia patients with vaso-occlusive crisis histories were analyzed, 12 of the 23 had crises and five (41.7%) were heterozygous for the H63D mutation ($p=0.037$, Exact test Fisher) (Table 3).

Table 3. Distribution of the C282Y and H63D mutations in sickle cell anemia patients with high levels of serum ferritin and a history of vaso-occlusive crisis.

Genotype	Crisis - n (%)		Total
	Presence	Absence	
Wild Type	7 (38.9)	11 (61.1)	18
Mutant	5 (100)	0	5
Total	12	11	23

Exact test Fisher: $p=0.037$.

Analyses of the beta^s-globin gene haplotypes were carried out in 124 sickle cell anemia patients, 64 (51.6%) being Car/Benin; 35 (28.2%) Benin/Benin; 18 (14.5%) were CAR/CAR; two (1.6%) were CAR/Atypical; two (1.6%) Benin/Cameron; one (0.8%) CAR/Cameron; one (0.8%) CAR/Saudi Arabian and one (0.8%) Senegal/Atypical. No association between haplotypes and the presence of HFE gene mutations was found.

Discussion

The genetic bases of HH have been investigated in many populations. Some mutations have been identified, but only the C282Y, H63D and S65C mutations in the HFE gene have been associated with HH^(14 32 48). The frequencies and effects of these mutations, other than C282Y and H63D, have yet to be determined⁽³²⁾. The influence of iron overload severity and the risk of HH development has been shown among C282Y homozygous and H63D/C282Y and S65C/C282Y double heterozygous individuals⁽⁶⁷⁾.

The C282Y allele frequency in the Caucasian population was estimated at 0.063⁽⁷⁾. The association between HH and

C282Y homozygous vary according to populations. In studies among European descendants, the C282Y homozygous in haemochromatosis patients ranged from 64% among Italians⁽¹²⁾, 100% among Australians⁽²⁸⁾ and 80-90% among English and French⁽²⁰⁾.

The C282Y mutation is either absent or has a low allelic frequency in non-Caucasian populations, such as African, Asian, South Pacific and Aboriginal Australians^(34 43).

In Brazil the C282Y HFE mutation has been studied in four Brazilian population groups: Caucasians, African descendants, Amerindians and an ethnically mixed group. There was a description of an allelic frequency of 1.4% in the Caucasian group; 1.1% in the African descendant group and 1.1% in the ethnically mixed group and the mutation was not found in the Amerindian group⁽³⁾. Pereira et al.⁽³⁵⁾ found a frequency of 3.7% of C282Y HFE in Euro-Brazilian, 0.7% in a mixed group and 0.5% in Afro-Brazilians, when they studied a highly mixed urban population from São Paulo, a Southeastern Brazilian state.

The allelic frequencies of the HFE mutations between the studied groups here were similar and were in agreement with previous studies^(3 35) in the Brazilian population.

The manifestation of HH disease begins in the 4th and 5th decade of life due to progressive iron accumulation⁽¹⁷⁾. Carru et al.⁽¹³⁾ reported that the C282Y mutation is significantly increased in very old (>90 years) Sicilian women, suggesting a role in longevity. To validate and extend these results, they investigated the distribution of the three most common HFE gene mutations (C282Y, H63D and S65C) in Sardinian centenarians and controls; they did not confirm the increase in the C282Y mutation observed before in Sicilian oldest old women. This finding may be due to a feature of HH disease that manifests itself in the 4th or 5th decade of life, a phase when the physician investigate more this mutations.

The biochemistry parameter serum ferritin is very sensitive to iron overload, but it is not specific because it could increase in liver and malignant diseases and inflammation state. Bulaj et al.⁽¹⁰⁾ reported that approximately 25% of heterozygous members of HH patients' family could have high serum ferritin and transferrin iron saturation. Jackson et al.⁽²⁷⁾ found a high level of serum ferritin in men who were heterozygous for C282Y mutation.

When we analysed our sickle cell anemia patients group with high levels of the serum ferritin, the presence of HH mutations and histories of vasoocclusion crises, we verified that all five patients heterozygous for the H63D mutation had already had crisis episodes. This goes against previous studies that have shown that heterozygous HH mutations carriers can present high levels of serum ferritin and in this case specifically, it can influence vaso-occlusive crises and can be related to an increase in inflammation and protective antioxidants among these patients, as described by Walter et al.⁽⁴⁹⁾, when they studied the oxidative stress and inflammation in iron-overload patients with hemoglobinopathies.

Many pathologies have been associated with the presence of the HH mutation. The iron overload is highly toxic and plays a decisive role in the generation of reactive oxygen species (ROS)⁽³⁶⁾. The ROS are involved in inflammatory, infectious, atherosclerotic and neoplastic conditions. Therefore, the genotype that leads to an increase in iron in the body must be associated with an increased risk of many common diseases⁽⁵¹⁾.

Blood transfusion therapy has been used in sickle cell anemia patients mainly to prevent strokes. Stroke prevention in sickle cell anemia patients has already reported an increase in serum ferritin in these patients. Disease complications and early death have been associated with an increase in iron overload in patients with hereditary hemochromatosis and β thalassemia^(9, 16).

On analysis of the HH mutations in sickle cell anemia patients with high levels of serum ferritin with a history of vaso-occlusive crises, we found a statistical difference ($p=0.0372$). Koduri *et al.*⁽³⁰⁾ in a review about iron metabolism and sickle cell anemia described that when iron deficiency lowers, the mean corpuscular deoxyhemoglobin-S concentration (MCHC-S) thereby decreases the sickling tendency and the hemolysis severity. These data explain the presence of a high number of crises in sickle cell anemia with mutations. The crisis can be induced by iron overload and can increase the sickling and the number of crisis events.

The β^S - globin gene haplotypes have been associated as a marker in clinical and anthropological studies of sickle cell anemia patients. The CAR/BEN genotype has the highest frequency due to the fact that Bahia historically received slaves from Western Africa, Central and South Africa. Our results agree with those from previous studies carried out among sickle cell anemia patients from Bahia, in the Northeast of Brazil^(1, 23, 31).

The iron deposition pattern among African and European descendants vary, there is marked iron loading of Kupffer's cell as well as hepatocytes, being frequently associated to other unknown genetic, nutritional and environmental features. The iron overload has been reported in populations of countries of southern, eastern and western Africa. Bahia received a large influx of slaves from Central and Western Africa which is reflected in the predominance of the CAR/BEN genotype in our results. Therefore, we are unable to establish a possible association between the HH mutations in the reference group from a very mixed population and the clinical picture of the sickle cell anemia patients. However, to explain the role of these genetic alterations in hemolytic anemia severity it is necessary to carry out further studies involving other mutations in order to hypothesize about the possible mechanisms involved in iron overload among these patients.

The present study was important to establish a possible association between C282Y and H63D mutations in the HFE gene and the clinical events in a group of sickle cell anemia patients from Bahia. Further studies are needed in order to

explain the mechanism of iron overload in Afro-descendants from our population and the possible involvement of the other genes in this process.

Acknowledgments

We are thankful to Dra. Edeltrudes do Espirito Santo (head of the Tsylla Balbino Maternity Clinic) and the clinical staff who helped with sample collection.

References

- Adorno EV, Zanette A, Lyra I, Souza CC, Santos LF, Menezes JF, Dupuit MF, Almeida MN, Reis MG, Gonçalves MS. The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. *Hemoglobin* 28: 267-271, 2004.
- Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rego M, Reis MG, Gonçalves MS. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Caderno de Saúde Pública* 21: 292-298, 2005.
- Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, Bordin S, Soares MCP, Menezes RC, Costa FF, Saad STO. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells, Mol. and Dis.* 15: 324-327, 1999.
- Álvares Filho F, Naoum PC, Moreira HW, Cruz R, Manzato AJ, Domingos CRB. Distribucion geográfica étnica e racial da hemoglobina S em Brasil. *Sangre* 40: 97-102, 1995.
- Azevêdo ES, Silva KMC, Silva MCBO, Lima AMVMD, Fortuna CMM, Santos MG. Genetic anthropological studies in the Island of Itaparica, Bahia, Brazil. *Human Heredity* 31:353-357, 1981.
- Beutler E. The significance of the 187G(H63D) mutation in hemochromatosis. *American Journal Humam genet* 61: 762-764, 1997.
- Beutler E, Felitti V, Gelbart T, Ho N. The effect of HFE genotypes on measurements of iron overload in patients attending a health appraisal clinic. *Annals of Internal medicine* 133: 329-337, 2000.
- Biasiotto G, Belloli S, Ruggeri G, Zanella I, Gerardi G, Corrado M, Gobbi E, Albertini A, Arosio P. Identification of new mutations of the HFE, hepcidin, and transferrin receptor 2 genes by denaturing HPLC analysis of individuals with biochemical indications of iron overload. *Clin Chem* 49: 1981-8, 2003.
- Brittenham GM, Cohen AR, McLaren CE, Martin MB, Griffith PM, Nienhuis AW, Young NS, Allen CJ, Farrell DE, Harris JWH. Hepatic iron stores and plasma ferritin concentration in patients with sickle cell anemia and thalassemia major. *Am J Hematol* 42: 81-85, 1993.
- Bulaj ZJ, Griffen LM, Jorde LB, Edwards CQ, Kushner JP. Clinical and biochemical abnormalities in people heterozygous for hemochromatosis. *N Engl J Med* 355: 1799-1805, 1996.
- Bunn HF, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects. In: Bunn HF & Forget BC. *Hematology* W.B. Saunders, Philadelphia, p. 321-359, 1986.
- Carella M, D'Ambrosio L, Totaro A, Gifa A, Valentino MA, Piperno A, Girelli D, Roetto A, Franco B, Gasparini PCamaschella C. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis patients. *Am J Hum Gen* 60: 828-832, 1997.
- Carru C, Pes GM, Deiana L, Baggio G, Franceschi C, Lio D, Balistre CR, Candore G, Colonna-Romano G, Caruso C. Association between the HFE mutations and longevity: a study in Sardinian population. *Mech Ageing Dev* 124: 529-532, 2003.
- Cazzola M. Genetic disorders of iron overload and the novel "ferroportin disease". *Haematologica* 88: 721-724, 2003.
- Clark P, Britton LJ, Powell LW. The diagnosis and management of hereditary haemochromatosis. *Clin Biochem Rev* 31: 3-8, 2010.
- Cohen A. Treatment of transfusional iron overload. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 12: 04-08, 1990.

17. Conte VP. Hemocromatose hereditária. *Rev Bras Med* 57: 553-564, 2000.
18. Diniz D, Guedes C, Barbosa L, Tauil PL, Magalhães I. Prevalencia do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. *Cad Saúde Pública (R Janeiro)* 25: 188-194, 2009.
19. Dolbey CH. Hemochromatosis: a review. *Clin J Oncol Nurs* 5: 257-260, 2001.
20. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dermishian F, Domingo R, Ellis Jr MC, Fullan A, Hinton LM, Jones BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 13: 399-408, 1996.
21. Figueiredo MS, Kerbaux J, Gonçalves MS, Arruda VR, Saad STO, Sonati MF, Stoming T, Costa FF. Effect of a-Thalassemia and b-Globin gene cluster haplotypes on the hematological and clinical features of sickle-cell anemia in Brazil. *Am J Hematol* 53: 72-76, 1996.
22. Gonçalves MS, Nechtman JF, Figueiredo MS, Kerbaux J, Arruda VR, Sonati MF, Saad SOT, Costa FF and Stoming TA. Sickle cell disease in a Brazilian population from São Paulo: A study of the b^s haplotypes. *Hum Hered* 44: 322-327, 1994.
23. Gonçalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, Bomfim G, Adorno EV, Albuquerque AL, Pontes A, Dupuit MF, Fernandes GB, dos Reis MG. BetaS-haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 36: 1283-1288, 2003.
24. Gordeuk VR. African iron overload. *Semin Hematol* 39: 263-269, 2002.
25. Harford JB, Rouault TA, Huebers HA, Klausner RD. The molecular basis of blood diseases. 2nd edition. WB Saunders Company: Philadelphia, p. 351-378, 1994.
26. Harmatz P, Butensky E, Quirolo K, Williams R, Ferrell L, Moyer T, Golden D, Neumayr L, Vichinsky E. Severity of iron overload in patients with sickle cell disease receiving chronic red blood cell transfusion therapy. *Blood* 96: 76-79, 2000.
27. Jackson HA, Carter K, Darke C, Guttridge MG, Ravine D, Hutton RD, Napier JA, Worwood M. HFE mutations, iron deficiency and overload in 10.500 blood donors. *Br J Haematol* 114: 474-484, 2001.
28. Jazwinska EC, Cullen LM, Busfield F, Pyper WR, Webb SI, Powell LW, Morris CP, Walsh TP. Haemochromatosis and HLA-H [Letter]. *Nature Genetic* 14: 249-251, 1996.
29. Klein HG. Transfusions with young erythrocytes (neocytes) in sickle cell anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 4: 162-165, 1982.
30. Koruri PR. Iron in sickle cell disease: A review why less is better. *Am J Hematol* 73: 59-63, 2003.
31. Lyra IM, Gonçalves MS, Braga JJAP, Gesteira MF, Carvalho MH, Saad STO, Figueiredo MS, Costa FF. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. *Cad Saúde Pública (Rio de Janeiro)* 21: 1287-1290, 2005.
32. Lyon E, Frank EL. Hereditary Hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clinical Chemistry* 47: 1147-1156, 2001.
33. Manual de diagnóstico e tratamento de Doenças falciformes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, p. 47-50, 2001.
34. Merryweather-Clark AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJL. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *Journal Medic Genet* 34: 275-278, 1997.
35. Pereira AC, Mota GFA, Krieger JE. Hemochromatosis gene variants in three different ethnic populations: Effects of admixture for screening programs. *Human Biology* 73: 145-151, 2001.
36. Pietrangelo A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. *Am J Physiol Gastrointest Liver* 282: G403-G414, 2002.
37. Pietrangelogel A. Haemochromatosis. *Gut* 52: ii23-ii30, 2003.
38. Pietrangelo A, Camaschella C. Molecular genetics and control of iron metabolism in hemochromatosis. *Haematologica* 83: 456-461, 1998.
39. Raghupathy R, Manwani D, Little JA. Iron overload in sickle cell disease. *Adv Hematol* 2010: 272940, 2010.
40. Riddington C, Wang W. Blood transfusion for preventing stroke in people with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Ver: CD003146*, 2002.
41. Rolfs A, Bonkovsky HL, Kohlroser JG, McNeal K, Sharma A, Berger UV, Kohlroser JG, Hediger MA. Intestinal expression of genes involved in iron absorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver* 282: G598-G607, 2002.
42. Salzano FM. Incidence, effects, and management of sickle cell disease in Brazil. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 7: 240-244, 1985.
43. Santos PCJL, Cançado RD, Terada CT, Rostelato S, Gonzales I, Hirata RDC, Chiattono CS, Guerra-Shinohara EM. HFE gene mutations and ironstatus of Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res* 43: 107-114, 2010.
44. Steinberg MH, Hsu H, Nagel RL, Milner PF, Adams JG, Benjamin L, Fryd S, Gillette P, Gilman J, Josifovska O, Hellman-Erlingsson S, Safaya S, Huey L, Rieder RF. Gender and Haplotypes effects upon hematological manifestations of adult sickle cell anemia. *Am J Hematol* 48: 175-181, 1995.
45. Steinberg MH. Minireview: Genetic modulation of sickle cell anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 209: 1-13, 1995.
46. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of b-like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 32: 66-69, 1989.
47. Townsend A, Drakesmith H. Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron overload. *Lancet* 359: 786-790, 2002.
48. Veneri D, Krampera M, Zaffanello GM, Sotero P, Franchini M. Screening for hemochromatosis in a population with abnormal iron status. *Haematologica/J Hematol* 88: 593-594, 2003.
49. Walter PB, Fung EB, Killilea DW, Jiang Q, Hudes M, Madden J, Porter J, Evans P, Vichinsky E, Harmatz P. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol* 135: 254-263, 2006.
50. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. The Hemoglobinopathies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds.), *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill: New York, p. 4571-4636, 2001.
51. Worwood M. HFE mutations as risk factors in disease. *Best Prac research Clin Haematol* 15: 295-314, 2002.

SICKLE CELL DISEASE SC IN NORTHEAST OF BRAZIL: A CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

DOENÇA FALCIFORME SC NO NORDESTE DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR

Cynthia Cajado, Cynara G. Barbosa, Elisângela V. Adorno, Joelma F. Menezes, Mitermayer G. Reis, Marilda S. Gonçalves
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (CPqGM-FIOCRUZ); e Faculdade de Farmácia da Universidade
 Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil

The SC disease is really prevalent in Brazil, mainly in Bahia, being that the patients present a severe anemia but with less clinical complications than SS homozygous. The patients with SC disease have less painful crisis, infections, skeletal involvement, anemia, and priapism. The aim of the present study was to investigate the hemoglobin C and S globin gene haplotypes distribution among 63 individual with SC disease from Northeast Brazil, associating with their phenotype. Our results show that the studied patients have mild anemia (hemoglobin median=10.88 g/dL) and slightly high fetal hemoglobin levels (median=3.06%). The α -thalassemia^{3-4kb} deletion was found in 18 (28%) patients. The most frequent β^c and β^s globin gene haplotypes were CAR and Benin. We have not found any association among the globin haplotypes and clinical events of the patients, however further studies need to be developed to confirm the finding related to the SC disease patients.

Keywords: Sickle cell disease, SC disease, thalassemia, haplotypes.

A doença SC é muito prevalente no Brasil, principalmente na Bahia, sendo que os pacientes apresentam anemia grave, mas com menos complicações clínicas que os homocigotos SS. Os pacientes com doença de SC têm menos crises dolorosas, infecções, comprometimento ósseo e priapismo. O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização clínica e molecular dos haplótipos ligados ao gene das globinas β^c e β^s e da talassemia α^{3-4kb} em 63 indivíduos com doença de SC da Bahia, Brasil. Os resultados obtidos demonstram que os pacientes estudados têm moderada anemia (média de hemoglobina=10,88g/dL) e níveis discretamente elevados de hemoglobina fetal (média=3,06%). A talassemia α^{3-4kb} foi encontrada em 18 (28%) pacientes. Os haplótipos ligados aos genes da globina do gene da globina β^c e β^s mais frequentes foram CAR e Benin. Não foi encontrada associação entre os haplótipos da globina e eventos clínicos dos pacientes, porém estudos adicionais poderão confirmar os resultados obtidos com relação aos pacientes com doença SC.

Palavras-chave: doença falciforme, doença SC, talassemia, haplótipos.

The hemoglobinopathies result of molecular alteration in a globin gene and may be divided in two major groups, characterized by the presence of a structurally abnormal globin chain or by a reduction or absence of globin chains synthesis named thalassemias⁽⁷⁾.

The hemoglobin S has a single GAT→GTA at the sixth codon of the β -globin gene, conducting to the glutamic acid to valin substitution ($\beta^{6\text{Gln}\rightarrow\text{Val}}$) and a variant β -globin chain. Sickle cell anemia disease, the homozygous state of HbS (HbSS) has heterogeneous clinical picture with vasoocclusive crisis, hemolysis, painful episodes and other chronic complications such as leg ulcers and priapism and others in different degrees⁽²³⁾.

Sickle cell disease affects million of people worldwide, in Brazil, around 4 million of people has a sickle cell trait (HbAS)⁽¹⁾. In Bahia, Northeast of Brazil, studies conducted in different population groups, described a frequency of 7.4 to 15.7% for heterozygous AS^(2,9), the heterozygous state is found in a frequency of 6.5% among the African population⁽²⁾. The second most common variant hemoglobin described in Brazil

is the C hemoglobin in which the sixth codon of the b-globin gene, the GAG is replaced by AAG, resulting in the glutamic acid to lysine ($\beta^{6\text{Lys}\rightarrow\text{Gln}}$) substitution at globin chain⁽¹⁸⁾. The β^c homozygous (CC) has a moderate hemolytic anemia. The presence of hemoglobin S and C in Brazilian population has contributed to a high prevalence of SC disease, mainly in Bahia where the heterozygous frequency is around 3.5%. The double heterozygous SC presents a severe anemia but with less clinical complications than SS homozygous⁽⁶⁾.

All complications that are found in patients with sickle cell disease anemia have occurred in individuals with HbSC disease. Yet, most – but not all – of these complications are seem less often and appear at later time in HbSC disease compared with sickle cell anemia⁽¹⁷⁾. The patients with SC disease have less painful crisis, infections, skeletal involvement, anemia, and priapism. However, they have more thromboembolic events, renal papillary necrosis⁽²⁶⁾ and a particular incidence of retinopathy⁽⁸⁾, aseptic necrosis of the head of long bones, and pathological events involving the spleen during adulthood^(13,14).

Five major β^c -globin gene haplotypes defined by the presence of restriction endonuclease polymorphics sites located throughout the β -globin gene cluster have been described. The haplotypes are associated with the African geographic origin of the mutation⁽²⁰⁾ with description of the Benin (BEN) type in the Midwestern Africa, the Bantu in Central Africa Republic (CAR) in South Central and Eastern

Recebido em 28/6/2010 Aceito em 11/9/2010
 Correspondence to: Profa. Marilda Souza Gonçalves, Centro de Pesquisas
 Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal,
 40296-710 Salvador, Bahia, Brasil. C-elo: mari@bahia.fiocruz.br.
 Financial support: CNPq, DECT 306524/2004-0 and 409800/2006-6.

Gazeta Médica da Bahia 2010;80:3(Ago-Out):20-23
 © 2010 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

Africa, the Senegal (SEN) in Atlantic West Africa, the Cameroon along west coast and the Saudi Arabia-India on Indian subcontinent and Arabian peninsula^(10,18).

The β^c -globin gene haplotypes have been divided among the groups: I, II and III⁽¹¹⁾. A single origin of the mutation followed by the spread to other haplotypes by meiotic recombination of 5' to the β -globin gene has been proposed by Nagel and Rannel⁽⁸⁾. The β^c -globin gene haplotype when combined with the Benin β^s -globin gene haplotype, commonly presents very low HbF levels⁽¹⁷⁾.

Other common hemoglobin disorder with a high worldwide distribution is caused by reduction or absence of the globin chain synthesis, known as thalassemia syndromes. The α -thalassemia has different molecular bases and the α_2 -thalassemia followed by a 3.7 Kb deletion has been described in 20-25% of the black Brazilian population⁽²³⁾.

Based on the high prevalence of sickle cell disease and SC disease among the Northeast of Brazil population, we investigated the hemoglobin C and S globin gene haplotypes distribution among SC disease patients associating with the patients' phenotype.

Material and Methods

We studied 126 chromosomes of SC disease patients, aged 23 ± 15.3 years, after obtaining the approval of the Oswaldo Cruz Foundation Institutional Ethical Committee (protocol number 142). They attended the out patient's clinic of the Bahia Blood Center Foundation (HEMOBA) and the peripheral blood samples were obtained during a regular clinic visit. Hematological data were analyzed by an automated cell counter (Coulter-Counter T890), hemoglobin profile was investigated by high-performance liquid chromatography (HPLC) (Bio-Rad VARIANTTM II, CA, USA) and DNA was isolated from the peripheral blood leukocytes by *GFXTM Genomic Blood DNA Purification KIT* (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). β^s and β^c globin gene haplotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR) and RFLP techniques as previous described^(5,24). The statistical analyses were developed at the software EPI Info version 6.04.

Results

In a group of 63 (39 female and 24 male) the patients median hemoglobin concentration was $10.88 (\pm 1.67)$ g/dL; median hematocrit (Hct) $34.48 (\pm 7.9)\%$; median cell volume (MCV) $79.93 (\pm 11.3)$; median cell hemoglobin (MCH) $27.5 (\pm 12.80)$; median cell hemoglobin concentration (MCHC) of $34.66 (\pm 17.56)$ and median fetal hemoglobin concentration 3.06% . Table 1 shows the β -globins haplotypes distribution among the 63 SC disease patients.

The α -thalassemia was studied in 60 patients and we observed five (8.3%) homozygous and six (10.0%) heterozygous. The result of α -thalassemia in the different haplotypes is described on Table 2.

Table 1. The β^c and β^s globin gene haplotypes among 45 SC disease patients from Salvador, Bahia (Northeast-Brazil).

β^c Haplotypes	β Haplotypes - n(%)			Total n(%)
	Benin	CAR	Athypical	
β^c I	29 (46.1)	20 (31.7)	2 (3)	48 (80.9)
β^c II	7 (11.1)	5 (7.9)	0	12 (19.1)
Total	33 (57.2)	25 (39.7)	2 (3.1)	63 (100)

Table 2. Association between α -thalassemia and β^s globin gene haplotypes among 45 SC disease patients from Salvador, Bahia (Northeast-Brazil).

Thalassemia	Globin gene haplotypes n(%)			
	Ben I	Ben II	CAR I	CAR II
Normal	21 (35)	4 (67)	1 (17)	18 (30)
Homozygous	3 (5)	1 (17)	0	1 (17)
Heterozygous	3 (5)	1 (17)	1 (17)	1 (17)

The patients' phenotypes and hematological data are shown in Table 3. There was no statistic significance between gender and hematological data.

Table 4 shows association among the β^c/β^s haplotypes and the phenotype of 63 SC disease patients. There was not found any association between these data.

Table 5 compares the present study with other reports worldwide about SC disease clinical events.

Table 3. Hematological Data and β^c and β^s globin gene haplotypes among SC disease patients from Salvador, Bahia (Northeast-Brazil).

Haplotypes (n)	Gender		MEANS (\pm SD)			
	(M/F)	Age	%HbS	%HbF	%HbC	
CAR I (20)	12/8	25 (15.2)	48 (2.5)	2.4 (3.1)	44.7 (1.9)	
CAR II (5)	5/0	29 (18.8)	46.5 (2.7)	4.7 (4.2)	43.9 (2.6)	
Ben I (29)	17/12	18.1 (13.8)	45.2 (96)	3.4 (3.9)	44.6 (2.3)	
Ben II (7)	4/3	34.4 (17.8)	49.2 (3.4)	3.0 (3.5)	44.0 (3)	
Athypical I (2)	1/1	23.0 (4.2)	49.7 (0.6)	0.7 (0.1)	44.0 (0.6)	
p value	-	0.87*	0.22**	0.47*	0.45*	

*Anova; **Kruskal-Wallis test.

Discussion

Bahia, a Northeast Brazilian state received immigrants from Portugal, Holland and France, but the major important racial group in the Bahia population is the Black African. About of 1,200,000 slaves were estimated to have been imported to Bahia from 1678 to 1851. Historical data suggest that about 90% of slaves imported into northern Brazil were from Angola, Congo and Mozambique, where the CAR or Bantu haplotype predominates^(12,19). Northeast region of Brazil (Bahia,

Table 4. The β globin gene genotypes and phenotypes among a group of 63 SC disease patients from Salvador, Bahia (Northeast-Brazil).

β^s/β^c haplotypes	N cases	Clinical features – n(%)				
		Retinopathy	Hepatomegaly	Splenomegaly	Pain	Leg ulcer
CAR I	20	2	2	5	11	2
Ben I	29	4	5	7	18	0
P value	-	0.52*	0.68*	0.60*	<0.06*	0.17*
CAR II	5	0	1	2	3	0
Ben II	7	1	1	1	3	0
P value	-	1*	1*	0.52*	1*	-
Ben I	29	4	5	7	18	0
Ben II	7	1	1	1	3	0
P value	-	1*	1*	1*	<0.04*	-
CAR I	20	2	2	5	11	2
CAR II	7	0	1	2	3	0
P value	-	1*	0.50*	0.59*	1*	1*

Fisher Exact Test.

Table 5. SC disease phenotype and description in several studies worldwide.

Clinical features	Country, Author (year) ^(reference) [n cases]					
	Jamaica, Sejeant et al. ⁽²²⁾ (1973) [n=?]	Ghana, Konothey-Ahulu et al. ⁽²⁴⁾ (1974) [n=?]	USA, Ballas et al. ⁽³⁾ (1982) [n=27]	Brazil, Zago et al. ⁽²³⁾ (1983) [n=26]	Brazil, Marmitt et al. ⁽¹⁵⁾ (1986) [n=32]	Brazil, present study [n=63]
	Percentage cases (%)					
Hepatomegaly	38	22	16	65	59	14.3
Splenomegaly	60	0	52	58	50	25.4
Bone or joint pain	82	92	0	35	72	58.7
Leg ulcers	20	2	0	0	6	3.2
Retinopathy	?	?	75	?	?	11.1
Cardiopathy	19	0	4	0	13	3.2

(?) No related.

Pernambuco and Maranhão) was heavily supplied by slaves from Central West Africa until the middle of 19th century. The Sudans composed the mayor part of Bahia's population and Pernambuco in minor part and the Bantus occupied Maranhão and center-south of Brazil⁽¹²⁾, because of the local where arrived the slave African route in spite of economical development in Brazil.

The β^c allele is found almost exclusively among African-Americans and West Africans from Northern Ghana and the Volta territory and to a much lesser degree, Western Nigeria. The β^s allele presence in West African make up less than 10% of the haplotypes⁽¹⁹⁾. Although it has been found rarely in individuals from Italy, particularly from Sicily, its geographic distribution when compared to the other common b-globin variants such as β^S , β^E , β^D is quite localized⁽¹⁹⁾.

Haplotypes analysis is a useful tool important to describe the molecular background and its association with normal and variant β -globin alleles, providing clues about the origins of several β -globin variants⁽⁹⁾.

This group of patients does not represent the bulk of individuals with SC hemoglobinopathy in Salvador-Bahia-

Brazil, because of the small number of patients in the sample, perhaps explain with complications such as hepatomegaly, bone or joint pain, retinopathy and leg ulcer were infrequent or hardly observed. RBC from these patients with HbSC disease contains comparable amounts of HbS and HbC, only one patient had increased level of HbF (16.7g/dl). Hematological and biochemical profiles of the disease were defined while the patients were in their usual steady state.

Splenomegaly is a commonly described physical finding in children with HbSC disease, other studies in Brazil found 50%⁽¹⁵⁾ and 58%⁽²⁷⁾ of splenomegaly differing from our study that found 25.4%, this low number may be a special characteristic of the group in study, these authors did not made any association between age and splenomegaly. Rivera-Ruiz⁽²¹⁾ found palpable splenomegaly in 34% of patients and was more common in males. Hepatomegaly was found only in 9 (14.3%) patients, differing from Rio de Janeiro a Southernst Brazilian State with 59% of hepatomegaly⁽¹⁵⁾, Jamaica 38%⁽²²⁾ and US with 16%⁽³⁾.

Proliferative retinopathy is more common and more severe than in sickle cell anemia and progressive loss of vision may have its onset early in the second decade. Nagel et al.⁽¹⁷⁾ found that retinopathy appears in patients between 15 and 30 years old but in our group retinopathy was present in seven (11.1%) patients aged among 26 to 57, four of these presents Ben I haplotype, one Ben II and two CAR II haplotype. It was previously described that the higher Hb and Hct levels in HbSC disease may be responsible for the higher incidence of retinopathy in this disease, but these hematological data were not observed in this study with association to retinopathy. Balo et al.⁽⁴⁾ found 84% of retinopathy SC disease. There are few publications concerning retinal complications of hemoglobinopathies.

Bone or joint pain was found in 58.7 % of the patients in according with Ballas et al.⁽³⁾ that found 50% of HbSC patients with painful crisis. Only 8 (17.7%) patients in the present study had some kind of infection, seven of these with respiratory infection and one osteomyelitis. These findings indicate that SC disease is characterized by a wide range of clinical severity, milder than sickle cell anemia.

The symptomatology of this group of SC disease patients seems to be peculiar. Comparing our population with others in the world, this study demonstrates some aspects of HbSC disease in Brazil that were not previous appreciated, and confirmed features described by others investigators in world. But what we are asking is: What is the influence of β^s and β^c globin gene haplotypes in the investigated SC disease group? Does the β^s haplotype is more critical from the clinical features of the HbSC disease or the β^c haplotype is responsible for better clinical of the SC disease? We found that Ben I haplotype had more painful events that Ben II and that other haplotypes. Leg ulcer appears in the CAR I haplotype. Splenomegaly was more frequent in the β^c I haplotype than in β^c II. Thalassemia was more present in Ben I haplotype. Our data suggest that there is an influence of β^s and β^c globin gene haplotypes in

the phenotype of Northeast SC disease patients. We are addressing our study to answer this question or whether chromosomes carrying the β^C mutation interact differentially with the common haplotypes associated with β^S gene and affect the clinical features of HbSC disease. Further studies need to be developed to confirm the different association between haplotype and phenotype SC disease patients.

References

1. Álvares-Filho F, Naoum PC, Moreira HW, Cruz R, Manzato AJ, Domingos CRB. Distribución geográfica etaria y racial de la hemoglobina S en Brasil. *Sangre* 40: 197-102, 1995.
2. Azevêdo ES. Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil. *Ann Hum Genet* 44: 55-60, 1980.
3. Ballas KS, Lewis CN, Noone AM, Krasnow SH, Kamarulzaman E, Burka ER. Clinical Hematological and Biochemical Features of HbSC disease. *Am J Hematology* 13: 37-51, 1982.
4. Balo KP, Segbena K, Mensah A, Djagnikpo P, Muhluedo H, Adjivon K, Koffi-Gue KB. Retinal complications in hemoglobinopathies: report of 32 cases. *Med Trop (Mars)* 55: 450-453, 1995.
5. Boehm CD, Dowling CE, Antonarakis SE, Honig RG, Kalazian Jr HH. Evidence supporting a single origin of the β^C -globin gene in blacks. *Am J Hum Genet* 37: 771-777, 1985.
6. Bunn HF, Noguchi CT, Hofrichter J, Schechter GP, Schechter AN, Eaton WA. Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7527-7531, 1982.
7. Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 33: 11-16, 2009.
8. Fadugbagbe AO, Gurgel RQ, Mendonça CQ, Cipolotti R, dos Santos AM, Cuevas LE. Ocular manifestations of sickle cell disease. *Ann Trop Paediatr* 30: 19-26, 2010.
9. Gonçalves MS, Bomfim GC, Maciel E, Cerqueira I, Lyra I, Zanette A, Bomfim G, Adorno EV, Albuquerque AI, Pontes A, Dupuit MF, Fernandes GB, Reis MG. β^S -haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, northeastern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 36: 1283-1288, 2003.
10. Gonçalves MS, Nechtman JF, Figueiredo MS, Kerbauy J, Arruda VR, Sonati MF, Saad SOT, Costa FF, Stoming TA. Sickle cell disease in a Brazilian population from São Paulo: a study of the β^S haplotypes. *Hum Hered* 44: 322-327, 1994.
11. Kan YW, Dozy AM. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene. Relationship to sickle mutation: Proceedings of the National Academy Sciences USA 75: 5631-5635, 1978.
12. Lavinha J, Gonçalves J, Faustino P, Romão L, Osorio-Almeida L, Peres MJ, Picanço I, Martins MC, Ducrocq R, Labie D, Krishnamoorthy R. Importation route of the sickle cell trait into Portugal: a contribution of molecular epidemiology. *Hum Biol* 64: 891-901, 1992.
13. Lee K, Prehu C, Merault G, Keclard L, Roudot-Thoraval F, Bachir D, Wajcman H, Denis L, Galacteros F. Genetic and hematological studies in a group of 114 adult patients with SC sickle cell disease. *Am J Hematol* 59: 15-21, 1998.
14. Leshner AP, Kalpathi R, Glenn JB, Jackson SM, Hebra A. Outcome of splenectomy in children younger than 4 years with sickle cell disease. *J Pediatr Surg* 44: 1134-1138, 2009.
15. Marmitt CR, Hutz MH, Salzano FM. Clinical and Hematologica features of Hemoglobin SC disease in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian J Med Biol Res* 19: 731-734, 1986.
16. Mears JG, Lachman HM, Cabannes R, Amegnizin KPE, Labie D, Nagel RL. Sickle gene: its origin and diffusion from West Africa. *J Clin Invest* 68: 606-610, 1981.
17. Nagel RL, Fabry ME, Steinberg MH. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Reviews* 17: 167-178, 2003.
18. Nagel RL, Ranney HM. Genetic Epidemiology of structural Mutations of β -globin Gene. *Seminars in Hematology* 27: 342-359, 1990.
19. Oner PD, Dimovski AJ, Oliviere NF, Schirilo G, Codrington JF, Fattoum S, Adekile AD, Oner R, Yuregir GT, Altay C, Gurgey A, Gupta RB, Jogessar VB, Kitundu MN, Loukopoulos D, Tamagnini GP, Ribeiro MLS, Kutlar F, Gu L-H, Lancellotti KD, And Huisman, T.H.J. β^S haplotypes in various world population. *Hum Genet* 89: 99-104, 1992.
20. Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE, Goff SC, Boehm CD, Sexton JP, Waber PG, Giardina PJ. Linkage of beta-thalassemia mutation and β -globin gene polymorphisms in human β -globin gene cluster. *Nature* 296: 627-631, 1982.
21. Rivera-Ruiz M, Varon J, Sternbach GL. Acute splenic sequestration in an adult with hemoglobin S-C disease. *Am J Emerg Med* 26: 1064, 2008.
22. Serjeant GR, Ashcroft MT, Serjeant BE. The clinical features of hemoglobin SC disease in Jamaica. *British Journal of Haematology* 24: 491-501, 1973.
23. Sonati MF, Farah SB, Ramalho AS, Costa FF. High prevalence of α -Thalassemia in a black population of Brazil. *Hemoglobin* 15: 309-311, 1991.
24. Steinberg MH. Modulation of the phenotypic diversity of sickle cell anemia. *Hemoglobin* 20: 1-19, 1996.
25. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *ScientWorld J* 18: 46-67, 2009.
26. Talacki CA, Rappaport E, Schwartz E, Surrey S, Ballas SK. β -globin gene cluster in HbC heterozygotes. *Hemoglobin* 14: 229-240, 1990.
27. Zago MA, Costa FF, Tone LG, Bottura C. Hereditary hemoglobin disorders in a Brazilian population. *Hum Hered* 3: 125-129, 1983.

RESEARCH

Open Access

Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease

Magda O Seixas^{1,2}, Larissa C Rocha^{1,3}, Mauricio B Carvalho², Joelma F Menezes^{1,2}, Isa M Lyra^{3,4}, Valma ML Nascimento³, Ricardo D Couto², Ájax M Atta², Mitermayer G Reis¹, Marilda S Goncalves^{1,2*}

Abstract

Background: The search for sickle cell disease (SCD) prognosis biomarkers is a challenge. These markers identification can help to establish further therapy, later severe clinical complications and with patients follow-up. We attempted to study a possible involvement of levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in steady-state children with SCD, once that this lipid marker has been correlated with anti-inflammatory, anti-oxidative, anti-aggregation, anti-coagulant and pro-fibrinolytic activities, important aspects to be considered in sickle cell disease pathogenesis.

Methods: We prospectively analyzed biochemical, inflammatory and hematological biomarkers of 152 steady-state infants with SCD and 132 healthy subjects using immunochemistry, immunoassay and electronic cell counter respectively. Clinical data were collected from patient medical records.

Results: Of the 152 infants investigated had a significant positive association of high-density lipoprotein cholesterol with hemoglobin ($P < 0.001$), hematocrit ($P < 0.001$) and total cholesterol ($P < 0.001$) and a negative significant association with reticulocytes ($P = 0.046$), leukocytes ($P = 0.015$), monocytes ($P = 0.004$) and platelets ($P = 0.005$), bilirubins [total bilirubin ($P < 0.001$), direct bilirubin ($P < 0.001$) and indirect bilirubin ($P < 0.001$), iron ($P < 0.001$), aminotransferases [aspartate aminotransferase ($P = 0.004$), alanine aminotransferase ($P = 0.035$)], lactate dehydrogenase ($P < 0.001$), urea ($P = 0.030$), alpha 1-antitrypsin ($P < 0.001$), very low-density lipoprotein cholesterol ($P = 0.003$), triglycerides ($P = 0.005$) and hemoglobin S ($P = 0.002$). Low high-density lipoprotein cholesterol concentration was associated with the history of cardiac abnormalities ($P = 0.025$), pneumonia ($P = 0.033$) and blood transfusion use ($P = 0.025$). Lipids and inflammatory markers were associated with the presence of cholelithiasis.

Conclusions: We hypothesize that some SCD patients can have a specific dyslipidemic subphenotype characterized by low HDL-C with hypertriglyceridemia and high VLDL-C in association with other biomarkers, including those related to inflammation. This represents an important step toward a more reliable clinical prognosis. Additional studies are warranted to test this hypothesis and the probably mechanisms involved in this complex network of markers and their role in SCD pathogenesis.

* Correspondence: mari@bahia.fiocruz.br

¹Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação de Pesquisa Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Sickle cell disease (SCD) clinical outcomes vary widely from mild to severe and the disease has been associated with multi-organ damage and risk of early mortality [1,2]. Acute and chronic clinical manifestations of SCD include vaso-occlusive pain episodes (VOE), impaired blood flow as a result of intravascular sickling in capillaries and small vessels, inflammation processes and high susceptibility to infection. Researchers have found a complex network of associations among laboratory analyses and clinical events predicting a probably risk of death [1,3,4].

The sickle cell disease vaso-occlusive phenomenon has been described as a complex event with the participation of stressed reticulocytes, sickled erythrocytes, leukocytes, platelets and endothelium activation [2,5-8]. Reactive oxygen species (ROS), scavenger molecules and nitric oxide (NO) play important roles as regulators of vascular homeostasis in SCD pathogenesis [9].

Several biomarkers have been associated with SCD clinical prognosis; some, such as fetal hemoglobin (HbF) concentration, leukocytes count and reticulocyte count are considered to be classic [2,5]. Recently, serum lactate dehydrogenase (LDH), a well-known marker of intravascular hemolysis, was described as a biomarker of prognosis in SCD [10]. It has been associated with nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in SCD patients [11].

We conducted a prospective study to investigate high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels, including also determination of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), very low-density lipoprotein cholesterol (VLDL-C) and triglycerides to test the hypothesis that they can be used as a marker of prognosis among steady-state sickle cell disease children. This potential biomarker and their association with others laboratory determination and medical history were investigated in order to identify sub-phenotypes associated with the disease.

Subjects and Methods

Subjects and Controls

Of 152 steady-state SCD children from Salvador city, state of Bahia, in Brazil were prospectively analyzed for laboratory (biochemical and hematological) markers. Brazil is the largest country in South America, with one of the most heterogeneous populations due to several waves of immigration that have resulted in cultural, socioeconomic, and ethnic diversity in different geographic regions. Salvador is the largest city in Bahia, a Northeastern Brazilian state. Among the local population, 86% is of African origin, and Salvador has the highest incidence of SCD in Brazil [12].

The study was conducted from March 2007 to November 2008 and included patients from the Fundação de Hematologia e Hemoterapia do estado da Bahia (HEMOBA), a reference center attending to sickle cell disease patients who are seen for routine visits at the outpatient clinic. The study also included 132 healthy children randomly selected from the Clinical Laboratory of the Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA); these were matched to cases by age, gender and African ethnic origin as a control group. The study was approved by the Fundação de Pesquisa Oswaldo Cruz human subject research board, and all officials responsible provided written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2000.

Laboratory Methods

Clinical laboratory analyses were performed in the Clinical Analyses Laboratory of the PHAR-UFBA and the Pathology and Molecular Biology Laboratory of the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação de Pesquisa Oswaldo Cruz. Biochemical markers analyses were measured in serum by immunochemistry assay (A25 system, BIOSYSTEMS SA, Barcelona, Spain). Serum ferritin was measured by immunoassay using an Access[®] 2 Immunoassay system X2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). C-reactive protein (CRP), alpha 1-antitripsin (A1AT) and antistreptolysin-O (ASO) were measured by immunochemistry (Immage[®] 800 system, Beckman Coulter, Fullerton, CA). Hematological analyses were carried out using an electronic cell counter, Coulter Count T-890 (Coulter Corporation, FL, USA). The hemoglobin (Hb) profile and HbF levels were investigated by high performance liquid chromatography (HPLC/VARIANT I; BIO-RAD, CA, USA).

Definition of Clinical Events

Clinical data were collected from patient medical records. Demographic data were provided by interviews with patients and parents or guardians. Eligibility criteria included only SCD patients of pediatric age. All patients were in the steady-state of the disease when samples were collected; steady-state was characterized as a period without any acute events and no blood transfusion for 120 days prior to blood sampling. Exclusion criteria included infection or inflammatory episodes and previous blood transfusion (within four months prior to the study). To identify possible associations between HDL-C levels and clinical characteristics in SCD we assessed medical history from patients' records, including prevalence of stroke, number of hospitalizations, painful episodes, VOE, infection, pneumonia, priapism, splenomegaly, splenic sequestration, leg ulcers, cardiac

abnormalities, respiratory insufficiency and cholelithiasis. Pneumonia was defined as an acute infection of the lung by virus, bacteria or atypical organisms with a clinical outcome that did not meet the criteria for ACS [8].

Statistical analysis

Baseline characteristics were summarized as means and proportions of selected variables. Distribution of quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Mean values of quantitative variables between groups were compared using the unpaired t-test for normal data distribution and Mann-Whitney for non-normal data. Bivariate correlation analyses were carried out to determine correlations between pairs of variables using Pearson's and Spearman's rank correlation (R). The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare means among two or more groups as measured by interval variables. The level of 40 mg/dl was considered as a reference range and interactions between low HDL-C (less than 40 mg/dl) and high HDL-C (at least 40 mg/dl) and baseline characteristics were evaluated using independent t-test and Mann-Whitney tests. The interactions between low HDL-C (less than 40 mg/dl) and high HDL-C (at least 40 mg/dl) and specific categorical clinical variables were tested for significance using a χ^2 test or Fisher's exact test, taking into account the expected frequency in the cell tables. All tests were considered significant if *p* values were less than .05. Data analyses were performed using Prism 5.01 (Graphpad Software, San Diego, CA), EPIinfo 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia) and STATA SE 10 software (StataCorp, Texas, USA).

Results

First of all we compared the analyses of markers of intravascular hemolysis, hemolysis and hepatic involvement, leukocyte and platelet counts, renal involvement, lipid metabolism, inflammation and Hb profile in order to establish how much are the difference between those markers between control and patients groups (Table 1).

HDL-C association with markers of hemolysis, inflammation and vascular dysfunction

The high-density lipoprotein cholesterol was positively correlated with red blood cells (RBC), Hb, hematocrit and total cholesterol and urea concentrations and negatively correlated with hematimetric indexes of mean cell volume (MCV), mean cell hemoglobin (MCH) and mean cell hemoglobin concentration (MCHC); reticulocytes, hemoglobin S (HbS), hemolysis and hepatic markers, total leukocytes, monocytes and platelets, alanine aminotransferase (ALT), iron and A1AT. However, it was not correlated with LDL-C. Steady state

triglycerides were negatively correlated with RBC, Hb, hematocrit and HDL-C, and positively correlated with HbS, LDH, AST, total bilirubin, platelet, total protein, total cholesterol, and VLDL-C (Table 2).

We next determined whether the levels of HDL-C in SCD group (HDL-C less than 40 mg/dl vs. 40 mg/dl or more) showed difference among the laboratorial markers. In the first group, there were 80 HBSS and 23 HBSC patients, and in the second group, there were 23 HBSS and 25 HBSC patients. Sick cell patients with low HDL-C presented lower RBC counts as well as Hb and hematocrit concentrations than patients from the group with normal HDL-C levels. The low concentration HDL-C group had higher erythroblast, leukocyte, platelet, neutrophil, monocyte and reticulocyte counts and higher iron, AST, total bilirubin, direct bilirubin, indirect bilirubin, LDH and A1AT concentrations. There was no difference in LDL-C concentration between the two HDL-C subgroups, but the VLDL-C and triglycerides concentrations were higher in the low HDL-C group (Table 3).

Association of HDL-C with sickle cell disease clinical history

We assessed possible associations between HDL-C levels and a series of clinical characteristics in SCD medical history, including prevalence of stroke, number of hospitalizations, painful episodes, VOE, infection, pneumonia, priapism, splenomegaly, splenic sequestration, leg ulcers, cardiac abnormalities, respiratory insufficiency and cholelithiasis. To compare these categorical variables with HDL-C concentration, we divided patients into two groups. The low HDL-C group (less than 40 mg/dl) comprised 103 sickle cell disease patients (80 HBSS and 23 HBSC), with an HDL-C range of 16-39 mg/dl and mean of 28.95 mg/dl. The high HDL-C group (at least 40 mg/dl) comprised 48 SCD patients (23 HBSS and 25 HBSC), with an HDL-C range of 41-85 mg/dl and mean of 51.2 mg/dl.

The prevalence of pneumonia (OR = 2.42, 95%CI: 1.06-5.53; *P* = 0.033) and the prevalence of cardiac abnormalities (OR = 2.88, 95%CI: 1.12-7.59, *P* = 0.025) were significantly different between the HDL-C groups. Forty-one children in the low HDL-C group had cardiac abnormalities typical of hemolytic anemia on auscultation. However, among these, 24 had electrocardiograph arrhythmia, and 3 had tricuspid regurgitant jet velocity of at least 2.6 m/sec, indicating a possible presence of pulmonary hypertension. These results were obtained from previously performed echocardiograms that were not performed at the same time of the present study. The low HDL-C concentration group underwent more blood transfusions (OR = 2.52, 95%CI: 1.11-5.77, *P* = 0.025).

Table 1 Patient and control group characteristics

Characteristics	Patients		Controls		p
	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	
Age (Years)	152	9.2 ± 4.0	132	8.7 ± 3.2	
Gender					
Male	82	53.9*	68	51.5*	
Female	70	46.1*	64	48.5*	
Hemoglobins					
AA	—	—	132	100.0	
SS	103	67.8	—	—	
SC	48	31.5	—	—	
SD	01	0.7	—	—	
Hemoglobin					
Fetal (%)	142	7.51 ± 6.20	130	0.47 ± 0.46	<0.001
Hemolysis					
RBC (× 10 ⁹ /cu mm)	152	3.24 ± 0.97	131	4.74 ± 0.39	<0.001
Hemoglobin (g/dL)	152	8.93 ± 2.01	131	12.83 ± 1.03	<0.001
Hematocrit (%)	152	27.65 ± 6.20	131	38.47 ± 2.78	<0.001
Mean Cell Volume (fl)	152	87.44 ± 10.85	131	81.37 ± 5.16	<0.001
Mean Cell Hemoglobin (pg)	152	28.29 ± 3.73	131	27.14 ± 1.95	0.007
Reticulocyte Count (%)	140	7.61 ± 4.88	122	0.846 ± 0.256	<0.001
Leukocytes					
Leukocyte Count (× 10 ⁹ /L)	152	13.1 ± 5.8	131	7.0 ± 2.2	<0.001
Neutrophil Count (× 10 ⁹ /L)	152	6161.72 ± 3779.49	131	3240.32 ± 1686.15	<0.001
Monocyte Count (× 10 ⁹ /L)	152	817.15 ± 481.83	131	488.67 ± 204.90	<0.001
Platelets					
Platelet Count (× 10 ⁹ /L)	152	403.93 ± 158.66	131	308.21 ± 67.35	<0.001
Lipid metabolism					
Total Cholesterol (mg/dL)	151	121.12 ± 26.16	124	164.08 ± 34.55	<0.001
HDL Cholesterol (mg/dL)	151	35.65 ± 12.34	123	48.90 ± 13.67	<0.001
LDL Cholesterol (mg/dL)	151	64.95 ± 22.19	123	97.41 ± 33.54	<0.001
VLDL Cholesterol (mg/dL)	151	20.44 ± 9.38	123	17.75 ± 10.37	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	150	102.07 ± 46.86	123	88.31 ± 51.73	0.002
Hemolysis plus Hepatic					
Aspartate aminotransferase (U/L)	152	48.05 ± 24.92	122	30.28 ± 11.13	<0.001
Total bilirubin (mg/dL)	151	2.73 ± 1.76	118	0.49 ± 0.21	<0.001
Direct bilirubin (mg/dL)	151	0.66 ± 0.46	118	0.250 ± 0.082	<0.001
Indirect bilirubin (mg/dL)	151	2.08 ± 1.59	118	0.244 ± 0.182	<0.001
Iron serum (mcg/dL)	126	123.40 ± 119.94	119	71.14 ± 40.31	<0.001
Lactate dehydrogenase(U/L)	151	858.22 ± 503.81	119	406.27 ± 132.03	<0.001
Hepatic					
Alanine aminotransferase (U/L)	152	28.25 ± 21.34	121	17.36 ± 7.10	<0.001
Total protein (g/dL)	151	7.33 ± 0.848	119	7.31 ± 0.62	0.695
Albumin (g/dL)	151	4.07 ± 0.675	119	4.24 ± 0.49	0.249
Globulin (g/dL)	151	3.26 ± 0.781	119	3.06 ± 0.63	0.109
Albumin/Globulin ratio	151	1.35 ± .54	112	1.44 ± .42	0.289
Renal					
Urea nitrogen (mg/dL)	150	17.73 ± 6.41	120	21.65 ± 5.92	<0.001
Creatinine (mg/dL)	151	0.51 ± 0.50	120	0.523 ± 0.185	0.708
Inflammation					
C-reactive protein (mg/L)	148	7.08 ± 11.97	102	2.01 ± 2.29	<0.001
Alpha 1-antitrypsin (mg/dL)	151	152.50 ± 46.18	129	137.48 ± 43.36	0.013
Ferritin (ng/mL)	152	313.32 ± 361.44	117	37.29 ± 28.28	<0.001
Antistreptolysin-O(Ul/mL)	148	192.70 ± 285.42	101	132.75 ± 131.19	0.181

* percentage Mann-Whitney test

Table 2 Laboratory value associations with HDL-C and Triglycerides in sickle cell disease

	HDL Cholesterol (mg/dL)		Triglycerides (mg/dL)	
	r	p	r	p
Hemoglobin				
S hemoglobin (%)	-0.311	0.002	0.286	0.005
Fetal hemoglobin (%)	-0.048	0.644	-0.685	0.685
Hemolysis				
RBC ($\times 10^6$ /cu mm)	0.328	<0.001	-0.190	0.019
Hemoglobin (g/dL)	0.292♣	<0.001	-0.202	0.013
Hematocrit (%)	0.309	<0.001	-0.189	0.020
Mean Cell Volume (fL)	-0.273♣	0.006	0.126	0.125
Mean Cell Hemoglobin (pg)	-0.284♣	0.002	0.111	0.175
Reticulocyte Count (%)	-0.170♣	0.046	0.082	0.339
Leukocyte				
Leukocyte Count ($\times 10^9$ /L)	-0.198♣	0.015	0.081	0.325
Neutrophil Count ($\times 10^9$ /L)	0.017♣	0.838	-0.154	0.061
Monocyte Count ($\times 10^9$ /L)	-0.234	0.004	0.139	0.089
Platelets				
Platelet Count ($\times 10^9$ /L)	-0.228♣	0.005	0.233	0.004
Hemolysis plus Hepatic				
Aspartate aminotransferase (U/L)	-0.235♣	0.004	0.207	0.011
Total bilirubin (mg/dL)	-0.298♣	<0.001	0.165	0.044
Direct bilirubin (mg/dL)	-0.471	<0.001	0.035	0.669
Indirect bilirubin (mg/dL)	-0.287	<0.001	0.140	0.088
Iron Serum (mcg/dL)	-0.186	0.038	0.159	0.076
Lactate dehydrogenase (U/L)	-0.375	<0.001	0.167	0.041
Hepatic				
Alanine aminotransferase (U/L)	-0.172	0.035	0.075	0.364
Total protein (g/dL)	-0.021♣	0.793	0.274	0.001
Albumin (g/dL)	0.102	0.213	0.142	0.083
Globulin (g/dL)	-0.124♣	0.129	0.133	0.104
Albumin/Globulin ratio	0.033	0.689	-0.033	0.684
Renal				
Urea nitrogen (mg/dL)	0.178	0.030	0.020	0.806
Creatinine (mg/dL)	0.118	0.152	0.105	0.201
Lipid metabolism				
Total Cholesterol (mg/dL)	0.299♣	<0.001	0.268	0.001
HDL Cholesterol (mg/dL)	—	—	-0.228	0.005
LDL Cholesterol (mg/dL)	-0.083♣	0.312	0.068	0.409
VLDL Cholesterol (mg/dL)	-0.242	0.003	0.998	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	-0.228	0.005	—	—
Inflammation				
C-reactive protein (mg/L)	0.048	0.563	-0.031	0.714
Alpha 1 antitrypsin (mg/dL)	-0.327♣	<0.001	-0.074	0.378
Ferritin (ng/mL)	-0.032	0.699	0.102	0.220
Antistreptolysin O (U/ml)	-0.079	0.339	0.157	0.058

Spearman or Pearson correlation coefficients (r) and p values (p) ♣ r = Pearson correlation coefficient

High serum levels of LDL-C, VLDL-C and total cholesterol lipoproteins, TRIG, ferritin and A1AT but not HDL-C were associated with the occurrence of cholelithiasis (Figure 1).

Discussion

The present study analyzed levels of HDL-C in steady-state children with SCD. Children with SCD, even in steady-state, have differences in several biomarkers as compared to healthy age-matched children [13]. Those differences are related to numerous mechanisms associated with infection, inflammation and VOE in the disease [1,2]. Several biomarkers associated with hemolysis, inflammation, renal metabolism, hepatic metabolism, and lipid metabolism in children with SCD and healthy subjects were studied, and the findings of normal concentrations of protein and globulin as well as the albumin/globulin ratio among the SCD patients suggest an absence of early severe liver cell damage in the studied group [13]. Normal levels of creatinine in the patient group confirm previous observations that an increased rate of creatinine secretion by dysfunctional renal tubules may lead to a falsely normal plasma creatinine and creatinine clearance. A more accurate evaluation of different aspects of SCD nephropathy, emphasizing proteinuria and hyperfiltration, needs to be developed in children in order to detect early renal alteration [14-16].

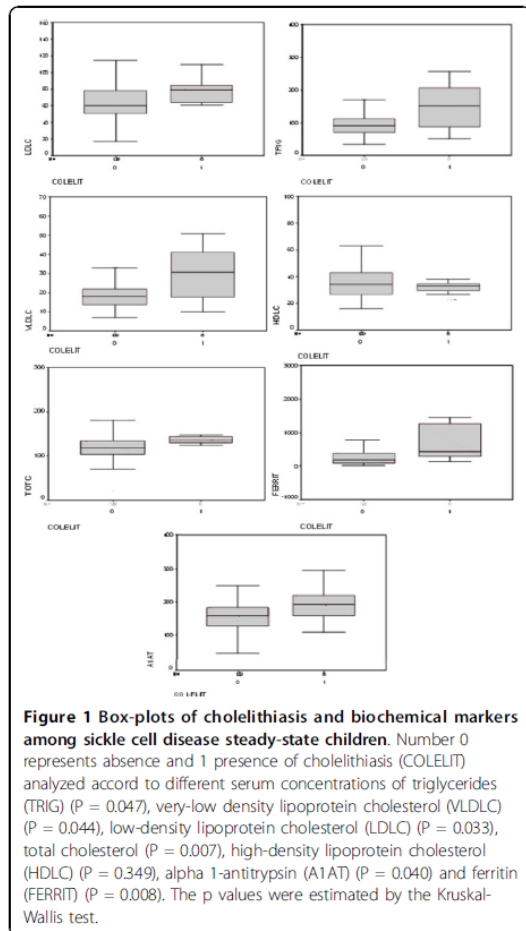
Hypocholesterolemia has been described in SCD patients with significantly decreased LDL-C and HDL-C [17-22] and has been also described for our group as a potential biomarker for SCD clinical severity [23]. A negative association was found for HDL-C and VLDL-C, which was directly associated with triglycerides. Triglyceride-rich VLDL-C particles availability may play an important role in lipid oxidization in SCD patients. It has been suggested that VLDL-C is an important factor for atherosclerosis development. VLDL-C particles assemble by a complex process that includes an apolipoprotein B (apoB)-containing VLDL precursor and a VLDL-sized lipid droplet lacking apoB. Both particles fuse to produce a mature VLDL particle [24]. The increase of triglycerides probably contributes to an increase in the hepatic production of VLDL-C, increasing the number of receptors for LDL-C that is extensively metabolized, decreasing its serum levels. However, the role of cholesterol and triglycerides and the regulation of assembly and production of VLDL-C are poorly understood.

A negative association was observed between LDH and HDL-C, showing that HDL-C, as measured by its

Table 3 Laboratory values for sickle cell disease patients with different steady-state levels of HDL-C

	HDL less than 40 mg/dL		*HDL at least 40 mg/dL		*p
	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	
Hemolysis					
RBC (× 10 ⁹ /cu mm L)	103	3.01 ± 0.85	48	3.75 ± 1.0	<0.001
Hemoglobin (g/dL)	103	8.57 ± 2.02	48	9.76 ± 1.75	0.001
Hematocrit (%)	103	26.42 ± 6.17	48	30.43 ± 5.37	<0.001
Mean Cell Volume (fL)	103	89.17 ± 10.34	48	83.52 ± 11.01	0.003
Mean Cell Hemoglobin (pg)	103	28.94 ± 3.52	48	26.82 ± 3.79	0.001
Mean Cell Hemoglobin Concentration (%)	103	32.44 ± 0.96	48	32.07 ± 0.86	0.025
Erythroblast (%)	103	1.90 ± 2.31	48	1.02 ± 2.48	0.034
Reticulocyte count (%)	97	8.34 ± 4.55	42	5.90 ± 5.25	0.006
Hemoglobins					
S hemoglobin (%)	97	79.22 ± 16.16	44	60.75 ± 18.22	<0.001
Fetal hemoglobin (%)	97	7.55 ± 5.99	44	7.41 ± 6.78	0.899
Leukocyte					
Leukocyte Count (× 10 ⁹ /L)	103	14105.83 ± 6085.37	48	10868.75 ± 4416.13	0.001
Neutrophil Count (× 10 ⁹ /L)	103	6723.36 ± 4167.75	48	4971.83 ± 2459.10	0.002
Monocyte Count (× 10 ⁹ /L)	103	910.35 ± 499.84	48	604.69 ± 361.83	0.004
Platelets					
Platelet Count (× 10 ⁹ /L)	103	424.90 ± 160.26	48	357.69 ± 148.02	0.015
Hemolysis plus Hepatic					
Aspartate aminotransferase (U/L)	103	51.45 ± 26.29	48	40.65 ± 20.32	0.013
Total bilirubin (mg/dL)	103	3.13 ± 1.82	48	1.88 ± 1.25	<0.001
Direct bilirubin (mg/dL)	103	0.79 ± 0.47	48	0.38 ± 0.25	<0.001
Indirect bilirubin (mg/dL)	103	2.34 ± 1.68	48	1.50 ± 1.20	0.002
Iron serum (mcg/dL)	95	136.65 ± 133.77	31	82.77 ± 40.17	0.029
Lactate dehydrogenase (U/L)	103	977.19 ± 524.50	48	602.92 ± 339.59	<0.001
Lipid metabolism					
Total Cholesterol (mg/dL)	103	116.49 ± 25.17	48	131.06 ± 25.73	0.001
LDL Cholesterol (mg/dL)	103	65.78 ± 21.47	48	63.19 ± 23.81	0.506
VLDL Cholesterol (mg/dL)	103	21.62 ± 10.31	48	17.90 ± 6.38	0.023
Triglycerides (mg/dL)	102	107.74 ± 51.64	48	90.02 ± 31.86	0.030
Hepatic					
Alanine aminotransferase (U/L)	103	29.90 ± 22.10	48	24.58 ± 19.56	0.156
Total protein (g/dL)	103	7.40 ± .89	48	7.46 ± .82	0.684
Albumin (g/dL)	103	4.01 ± .75	48	4.23 ± .59	0.054
Globulin (g/dL)	103	3.36 ± .85	48	3.23 ± .72	0.333
Albumin/Globulin ratio	103	1.34 ± .55	48	1.38 ± .53	0.709
Renal					
Urea nitrogen (mg/dL)	102	17.25 ± 6.70	47	18.77 ± 5.73	0.181
Creatinine (mg/dL)	103	0.49 ± 0.50	47	0.57 ± 0.50	0.315
Inflammation					
C-reactive protein (mg/L)	101	7.79 ± 14.02	46	5.39 ± 5.18	0.133
Alpha 1 antitrypsin (mg/dL)	102	163.13 ± 44.06	48	128.92 ± 42.13	<0.001
Ferritin (ng/mL)	103	300.76 ± 399.59	46	323.46 ± 348.87	0.740
Antistreptolysin O (U/mL)	101	198.62 ± 288.98	46	183 ± 282.56	0.759

* unpaired t-test ** 80 HBSS and 23 HBSC ***23 HBSS and 25 HBSC



concentration, may function as a prognostic marker of intravascular hemolysis and endothelial dysfunction given its anti-inflammatory, anti-oxidative, anti-aggregation, anti-coagulant and pro-fibrinolytic activities [25,26].

Sickle cell disease patients with higher HDL-C levels presented a low risk of hemolysis and endothelial dysfunction, including lower reticulocyte and erythroblast counts as well as a lower HbS concentration and it may be related to the high consumption of cholesterol due to acceleration of blood marrow cell production during hemolysis crisis. Sickle cell disease patients with higher HDL-C levels had lower leukocyte, monocyte and platelet counts as well as a lower concentration of hepatic and hemolytic markers and significantly lower VLDL-C, triglycerides and A1AT concentrations; this may reflect the action of the anti-inflammatory and anti-oxidative

properties of this biomarker [25,26]. The high-density lipoprotein cholesterol removes excess cholesterol from peripheral tissues and transports it to the liver for excretion via bile by reverse cholesterol transport. The high-density lipoprotein is made up of several particles with different composition and function [24,27,28].

Further confirmation of these associations came from comparing HDL-C concentrations and patients' clinical records, which revealed a higher occurrence of pneumonia and cardiac abnormalities among those with lower HDL-C levels. The results related to pneumonia risk can be explained by the production of auto-antibodies specific to oxidized phospholipids; these auto-antibodies have been shown to inhibit macrophage uptake of oxidized LDL and to provide protection against virulent pneumococcal infection [29]. Low levels of HDL-C are an important cardiovascular risk factor, and HDL-C and apoA-I have been shown to decrease lesions and improve vascular reactivity in animal models of atherosclerosis and in humans; these changes may be due to the reduction of oxidized lipids and the enhancement of reverse cholesterol transport [30]. The presence of pulmonary hypertension was shown to be associated with several laboratory test alterations [31]. Recent study has also demonstrated the important role of the apolipoprotein pathway and its association with endothelial dysfunction in SCD patients with pulmonary hypertension [31].

Patients with lower HDL-C levels were also likely to have had more blood transfusions; this can be linked with a more severe clinical course of disease, once that it is a therapeutic strategy used to prevent several clinical symptoms, such as stroke [1].

It is well known that gallstones in patients with hemolytic anemia are said to be calcium bilirubinate stones. In view our results of correlation of cholesterol and triglycerides with hemolysis, we propose that the stones in SCD patients could be related directly to hemolysis and bilirubin generation, and indirectly to cholesterol and lipids and it could be a novel observation and needs to be confirmed by further studies. The association of acute-phase proteins and cholelithiasis may be explained by the response to stress due to traumatic injury or infection-related mechanisms including hypermetabolism and protein catabolism associated with a cytokine-driven inflammatory response.

Conclusions

In conclusion, we hypothesize that some SCD patients can have a specific dyslipidemic subphenotype characterized by low HDL-C with hypertriglyceridemia and high VLDL-C in association with other biomarkers, including those related to inflammation. This represents an important step toward a more reliable clinical

prognosis. Additional studies are warranted to test this hypothesis and the probably mechanisms involved in this complex network of markers and their role in SCD pathogenesis.

Abbreviations

SCD: Sickle cell disease; VOE: vaso-occlusive pain episodes; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low-density lipoprotein cholesterol; LDH: lactate dehydrogenase; CRP: C-reactive protein; A1AT: alpha 1-antitrypsin; ASO: antistreptolysin-O; HB: hemoglobin; HbF: hemoglobin fetal; HPLC: high performance liquid chromatography; RBC: red blood cells; MCV: mean cell volume; MCH: mean cell hemoglobin; MCHC: mean cell hemoglobin concentration; HbS: hemoglobin S; COLELIT: cholelithiasis.

Acknowledgements

The authors would like to thank the subjects from HEMOBA and PHAR-UFBA who participated in the study. They are also grateful for the expertise provided by the staff of FIOCRUZ, HEMOBA and PHAR-UFBA. This work was supported by grants from the Brazilian National Council of Research (CNPq) (3065427/2007-5 and 484457/2007-1) (M.S.G.); the Foundation of Research and Extension of Bahia (FAPESB) (1431040053063 and 9073/2007) (M.S.G.); and MCD/CNPq/MS-SCITE-DECIT (409800/2006-6), (M.S.G.). The sponsors of this study are public or nonprofit organizations that support science in general. They had no role in gathering analyzing, or interpreting the data.

Author details

¹Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação de Pesquisa Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil. ²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil. ³Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA), Salvador, Bahia, Brasil. ⁴Hospital Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

Authors' contributions

MOS performed experiments and analyzed the results; LR, MBC, JM, RDC, and AMA performed experiments; IML, VML and LR performed clinical evaluation of patients; MGR analyzed the results; and MSG was the principal investigator and takes primary responsibility for the paper, designed the research, analyzed the results and wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 12 July 2010 Accepted: 27 August 2010

Published: 27 August 2010

References

- Ohene-Frempong K, Steinberg MH: **Clinical Aspects of sickle cell anemia in adults and children.** In *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management.* Edited by: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. New York: Cambridge University Press; 2001:611-70.
- Stuart MJ, Nagel RL: **Sickle cell disease.** *Lancet* 2004, **364**:1343-60.
- Nagel RL, Platt OS: **General pathophysiology of sickle cell anemia.** In *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management.* Edited by: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. New York: Cambridge University Press; 2001:494-526.
- Sebastiani P, Nolan VG, Baldwin CT, Abad-Grau MM, Wang L, Adewoye AH, McMahon LC, Farrer LA, Taylor JG, Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH: **A network model to predict the risk of death in sickle cell disease.** *Blood* 2007, **110**:2727-2763.
- Okpala I: **The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease - a red cell disorder.** *Blood Reviews* 2004, **18**:65-73.
- Telen MJ: **Role of adhesion molecules and vascular endothelium in the pathogenesis of sickle cell disease.** *Hematology Am Soc of Hematol Educ Program* 2007, **2007**:84-90.
- Villagra J, Shiva S, Hunter LA, Machado RF, Gladwin MT, Kato GJ: **Platelet activation in patients with sickle cell disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin.** *Blood* 2007, **110**:2166-2172.
- Johnson C, Telen MJ: **Adhesion molecule and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease.** *Hematologica* 2008, **93**:481-486.
- Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP: **Serial review: Biomedical implications for hemoglobin interactions with nitric oxide.** *Free Radical Biology & Medicine* 2003, **36**:707-717.
- Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM Jr, Gladwin MT: **Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease.** *Blood* 2006, **107**:2279-2285.
- O'Driscoll S, Height SE, Dick MC, Rees DC: **Serum lactate dehydrogenase activity as a biomarker in children with sickle cell disease.** *Br J Haematol* 2007, **140**:206-209.
- Azevêdo ES: **Subgroup studies of black admixture within a mixed population of Bahia, Brazil.** *Ann Hum Genet* 1980, **44**:55-60.
- Isichei UP: **Liver function and the diagnosis significance of biochemical changes in the blood of African children with sickle cell disease.** *J Clin Pathol* 1980, **33**:626-630.
- Skalar AH, Campbell H, Caruana RJ, Lightfoot BO, Gaier JG, Milner P: **A population study of renal function in sickle cell anemia.** *Int J Artif Organs* 1990, **13**:231-236.
- Skalar AH, Perez JC, Harp RJ, Caruana LR: **Acute renal failure in sickle cell anemia.** *Int J Artif Organs* 1990, **13**:347-351.
- Marouf R, Mojiminiyi O, Abdella N, Kortom M, Al Wazzan H: **Comparison of renal function markers in Kuwaiti patients with sickle cell disease.** *J Clin Pathol* 2006, **59**:345-351.
- Sasaki J, Waterman MR, Buchanan GR, Cottam GL: **Plasma and erythrocyte lipids in sickle cell anaemia.** *Clin Lab Haematol* 1983, **5**:35-44.
- Vanderjagt DJ, Huang YS, Chuang LT: **Phase angle and n-3 polyunsaturated fatty acids in sickle cell disease.** *Arch Dis Child* 2002, **87**:252-254.
- Vanderjagt DJ, Shores J, Okorodudu A, Okolo SN, Glew RH: **Hypocholesterolemia in Nigerian children with sickle cell disease.** *J Trop Pediatr* 2002, **48**:156-161.
- Shores J, Peter son J, Vanderjagt D, Gless RH: **Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease.** *J Natl Med Assoc* 2003, **95**:813-817.
- Djoumessi S, Zekeng L, Lando G, Zeukeng D: **Serum lipids and atherogenic risk in sickle-cell trait carriers.** *Ann Biol Clin* 1994, **52**:663-665.
- Zorca S, Freeman L, Hildesheim M, Allen D, Remaley AT, Taylor JG, Kato GJ: **Lipid levels in sickle-cell disease associated with haemolytic severity, vascular dysfunction and pulmonary hypertension.** *Br J Haematol* 2010, **149**:436-45.
- Magda Oliveira Seixas, Larissa Rocha, Mauricio Carvalho, Joelma Menezes, Isa Lyra, Valma Nascimento, Ricardo Couto, Ajax Atta, Mitermayer Galvão Reis, Marilda Souza Gonçalves: **Lipoprotein Cholesterol and Triglycerides in Children with steady-state sickle cell anemia [Abstract].** *Blood* 2009, **114**:s1547.
- Prinsen BHCMT, Romijn JA, Bisschop PH: **Endogenous cholesterol synthesis is associated with VLDL-2 apo-B100 production in healthy humans.** *J Lipid Res* 2003, **44**:1341-1348.
- Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G, von Eckardstein A: **HDL arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport.** *Atherosclerosis* 2002, **161**:1-16.
- Fredenrich A, Bayer P: **Reverse cholesterol transport, high density lipoproteins and HDL cholesterol: recent data.** *Diabetes Metab* 2003, **29**:201-205.
- Miyazaki O, Fukamavhi I, Mori A: **Formation of pre β 1-HDL during lipolysis of triglyceride-rich lipoprotein.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **379**:55-59.
- Pearson T, Wattis JA, O'Malley B: **Mathematical modeling of competitive LDL/VLDL binding and uptake by hepatocytes.** *J Math Biol* 2009, **58**:845-880.
- Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G, Hama S, Lusis AJ, Castellani LW, Reddy S, Shih D, Shi W, Watson AD, Van Lenten BJ, Vora D, Fogelman AM: **HDL and inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, **21**:481-488.

30. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST: **The oxidation hypothesis hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL.** *J Lipid Res* 2004, **45**:9932-1007.
31. Minniti CP, Sable C, Campbell A, Rana S, Ensing G, Dham N, Onyekwere O, Nouraié M, Kato GJ, Gladwin MT, Castro OL, Gordeuk VR: **Elevated tricuspid regurgitant jet velocity in children and adolescents with sickle cell disease: association with hemolysis and hemoglobin oxygen desaturation.** *Haematologica* 2009, **94**:340-347.

doi:10.1186/1476-511X-9-91

Cite this article as: Seixas *et al.*: Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. *Lipids in Health and Disease* 2010 **9**:91.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



***PON 1* gene polymorphisms and Paraoxonase levels: association with clinical and laboratorial markers in sickle cell disease .**

^{1,2} Joelma F. Menezes, ^{1,3} Larissa Rocha,^{1,2} Magda O. Seixas, ² Felipe Santos,² Elisangela V. Adorno, ² Cyntia C. Souza,^{3,4} Isa M. Lyra,^{3,4} Valma M. L. Nascimento,² Ricardo D. Couto, ¹ Alberto Barros, ¹ Mitermayer G. Reis,^{1,2} and Marilda S. Goncalves

¹ Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação de Pesquisa Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil.

² Departamento de Toxicologias e Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

³ Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA), Salvador, Bahia, Brasil.

⁴ Hospital Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

Email: Joelma F. Menezes- joelma_menezes@hotmail.com; Larissa Rocha- larissa@hemoba.ba.gov.br; Magda O. Seixas- magdaseixas@bahia.fiocruz.br; Cyntia C. Souza- cyntiacs@hotmail.com; Isa M. Lyra- isalyra@gmail.com; Valma M. L. Nascimento- valma.lopes@oi.com.br; Ricardo D. Couto- rdc@ufba.br; Alberto Mitermayer G. Reis- miter@bahia.fiocruz.br; Marilda S. Goncalves*- mari@bahia.fiocruz.br

*Corresponding author: Marilda Souza Goncalves, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Fiocruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP: 40296-710, Salvador, Bahia, Brasil or at mari@bahia.fiocruz.br.

Key Words: Sickle cell disease, Paraoxonase, HDL-C, biomarkers

ABSTRACT

Background: The paraoxonase (PON) is a serum glycoprotein associated with ApoA-I in high-density lipoproteins (HDLs). The variability of the PON activity has been associated to different gene polymorphisms related as *PON1*, *PON2* and *PON3*. This study aims to establish the association of paraoxonase levels, *PON1* gene polymorphisms (M55L and R192Q) and clinical and laboratorial markers in sickle cell disease (SCD) patients.

Methods: We analyzed 154 SCD and 196 health individuals in pediatric as a control group. The biochemical, inflammatory and hematological biomarkers were estimated using immunochemistry, immunoassay and electronic cell counter respectively. Clinical data were collected from patient medical records. Molecular analyses were performed by PCR and PCR-RFLP techniques.

Results: The allelic frequency of *PON1*192R of the SCD patients group was 0.38 and to *PON1*192Q was 0.62. The allelic frequency of the control group individuals was 0.45 for the *PON1*192R and 0.55 for *PON1*192Q. The allelic frequency of *PON1*M55L gene polymorphism was 0.91 for the *PON1*55L and 0.09 for the *PON1*55M among the SCD patients group. The allelic frequency of the *PON1*55L was 0.85 and for the *PON1*55M was 0.15 among individuals for the control group. The *PON1* gene polymorphisms allelic frequencies were not in Hardy-Weinberg equilibrium. Patients with genotype RR for *PON1*192 and MM for *PON1*55 showed less activity of paraoxonase than the others genotypes. In the lipid metabolism analyses the genotypes MM and RR showed lower values than the other genotypes. Was found statistical significance to VLDL-C e Triglycerides and polymorphism *PON1*c.192Q>R. To hematological data and polymorphism *PON1*c.55L>M was found statistical significance to Platelet (p=0.0109); to biochemical data polymorphism *PON1*c.55L>M was found statistical significance to creatinine (p=0.0329) and PCR (p=0.0141). The clinical characteristic was found statistical significance to stroke (p=0.049) and splenectomy (0.0108) and polymorphism *PON1*55.

Conclusion: In SCD patients the presence of polymorphisms in *PON1* gene, which alter its activity, may represent a risk factor leading to a worsening of clinical symptoms of these individuals. Further studies are needed to confirm the polymorphism of the *PON1* gene as a risk factor for patients with sickle cell disease.

Introduction

The paraoxonase-1 (PON1) is an arylalkylphosphatase, glycoprotein synthesized by the liver that circulates in serum associated with apoA-I of the high-density lipoproteins cholesterol (HDL-C). The *PON* genes are located to chromosome 7q21-q22 and contain three members *PON1*, *PON2* and *PON3* and the variability of the PON activity has been associated to polymorphisms in these genes [1]. The *PON1* gene has been shown to play important role in lipid metabolism and in cardiovascular disease and atherosclerosis [3]. It has been identified two polymorphisms in the coding region of the *PON1* gene, one where methionine replaces leucine at position 55 (*PON1* 55 M/L); and other where arginine replaces glutamine at position 192 (*PON1* 192 R/Q). The frequency of the *PON1* varies among human populations [7]. The *PON2* has two polymorphisms, the 148 G/A where glycine replaces arginine and the 311 C/S where cysteine replaces serine. No genetic variants have been reported for *PON3* [7, 8, 9].

The high-density lipoprotein cholesterol is a relevant cardio vascular risk factor and is a fraction of total cholesterol and is compound by a group of particles originally obtained by ultracentrifugation of plasma [10, 11]. The main apolipoproteins of HDL-C are apoA-I and apoA-II, although others, such as apoA-IV, apoA-V, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD and apoE, may be present [11].

Previous studies reported that PON1 has antioxidative and anti-inflammatory properties, hydrolyzes oxidized lipids in low-density lipoproteins cholesterol (LDL-C), atherosclerotic lesions and macrophages, preventing the initiation and progression of atherosclerotic lesion [4, 5, 6]. The HDL has an anti-atherogenic function and some protective actions including antioxidant protection, mediation of cholesterol efflux, inhibition of cell adhesion molecules expression and leukocyte activation, induction of nitric oxide (NO) production, regulation of blood coagulation and platelet activity [12]. The oxidation of LDL-C is considered the main event involved at atherosclerosis initiation [13, 14]. The oxidized LDL-C (oxLDL-C) act as a chemotactic factor for monocytes and contribute to endothelial cells cytotoxicity, increase of platelets activation, stimulating of migration and proliferation of smooth muscle cell (SMC) and antagonize the NO vasodilator effects [13].

Sickle cell disease is a genetic disorder characterized by the hemoglobin S presence that has complex interactions with endothelial cells, leucocytes, platelets and plasma constituents, leading to vaso-occlusion, which is responsible for the most of clinical features and complications of disease [15, 16,]. The hemoglobin S is susceptible to a slow autoxidation that is followed by O_2^- release [17, 18], leading to chronic cycles of vascular ischemia-reperfusion and tissue injury. This direct tissue ischemia and factors such as plasma hemoglobin-induced endothelial dysfunction, free radical generation and cytokine activation, producing a characteristic chronic inflammatory state [19].

The erythrocytes free radicals generation occurs when there is low Hb S oxygenation. The release of oxygen makes it susceptible to be attack by electrons that are inside the cell. To prevent the superoxide ion (O_2^-) and other radicals' formation, the antioxidant enzymatic system operates through the erythrocyte superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase [20,].

Once that it has been shown that PON1 play important role in lipid metabolism and has antioxidative and anti-inflammatory properties, we analyzed the independent and interactive effects of *PON1* gene polymorphisms on paroxonase levels and assessed potential interactions with relevant clinical and laboratorial status in sickle cell disease patients.

Subjects and Methods

Subjects and Controls

Of 154 pediatric sickle cell disease patients participated of a case-control study. A total of 101(67.8%) with sickle cell anemia with a mean age of 8.657 ± 0.388 and 45 (44.6%) of female; 47 (31.5%) with SC disease, with a mean age of 10.787 ± 0.621 and 23 (48.9%) of female, and one (0.7%) four years old infant with $S\beta$ thalassemia. Patients are attended at Hematology Unit of "Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA)". The study also included 196 healthy individuals in pediatric age that matched to cases by age, gender and African ethnic origin as a control group and were selected from individuals that attended the Clinical laboratory of "Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia". The control group had a mean age of $9.310 (\pm 0.248)$ with 97(49.5%) of female and all had normal hemoglobin profile (AA).

The study was approved by the *Oswaldo Cruz* Research Foundation's human subject research board, and all officials responsible provided written informed consent, in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2000.

Laboratory Methods

The measurements biochemical were performed by spectrophotometric methods. Biochemical markers analyses were measured in serum by immunochemistry assay (A25 system, BIOSYSTEMS SA, Barcelona, Spain). Serum ferritin was measured by immunoassay using an Access® 2 Immunoassay system X2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). C-reactive protein (CRP), alpha 1-antitripsin (A1AT) and anti-streptolysin-O (ASLO) were measured by immunochemistry (Image® 800system, Beckman Coulter, Fullerton, CA). Hematological analyses were carried out using an electronic cell counter, CELL – DYN 3700 (Santa Clara, USA). The hemoglobin (Hb) profile and HbF levels were investigated by high performance liquid chromatography (HPLC / VARIANT I; BIO-RAD, CA, USA). Reticulocytes were counted after blue brilliant cresyl dye.

Pon 1 activity was measured by adding serum preincubated with 5 µmol/L de serine to 1mL of tris- hCl buffer (100 mmol/L, pH 8.0) containing 2 mmol/L CaCl₂ and 5.5 mmol/L paraoxon (O,O-diethyl-O-pnitrophenyl phosphate; Sigma Chemical Co.,U.K.) [37]. The rate of generation of p-nitrophenol (nmol min⁻¹ ml⁻¹ serum) was determined at 25° C, with the use of spectrophotometer (SpectraMax, USA) at 405nm.

The genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using FlexiGene DNA Kit of QIAGEN (Uniscience do Brasil) following the manufacturer guidelines and polymerase chain reaction was performed with thermocycler Eppendorf (Canada). The analysis of fragments was made by race electrophoresis on agarose gel 1% with bromophenol blue/ xilenocianol / sucrose in buffer 1x TAE, the gel was stained with ethidium bromide and visualized under UV light. The specifics primers were used to identify R192Q and M55L mutations to PON1. The primers for position 192 were 5'-TAT.TGT.TGC.TGT.GGG.ACC.TGA.G-3' AND 5'-CAC.GCT.AAA.CCC.AAA.TAC.ATC.TC – 3' for 99 bp DNA ; for position 55 were 5' – GAA.GAG.TGA. TGT. ATA. GCC. CCA. G – 3' AND 5' – TTT.AAT.CCA.GAG.CTA.ATG.AAA.GCC – 3' for 170 bp. The PCR products were

digested by AlwI to R192Q and CviAII to M55L and analyzed in an 8% polyacrilamide gel, stained by ethidium bromide and UV visualized.

Statistical analysis

Baseline characteristics were summarized as means and proportions of selected variables. Distribution of quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Mean values of quantitative variables between groups were compared using the unpaired t-test for normal data distribution and Mann-Whitney for non-normal data. Bivariate correlation analyses were carried out to determine correlations between pairs of variables using Pearson's and Spearman's rank correlation (R). The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare means among two or more groups as measured by interval variables. The interactions between specific categorical clinical variables were tested for significance using a χ^2 test or Fisher's exact test, taking into account the expected frequency in the cell tables. All tests were considered significant if *p* values were less than .05. Data analyses were performed using Prism 5.01 (Graphpad Software, San Diego, CA), EPIinfo 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia) and STATA SE 10 software (StataCorp, Texas, USA).

Results

We analyzed 154 patients with sickle cell disease (SCD), compound by 106 (68.83%) HbSS patients, with a mean age of 8.657 ± 0.388 , being 44.6% of female; 47 (30.52%) HbSC patients with a mean age of 10.787 ± 0.621 , being 48.9% of female and one (0.65%) four years old boy, with S β -Thalassemia. Of 196 individuals with normal hemoglobin profile matched the patient group by age and ethnic origin composed the health control group, which had a mean age of 9.327 ± 3.467 and 49.5% of female. Hematological data of sickle cell disease (SCD) patients and control group are described in table 1.

The mean values for the biochemical parameters that evaluate the lipid profile (Total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, VLDL cholesterol and triglycerides), kidney function (urea and creatinine), liver function (AST, ALT, total

bilirubin and fractions), iron status (serum iron and ferritin) and inflammation (ASLO, PCR and alpha-1 antitrypsin), considered possible risk factors for the population are in table 2. The table 2 had shown the clinical characteristic between SCD and control group.

The frequency of *PON1c.192Q>R* and *PON1c.55L>M* to *PON1* gene in SCD patients and control group are demonstrated in Table 3. In SCD patients the allelic frequency to PON192R is 0.37 and to PON192Q is 0.63; to reference group the allelic frequency to PON192R is 0.45 and to PON192Q is 0.55; To *PON1c.55L>M* polymorphism we found in SCD patients the allelic frequency to PON55L is 0.91 and to PON55M is 0.09; to reference group the allelic frequency to PON55L is 0.85 and to PON55M is 0.15. The polymorphisms were not in Hardy-Weinberg equilibrium.

When we analyzed the activity of paraoxonase median between SCD group and reference group we found statistic difference with SCD had activity of 27.026 ± 24.827 and 13.472 ± 9.840 to control group ($p < 0.000$) (Figure 01). In relation to genotype for mutations investigated we verify that the polymorphism PON192 RR genotype had lower activity (11.447 ± 8.489 μ moles de p-nitrofenol/min/mL) that individuals had a mutation (RQ / QQ) with activity (29.748 ± 26.646 μ moles de p-nitrofenol/min/mL) ($p = 0.0011$) (Figure 02). To polymorphism PON55 the MM genotype present lower activity (14.330 ± 0.000 μ moles de p-nitrofenol/min/mL) than those with the mutation (ML / LL), with activity of (28.144 ± 26.119 μ moles de p-nitrofenol/min/mL).

Analysis of PON1 activity between groups of wild and mutant to polymorphisms *PON1c.192Q>R* and *PON1c.55L>M* in SCD patients showed a statistically significant difference for both polymorphisms with $p = 0.0164$ $p = 0.0328$, respectively figure 03.

Analysis of haematological characteristics with SCD carrier wild and mutant alleles for the polymorphisms *PON1c.55L>M* showed

Analysis of hematological data in individuals with SCD with wild and mutant alleles of the polymorphism *PON1c.55L>M* showed statistically significant differences for platelet count ($p = 0.0109$) (Figure 04). As to the biochemical profile of these individuals there was no statistically significant differences for serum creatinine ($p = 0.0329$) and CRP ($p = 0.0141$) (Figure 05). The analysis of the biochemical characteristics in individuals with SCD with different alleles for polymorphisms *PON1c.192Q>R* showed significant

differences for the variables VLDL cholesterol ($p = 0.0267$) and triglycerides ($p = 0.0127$) (Figure 06).

The analysis of the correlation between PON1 activity and the biochemical variables studied were found statistically significant difference in serum globulin and serum iron, also observed a correlation between hemeoxygenase and serum iron (Figure 07).

The analysis of the clinical histories of SCD patients and their correlation with paraoxonase activity showed a statistically significant difference for stroke, splenectomy, figure 08.

To clinical characteristic of the sickle cell disease patients and *PON* gene polymorphism we observed statistical difference to splenic sequestration and PON55 polymorphism ($p=0.0421$), where verify that of the all of 17 individuals with splenic sequestration were MM genotype. We not found statistical difference between polymorphism PON192 and clinical characteristic of the sickle cell disease patients.

DISCUSS

The sickle cell disease comprises a group of genetic diseases that has the feature the presence of hemoglobin S. Under conditions of low oxygen occur the polymerization of haemoglobin S, process that leads to sickling of the red cell, this events is central to process of vasoocclusion, resulting in ischemia, pain device vaso-occlusive crises, hemolysis [21, 22]. The SCD patients show heterogeneous characteristics clinical with serious complications related to vaso-occlusive crises such as splenic sequestration, acute chest syndrome, ischaemic stroke, priapism, leg ulcers [23, 24]. When analyzed the hematological dates between this patients and reference group we found statistical difference for almost all parameters except MCHC. These results can be explained due to the frequent phenomenon of sickling that lead vaso occlusive event suffered by the patients, with consequent decrease the lifetime of erythrocytes and haemolysis.

The biochemical parameters that evaluate the lipid profile, kidney function, liver function, iron status and inflammation, considered possible risk factors were realized in both groups. We found statistical difference in the inflammatory tests (PCR, ASLO and Alpha -1 antitripsin), iron status (iron and ferritin) and marker of haemolysis (LDH) and marker of lipid profile (Total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides). Many works reporter that SCD patients presents due to repeated sickling phenomena the red cell

membrane fragile and increase haemolysis which explain the our results for LDH higher than reference group. El-Hazmi (1992) reported that several haematological and biochemical abnormalities accompany this disease. Iron and ferritin increased can be consequence to haemolysis or treatment with repeated blood cell transfusion without chelation. The inflammatory tests confirm the status chronic inflammatory characteristic by SCD patients. Our results show that the level of total cholesterol and LDL is lower than reference group and confirm previous studies where patients with SCD had same profile [12, 26].

The frequency of alleles of the *PON* gene shows variability related to ethnicity, this fact is seen in studies with various populations. According to Szabó and colleagues *PON1*c. 192Q>R polymorphism is found in 45% of European population (Caucasian) and American (Caucasian) has the R allele, 12% of the Q allele and 43% of the RQ, while East Africans and American Indians did not have the polymorphism. Several population studies have demonstrated the predominance of the R allele in Asians (Japanese, Chinese and Africans in Central Africa (Benin and Ghana). Since the Q allele seems to be more frequent in North America and Europe. As for the polymorphism *PON1*c.55L>M the L allele appears to be prevalent among Japanese and Chinese (91-94%) and Caucasians (67-74%). In Brazil, Santos and colleagues studied the ten Amazonian Amerindian tribes in Belém demonstrated that the most frequent alleles are the L and R with 97% to 73%. Allebrandt and collaborators studying euro and african-brazilian from Curitiba found significant differences in the genotypic and allelic distribution for PON55, except for genotype M / L. In this study was found a higher frequency of alleles Q (62% in patients and 55% in controls) and L (91% in patients and 85% in controls) both in patients with sickle cell disease as the control group. As the distribution of polymorphic paraoxonase varies depending on the ethnicity of individuals the difference in allele frequency observed may be explained by racial mixing that is characteristic of our population.

The paraoxonase is an enzyme with antioxidant function, numerous studies have associated polymorphisms in PON with diseases such as atherosclerotic coronary disease [48]. Two polymorphisms are well described in literature *PON1*c.55L>M and *PON1*c.192Q>R, these polymorphisms affect the hydrolytic activity of PON1 isoenzymes with respect to lipid peroxide. The activity of glutamine 192 (R allele) and methionine 55 (M allele) has reported a lower activity than arginine 192 (allele Q) and leucine 55 (L allele), as soon PON1 RR and MM genotypes appeared to be effective in protecting against the

oxidation of LDL cholesterol that the genotypes QQ and LL [28]. When analyzing the activity level of PON was found that patients with genotype RR for PON192 and MM to PON55 showed less activity of paraoxonase than the genotypes QQ to PON102 and LL to PON55, thus confirming what the literature reports on the influence of polymorphisms in the variability of enzymatic activity, our data are consistent with Mackness et al. (1998) and Saadatmand et al. (2010). Lawler et al. (2004) found decreased PON1 activity in subjects with alleles Q and M, the controversial data may be due to the substrate in which PON1 operates, because its hydrolytic activity varies with the substrate used according Mackness (1997).

The PON1 circulates on the current sanguine linked to apo A-I in high density lipoprotein (HDL) [1, 12]. HDL is a fraction of serum lipoproteins, has an inverse relationship with total cholesterol, because it is responsible for doing the reverse transport of cholesterol circulating in the liver [12]. This mainly involved in protection against development of coronary disease by potentially anti-aterigenico in this process HDL has several properties as an inhibitor of monocyte chemotaxis, adherence of leukocytes, the oxidation of LDL, platelet activation. The HDL acts as an antioxidant when it reduces oxidative modification of LDL, inhibition of LDL oxidation is attributed to the antioxidant content of lipoproteins and the presence of paraoxonase. [12]. Aviram and colleagues have shown that paraoxonase inhibits the oxidation of HDL. Heinenecke & Lusic (1998) and demonstrated that in addition to hydrolytic activity PON has an important role in lipid metabolism and cardiovascular diseases. In the present study the lipid profile presented by both groups is in agreement with previous work [30] with genotypes MM and RR showed lower values than the other genotypes.

The VLDL-C is a subclass of lipoprotein synthesized in the liver and is responsible for the transport of endogenous products (cholesterol, cholesterol esters, triglycerides, phospholipids) in circulation, which receive the apolipoprotein E and C2 in the capillaries in contact with the lipoprotein lipase (LPL), the action of LPL is the removal of triglycerides from VLDL-c, which turns into LDL-c. The levels of VLDL have been associated with accelerated rate of atherosclerosis and increase in number of diseases and metabolic states [12].

By analyzing the biochemical profile of individuals with SCD for the presence of the polymorphism c.192Q> R observed association with the VLDL-C and triglycerides,

and the individuals with the mutation showed elevated levels. The polymorphism located at position 192 of PON1 gene is a major determinant of enzyme activity. The isoform that has glutamine at this position is eight times lower activity than that which has arginine. Furthermore, several studies have shown an increased risk of CHD in individuals with low activity of paraoxonase, polymorphism at position 55 does not influence either the PON1 enzyme activity as the position 192 [30]. Our findings are consistent with the literature, suggesting the facilitation of oxidative stress status of these individuals confirmed by the data of association with variables related to lipid metabolism and iron and with markers of hemolysis.

With respect to clinical history of individuals with SCD described a statistically significant difference between the activity of paraoxonase and the occurrence of stroke and the levels of PON1 activity in splenectomized patients, confirming the antioxidant activity of PON1. Many diseases are associated with oxidative stress, such as the HbSS and cardiovascular diseases. In the present study described the association of PON1 polymorphism c.55L> M and platelets in SCD patients, and that individuals with mutant genotype had platelet counts decreased. According to Freedman (2008), oxidative stress and decreased antioxidant capacity seen in coronary artery disease may also be associated with changes in platelet function. The presence of the polymorphism PON1c.55L> M alters enzyme activity and its antioxidant function [31, 32] and thus may favor the establishment of oxidative stress in HbSS individuals. The evaluation of the biochemical profile and the presence of the polymorphism PON1c.55L> M HbSC individuals in this study showed the association of high serum urea, creatinine and bilirribuna direct the mutant group, such findings may be a consequence of oxidative stress present in these individuals, where probably the antioxidant capacity of PON1 is decreased due to the mutant allele for the polymorphism involved in causing the occurrence of possible kidney damage and hemolysis.

The PON appears to prevent the accumulation of lipoperoxide in LDL and thus prevent the propagation of lipid peroxidation as a consequence of the action of free radicals with oxidized LDL. In SCD patients the presence of polymorphisms in *PON1* gene, which alter its activity, may represent a risk factor leading to a worsening of clinical symptoms of these individuals. Further studies are needed to confirm the polymorphism of the *PON1*

gene as a risk factor for patients with sickle cell taking into account the racial characteristics of the population.

TABLES LIST

Table 1. Hematological data of sickle cell disease (SCD) patients and control group.

	SCD N=154 Mean \pm SD	Control group N=196 Mean \pm SD	p Value
Age (years)	9.285 \pm 4.050	9.327 \pm 3.467	----
Sex			
Male (%)	83 (54.3)	98 (50.3)	----
Female (%)	70 (45.8)	97 (49.7)	----
Red blood cells (X10⁶/cu mm L)	3.2311 \pm 0.664	4.7184 \pm 0.3760	0.000* *
Hemoglobin (g/dL)	8.9247 \pm 2.005	12.7240 \pm 1.0828	0.000* *
Hematocrit (%)	27.6019 \pm 6.2038	38.2123 \pm 2.8752	0.000* *
MCV (fl)	87.5234 \pm 10.8127	81.1701 \pm 5.1897	0.000* *
MCH (pg)	28.3494 \pm 3.7510	27.0279 \pm 2.0011	0.000* *
MCHC (%)	32.3597 \pm 0.9868	33.2221 \pm 1.1093	0.000* *
White blood cell (10⁹/L)	13081.8182 \pm 5744.8295	6965.1282 \pm 2138.9405	0.000* *
Reticulocytes (%)	7.4039 \pm 4.7826	0.8680 \pm 0.2712	0.000* *

Platelet (10⁹/L)	405.5390	±	303.2194 ± 67.9722	0.000*
	158.2528			*
Neutrophils (10⁶/L)	6128.331	±	45.471 ± 11.804	0.000*
	3001.368			*
Monocyte (10⁶/L)	811.234 ± 483.582		526.814±420.188	0.000*
				*
Typical lymphocyte (10⁶/L)	5063.208 ± 2353.		2753.328±846.877	0.000*
	853			*

** Teste de Mann-Whitney

Table 2. Table2. Mean values of biochemical markers among SCD patients and individuals from the control group.

	N	SCD Mean ± SD		N	Control group Mean ± SD	p value
Total cholesterol, mg/dL	1	121.317	±	1	164.414 ± 35.943	0.00
	52	26.460		86		0**
HDL cholesterol, mg/dL	1	32.297	±	1	47.039 ± 12.950	0.00
	52	10.038		84		0**
LDL cholesterol, mg/dL	1	67.475	±	1	99.322 ± 33.095	0.00
	52	22.373		83		1**
VLDL cholesterol, mg/dL	1	22.485	±	1	17.924 ± 9.796	0.00
	52	10.945		84		2**
Triglycerides, mg/dL	1	112.110	±	1	89.197 ± 48.855	0.00
	51	54.835		83		0**
Urea, mg/dL	1	17.356 ± 6.579		1	21.833 ± 6.068	0.00
	51			80		0**
Creatinine, mg/dL	1	0.448 ± 0.186		1	0.557 ± 0.200	0.00
	52			78		3**
Iron, mcg/dL	1	136.320	±	1	74.740 ± 40.175	0.00
	27	126.114		77		0**
Ferritin, ng/dL	1	395.413	±	1	38.0804 ± 25.765	0.00
	53	414.651		77		0**
AST, U/L	1	55.723± 26.747		1	32.199 ± 10.499	0.000**
	53			81		
ALT, U/L	1	30.455	±	1	18.389 ± 7.316	0.00
	53	24.333		80		0**

Total bilirubin, mg/dL	1	3.331 ± 1.782	1	0.506 ± 0.218	0.00
	52		75		0**
Direct bilirubin, mg/dL	1	0.777 ± 0.532	1	0.252 ± 0.098	0.00
	52		74		0**
Indirect bilirubin, mg/dL	1	2.553 ± 1.641	1	0.254 ± 0.177	0.00
	52		74		0**
Totals Proteins, g/dL	1	7.353 ± 0.939	1	7.251 ± 0.620	0.03
	52		77		9**
Albumin, g/dL	1	4.024 ± 0.723	1	4.167 ± 0.601	0.46
	52		77		2**
Globulins, g/dL	1	3.330 ± 0.843	1	3.084 ± 0.631	0.00
	52		77		5**
LDH, U/L	1	1034.584±	1	357.511 ±	0.00
	52	501.950	76	143.016	0**
ASLO, UI/mL	1	207.784 ±	1	134.944 ±	0.00
	52	296.649	93	137.578	0**
PCR mg/L	1	7.626 ± 13.273	1	3.932 ± 15.814	0.00
	52		93		0**
Alpha antitrypsin, mg/dL	1-	160.832 ±	1	136.097 ± 39.109	0.00
	52	45.345	92		0**

** Teste de Mann-Whitney

Table 3. The clinical characteristics presented by SCD patients.

	N	HbSS Patients (%)	HbSC Patients (%)	P Value	O R	IC	
Acute chest syndrome	11/13 9	08 (72.7)	03 (27.3)	0.512 3**	0. 79	0.15 3.55	-
Blood transfusion	73/13 8	64 (87.7)	09 (12.3)	< 0.001*	0. 12	0.05 0.31	-
Hospitalized	112/1 38	82 (73.2)	30 (26.8)	0.014 9*	0. 31	0.12 0.83	-
Infection	64/11 3	47/77 (61.04)	17/36 (47.22)	0.239 1*	1. 75	0.73 4.20	-
Leg ulcer	02/13 8	01/94 (1.06)	01/44 (2.27)	0.537 6	0. 46	0.01 37.13	-
Painful crisis	111/1 39	79/95 (83.15)	32/44 (72.73)	0.230 6*	1. 85	0.71 4.70	-
Pneumonia	74/13 8	62/94 (65.96)	12/44 (27.27)	< 0.001*	5. 17	2.21 12.45	-
Priapism	05/67	04/45	01/19	0.531	1.	0.16	-

		(8.89)	(5.26)	5**	76	91.22	
Splenic sequestration	18/13 7	17/94 (18.08)	01/43 (2.32)	0.023 7**	9. 27	1.34 396.58[‡]	-
Stroke	08/13 8	07/94 (7.45)	01/44 (2.27)	0.211 7**	3. 46	0.42 159.50	-
Vase-occlusion	118/1 44	80/95 (8.42)	34/44 (77.27)	0.0.61 97*	1. 38	0.51- 3.59	

* = χ^2 ; ** = Fisher exact

Table 4. The frequency of polymorphism *PON1* c.192Q>R and *PON1* c.55L>M among SCD patients and reference group.

Polymorphis m	SCD patients N (%)	Genoty pic Freque ncy	Allele Freque ncy	Refere nce group N (%)	Genoty pic Freque ncy	Allele Freque ncy
PON1c.192R >Q						
QQ	49 (36.8)	0.368	0.620	50 (27.3)	0.273	0.547
RR	17 (12.9)	0.128	0.380	33 (18.0)	0.180	0.453
RQ	67 (50.3)	0.503		100 (54.6)	0.547	
<i>PON1</i>c.55L> M	N (%)			N (%)		
LL	108 (83.1)	0.831	0.912	137 (74.0)	0.740	0.846
MM	01 (0.8)	0.008	0.088	09 (4.9)	0.049	0.154
LM	21 (16.2)	0.161		39 (21.1)	0.211	

Tables 5. Levels of PON1 activity in different genotypes for the polymorphisms *PON1* c.192Q> R and *PON1* c.55L> M in individuals with SCD and controles.

Polymorphism	Ac tv. PON1		Valor de p
<i>PON1</i> c.192Q>R	SCD	Control	
QQ	37.286± 3.854	12.458± 10.173	0.109**
RR	11.447± 8.489	11.546± 7.561	0.144**
QR	24.364± 8.517	14.704± 10.477	0.027**
<i>PON1</i> c.55L>M			
LL	30.351± 27.204	14.643± 9.571	0.002**
MM	14.330± 0.000	29.470± 17.409	0.252**
LM	15.569± 7.841	6.971± 17.409	0.176**

FIGURE LIST

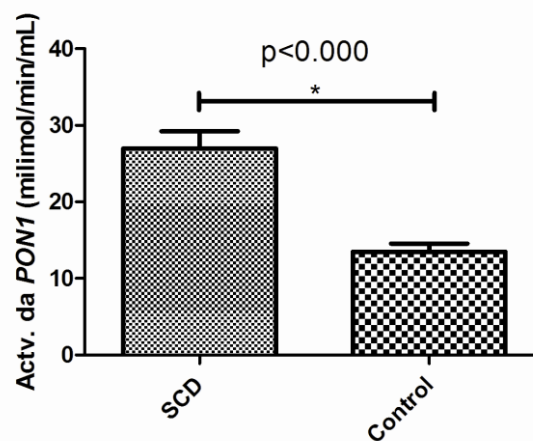


Figure 01. Analysis of PON1 activity in SCD patients and controls. * Mann-Whitney Test.

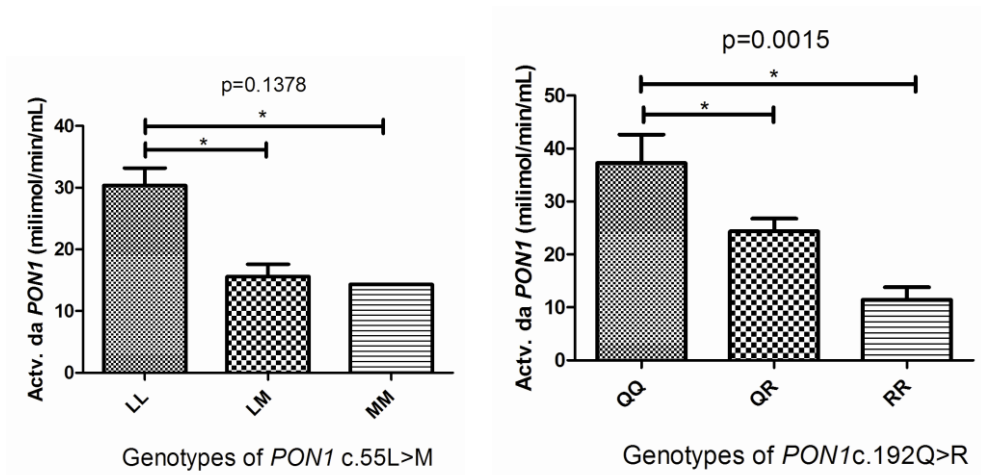


Figure 02. Analysis of activity of PON1 in different genotypes for the polymorphisms *PON1*c.192Q> R and *PON1*c.55L> M in SCD patients. * Kruskal-Wallis.

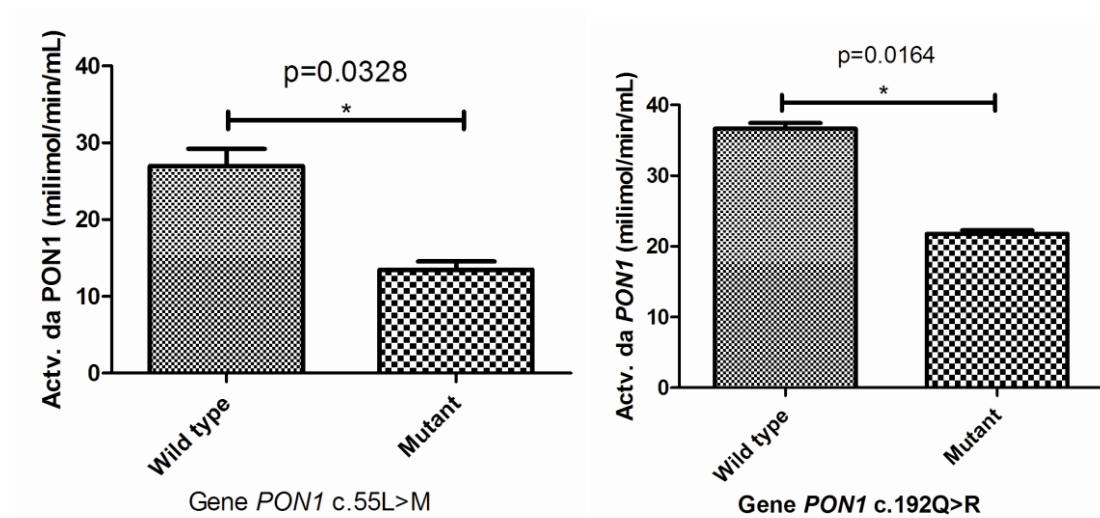


Figure 03. Analysis of PON1 activity between groups of wild and mutant alleles to polymorphisms *PON1*c.192Q> R and *PON1*c.55L> M in SCD patients.

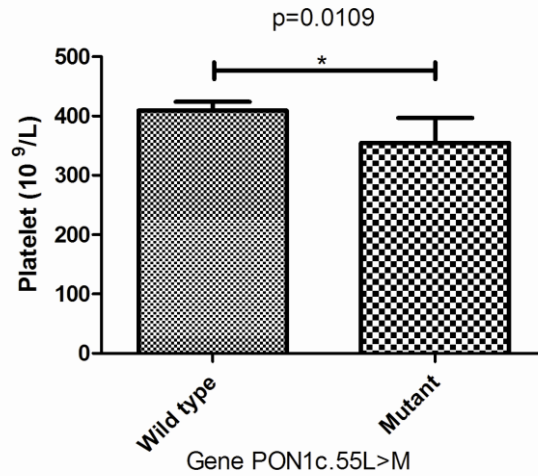


Figure 04. Analysis of platelet count in SCD Patients with wild and mutant alleles for the polymorphisms *PON1*c.55L> M. * Mann-Whitney test.

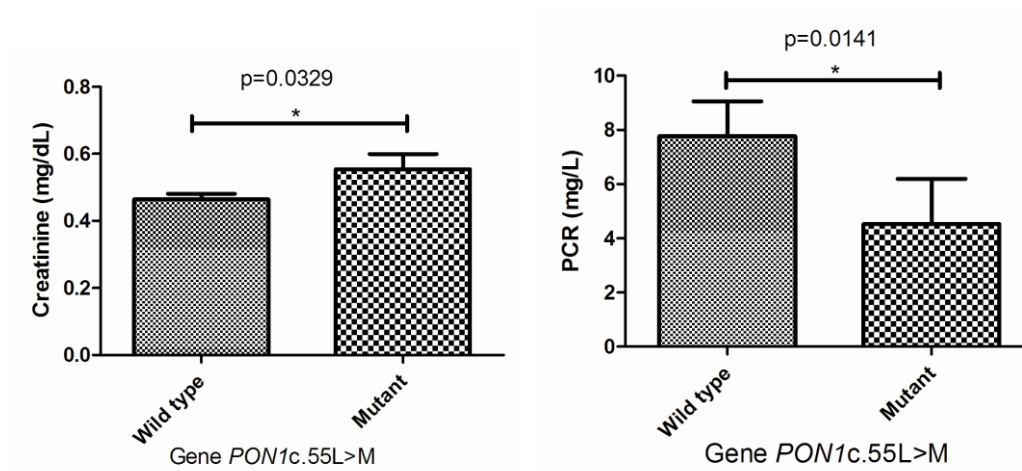


Figure 05. Analysis of biochemical data in subjects carrying the SCD wild and mutant alleles for the polymorphism *PON1* c.55L> M. * Mann-Whitney Test.

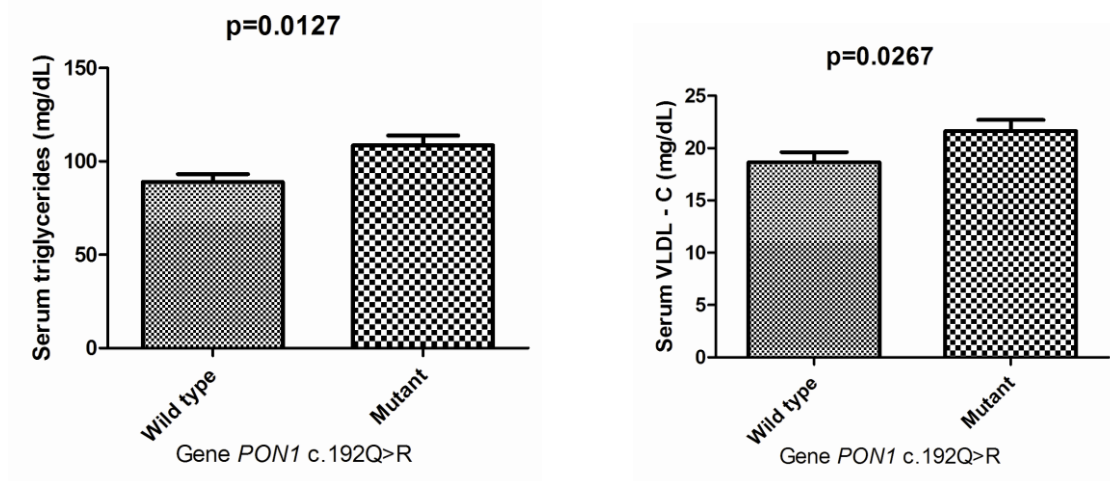


Figura 06. Analysis of levels serum VLDL cholesterol and triglycerides in SCD patients with wild and mutant alleles for the polymorphisms *PON1* c.192Q> R. * Mann-Whitney test.

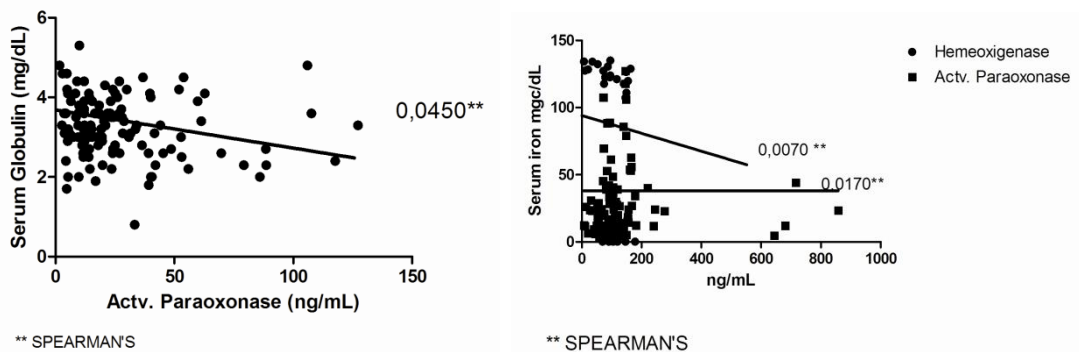


Figure 07. Correlation between paraoxonase activity and Levels serum globulin and between hemeoxigenase and paraoxonase activity with serum iron in patients with SCD.

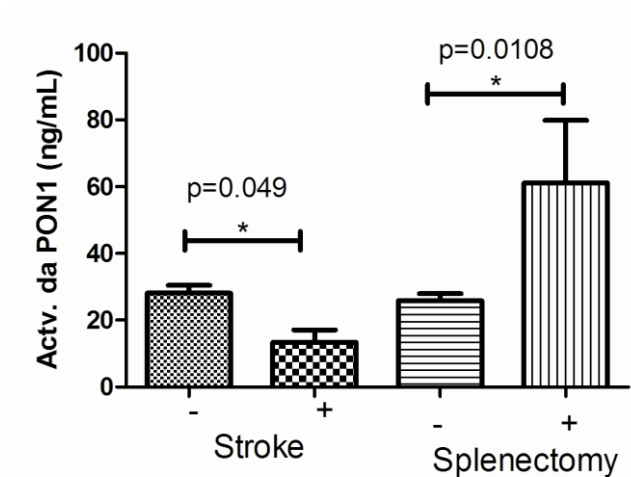


Figura 08. Analysis of the clinical history of individuals with SCD and levels of activity of paraoxonase, association between AVC e splenectomy.

REFERENCES

1. MACKNESS B, MACKNESS MI, DURRINGTON PN, CONNELLY PW, HEGELE RA: **Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins.** *Curr Opin Lipidol* 1996, 7:69-76.
2. HEINECKE JW, LUSIS AJ: **Paraoxonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis?** *Am J Hum Genet* 1998, 62:20-24.
3. MACKNESS MI, ARROL S, ABBOTT C *et al.*: **Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase.** *Atherosclerosis* 1993, 104:129-135.
4. AVIRAM M, HARDAC E, VAYA J *et al.*: **Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities.** *Circulation* 2000, 101:2510-2517.

5. FUHRMAN B, VOLKOVA N, AVIRAM M: **Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: Protective role of antioxidants and paraoxonase.** *Atherosclerosis* 2002, 161:307-316.
6. HUMBER R, ADLER DA, DISTECHE CM, HASSETT C, OMIECINSKI CJ, FURLONG CE: **The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism.** *Nat Genet* 1993, 3:73-76.
7. MOCHIZUKI H, SCHERER SW, XI T, NICKLE DC, MAJER M, HUIZENGA JJ, TSSU LC, PROCHAZKA M: **Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphism in the coding sequence.** *Gene* 1998, 213:149-157.
8. LEVIEV I, JAMES RW: **Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations.** *Arterioscler Tromb Vasc Biol* 2000, 20:516-521.
9. KOPPAKA V: **Structural studies of discoidal lipoprotein A-I.** *Cell Mol Life Sci* 2001, v. 58, n. 7, p. 885-93.
10. LUND-KATZ S. *et al.*: **High density lipoprotein structure.** *Front Biosci* 2003, v. 8, p. 1044-54.
11. LIMA ES, COUTO RD: **Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade.** *J. Bras. Patol. Med. La* 2006, vol.42 no.3 Rio de Janeiro.
12. NOFER, JR *et al.*: **HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport.** *Atherosclerosis* 2002, v. 161, n. 1, p. 1-16.
13. CHISOLM GM & STEINBERG D. **The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview.** *Free Radic Biol Med* 2000, v. 28, n. 12, p. 1815-26.
14. LULIANO L. **The oxidant stress hypothesis of atherogenesis.** *Lipids* 2001, v. 36, p. 41-4.

15. MANFREDINI, V. *et al.* **Blood antioxidant parameters in sickle cell anemiapaitents in steady state.** J. Natl. Med. Assoc. **2008**, v. 100, n.8, p. 897-902.
16. ALABDULAALI MK: **Sickle cell disease patients in eastern province of Saudi Arabia suffer less severe acute chest syndrome than patients with African haplotypes.** *Annals of Thoracic Medicini* 2007, v 2, Issue 4, 158 – 162.
17. NAOUM, P. C.; SOUZA, P. C. **Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da Hb S nos genótipos SS, SF (S/β0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais.** J Bras Patol Med Lab . 2004, • v. 40 • n. 4 • p. 249-59.
18. [CHAVES MA](#), [LEONART MS](#), [DO NASCIMENTO AJ](#). **Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S.** [Hematology](#). 2008 Jun;13(3):187-92.
19. [BELCHER JD](#), [BECKMAN JD](#), [BALLA G](#), [BALLA J](#), [VERCELLOTTI G](#). **Heme degradation and vascular injury.** [Antioxid Redox Signal](#). 2010 Feb;12(2):233-48.
20. STEHBENS WE. **Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc.** Exp Mol. Pathol.2003, 75:256-76.
21. WEATHERALL DJ, PROVAN AB. Red cells I: inherited anaemias. Lancet 2000; 355:1169-75.
22. ZAGO MA. Defeitos hereditários das hemoglobinas. 5. In: ZAGO MA, FALCÃO RP, PASQUINI R, editores. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo: Atheneu. p.279-87, 2001.
23. BENDER MA & HOBBS W. **Sickle Cell Disease.** Gene Reviews. Last Revision: September 17, 2009.
24. LYRA IM, GONCALVES MS, BRAGA JA, GESTEIRA MF, CARVALHO MH, SAAD ST *et al.*: **Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil.** *Cad Saude Publica*, 2005;21(4):1287-90.
25. EL-HAZMI MAF. **Clinical and Haematological Diversity of Sickle Cell Disease in Saudi Children.** J Trop Pediatr (1992) 38 (3): 106-112.
26. NAOUM FA. **Alterações do perfil lipídico nas anemias.** Rev. bras. hematol. hemoter. 2005;27(3):223-226
27. SZABÓ I, RÓNIA K, CZINNER A & GACHÁLYI B. **Human paraoxonase polymorphism: Hungarian population studies in children and adults.** International J.Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 1991, 29 (6): 238-241.

28. MENDONÇA MI, REIS RP, FREITAS AI, SOUSA AC, PEREIRA A, FARIA P, GOMES S, SILVA B, SANTOS N, SERRÃO M, ORNELAS I, FREITAS S, ARAÚJO JJ, BREHM A, CARDOSO AA. **Polimorfismos do Gene da Paraoxonase Humana e Risco de Doença Coronária. Rev Port Cardiol 2008; 27 (12): 1539-1555**
29. MACKNESS B, MACKNESS M I, ARROL S, TURKIE W and DURRINGTON PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 1989, **423**, 57 - 60
30. SAADATMANDI CB, RIMBACH G, SCHRADER C, KOFLER BM, ARMAH CK, MINIHAANE AM. **Determinants of paraoxonase activity in healthy adults.** *Mol Nutr Food Res.* 2010, 54:1-9.
31. LAWLOR DA, DAY INM, GAUNT TR, HINKS LJ, BRIGGS PJ, KIESSLING M, TIMPSON N, SMITH GD AND EBRAHIM S .**The association of the *PON1* Q192R polymorphism with coronary heart disease: findings from the British Women's Heart and Health cohort study and a meta-analysis.** *BMC Genetics* 2004, **5**
32. MACKNESS B, MACKNESS MI, ARROL S, TURKIE W, DURRINGTON PN: **Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon.** *Br J Pharmacol* 1997, **112**:265-268.
33. AVIRAM M, HARDAC E, VAYA J *et al.* **Human serum paraoxonases 9PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities.** *Circulation.*,101:2510-2517, 2000.
34. FREEDMAN JE. **Oxidative Stress and Platelets.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:s11-s16
35. FRENETTE PS. **Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm.** [Curr Opin Hematol.](#) 2002 Mar;9(2):101-6.
36. COLE TB, JAMPSA RL, WALTER NJ, ARNDT TL, RICHTER RJ, SHIH DM, TWARD A, LUSIS AJ, JACK RM, COSTA LG, FURLONG CE. **Expression of paraoxonase (PON1) during development.** *Pharmacogenetics.* 2003, 13:357-364.
37. SEIXAS MO, ROCHA LC, [CARVALHO MB](#), [MENEZES JF](#), [LYRA IM](#), [NASCIMENTO VM](#), [COUTO RD](#), [ATTA AM](#), [REIS MG](#), [GONCALVES MS](#). **Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease.** [Lipids Health Dis.](#) 2010 Aug 27;9:91.

38. SANTOS NPC, RIBEIRO –DOS- SANTOS AKC, SANTOS SEB. Frequency of the Q192R and L55M polymorphisms of the human serum paraoxonase gene (PON1) in ten Amazonian Amerindian tribes. *Genetics and Molecular Biology*. 2005, 28(1):36-39.
39. ALLEBRANDT KV, SOUZA RLR , CHAUTARD-FREIRE-MAIA EA. **Variability of the Paraoxonase Gene (*PON1*) in Euro- and Afro-Brazilians**. *Toxicology and applied pharmacology*.2002, 180(3):151- 156.

Polymorphisms in the glutathione S-transferase *theta* and *mu* genes association with clinical and laboratorial aspects of sickle cell disease patients from Salvador – Bahia.

^{1,2} Joelma F. Menezes, ^{3,4} Larissa Rocha,^{1,2} Magda O. Seixas, ^{1,2} Nadja de Jesus Gonçalves dos Santos, ¹ Cyntia C. Souza, ¹ Isa M. Lyra,^{3,4} Valma M. L. Nascimento,³ Ricardo D. Couto,² Mitermayer G. Reis, ^{1,2}Marilda S. Goncalves,

1-Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brazil.

2-Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil.

3-Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado da Bahia (HEMOBA), Salvador, Bahia, Brazil.

4-Hospital Pediátrico Professor Hosannah de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

Email: Joelma F. Menezes- joelma_menezes@hotmail.com; Larissa Rocha- larissa@hemoba.ba.gov.br; Magda O. Seixas- magdaseixas@bahia.fiocruz.br; Nadja Jesus Gonçalves dos Santos- nadjajgs@yahoo.com.br; Cyntia C. Souza- cyntiacs@hotmail.com; ; Isa M. Lyra- isalyra@gmail.com; Valma M. L. Nascimento- valma.lopes@oi.com.br; Ricardo D. Couto- rdc@ufba.br; Mitermayer G. Reis- miter@bahia.fiocruz.br; Marilda S. Gonçalves*- mari@bahia.fiocruz.br

*Corresponding author: Marilda Souza Gonçalves, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Fiocruz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP: 40296-710, Salvador, Bahia, Brasil or at mari@bahia.fiocruz.br.

Key Words: Sickle cell disease, Glutathione S-transferase, clinical biomarkers, vitamin C.

Abstract

Background: Glutathione S-transferase (GST) is a family of enzymes with an important role in detoxification and biotransformation of many xenobiotic and endogenous substances. Different frequencies of *GSTT1* and *GSTM1* genes polymorphisms have been associated to geographic location and ethnic groups, with important role in antioxidant defense and regulation of cellular events. The presence of these genes polymorphisms has been associated to the pathogenesis of many diseases, such as sickle cell disease (SCD). **Objective:** It was develop a case-control study, with the aim to associate polymorphisms of *GSTM1* and *GSTT1* genes with clinical and laboratorial aspects of sickle cell disease patients and its association with the level of vitamin C. **Methods:** We prospectively analyze biochemical, inflammatory and hematological biomarkers of 154 SCD patients, with 101(67.8%) with sickle cell anemia and 47 (31.5%) with SC disease and a control group compound of 196 health individuals, using immunochemistry, immunoassay and electronic cell counter respectively. The *GST* gene polymorphisms were investigated by multiplex PCR. Serum levels of vitamin C were determined by the colorimetric reaction kit. Clinical data were collected from patient medical records. **Results:** We found statistical difference between groups for almost all hematologic and biochemical data. The frequency of GST polymorphism in SCD group were 56 (45.2%) *GSTM1*⁺/*GSTT1*⁺; 51 (41.1%) *GSTM1*⁻/*GSTT1*⁺; 11 (8.9%) *GSTM1*⁺/*GSTT1*⁻; 06 (4.8%) *GSTM1*⁻/*GSTT1*⁻. In the control group the frequency of GST polymorphism were 111 (58.7%) *GSTM1*⁺/*GSTT1*⁺; 54 (28.6%) *GSTM1*⁻/*GSTT1*⁺; 13 (6.9%) *GSTM1*⁺/*GSTT1*⁻; 10 (5.8%) *GSTM1*⁻/*GSTT1*⁻. Within the HbSS group we found statistical significance with white blood cell count $p=0.0452$, specifically segmented neutrophil ($p=0.0224$)

and CRP ($p=0.0167$). When analyzed the biochemistry variables in SCD patients was found statistical difference to urea ($p=0.0167$) and ferritin (0.0316). The correlation analysis between *GST* polymorphisms and serum levels of vitamin C showed a statistically significant difference between wild and mutant groups ($p = 0.0388$). **Conclusions:** The results confirm data of leukocyte reduction, since the decrease of CRP and ferritin levels reflect a decrease in inflammatory processes, suggesting a possible role in protection of the mutant alleles of inflammatory events in individuals with SCD.

Introduction

Glutathione S-transferase (GST) is a family of enzymes that play an important role in detoxification and biotransformation of many xenobiotic and endogenous substances; they are implicated in phase II of metabolism throughout conjugation and detoxification reactions. Two widespread genetic polymorphisms (deletions) in the *GSTT1* and *GSTM1* genes have been reported to lead to abrogation enzyme activity (Mannervick, 1985; Bolufer, 2007). There are different *GST* genes, such as Alpha (A), mu (M), pi (P) and theta (T). The genes *GSTM1* and *GSTT1* can present null genotype that result in lack of enzyme activity (Vicari, 2007). Previous works reported different gene frequencies for *GSTT1* and *GSTM1* according to ethnic group (Vicari, 2007); also there are different *GST* gene polymorphism frequency associated independently with population such as Italian, Japanese, Spanish, French, English, Nigerians and Brazilian (Hatagima, 2000).

The *GSTM1* gene found absence in 30 to 50 % of individuals in according to ethnical groups (Losi-Guembarovski, 2001). The evaluation of *GSTM1* gene polymorphism among health individuals showed a frequency of 23 and 41% among Afro-Americans and Blacks respectively; frequency of 23 - 48% in African; 33- 66 % in Asian and 57% in Caucasian (London et al, 1995, Cotton et al., 1999). The distribution of the *GSTM1* null genotype was more frequent among white individuals (55.4%) than among mulattos (41.4%) and blacks (32.8%) from São Paulo, or Bahian rural workers in general (35.7%) (Gattás et al., 2004).

The *GST* play important role in antioxidant defense and regulation of cellular events and a deficient activity of this enzyme contributes to increase the oxidative stress, increasing the reactive oxidant species (ROS), which contribute to the pathogenesis of several diseases, such as Alzheimer disease, Parkinson's

disease, sickle cell disease, cancer, HIV infection, cystic fibrosis and diabetes (Wu, 2004).

Sickle cell disease is a genetic disorder characterized by homozygous hemoglobin S. A point mutation in the sixth codon of beta globin gene ($GAG \rightarrow GTG$), leads of valine replace glutamic acid at sixth position of the beta amino acid chain, (Alabdulaali, 2007). Under conditions of hypoxia, acidosis or dehydration; the S hemoglobin begin the polymerization process that leads to sickling of the red cell. This event is central to the process of vaso-occlusion, resulting in ischemia, painful and hemolytic crisis and others clinical manifestations associated to sickle cell disease pathogenesis (Manfredini 2008). The red blood cells (RBC) are susceptible to peroxidative damage directly related to the hemoglobin contain; oxidative damage modify membrane properties, beginning a peroxidative reaction (Naum, 2006).

The aim of this study was investigate the presence of polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* genes can be associated to alteration of clinical and laboratorial biomarkers among a group of sickle cell disease patients, including the levels of paroxonase.

Patients and methods

Of 154 pediatric sickle cell disease patients participated of a case-control study. Patients are attended at Hematology Unit of “Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA)”. The mean age was 9.250 ± 0.329 , with 46.1% of female. The control group was selected from individuals that attended the Clinical laboratory of “Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia”

and was composed by 196, with 49.5% of female. The control group had normal hemoglobin profile and was selected to match patients group by age and ethnic origin and had mean age of 9.310 ± 0.248 . Patients' official responsible answers the questionnaire and signed the informed consent. The study was approved by Ethics Research Board on Human subjects of the "Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ".

The measurements biochemicals were carried by spectrophotometric methods. Biochemical markers analyses were measured in serum by immunochemistry assay (A25 system, BIOSYSTEMS SA, Barcelona, Spain). Serum ferritin was measured by immunoassay using an Access® 2 Immunoassay system X2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). C-reactive protein (CRP), alpha 1-antitripsin (A1AT) and anti-streptolysin-O (ASLO) were measured by immunochemistry (Image® 800system, Beckman Coulter, Fullerton, CA). Hematological analyses were carried out using an electronic cell counter, CELL – DYN 3700 (Santa Clara, USA). The hemoglobin (Hb) profile and HbF levels were investigated by high performance liquid chromatography (HPLC / VARIANT I; BIO-RAD, CA, USA). Reticulocytes were counted after blue brilliant cresyl dye.

The genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using FlexiGene DNA Kit QIAGEN (Uniscience do Brasil) following the manufacturer guidelines. The *GST* gene polymorphisms were investigated using the multiplex Polymerase chain reaction (PCR), the *β-globin* gene as an internal control (Arruda et al., 2001).

Serum levels of vitamin C were determined using the kit Ascorbic Acid Assay Kit (BioVision, California). The colorimetric reaction kit where the catalyst oxidizes

ascorbic acid and the oxidation product reacts with ascorbic acid probe generating color and flowering. Reading is done at 570 nm optical density and the test can detect concentrations of 0.01 to 10 nmol of acid ascorbico.

Statistical analysis

Baseline characteristics were summarized as means and proportions of selected variables. Distribution of quantitative variables was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Mean values of quantitative variables between groups were compared using the unpaired t-test for normal data distribution and Mann-Whitney for non-normal data. Bivariate correlation analyses were carried out to determine correlations between pairs of variables using Pearson's and Spearman's rank correlation (R). The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare means among two or more groups as measured by interval variables. The interactions between specific categorical clinical variables were tested for significance using a X^2 test or Fisher's exact test, taking into account the expected frequency in the cell tables. All tests were considered significant if *p* values were less than .05. Data analyses were performed using Prism 5.01 (Graphpad Software, San Diego, CA), EPIinfo 6.04 (CDC, Atlanta, Georgia) and STATA SE 10 software (StataCorp, Texas, USA).

Results

We analyzed 154 patients with sickle cell disease (SCD), compound by 106 (68.83%) sickle cell anemia patients, with a mean age of 8.657 ± 0.388 , being 44.6% of female; 47 (30.52%) SC patients with a mean age of 10.787 ± 0.621 , being 48.9% of female and one (0.65%) four years old boy, with S β -Thalassemia. Of 196 individuals with normal hemoglobin profile matched the patient group by age and ethnic origin composed the health control group, that had a mean age of 9.327 ± 3.467 and 49.5% of female. Hematological data of sickle cell disease (SCD) patients and control group are described in table 1.

The mean values for the biochemical evaluation of lipids (Total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, low density lipoprotein (LDL) cholesterol, very low density lipoprotein (VLDL) cholesterol and triglycerides), kidney function (urea and creatinine), liver function (serum alanine transaminase (ALT) and serum aspartame transaminase (AST), total bilirubin and fractions), iron status (serum iron and ferritin) and inflammation (Anti-streptolysin O - ASLO, C reactive protein - PCR and alpha-1 antitrypsin are in table 02.

The table 03 had shown the clinical characteristic between SS and SC patients.

The distribution of *glutathione S-transferase* gene polymorphisms *GSTM1* and *GSTT1* is showed at Table 4. It was observed that samples that presented *GST* polymorphism, the *Mu* null genotype was more frequent in both studied groups. For both polymorphisms the genotypic and allelic frequencies are in Hardy Weinberg equilibrium.

In the SCD patients group the *GSTM1* and *GSTT1* genotypes were clustered in wildtype (*GSTM1*⁺/*GSTT1*⁺) and mutant alleles for *Glutathione S-transferase*

(*GSTM1*⁻/*GSTT1*⁺; *GSTM1*⁺/*GSTT1*⁻; *GSTM1*⁻/*GSTT1*⁻); the association of *GSTM1* and *GSTT1* genotypes with hematological, sex and age data did not shown any statistical significance, but when was analyzed hematological characteristics within the SS group, it was found a statistical significance for WBC count (p=0.0452) and segmented neutrophils (p=0.0224). It was not find association of hematological data among SC patients group.

The groups of SCD patients with genotypes clustered were compared to biochemical biomarkers. (Tables 05), was found significant association with urea (p= 0.0288) and Ferritin (p=0.0316). When was analyzed each GST genotype in SS group patients with the biochemical biomarkers, it was found significant association between *Mu null* genotype and PCR (p= 0.0196). The analysis of the clinical characteristics of SCD patients and GST polymorphisms no showed statistical significance.

The vitamin C levels were evaluated in 32 samples of SCD patients, in duplicate. The correlation analysis between GST polymorphisms and serum levels of vitamin C showed a statistically significant difference between wild and mutant groups (p = 0.0388) (Figure 3).

Discussion

Patients with SCD have heterogeneous clinical characteristics and the search of prognostics markers are very important to identify subphenotype of the disease (Gualandro, 2009). The present study investigated GST gene polymorphisms and their association with hematological, biochemical biomarkers,

clinical severity and serum levels of vitamin C among a group of SCD disease patients and reference group.

When it was analyzed hematological data between these patients and reference group we found statistical difference for almost all parameters except MCHC. This results can be explained due to the frequent phenomenon of sickling that lead vaso-occlusive event suffered by the patients, with consequent decrease the lifetime of erythrocytes and hemolysis (Cançado, 2007; Zanette, 2007).

The biochemical parameters that evaluate the lipid profile, kidney function, liver function, iron status and inflammation, considered possible risk factors were realized in between SCD patients and reference groups. We found statistical difference in the inflammatory tests (PCR, ASLO and Alpha -1 antitripsin), iron status (iron and ferritin) and marker of haemolysis (LDH) and marker of lipid profile (Total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides). Many works reporter that SCD patients presents due to repeated sickling phenomena the red cell membrane fragile and increase hemolyse which explain the our results for LDH higher that reference group. El-Hazmi et al in 1987 reporter that several hematological and biochemical abnormalities accompany this disease. Iron and ferritin increased can be consequence to haemolysis or treatment with repeated blood cell transfusion without chelating. The inflammatory tests confirm the status chronic inflammatory characteristic by SCD patients. Our results show that the level to total cholesterol and LDL cholesterol is lower than reference group and confirm previous studies where patients with SCD had same prolife (El-Hazmi, 1987; Oforofuo, 1994; Rahimi, 2006, Seixas *et al.*, 2010).

Inheritance changes in the hemoglobin molecule may be structural (S, C, D, E and others) or deficiency of synthesis (thalassemias). The variants S and C are the

most prevalent worldwide (Lee et al, 1995; Weatherall & Provan , 2000). Hemoglobin S, in homozygous, sickle cell anemia characterized. The HbSS patient had severe anemia and the clinical picture heterogeneous (Bunn, 1997; Weatherall & Provan, 2000). When we analyzed the clinical features of SCD Patients find that our results are consistent with the literature, because the HbSS patients have higher intraerythrocytic concentrations of HbS than HbSC patients, once their clinical condition is more serious.

Glutathione S-transferase is a family of enzymes that play important role in detoxification of xenobiotic and endogenous substances (Vicari, 2007). The four subfamilies of GST can be identify in humans the alfa, mu, tetha e pi and each subfamily is composed of several members that can display deletion polymorphism and leads to absence or of enzyme activity (Stanulla, 2000). In our study the we found that the *Mu null* is the more frequent following of the *GSTT1 null* and *Mu/Theta null* in both groups. Many studies report the high frequency to phenotype null to *GSTM1* which varies among ethnic groups. Lower incidence of *GSTM1null* genotype in Nigerians and Indians and higher incidence in Chinese and Micronesians (Hatagima, 2000). Another works with health people reported that the incidence to genotype Mu null shows difference incidence to according characteristic ethnical, 23 – 41% to afro-American and black, 33 – 63% Asian-people, 23 – 48% Africans, 57% Caucasians (Losi-Guembarovski, 2001). We know that the frequency this polymorphisms exhibit different in the world according to ethnic group. Our population was composed of Amerindian, African and European and our population have high racial admixture (Gattas, 2004). Our frequencies are to accord previous studies and the difference can be explained by high racial admixture.

When compare hematological data between patients HbSS with wild and mutant genotype to *GST* polymorphism. (*GSTM1*⁻; *GSTT1*⁻ ; *GSTM1*⁻/*GSTT1*⁻) was found statistical difference to white blood cell count and segmented with values lower to mutant group. Data related to the presence of leukopenia, its association with the mutant gene in the *GST* are not frequent in literature. However, these findings corroborate a previous study by our group linked to the decrease of leukocyte count to mutant alleles of the gene for *GST* (GONCALVES et al., 2010).

The analysis of the biochemical parameters and the association of polymorphisms in the gene for *GST* in SCD patients showed statistically significant differences in outcome values decreased ferritin and increased urea in carriers of mutant alleles. To individuals HbSS was observed lower values of CRP. The described results confirm data of leukocyte reduction, since the decrease of CRP and ferritin levels reflect a decrease in inflammatory processes, suggesting a possible role in protection of the mutant alleles of inflammatory events in individuals with SCD. The relationship between increased urea and mutant genotype may mean an association with early renal damage, a fact that can be confirmed with further study.

Was observed association between wild and mutant genotype and vitamin C levels, with higher values for the mutant group, suggesting a possible role in protection of the mutant alleles of inflammatory events in individuals with SCD.

In summary The *GSTM1* null genotype was the most frequent, followed by Theta null and *GSTM1*/*GSTT1* in both groups. The results confirm data of leukocyte reduction, since the decrease of CRP and ferritin levels reflect a decrease in inflammatory processes, suggesting a possible role in protection of the mutant alleles of inflammatory events in individuals with SCD.

TABLES LIST

Table1. Hematological data of sickle cell disease (SCD) patients and control group.

	SCD N=154 Mean ± SD	Control group N=196 Mean ± SD	p Value
Age (years)	9.285 ± 4.050	9.327 ± 3.467	----
Sex			
Male (%)	83 (54.3)	98 (50.3)	----
Female (%)	70 (45.8)	97 (49.7)	----
Red blood cells	3.2311 ± 0.664	4.7184 ± 0.3760	0.000**
Hemoglobin (g/dL)	8.9247 ± 2.005	12.7240 ± 1.0828	0.000**
Hematocrit (%)	27.6019 ± 6.2038	38.2123 ± 2.8752	0.000**
MCV (fl)	87.5234 ± 10.8127	81.1701 ± 5.1897	0.000**
MCH (pg)	28.3494 ± 3.7510	27.0279 ± 2.0011	0.000**
MCHC (%)	32.3597 ± 0.9868	33.2221 ± 1.1093	0.000**
White blood cell (10⁹/L)	13081.8182 ± 5744.8295	6965.1282 ± 2138.9405	0.000**
Reticulocytes (%)	7.4039 ± 4.7826	0.8680 ± 0.2712	0.000**
Platelet (10⁹/L)	405.5390 ± 158.2528	303.2194 ± 67.9722	0.000**
Neutrophils (10⁶/L)	6128.331 ± 3001.368	45.471 ± 11.804	0.000**
Monocyte (10⁶/L)	811.234 ± 483.582	526.814 ± 420.188	0.000**
Typical lymphocyte (10⁶/L)	5063.208 ± 2353.853	2753.328 ± 846.877	0.000**

** Teste de Mann-Whitney

Table 2. Mean values of biochemical markers among SCD patients and individuals from the control group.

		N	SCD Mean ± SD	N	Control group Mean ± SD	p value
Total cholesterol, mg/dL		152	121.224 ± 26.124	186	164.414±35.943	0.000**
HDL cholesterol, mg/dL		152	35.605 ± 12.419	184	47.039 ± 12.950	0.000**
LDL cholesterol, mg/dL		152	65.711 ± 22.173	183	99.322 ± 33.095	0.001**
VLDL cholesterol, mg/dL		152	20.829 ± 10.052	184	17.924 ± 9.796	0.002**
Triglycerides, mg/dL		151	104.060 ± 50.261	183	89.197 ± 48.855	0.002**
Urea, mg/dL		151	17.660 ± 6.360	180	21.833 ± 6.068	0.000**
Creatinine, mg/dL		152	0.475 ± 0.177	178	0.557 ± 0.200	0.008**
Iron, mcg/dL		127	123.022 ± 119.562	177	74.740 ± 40.175	0.000**
Ferritin, ng/dL		153	321.888 ± 75.481	177	380.804 ± 25.765	0.000**
AST, U/L		153	48.307 ± 25.345	181	32.199 ± 10.499	0.000**
ALT, U/L		153	28.072 ± 21.152	180	18.389 ± 7.316	0.000**
Total bilirubin, mg/dL		152	2.739 ± 1.769	175	0.506 ± 0.218	0.000**
Direct bilirubin, mg/dL		152	0.666 ± 0.483	174	0.252 ± 0.098	0.000**
Indirect bilirubin, mg/dL		152	2.073 ± 1.587	174	0.254 ± 0.177	0.000**
Totals Proteins, g/dL		152	7.326 ± 0.846	177	7.251 ± 0.620	0.542**
Albumin, g/dL		152	4.047 ± 0.672	177	4.167 ± 0.601	0.173**
Globulins, g/dL		152	3.278 ± 0.781	177	3.084 ± 0.631	0.053**
LDH, U/L		152	858.658 ± 502.481	176	357.511±143.016	0.000**
ASLO, UI/mL		152	192.349 ± 283.470	193	134.944±137.578	0.035**
PCR mg/L		152	6.993 ± 11.836	193	3.932 ± 15.814	0.000**
Alpha 1-antitrypsin, mg/dL		152	152.840 ± 45.781	192	136.097 ± 39.109	0.000**

** Teste de Mann-Whitney

Table 3. The clinical characteristics presented by SCD patients

Clinical data	N	Pacientes SS (%)	Pacientes SC (%)	Valor de p	OR	IC
Acute chest syndrome	11/138	08/94 (8.51)	03/44 (6.82)	0.5123**	1.27	0.29 – 7.81
Blood transfusion	73/138	64/94 (68.08)	09/44 (20.45)	< 0.001*	8.30	3.33 – 21.87
Hospitalized	112/138	82/94 (87.23)	30/44 (68.18)	0.0149*	3.19	1.21 – 8.43
Infection	64/113	47/77 (61.04)	17/36 (47.22)	0.2391*	1.75	0.73 – 4.20
Painful crisis	111/139	79/95 (83.15)	32/44 (72.73)	0.2306*	1.85	0.71 – 4.70
Pneumonia	74/138	62/94 (65.96)	12/44 (27.27)	< 0.001*	5.17	2.21 – 12.45
Priapism	05/67	04/45 (8.89)	01/19 (5.26)	0.5315**	1.76	0.16 – 91.22
Splenic sequestration	18/137	17/94 (18.08)	01/43 (2.32)	0.0237**	9.27	1.34 -396.58
Stroke	08/138	07/94 (7.45)	01/44 (2.27)	0.2117 **	3.46	0.42 – 159.50
VO	118/144	80/95 (8.42)	34/44 (77.27)	0.06197*	1.38	0.51- 3.59

* χ^2 , **Fisher exact

Table 4. Distribution of genetic analyses of Glutathione S-transferase, *GSTM1* and *GSTT1* genes.

Gene	SDC group N(%)	Genotype frequency	Allelic frequency	Control group N(%)	Genotype frequency	Allelic frequency
Gene Mu						
<i>GSTM1</i> ⁺	56 (49.6)	0.496	0.721	111 (63.1)	0.631	0.784
<i>GSTM1</i> ⁻	06 (05.3)	0.053	0.279	11 (6.2)	0.062	0.216
<i>GSTM1</i> ⁺ / <i>GSTM1</i> ⁺	51 (45.1)	0.451		54 (30.7)	0.307	
Gene Theta						
<i>GSTT1</i> ⁺	56 (76.7)	0.767	0.842	111 (82.2)	0.822	0.870
<i>GSTT1</i> ⁻	06 (08.2)	0.082	0.158	11 (08.2)	0.082	0.130
<i>GSTT1</i> ⁺ / <i>GSTT1</i> ⁻	11 (15.1)	0.151		13 (09.6)	0.096	

Table 5. Hematological data of SCA patients with wildtype (*GSTM1*⁺/*GSTT1*⁺) and mutant alleles for *Glutathione S-transferase* (*GSTM1*⁺/*GSTT1*⁺; *GSTM1*⁺/*GSTT1*⁻ ; *GSTM1*⁻/*GSTT1*⁻).

Hematological Data	SS (Wild type GST) N=41 Mean ± SD	SS (Mutant GST) N=46 Mean ± SD	P Value
Age (Years)	7.750 ± 3.801	8.911 ± 3.710	0.1583*
Sex			
Male (%)	27 (65.8%)	23 (50%)	0.2020*
Female (%)	14 (34.2%)	23 (50%)	
Hemoglobin (g/dL)	7.773 ± 1.220	8.020 ± 1.376	0.3818*
Hematocrit (%)	23.946 ± 3.813	24.846 ± 4.090	0.2936*
MCV (fl)	89.449 ± 10.113	91.924 ± 10.829	0.2754*
MCH (pg)	29.080 ± 3.564	29.692 ± 3.718	0.4374*
MCHC (%)	32.488 ± 1.028	32.267 ± 0.940	0.2991*
White blood cell (10 ⁹ /L)	16334.146± 6286.239	13413.043± 3627.280	0.0452**
Neutrophils (%/mL)	7971.610 ± 4402.931	5871.174 ± 2643.981	0.0224**
Monocyte (%/mL)	1020.268 ± 556.231	835.303 ± 340.468	0.2708**
Typical lymphocyte (%/mL)	6134.024 ± 2466.388	5506.587 ± 1715.671	0.4047*
Reticulocytes (%)	9.095 ± 5.247	8.872 ± 4.381	0.8357*
Platelet (10 ⁹ /L)	459.098 ± 116.108	434. 630 ±148.215	0.3979*

*ANOVA, ** Kruskal -Wallis

Table 6. Analyzes of biochemical parameters of SCD patients with wildtype (*GSTM1*⁻/*GSTT1*) and mutant alleles for *Glutathione S-transferase* (*GSTM1*⁻/*GSTT1*⁺; *GSTM1*⁺/*GSTT1*⁻; *GSTM1*⁻/*GSTT1*)

Biochemical parameters	SCD Wild type N=56 Mean ± SD	SCD Mutant N=68 Mean ± SD	P Value
Total cholesterol, mg/dL	123.768 ± 29.147	117.926 ± 24.535	0.2279*
HDL cholesterol, mg/dL	35.107 ± 11.380	35.338 ± 11.423	0.9108*
LDL cholesterol, mg/dL	65.839 ± 26.315	63.853 ± 19.553	0.8271**
VLDL cholesterol, mg/dL	20.875 ± 10.180	20.162 ± 7.712	0.7419**
Triglycerides, mg/dL	103.364 ± 51.098	101.368 ± 38.261	0.5637
Urea, mg/dL	16.442 ± 5.330	18.715 ± 5.752	0.0288**
Creatinine, mg/dL	0.475 ± 0.191	0.490 ± 0.177	0.6901*
Iron, mcg/dL	147.209 ± 170.492	117.672 ± 83.416	0.9062**
Ferritin, ng/dL	363.236 ± 403.372	262.456 ± 281.570	0.0316**
AST, U/L	50.071 ± 25.167	45.206 ± 19.023	0.3877**
ALT, U/L	28.125 ± 21.759	26.603 ± 16.339	0.7785**
Total bilirubin, mg/dL	2.679 ± 1.601	2.972 ± 1.975	0.3722*
Direct bilirubin, mg/dL	0.727 ± 0.603	0.640 ± 0.350	0.6607**
Indirect bilirubin, mg/dL	1.952 ± 1.298	2.332 ± 1.890	0.5701**
Totals Proteins, g/dL	7.329 ± 1.013	7.322 ± 0.781	0.3708**
Albumin, g/dL	4.014 ± 0.787	4.038 ± 0.588	0.6724**
Globulins, g/dL	3.314 ± 0.794	3.284 ± 0.759	0.8279*
LDH, U/L	844.643 ± 524.467	878.750 ± 502.265	0.7129*
ASLO, UI/mL	181.204 ± 288.003	209.297 ± 307.138	0.6031*
PCR mg/L	9.351 ± 15.646	6.019 ± 9.953	0.05913**
Alpha 1- antitrypsin, mg/dL	150.411 ± 51.262	156.985 ± 44.316	0.4452*

*ANOVA, ** Kruskal -Wallis

FIGURE LIST

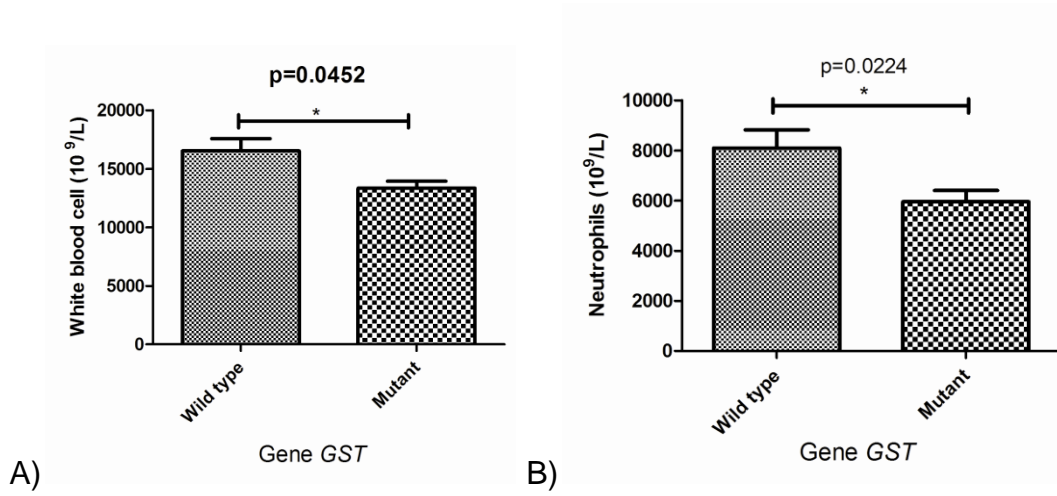
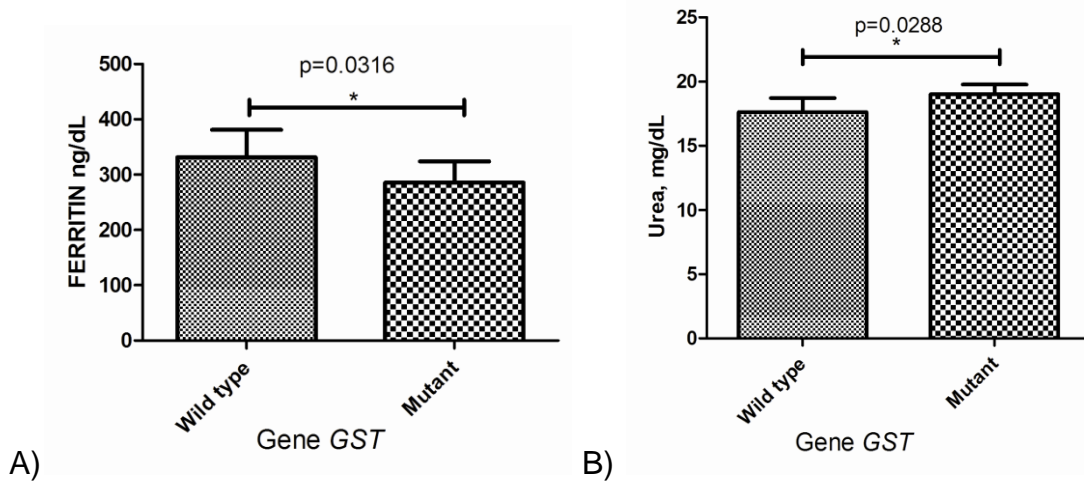


Figure 01. Analysis of total leukocyte and segmented neutrophils in HbSS individuals carrying the wild type and mutant alleles for the gene of GST. * T test



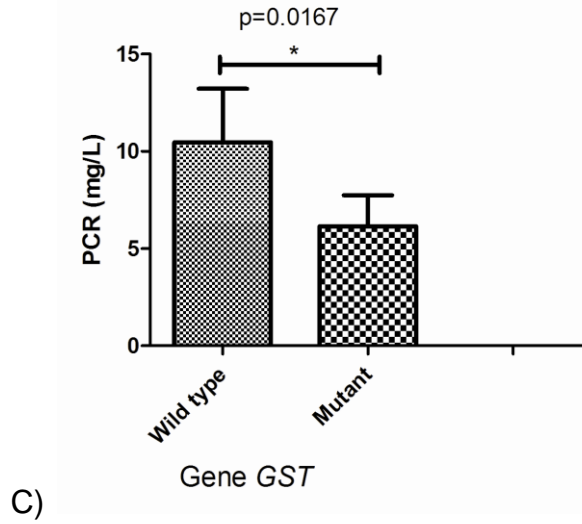


Figure 02. Analysis of biochemical variables in SCD patients with wild and mutant genotypes for *GST* gene. A: Serum levels of urea; B: Serum levels of ferritin; and C: Serum Levels of C-reactive protein in HbSS individuals. * Test Mann-Whitney

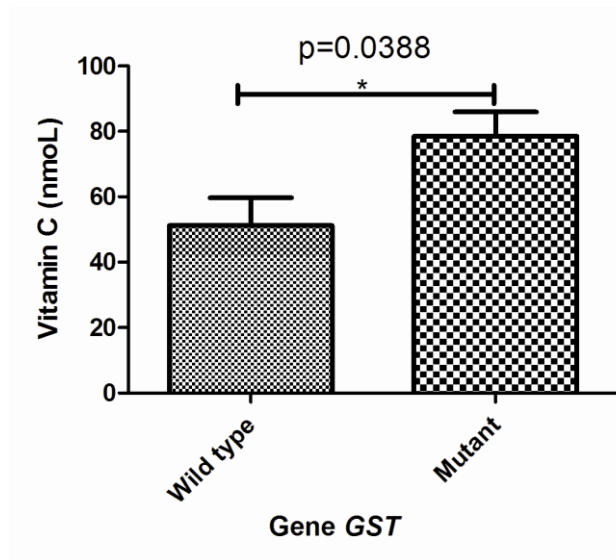


Figure 03. Analysis of serum levels of vitamin C in SCD patients with wild and mutant genotype to *GST* polymorphism.

REFERENCES

1. ALABDULAALI MK. Blood Antioxidant Parameters in Sickle Cell Anemia Patients in Steady State. *Annals of Thoracic Medicine- Vol 2 , issue4, oct-cdec 2007.*
2. ALBERTO FL, SAAD STO and COSTA FF. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene defects. *Eur J Haematol. 66:383-388, 2001.*
3. ARRUDA VR, LIMA CS, GRIGNOLI CR, MEO MB, LORAND-METZE I, AVIRAM M, HARDAK E, VAYA J, *et al.* Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation.101:2510–7, 2000.*
4. BOLUFER P, COLLADO M, BARRAGÁN E, CERVERA J, CALASANZ MJ, COLOMER D, ROMAN-GÓMEZ J, SANZ MA. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. *The hematology journal. 92(03):308-314, 2007.*
5. BROOMFIELD CA: A purified recombinante organophosphorus adid anhydrase protects mice against soman. *Pharmacol Toxicol 1992, 70:65-66.*
6. BUNN HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med. 337:762–769, 1997.*

7. COTTON, S.C.; SHARP, L.J.; BROCKTON, N. Glutathione S transferase polymorphisms and colorectal cancer. *American Journal of Epidemiology*, p.1-18, 1999.
8. EL-HAZMI MA, JABBAR FA, WARSY AS. Cholestrol and triglyceride level in patients with sickle cell anaemia. *Scand J Clin Lab Invest*. 47:351-4, 1987.
9. FUHRMAN B, VOLKOVA N, AVIRAM M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized lowdensity lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and paraoxonase. *Atherosclerosis*.161:307–16, 2002.
10. GATTÁS GJF, KATO M, SOARES-VIEIRA JA, SIRAQUEL MS, KOHLER P, GOMES L, REGO MAV, BYDLOWSKI SP. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2004) 37: 451-458.
11. GUALANDRO SFM. A associação anemia falciforme e hemoglobina fetal. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*;31(6):403-404, 2009.
12. HATAGIMA A, KLAUTAU-GUIMARÃES MN, SILVA FP, CABELLO H. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genet. Mol. Biol.* Vol23 no.4 São Paulo. 2000.
13. HEINECKE JW & LUSIS AJ Paraoxonase gene polymorphisms associated with coronary heart disease: Support for the oxidative damage hypothesis [Editorial]. *Am J Hum Genet*. 62:20–24, 1998.
14. LEE A, THOMAS P, CUPIDORE L, et al.: Improved survival in homozygous sickle cell disease: lessons from a cohort study. *BMJ* 311:1600-1602, 1995.

15. LONDON, S.J et al. Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and lung cancer risk Among African- American and Caucasians in Los Angeles County, Califórnia. Journal of the National Cancer Institute. v. 87, p.1246-1253, 1995.
16. LOSI-GUEMBAROVSKI R, CÓLUS IMS. Glutathione S-transferase M1 (GSTM_1): ethnic distribution and relation with cancer Semina: Ci. Biol. Saúde, Londrina, v. 22, p. 3-9, jan./dez. 2001
17. LOSI-GUEMBAROVSKI, R. Estimativa da freqüência dos indivíduos portadores do gene GSTM-1 na Região Norte do Paraná. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina 2001.
18. MACKNESS MI, ARROL S, ABBOTT CA AND DURRINGTO PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. Atherosclerosis, 104, 129-135, 1993.
19. MANFREDINI V, LAUERMANN LL; GRIEBELER IH, SANTIN AP, BRANDÃO VDM, WAGNER S, CASTRO SM, PERALBA MCR and BENFATO MS. Blood Antioxidant Parameters in Sickle Cell Anemia Patients in Steady State. JOURNAL OF THE NATIONAL MEDICAL ASSOCIATION, VOL. 100, NO. 8, AUGUST 2008
20. MANNERVICK B. The isoenzymes of glutathione transferase. Adv. Enzymol.57:357-417, 1985.
21. NAUM PC, QUERINO SSS, CURY NM, TOLEDO CG, NAOUM FA. Avaliação laboratorial da toxicidade molecular em eritrócitos talassêmicos. Ver. Brás. Hematol. Hemoter. 28(4):301-302, 2006.

22. OFOROFUO IA & ADEDEJI MO. Effect of sickle-cell gene expression on plasma cholesterol in a Nigerian population. *Clin Biochem* .27:505-8, 1987.
23. RAHIMI Z, MERAT A, HAGHSHENASS M, MADANI H, REZAEI M, NAGEL RL. Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL-cholesterol in sickle cell trait. *Clin Chim Acta*. Vol. 365, Issue 1-2, Pages 217-20, 2006.
24. SEIXAS MO, ROCHA LC, [CARVALHO MB](#), [MENEZES JF](#), [LYRA IM](#), [NASCIMENTO VM](#), [COUTO RD](#), [ATTA AM](#), [REIS MG](#), [GONCALVES MS](#). Levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) among children with steady-state sickle cell disease. [Lipids Health Dis](#). 2010 Aug 27;9:91.
25. STANULLA M, MATTIN S, ANNETTE MB, MARTIN Z, WELTE K. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study 2000
26. VICARI P, DUCH CR, SHIMMOTO MMA, NOGUTI MAE, FIGUEIREDO MS. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase mu1 and theta 1 in patients with acquired aplastic anemia: A Brazilian experience. *Rev. bras. Hematol hemoter*. 29(4): 344-345, 2007.
27. WEATHERALL DJ, PROVAN AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet*. 355 (9210):1169-75. 2000
28. WU G, FANG YZ, YANG S, LUPTON JR, TURNER ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*. 134(3):489-92, 2004.

ANEXO

**VALORES DE REFERÊNCIAS PARA DETERMINAÇÕES
HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS**

HEMATOLOGIA

Hemácias (milhões/mL)	Homens	4,5 – 6,1
	Mulheres	4,0 – 5,4
Hemoglobina (g/dL)	12,8 – 17,8	
Hematócrito(%)	40,0 – 54,0	
VCM (fl)	80,0 – 98,0	
HCM (pg)	27,0 – 32,0	
CHCM (%)	31,0 – 35,0	
Leucócitos (10⁹/L)	4.000 – 10.000	
Neutrófilos (10⁹/L)	2.500 - 7500	
Bastonetas (10⁹/L)	40 – 400	
Segmentados (10⁹/L)	1600 – 7000	
Eosinófilos (10⁹/L)	400 – 600	
Basófilos (10⁹/L)	0 – 300	
Linfócitos típicos (10⁹/L)	720 – 4800	
Linfócitos atípicos (10⁹/L)	0 – 300	
Monócitos (10⁹/L)	120 – 1000	
Plaquetas (10⁹/L)	150.000 – 450.000	
Reticulócitos (%)	0,5 – 1,5	

BIOQUÍMICA

	Desejável	Limítrofe	Aumentado
Colesterol total (mg/dL) 2	<170	17- a 199	≥200
a 19 anos			
20 ou mais	<200	200 a 239	≥ 240
Colesterol HDL (mg/dL)	≥40		
até 10 anos			
11 ou mais	≥35		

Colesterol LDL (mg/dL) 2	<110	110 – 129	≥130
a 19 anos			
Colesterol VLDL (mg/dL)	< 40		
	Desejável	Aumentado	
Triglicerídeos (mg/dL)	Até 100	>100	
< 10 anos			
10 a 19 anos	Até 130	>240	
>20 anos	Até 199	>200	
Uréia (mg/dL)	15 a 40		
Creatinina (mg/dL)	0,4 a 1,3		
Ferro sérico (mcg/dL)	Homens	175	
	Mulher	170	
	Crianças	22 a 135	
	(2 a 12 anos)		
AST (U/L)	Até 42		
ALT (U/L)	Até 41 U/L		
Bilirrubina total (mg/dL)	Até 1,39		
Bilirrubina direta (mg/dL)	Até 0,4		
Bilirrubina indireta (mg/dL)	Até 0,9		
Proteínas totais (g/dL)	6,0 – 8,0		
Albumina (g/dL)	3,5 – 5,5		
Globulinas (g/dL)	2,3 – 3,5		
RE Alb/Glob	1,0 – 2,5		
LDH (U/L) a 37°C	207 – 414		
Ferritina (ng/mL)	Homens	23,9 a 335,2	
	Mulheres	11,0 a 305,8	
ASLO (UI/mL)	< 200		
PCR (mg/L)	< 6,0		
Alfa 1 antitripsina (mg/dL)	80 a 200		