

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Emanuelle Schneider Dal Ponte

**POLIMORFISMO DA ALA16VAL MNSOD EM PORTADORES DO TRAÇO**  
**FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE ESTRESSE**  
**OXIDATIVO**

**Dissertação de Mestrado**

**URUGUAIANA**

**2017**

**EMANUELLE SCHNEIDER DAL PONTE**

**POLIMORFISMO DA ALA16VAL MNSOD EM PORTADORES DO  
TRAÇO FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini

**Uruguiana  
2017**

P813p Ponte, Emanuelle Schneider Dal

Polimorfismo da Ala 16 Val MnSOD em portadores do traço falciforme e sua associação com biomarcadores de estresse oxidativo / Emanuelle Schneider Dal Ponte.

73 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2017.

"Orientação: Vanusa Manfredini".

1. Traço falciforme. 2. Ala 16 Val MnSOD. 3. hematologia. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

**EMANUELLE SCHNEIDER DAL PONTE**

**POLIMORFISMO DA ALA16VAL MNSOD EM PORTADORES DO  
TRAÇO FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM  
BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini

Área de concentração: Bioprospecção  
Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 03 de julho de 2017.

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini  
Orientadora  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Vanderlei Folmer  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UNIPAMPA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Bley Ribeirpo  
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Aos meus pais, Luciane e Leandro, e ao meu marido, Ryann, por acreditarem em mim quando nem mesmo eu o fiz, pelo amor incondicional e incentivo constante.

## AGRADECIMENTO

Eu agradeço, antes de tudo, à Deus, que sempre ilumina meu caminho, me abençoa e zela.

Grande parte do meu incentivo, da minha força e da minha determinação vem da minha família. Aos meus pais, Leandro e Luciane, eu agradeço imensamente por sempre apoiarem todas as minhas decisões, pelo amor que transborda e por não terem me deixado desistir nos momentos de incerteza. Vocês são o meu exemplo e a minha vida!

Ao meu marido, Ryann, pela compreensão nas horas em que estive ausente, pelo apoio incondicional, por compartilhar dos meus sonhos e por me ajudar a construí-los. Tua determinação, paixão e seriedade no trabalho me incentivam a trilhar esse caminho e almejar um futuro especial para nós. Te amo!

Para a minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanusa Manfredini, um agradecimento especial por sempre acreditar em mim. Sem teu apoio, teu zelo e tua instrução, eu não chegaria até aqui. Obrigada, acima de tudo, pela confiança e pela liberdade na execução do projeto. Que a vida lhe reserve muita luz e sucesso!

Às meninas do GESTOX, por me receberem tão bem quando cheguei a Uruguaiana. Pelas orientações, dicas e ajuda na execução do meu projeto. Sem vocês, nada disso seria possível. Espero, algum dia, poder retribuir tudo isso a vocês. MUITÍSSIMO obrigada!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jacqueline Piccoli, pelos conselhos e pela confiança e, também, à equipe do laboratório de Genômica, em especial à Patrícia Maurer e à Lyana Berro, que nunca hesitaram em ajudar e ensinar. Vocês são muito especiais e moram no meu coração!

Agradeço, ainda, à Unipampa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade que me foi concedida e a todos que, de alguma forma, fizeram parte da minha trajetória e contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Serei sempre muito grata pelo apoio e ajuda de todos vocês!

Muito obrigada!

*“Lembre-se de que você mesmo é o melhor secretário de sua tarefa, o mais eficiente propagandista de seus ideais, a mais clara demonstração de seus princípios, o mais alto padrão do ensino superior que seu espírito abraça e a mensagem viva das elevadas noções que você transmite aos outros. Não se esqueça, igualmente, de que o maior inimigo de suas realizações mais nobres, a completa ou incompleta negação do idealismo sublime que você apregoa, a nota discordante da sinfonia do bem que pretende executar, o arquiteto de suas aflições e destruidor de suas oportunidades de elevação – é você mesmo. ”*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica  
Fundação Universidade Federal do Pampa

### **POLIMORFISMO DA ALA16VAL MNSOD EM PORTADORES DO TRAÇO FALCIFORME E SUA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

Autora: Emanuelle Schneider Dal Ponte  
Orientadora: Vanusa Manfredini  
Local e Data da Defesa: Uruguaiana, 03 de julho de 2017.

O traço falciforme (HbAS) é o heterozigoto da anemia falciforme, portador do gene S assintomático e considerado, ainda, clinicamente normal. Estudos epidemiológicos mostram sua alta prevalência na população brasileira sendo que, em determinadas cidades do Rio Grande do Sul, estima-se uma frequência de 1:75 habitantes. Novos estudos têm apontado que o portador do traço falciforme, por apresentar aproximadamente 40% de HbS, tem envolvimento com estresse oxidativo, o qual pode atuar na progressão da doença. A Superóxido Dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante que pode ter sua atividade diminuída em algumas patologias. O polimorfismo mais comum da MnSOD é o Ala16Val, que é resultado de uma mutação que substitui o códon original GCT (alanina) para GTT (valina). O alelo valina (V) dificulta o transporte e a entrada da enzima para dentro da mitocôndria diminuindo, assim, a capacidade antioxidante do indivíduo e favorecendo as vias de estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi analisar a presença do polimorfismo Ala16Val MnSOD em portadores do traço falciforme e associá-lo com biomarcadores de estresse oxidativo. Os participantes do estudo foram recrutados junto ao Banco de Sangue do Hospital da Santa Casa de Caridade de Uruguaiana. Ao total obteve-se 102 indivíduos, sendo 50 do grupo controle e 52 do grupo traço falciforme (HbAS). Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi realizada a coleta de sangue venoso. Dois tubos contendo EDTA foram coletados para as análises hematológicas, genômicas e de estresse oxidativo. Os resultados encontrados apontam que os portadores do traço falciforme apresentam as atividades da catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase significativamente diminuídas ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle. O mesmo também foi observado com os níveis de compostos antioxidantes como a glutathione, vitamina C e status antioxidante total ( $p < 0,001$ ). Entretanto, os portadores do traço falciforme apresentam aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) no dano oxidativo a biomoléculas como carbonilação de proteínas, lipídeos e o DNA. A análise do polimorfismo Ala16Val MnSOD mostrou 100% do genótipo AV no grupo controle e 21% do genótipo AA e 79% do genótipo AV no grupo HbAS. O presente estudo não conseguiu, todavia, associar o polimorfismo com os biomarcadores de estresse oxidativo. Sugere-se, dessa forma, que o portador do traço falciforme possui aumento do estresse oxidativo e o polimorfismo Ala16Val MnSOD parece não estar associado aos parâmetros analisados. Entretanto, por esse estudo ser o primeiro a ser relatado, espera-se que em uma população maior de HbAS seja possível ampliar o conhecimento acerca dessa alteração genética.

**Palavras-chave:** traço falciforme, Ala16Val MnSOD, hematologia, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-Graduation in Biochemistry  
Federal University of Pampa

### **ALA16VAL MNSOD POLYMORPHISM IN SICKLE CELL TRAIT AND ITS ASSOCIATION WITH OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS**

Author: Emanuelle Schneider Dal Ponte  
Advisor: Vanusa Manfredini  
Date and Place of Defense: Uruguaiiana, July 03, 2017.

Sickle cell trait (SCT) is the heterozygote of sickle cell anemia (HbAS), which carries the asymptomatic S gene and is considered clinically normal. Epidemiological studies show its high prevalence in the overall Brazilian population, and in certain cities such as Rio Grande do Sul, where a frequency of 1:75 is estimated. Recent studies have pointed out that the SCT because it represents approximately 40% of hemoglobin S (HbS), is involved with oxidative stress, which can act in the progression of the disease. Superoxide dismutase (SOD) is an antioxidant enzyme that may have decreased activity in some pathologies. The most common MnSOD polymorphism is Ala16Val, which is the result of a mutation that replaces the original GCT (alanine) codon for GTT (valine). The valine allele (V) hinders the transport and entry of the enzyme into the mitochondria, thereby both reducing the antioxidant capacity of the individual and favoring oxidative stress pathways. The aim of this study is to analyze the presence of the Ala16Val MnSOD polymorphism in patients with SCT and to associate it with biomarkers of oxidative stress. The study participants were recruited from the Blood Bank of the Santa Casa de Caridade Hospital of Uruguaiiana. A total of 102 individuals were enrolled, 50 in the control group and 52 in the SCT group. After obtaining written informed consent, venous blood was collected. For each one, two tubes containing EDTA were collected for hematological, genomic, and oxidative stress analyses. The results showed that sickle cell carriers exhibit significantly decreased ( $p < 0.001$ ) catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities compared with the control group. The same was also observed for the levels of antioxidant compounds such as glutathione, vitamin C, and total antioxidant status ( $p < 0.001$ ). However, patients with SCT presented a statistically significant increase ( $p < 0.001$ ) in oxidative damage to biomolecules such as protein carbonylation, lipid peroxidation, and DNA. Analysis of the Ala16Val MnSOD polymorphism showed 100% of the AV genotype in the control group, and 21% of the AA genotype and 79% of the AV genotype in the HbAS group. Although the current study could not associate the polymorphism with oxidative stress biomarkers, it suggested the SCT increased oxidative stress, and the Ala16Val MnSOD polymorphism was not associated with the parameters analyzed. However, because this study is the first to report these findings regarding the Ala16Val MnSOD polymorphism, it is expected that in a larger HbAS population, it will be possible to gain a better understanding of this genetic alteration.

**Keywords:** Sickle cell trait, Ala16Val MnSOD, hematology, oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Presença de drepanócitos no sangue periférico.....	17
<b>Figura 2</b> - Frequência do gene S no Brasil.....	20
<b>Figura 3</b> - Polimerização da HbS e o processo de vaso oclusão.....	21
<b>Figura 4</b> - Esquema geral de formação de espécies reativas nas células eucarióticas.....	29
<b>Figura 5</b> - Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.....	32
<b>Figura 6</b> - Polimorfismo Ala16Val da MnSOD.....	34

## MANUSCRITO

<b>Figure 1</b> - Enzymatic defenses of controls and the sickle cell trait (SCT).....	45
<b>Figure 2</b> - Non-enzymatic defenses of controls and the sickle cell trait (SCT).....	45
<b>Figure 3</b> - Oxidative damage of controls and sickle cell trait (SCT).....	46

**LISTA DE TABELAS**

## MANUSCRITO

<b>Table 1</b> - Sociodemographic and hematological profiles of the control and SCT groups.....	44
<b>Table 2</b> - Genotypes of the Ala16Val MnSOD polymorphism and basal levels of oxidative stress parameters of controls and sickle cell trait.....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b><math>^1\text{O}_2</math></b>	-	Oxigênio Singlete
<b>A</b>	-	Alelo Alanina
<b>AA</b>	-	Genótipo Alanina-Alanina
<b>AV</b>	-	Genótipo Alanina-Valina
<b>AF</b>	-	Anemia Falciforme
<b>ATP</b>	-	Adenosina Trifosfato
<b>CAT</b>	-	Catalase
<b>CLAE</b>	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>DNA</b>	-	Ácido Desoxirribonucléico
<b>DF</b>	-	Doença Falciforme
<b>EO</b>	-	Estresse Oxidativo
<b>ER</b>	-	Espécies Reativas
<b>ERN</b>	-	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>ERO</b>	-	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>GPx</b>	-	Glutathione Peroxidase
<b>GSH</b>	-	Glutathione Reduzida
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	-	Peróxido de Hidrogênio
<b>Hb</b>	-	Hemoglobina
<b>HbA</b>	-	Hemoglobina normal (A)
<b>HbA<sub>2</sub></b>	-	Hemoglobina A <sub>2</sub>
<b>HbAS</b>	-	Portador do traço falciforme
<b>HbF</b>	-	Hemoglobina Fetal
<b>HbSS</b>	-	Homozigose da HbS
<b>HOCl</b>	-	Ácido Hipocloroso
<b>HU</b>	-	Hidroxiuréia
<b>MDA</b>	-	Malondialdeído
<b>MnSOD</b>	-	Superóxido Dismutase dependente de Manganês
<b>NO<math>\cdot</math></b>	-	Radical Óxido Nítrico
<b>O<sub>3</sub></b>	-	Ozônio
<b>O<sub>2</sub><math>\cdot^-</math></b>	-	Radical Ânion Superóxido

<b>OH<sup>•</sup></b>	- Radical Hidroxila
<b>OMS</b>	- Organização Mundial da Saúde
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	- Ânion Peroxinitrito
<b>PETN</b>	- Programa Estadual de Triagem Neonatal
<b>PNTN</b>	- Programa Nacional de Triagem Neonatal
<b>RL</b>	- Radical Livre
<b>RO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	- Radical Peroxila
<b>SCA</b>	- Sickle Cell Anemia
<b>SCT</b>	- Sickle Cell Trait
<b>SOD</b>	- Superóxido Dismutase
<b>TAS</b>	- <i>Status Antioxidante Total</i>
<b>TBA</b>	- Ácido Tiobarbitúrico
<b>TBARS</b>	- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>V</b>	- Alelo Valina
<b>VV</b>	- Genótipo Valina-Valina

## SUMÁRIO

PARTE I .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Anemia Falciforme .....	17
2.1.1 Epidemiologia .....	18
2.1.2 Distribuição do gene S no Brasil .....	19
2.1.3 Fisiopatologia .....	20
2.1.4 O portador do traço falciforme .....	23
2.1.5 Diagnóstico e tratamento .....	24
2.2 Programa Nacional de Triagem Neonatal (“Teste do Pezinho”) .....	26
2.3 Estresse Oxidativo .....	28
2.3.1 Radicais Livres e Espécies Reativas .....	28
2.3.2 Estresse Oxidativo e Anemia Falciforme .....	29
2.3.3 Dano Oxidativo em Biomoléculas .....	30
2.3.4 Antioxidantes .....	31
2.3.4.1 Defesas enzimáticas .....	31
2.3.4.2 Defesas não-enzimáticas .....	32
2.4 Superóxido Dismutase (SOD) .....	33
2.5 Polimorfismo Ala16Val da MnSOD .....	33
3 OBJETIVOS .....	36
3.1 Objetivo geral .....	36
3.2 Objetivos específicos .....	36
PARTE II .....	37
MANUSCRITO .....	37
PARTE III .....	38
4 CONCLUSÃO .....	38
5 PERSPECTIVAS .....	39
REFERÊNCIAS .....	40



## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontra-se a **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e os **OBJETIVOS**. Os resultados que fazem parte desta dissertação, assim como as seções materiais e métodos, resultados, discussão e referências, estão apresentados sob a forma de manuscrito, no item **MANUSCRITO**, que está na **parte II** deste trabalho. O item **CONCLUSÃO**, que apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados mostrados nos manuscritos deste trabalho, encontra-se na **parte III** desta dissertação, assim como o item **PERSPECTIVAS**, onde estão expostos os possíveis estudos para dar continuidade a este trabalho, e o item **REFERÊNCIAS**, que se refere somente às citações que aparecem nos itens introdução e revisão bibliográfica desta dissertação.

## PARTE I

### 1 INTRODUÇÃO

As hemoglobinopatias são patologias provenientes de alterações hereditárias autossômicas recessivas na hemoglobina (Hb). Essas alterações modificam a estrutura da molécula e geram, por conseguinte, hemoglobinas variantes (BETTATI; MOZZARELLI; PERUTZ, 1998). Aproximadamente 7% da população mundial é portadora grave de uma alteração em um dos genes da cadeia globínica, tornando esse tipo de caso uma preocupação ao nível de saúde pública mundial (EMBURY, 1995; PAULING et al., 1949).

A alteração estrutural mais frequente da molécula de Hb é a anemia falciforme, resultado da substituição do ácido glutâmico pelo aminoácido valina na posição 6 da cadeia  $\beta$ -globina, resultando na hemoglobina S (HbS). Esta mutação de ponto está comumente associada à africanos e afrodescendentes e, por isso, possui maior incidência em países da América Central e do Sul, bem como os países da África, Índia e, também, Estados Unidos. No Brasil, essa incidência varia conforme a miscigenação das diferentes regiões do país (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015; MANFREDINI et al., 2008; MATHEW et al., 2016).

O gene da anemia falciforme pode se manifestar de duas formas: por homozigose e heterozigose. O doente falciforme é caracterizado por homozigose da HbS (SS) e possui drepanócitos, ou seja, hemácias em formato de foice em sua corrente sanguínea. Essa característica causa um dos principais sintomas relacionado à doença: as crises vaso-oclusivas (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015). Já o heterozigoto (também chamado traço falciforme - HbAS), é apenas o portador do gene S, ou seja, é capaz de produzir tanto HbA como HbS (aproximadamente 40% de HbS). Contudo, os heterozigotos são indivíduos, em grande parte, assintomáticos e sem alterações hematológicas significativas (BEHERA et al., 2012). Os estudos mais recentes, entretanto, sugerem que o portador do traço falciforme deva ser reestudado e apontam ao aumento do estresse oxidativo nesses indivíduos, contribuindo para um maior dano oxidativo tecidual (CHIRICO et al., 2012a; MANFREDINI et al., 2008; REES; GIBSON, 2011; VOSKOU et al., 2015).

Os organismos aeróbios metabolizam, em condições normais, aproximadamente 90% do oxigênio na mitocôndria. Parte desse oxigênio, porém, é desviado para outras rotas metabólicas formando, as espécies reativas de oxigênio (ERO) (GÖRLACH et al., 2015).

Quando a produção de ERO se sobressai perante a sua eliminação por parte das defesas antioxidantes, o organismo perde o equilíbrio e entra, assim, no estado de estresse oxidativo (JEONG et al., 2012; NARENDHIRAKANNAN; HANNAH, 2013; REUTER et al., 2010).

Para combater ou neutralizar a intensa produção de ERO, os organismos desenvolveram um complexo mecanismo de reparo físico e químico: os antioxidantes. Esse sistema de defesa conta com antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos são representados, principalmente, pela glutathione (GSH), tióis não proteicos, ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). Já a defesa enzimática conta com a atividade de três enzimas antioxidantes principais: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (HALLIWELL, 2006; MILLER; SHAW; LANGRISH, 2012).

A SOD é a primeira enzima antioxidante na mitocôndria que converte ERO em oxigênio e peróxido de hidrogênio. É uma enzima que possui 3 isoformas, sendo a MnSOD, que se encontra dentro da mitocôndria, a mais importante (CHURCH et al., 1992). A SOD dependente de manganês é codificada por um gene que contém cinco éxons e que está localizado na posição 25 do braço longo do cromossomo 6 (6q25) (WISPÉ et al., 1989). Por ser produzida no citosol, essa enzima necessita ser transferida para dentro da mitocôndria para que exerça a sua função. Todo esse processo descrito é coordenado por uma sequência peptídica presente no início da proteína MnSOD; e é exatamente nessa sequência que um dos principais polimorfismos desse gene ocorre (DUARTE et al., 2010; VALKO et al., 2007).

O polimorfismo Ala16Val é resultado de uma mutação que substitui uma citosina por uma timina na sequência codificadora anteriormente descrita, fazendo com que o códon original GCT (alanina) seja convertido para GTT (valina). A partir disso, três genótipos foram descritos: genótipo AA, genótipo AV e genótipo VV (ROSENBLUM; GILULA; LERNER, 1996). O alelo valina (V) influi na conformação da sequência da proteína e acaba por dificultar o transporte e a entrada da enzima para dentro da mitocôndria, onde exercerá seu papel. Portanto, indivíduos portadores do alelo Val (V) possuem uma eficiência enzimática menor do que aqueles portadores do alelo Ala (A) e, conseqüentemente, sua capacidade antioxidante é reduzida, resultando em um aumento no estresse oxidativo dos mesmos (DUARTE et al., 2010; SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996).

Portanto, diante do exposto, tornou-se justificável o objetivo deste estudo: determinar a presença do polimorfismo da Ala16Val MnSOD em portadores do traço falciforme e associá-lo com biomarcadores de estresse oxidativo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Anemia Falciforme

As hemoglobinopatias são patologias provenientes de alterações hereditárias autossômicas recessivas na molécula hemoglobina (Hb), proteína dos glóbulos vermelhos (ADORNO et al., 2005). Essas alterações, são herdadas dos nossos pais, modificam a estrutura da molécula e geram, desse modo, hemoglobinas variantes (BETTATI; MOZZARELLI; PERUTZ, 1998; SERJEANT, 1997). A variação estrutural mais comum da molécula de Hb ocorre nas pessoas com anemia falciforme (AF), doença essa que foi pioneira na caracterização molecular (EMBURY, 1995; PAULING et al., 1949).

A denominação anemia falciforme, também chamada de anemia drepanocítica ou drepanocitose, vem do Latim *falci* (“foice”) e *forme* (“em formato de”) justamente pelo fato de que, nessa doença, os eritrócitos, normalmente arredondados, adquirem uma forma irreversível de “meia-lua” ou “foice” (Figura 1). A designação “anemia falciforme” é reservada para a forma da doença que ocorre em homozigotos para a mutação (HbSS). Essa modificação, a qual conduz a alterações na estabilidade e solubilidade da molécula, é resultado da substituição do ácido glutâmico pelo aminoácido valina na posição 6 da cadeia  $\beta$ -globina, gerando a hemoglobina S (HbS) (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015; VICHINSKY, 2012).

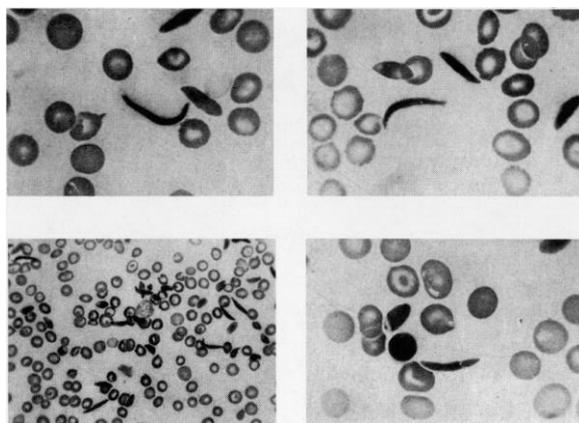


FIGURA 1 – Presença de drepanócitos no sangue periférico.  
Fonte: HERRICK, 2001.

A manifestação mais comum desta doença resulta da herança homozigótica da mutação, sendo normalmente referida como "HbSS", condição que faz com que esses indivíduos

produzam, predominantemente, a hemoglobina S. Entretanto, o grau de gravidade da doença falciforme pode mudar pois a hemoglobina variante combina-se, também, com outras hemoglobinas anormais. As formas heterozigóticas conhecidas são as que fazem associação com variantes como HbC, HbD, HbE e as interações com as talassemias  $\alpha$ ,  $\beta^0$  e  $\beta^+$  ou mesmo com HbA. A presença de apenas um gene para a hemoglobina S, combinado com outro gene para hemoglobina A, caracteriza o indivíduo como portador do traço falciforme, possibilitando que a pessoa produza tanto a HbS como a hemoglobina normal (HbA), sendo que somente até 40% da hemoglobina do portador é falcizada. Quando pareadas à hemoglobina A, outras hemoglobinas mutantes (HbC, HbD e HbE) também não causam sintomas clínicos, porém, quando pareadas com a HbS, apresentam quadro clínico semelhante ao da anemia falciforme (BEHERA et al., 2012; MATHEW et al., 2016). Portadores do traço falciforme possuem, comprovadamente, um benefício frente à outra doença: essa característica lhes confere proteção e resistência contra a malária (PIEL et al., 2010; SERJEANT, 1997).

### *2.1.1 Epidemiologia*

Mais de 300.000 bebês nascem, todo ano, com algum tipo sério de hemoglobinopatia e aproximadamente 5% da população mundial carrega o traço do gene para algum tipo de desordem na molécula de hemoglobina, destacando-se, principalmente, a doença falciforme e a talassemia (WHO, 2011). Em um estudo feito pela Global Burden of Disease (2015), o qual rastreou-se doenças agudas e crônicas em 188 países entre os anos 1990 e 2013, constatou-se uma prevalência em torno de 3,18 milhões de casos de AF e 43 milhões de casos de traço falciforme, somente no ano de 2013. Diante destes fatos, é preciso encarar essa realidade como uma preocupação a nível de saúde pública mundial.

A prevalência do gene para a HbS é maior em africanos e também é vista em outros países do mundo como o Brasil, por exemplo, que sofreram, há muitos anos atrás, migração da população africana pelo tráfico de escravos. A Nigéria, provavelmente, possui o maior número de pessoas com essa característica, com cerca 25-30% da população. Nos Estados Unidos, um estudo de duas décadas revelou que 1,5% dos nascidos vivos possuem o gene falciforme e que essa prevalência em afro-americanos é de, aproximadamente, 8% (KOTILA, 2016; MATHEW et al., 2016).

Atualmente, existe uma grande miscigenação do gene no mundo todo e, por isso, a anemia

falciforme deixou de ser uma doença exclusivamente de afro-descendentes. Estima-se que cerca de 1% da população europeia possua agora um gene para a hemoglobinopatia, a maioria dos quais codifica o gene falciforme. Em um estudo feito por Kunz e colaboradores (2016), um rastreamento de recém-nascidos entre imigrantes alemães mostrou uma prevalência de 22 casos a cada 1.000 nascimentos. A prevalência das características em outras populações ocidentais vem aumentando muito ao longo dos anos e tornou-se preocupante por ser um problema de saúde pública mundial (KOTILA, 2016).

É de grande importância que essa doença seja diagnosticada logo na primeira infância. Países mais subdesenvolvidos e com poucos recursos, como a maioria dos países africanos, por exemplo, ainda possuem grandes taxas de mortalidade. Na África Subsaariana, a anemia falciforme é responsável por, aproximadamente, até 6% de todas as mortes em crianças. A única forma de que esse panorama mude é consolidando recursos de diagnóstico precoce e trabalhando em melhorias para o tratamento dos sintomas, visando a qualidade de vida de cada indivíduo afetado (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015).

### *2.1.2 Distribuição do gene S no Brasil*

Quando comparadas com outras doenças diagnosticadas pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), as hemoglobinopatias são as doenças genéticas mais comuns nos recém-nascidos brasileiros. A hemoglobina S é a variante de hemoglobina mais prevalente no país e sua distribuição é bastante heterogênea, dependendo diretamente da população afrodescendente que compõe o Brasil e, por isso, sua prevalência varia consideravelmente nas 5 regiões do país. (DINIZ et al., 2009; VIANA-BARACIOLI et al., 2011).

Estima-se que, no Brasil, aproximadamente 4% da população geral brasileira e 6-10% dos afrodescendentes sejam portadores do traço falciforme (HbAS). O gene para a HbS é mais frequente nos estados da região Norte e Nordeste, se comparados aos estados da região Sul (LERVOLINO et al., 2010). Conforme figura 2, dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal mostram que, no estado da Bahia a incidência da doença falciforme é de 172 casos para cada 100 mil habitantes, enquanto o traço falciforme está presente em 9,8% da população. No Rio de Janeiro, 60 casos de DF para 100 mil habitantes e 13,96% para o traço. A presença dessa mutação, na região Sul, é consideravelmente mais baixa em relação às outras regiões do país, onde o estado do Rio Grande do Sul, por exemplo, que possui majoritariamente imigração de descendentes italianos, alemães e poloneses, possui uma

frequência de 0,85 caso de DF para cada 100.000 pessoas e 1,14% de casos de traço (BRASIL, 2012).

Segundo o Ministério da Saúde, nascem no Brasil, aproximadamente, 3,5 mil crianças por ano com DF e 200.000 com traço falciforme e, estima-se, que 7,2 milhões pessoas sejam portadoras do traço (HbAS) e que 25 a 30 mil pessoas tenham AF (FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010).

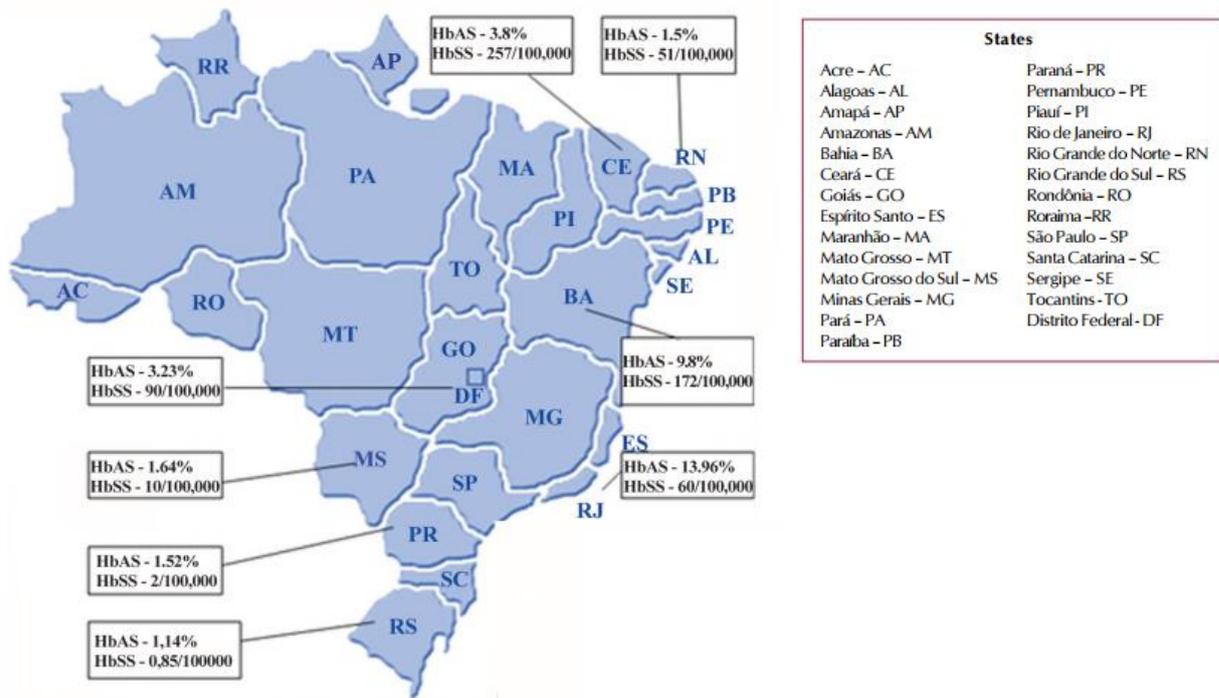


FIGURA 2 – Frequência do gene S no Brasil  
Fonte: Adaptado de LERVOLINO, 2010.

### 2.1.3 Fisiopatologia

A patogênese da anemia falciforme gira em torno da polimerização da HbS desoxigenada. Em seu estado oxigenado, a conformação estrutural das cadeias globínicas beta S ficam mais separadas e, por isso, a molécula de hemoglobina S fica “relaxada”. Quando em estado desoxigenado, as cadeias globínicas beta S ficam mais próximas e, conseqüentemente, a molécula de hemoglobina fica mais tensa. Todo esse quadro, em condições com baixa pressão de oxigênio, contribui com a “falcização” do eritrócito, em um processo que é chamado de polimerização da HbS desoxigenada (BEHERA et al., 2012; MANFREDINI et al., 2008).

Esse fato é de grande importância para a compreensão do processo de vaso oclusão (Figura 3). Além de mudarem seu formato sob condições de hipóxia, desidratação ou acidose, os eritrócitos (agora chamados de drepanócitos) se tornam mais suscetíveis à aderências, o que facilita a aglomeração ou aprisionamento dessas células dentro dos vasos sanguíneos, principalmente os de menor calibre, fazendo com que o fluxo sanguíneo diminua e gere crises de dor, infarto e síndrome torácica aguda (KOTILA, 2016; MATHEW et al., 2016). As crises vaso-oclusivas são, hoje, a principal causa de admissão em hospitais desses pacientes. Estudos relatam que, quando a proporção de células contendo HbS excede 30 a 40%, a resistência ao fluxo sanguíneo aumenta consideravelmente (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015).

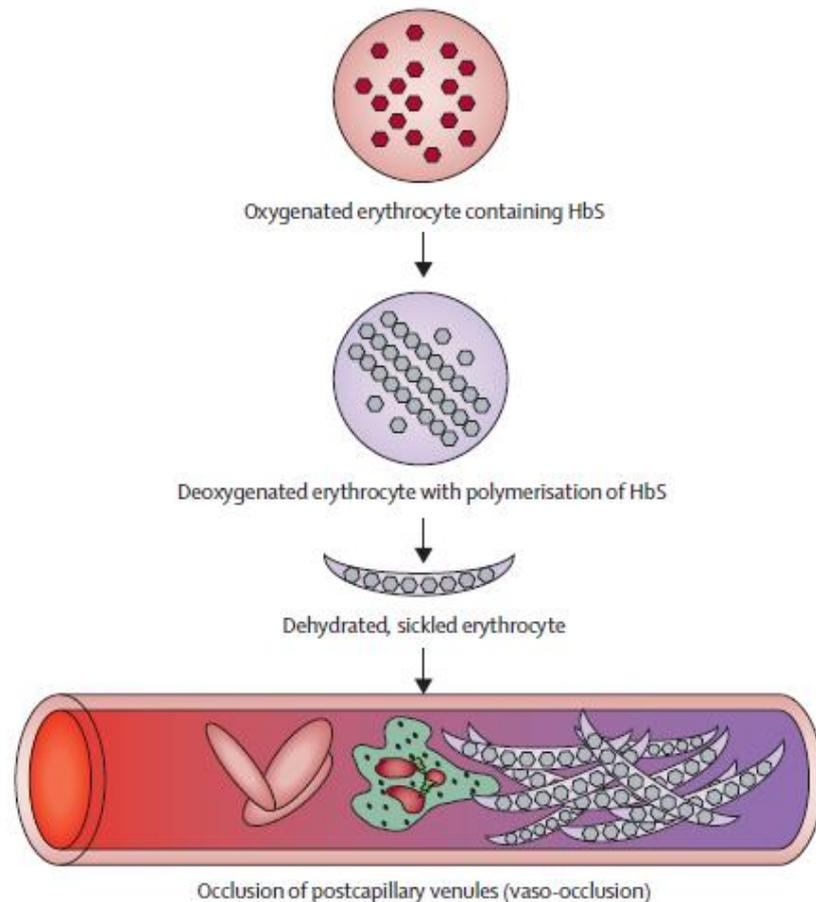


FIGURA 3 – Polimerização da HbS e o processo de vaso oclusão.  
Fonte: Adaptado de REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010.

No geral, o tempo frio ou ventoso parece estar associado ao crescimento da frequência hospitalar. A vasculopatia nessa doença aumenta ainda mais em menores temperaturas, onde o suprimento de oxigênio e fluxo sanguíneo é dificultado pela oclusão natural dos vasos (TEWARI et al., 2015).

A falcização da hemácia desencadeia outros inúmeros episódios que acompanham o quadro de sintomas do paciente. Os drepanócitos, agora em sua forma irreversível, são facilmente vistos no esfregaço periférico e possuem um defeito de membrana. Tal defeito permite que a membrana seja mais permeável, viabilizando a saída de potássio e hemoglobina e a entrada de cálcio dentro da célula. (MANFREDINI et al., 2008; STEINBERG et al., 2014).

Essa suscetibilidade da célula falciforme em se aderir a células endoteliais faz com que se tenha um aumento considerável de aderência nos vasos sanguíneos. Essa aderência resulta na ativação da célula endotelial e, conseqüentemente, ativa respostas microvasculares que acompanham a anemia falciforme. Gera-se, pois, um estado crônico de inflamação, com resposta inflamatória aumentada, expressão crescente de moléculas de adesão celular e também de espécies reativas de oxigênio (BEHERA et al., 2012; CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015). Os pacientes com anemia falciforme estável têm elevação crônica citocinas pró-inflamatórias, incluindo a proteína C reativa, TNF, IL-1, IL-8 (VICHINSKY, 2012).

É importante notar, também, que as hemácias falciformes são mais rígidas que o normal, o que pode contribuir parcialmente para hipertensão pulmonar nesses pacientes (MATHEW et al., 2016). Os distúrbios respiratórios em pacientes com doença falciforme têm sido associados ao aumento da morbidade e mortalidade (COHEN; KLINGS; STRUNK, 2015).

Um outro ponto importante dessa doença é que os drepanócitos possuem um ciclo de vida menor do que os eritrócitos normais (120 dias) (LUTZ et al., 2015). Esse fato acaba resultando em um quadro de anemia intensa, icterícia, esplenomegalia e hemólise crônica, com danos irreversíveis nos órgãos e aumentando a suscetibilidade desses pacientes a infecções graves. A hemólise crônica é causa frequente de morte além da infância. Além disso, ela causa intolerabilidade ao exercício, hipercoagulabilidade e vasculopatia, que podem agravar-se desenvolvendo hipertensão pulmonar e acidentes vasculares cerebrais isquêmicos (CHAKRAVORTY; WILLIAMS, 2015; MATHEW et al., 2016).

A maioria das crianças afetadas e que não são tratadas a tempo morrem de infecção no início de sua vida (MODELL; DARLISON, 2008). Medidas simples como diagnóstico neonatal e antibióticos, acesso à tratamento hospitalar de qualidade e informações e apoio às famílias, podem melhorar muito a qualidade de vida, bem como a expectativa de vida dessas pessoas.

#### *2.1.4 O portador do traço falciforme*

O portador do traço falciforme, heterozigoto para o gene da HbS, apresenta uma condição clinicamente normal e não apresenta alterações hematológicas. Geneticamente, a heterozigose (HbAS) se deve à herança do gene da hemoglobina S por parte de um dos pais, juntamente com o gene da hemoglobina normal (HbA) proveniente do outro (SERJEANT, 1997). Nesses indivíduos, a concentração de HbA é sempre mais elevada que a HbS. No Brasil aproximadamente 4% da população geral brasileira e 6-10% dos afrodescendentes sejam portadores do traço falciforme (HbAS). As estatísticas recentes nos Estados Unidos demonstram que a incidência do traço entre recém-nascidos vivos é de 73,1 casos por 1000 afro-americanos, 6,9 casos por 1000 hispânicos e 3,0 por 1000 brancos (NAIK; HAYWOOD JR., 2015). Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil, nascem por ano aproximadamente 200.000 pessoas com traço falciforme e, estima-se, que 7,2 milhões pessoas sejam portadoras do traço (FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010).

Os portadores dos traços falciformes são geralmente assintomáticos, não apresentam nenhuma anormalidade física e sua expectativa de vida é praticamente a mesma da população geral. Porém, com o passar dos anos, começaram a surgir inúmeros questionamentos a respeito da veracidade do conceito “assintomático” para os portadores. Isso gera dúvidas devido ao fato de que essa condição é encontrada com grande frequência em associação com outras desordens e porque, nesses indivíduos, ainda existe a produção, mesmo que em menor proporção, de HbS (KOTILA, 2016). Complicações como morte súbitas observadas em atletas (KARK et al., 1987), distúrbios renais (DAVIS JR.; MOSTOFI; SESTERHENN, 1995), vaso oclusões (SAXENA et al., 2015), diabetes mellitus (BIEDRZYCKI; GILLESPIE; LUCAS, 2006) e aumento do estresse oxidativo (VOSKOU et al., 2015) são exemplos disso.

Os casos de óbitos relacionados ao exercício em portadores do traço falciforme provavelmente estejam diretamente ligados com a anormalidade estrutural do eritrócito falcizado, que pode aumentar de número durante o exercício físico nesses indivíduos (EICHNER, 2010). Outro fator que parece colaborar é o aumento do estresse oxidativo nesses portadores quando praticam exercícios (DAS et al., 1993), sendo que as espécies reativas de oxigênio (ERO) induzem a disfunção endotelial e a adesão ao endotélio capilar, gerando quadros de vaso oclusões (CHIRICO et al., 2012a; VOSKOU et al., 2015).

A detecção de heterozigotos pelo Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) é uma informação muito importante sob os aspectos genéticos. Através dela é possível identificar famílias que possuem risco maior de gerar crianças com AF e, assim, possibilitar a essa família um acesso ao aconselhamento familiar (SOMMER et al., 2006).

### 2.1.5 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico padrão-ouro para a AF é feito através de eletroforese de hemoglobina, medindo e identificando os diferentes tipos de hemoglobina no sangue circulante. Por meio da eletroforese, são separados os diferentes tipos de Hb, formando uma série de bandas distintamente pigmentadas em um meio (acetato de celulose ou gel de amido). Nesse teste, as hemoglobinas A, A<sub>2</sub>, S e C são rotineiramente verificadas (ANVISA, 2002).

O sangue de cordão umbilical é utilizado para o diagnóstico neonatal e é importante destacar os componentes hemoglobínicos presentes do neonato, onde predominam as produções de cadeias  $\gamma$  e  $\beta$ . Em uma criança com hemoglobinas normais, encontra-se, aproximadamente, 90 a 100% de Hb Fetal ( $\alpha_2\beta_2$ ); 0 a 10% de Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ) e 0 a 1% de Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ). Depois do nascimento e até aproximadamente 6 meses de vida haverá a inversão na produção das cadeias, podendo ser observados valores definitivos do indivíduo adulto: cerca de 96-98% de Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ); 2,5 a 3,4% de Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ); 0-2% e Hb F ( $\alpha_2\beta_2$ ). Estes testes, em neonatos, costumam apresentar-se negativos devido à pequena concentração de HbS e, por isso, devem ser feitos testes de confirmação da HbS após 6 meses de vida (ADORNO et al., 2005; EMBURY, 1995).

Para complementar o diagnóstico, são realizados testes utilizando técnicas como a focalização isoeletrica ou a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), testes de avaliação qualitativa (falcização e solubilidade), dosagem de hemoglobina F e hemograma completo. O que possibilita o diagnóstico pré-natal dessa patologia é o fato de as cadeias beta globínicas serem detectáveis em fase precoce da vida fetal, a partir da 10<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana de gestação (NUZZO; FONSECA, 2004; WAILOO, 2017).

Atualmente, não existe nenhuma cura definitiva para a anemia falciforme. A melhora da qualidade e expectativa de vida concentram-se em medidas gerais e preventivas e na gestão de sintomas fornecidas para esses pacientes. Com isso, as consequências da anemia crônica, crises vaso-oclusivas e susceptibilidade a infecções, geradas pela anemia falciforme, conseguem ser monitoradas e minimizadas. Paralelamente, eventos associados à esses sintomas primários, como por exemplo a progressiva lesão à órgãos e tecidos, também diminuem (ANVISA, 2002; BRAGA, 2007).

O acompanhamento periódico desses pacientes é de suma importância para o monitoramento dos sintomas, para que diversos órgãos e sistemas sejam avaliados, a fim de

alterações precoces sejam detectadas (BRAGA, 2007). Outro ponto importante na terapêutica, é a orientação do paciente e de seus familiares sobre a doença. A criação de vínculo dos pacientes e seus familiares com a equipe de saúde que os acompanha é fundamental para facilitar a compreensão sobre o problema, principalmente quando se trata de crianças. Esse vínculo evita que os mesmos procurem diferentes alternativas, mantendo o acompanhamento em um único centro de referência e melhoram a adesão ao tratamento (CREARY et al., 2015).

Os pacientes e seus familiares devem ser instruídos sobre a necessidade de procurar tratamento médico sempre que aparecerem sintomas típicos, como: febre persistente acima de 38°C, dor torácica, aumento do volume do baço, dor abdominal, náuseas e vômito. Cuidados com a prevenção de infecções na infância, através do uso de vacinações e do uso de penicilina profilática, nutrição e hidratação adequada, uma vez que a desidratação e a hemoconcentração favorecem crises vaso oclusivas, ajudam o anêmico falciforme a não ter que passar por abordagens mais agressivas, como o transplante de células hematopoiéticas ou transfusões crônicas, que ajudam a hemodiluir as células falciformes (SANTA'ANA et al., 2017; WAILOO, 2017).

A Hidroxiureia (HU), no momento atual, é a única medicação disponível para pacientes com anemia falciforme. A HU diminui a dor vaso-oclusiva e síndromes torácicas agudas, bem como diminui o número de hospitalizações e transfusões em pacientes pediátricos e adultos. Contudo, aproximadamente 20% dos pacientes não aceitam essa medicação e, acredita-se que a principal justificativa para isso seja a preocupação com os efeitos colaterais que a medicação pode trazer para o paciente. Compreender, na íntegra, a apreensão tanto do paciente como da pessoa que o cuida, pode ajudar a equipe médica a fornecer melhor educação, aconselhamento e expectativas às famílias sobre a HU (CREARY et al., 2015).

A hemoglobina fetal (HbF) é um importante fator de melhora em doentes falciformes. Ela inibe a polimerização da HbS, minimizando todo o quadro de sintomas decorrentes desta patologia, e seus níveis podem ser geneticamente regulados. Algumas pessoas têm níveis muito aumentados de HbF, em relação à outros. Nesses doentes, a HbF associa-se à uma doença mais leve e pode beneficiar algumas complicações da doença (AKINSHEYE et al., 2011; BHAGAT; PATRA; THAKUR, 2012).

O desenvolvimento de fármacos para aumentar os níveis da HbF vem sendo a principal estratégia terapêutica no tratamento de transtornos falciformes. Entretanto, por mais que existam grandes estudos que abordem novos agentes moduladores da hemoglobina fetal, a HU ainda tem se mostrado com maiores benefícios a longo prazo (STEINBERG et al., 2014;

VICHINSKY, 2012).

Embora as transfusões de sangue crônicas e o transplante de células hematopoiéticas sejam eficazes, bem como e todo o acompanhamento ambulatorial periódico para o controle dos sintomas, nenhum desses consegue alterar a história natural da doença (SANTA'ANA et al., 2017).

Estudo recentemente publicado com células-tronco hematopoiéticas, mostrou outra perspectiva na busca da cura da AF. DeWitt e colaboradores (2016), isolaram as células tronco hematopoiéticas de pacientes com AF e corrigiram a mutação no gene da betaglobina, utilizando a recente técnica de edição de genoma (CRISPR/Cas9), o que possibilitou que as mesmas produzissem moléculas de hemoglobina normais. Essa técnica permite a modificação do genoma com uma alta precisão, eficiência e flexibilidade, sendo a Cas9 a enzima que corta o DNA e a CRISPR (ampla gama de sequências de DNA) sinaliza onde deve ser feito esse corte. Ainda se faz necessário estudos pré-clínicos e, espera-se que, dentro de cinco anos comecem os estudos clínicos em humanos. Esse estudo, assim como muitos outros, pode servir de incentivo para a descoberta de novas alternativas terapêuticas, tanto para a anemia falciforme como para outros distúrbios hemoglobínicos, dando esperança e melhoria na qualidade de vida de milhares de pessoas.

## **2.2 Programa Nacional de Triagem Neonatal (“Teste do Pezinho”)**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sempre destacou a importância da realização dos programas populacionais de Triagem Neonatal, desde a década de 60, especialmente nos países em desenvolvimento. No Brasil, a primeira tentativa de triagem neonatal ocorreu em 1976, na cidade de São Paulo, numa associação dedicada ao atendimento a crianças portadoras de deficiência mental. A princípio, eram realizados somente o diagnóstico de fenilcetonúria e, a partir de 1980, introduziu-se a detecção precoce do hipotireoidismo congênito. A implantação dos diversos serviços de Triagem Neonatal surgiu devido à iniciativa particular em alguns poucos estados do Brasil, como São Paulo e Paraná. Em setembro de 1999, foi fundada a Sociedade Brasileira de Triagem Neonatal com a finalidade de reunir os diversos serviços existentes e profissionais ligados à área, para que problemas como falta de integração de serviços, ausência de rotinas uniformes e a baixa cobertura populacional fossem resolvidos. O Ministério da Saúde fez o lançamento, em 6 de junho de 2001, através da Portaria Nº 822, do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN)

(BRASIL, 2002).

O PNTN teve o objetivo de ampliar a Triagem Neonatal existente (fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito), integrando a detecção precoce das doenças falciformes e outras hemoglobinopatias, assim como a fibrose cística. No estado de Minas Gerais já se realizavam exames para detecção de hemoglobinopatias desde 1998 (RODRIGUES et al., 2016). Esse programa tinha como metas ampliar a cobertura populacional no território nacional e o acompanhamento e tratamento adequado dos pacientes identificados. Essa portaria garantiu um dos princípios fundamentais da Ética Médica fosse restaurado, garantindo a igualdade nos acessos aos testes de triagem no Brasil, independentemente de sua origem geográfica, etnia ou classe socioeconômica (FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010; RAMALHO; MAGNA; PAIVA-E-SILVA, 2003).

O Teste do Pezinho, ou triagem neonatal, é um exame laboratorial que é realizado nos recém-nascidos, após 48 horas de vida ou até, preferencialmente, o 7º dia de vida. É chamado assim pois o sangue é colhido a partir de uma pequena punção no calcanhar do bebê, que é colocada imediatamente em papel de filtro apropriado e encaminhado ao laboratório especializado. Trata-se de um exame muito importante, gratuito e obrigatório em todo o Brasil (BRASIL, 2002). Estudos mostram que, apesar do diagnóstico precoce da anemia falciforme ser realizado, juntamente com o uso de medidas preventivas e terapêuticas, a mortalidade por essa doença ainda é significativa (ARDUINI; RODRIGUES; DE MARQUI, 2017).

No Brasil, segundo dados do PNTN, nascem no país, aproximadamente, 3.500 crianças com anemia falciforme por ano. A maior prevalência de hemoglobina S encontra-se no estado da Bahia, seguida pelo Rio de Janeiro, Minas Gerais, Maranhão, Pernambuco e Goiás. No estado de São Paulo, a incidência de doença falciforme é de 1:4.000 nascidos vivos e de traço falciforme é de 1:35 nascidos vivos (BRASIL, 2016; CARLOS et al., 2015).

No estado do Rio Grande do Sul, o Programa Estadual de Triagem Neonatal (PETN) obteve uma cobertura do Teste do Pezinho em 129.703 em 138.667 nascidos vivos, obtendo uma cobertura de 93,5%, sendo que 81% do total dos testes foi realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). No estudo de Sommer e colaboradores (2006) foram avaliadas 117.320 triagens de recém nascidos e, destes, 1.629 (1,4%) apresentaram algum padrão hemoglobínico alterado. Foram identificados a prevalência do traço falciforme em 0,73% do total de recém-nascidos.

## 2.3 Estresse Oxidativo

### 2.3.1 Radicais Livres e Espécies Reativas

Os radicais livres (RL) são todas as espécies químicas, com capacidade oxidante, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Essa característica confere um alto poder de reatividade e instabilidade à essas moléculas (ARUOMA, 1998). Os RL ou espécies reativas, como também são chamadas, podem ser provenientes do metabolismo do oxigênio (ERO), do nitrogênio (ERN) e de outras substâncias; no entanto, o  $O_2$  é a espécie reativa que mais recebe atenção, devido à sua grande importância nos processos metabólicos celulares (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; HALLIWELL, 1991).

Em condições normais, os organismos aeróbios metabolizam aproximadamente 90% do oxigênio na mitocôndria, através da cadeia transportadora elétrons. O restante desse oxigênio, cerca de 10%, é desviado para outras rotas metabólicas, sendo utilizado por diversas enzimas oxidases e oxigenases, formando assim, as espécies reativas de oxigênio (ERO) (GÖRLACH et al., 2015; REUTER et al., 2010).

As espécies reativas são produzidas continuamente pelas células como parte de seus processos metabólicos: na cadeia respiratória para a geração de energia em forma de ATP, na fagocitose e na oxidação de ácidos graxos, como também em processos inflamatórios ou infecciosos. Fontes exógenas como tabaco, radiações, luz ultravioleta, solventes e alguns fármacos, dentre outros, também contribuem para a geração dessas espécies (ARUOMA, 1998; JEONG et al., 2012).

Os radicais livres mais importantes gerados no nosso organismo incluem os radicais hidroxila ( $OH^\bullet$ ), ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ) e peroxil ( $RO_2^\bullet$ ). O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o ozônio ( $O_3$ ) não são radicais, mas podem facilmente levar a reações de radicais livres nos organismos vivos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os íons ferro (Fe) e cobre (Cu) são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os caracterizam como potentes catalisadores das reações formadoras de radicais livres. A ligação do ferro e cobre à proteínas específicas como a transferrina, ferritina e ceruloplasmina (onde são transportados, utilizados e armazenados) minimiza, ou até mesmo previne, as reações de geração de radicais livres catalisadas por esses metais (BARBOSA et al., 2010; FINKEL;

HOLBROOK, 2000).

A participação desses metais se dá, especialmente, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira reação diz respeito à geração de radical  $\text{OH}^\bullet$ , por meio da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com os íons; já na segunda, estes íons catalisam a reação entre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o radical  $\text{O}_2^\bullet$ , a fim de gerar, também, o radical  $\text{OH}^\bullet$  (Figura 4) (BARBOSA et al., 2010).

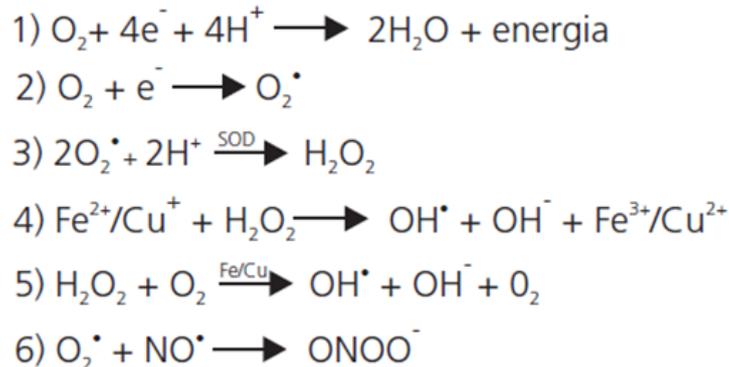


FIGURA 4 – Esquema geral de formação de espécies reativas nas células eucarióticas.  
Fonte: BARBOSA et al., 2010.

Quando a produção de ERO se sobressai perante a sua eliminação por parte das defesas antioxidantes, o organismo perde o equilíbrio e entra, assim, no estado de estresse oxidativo (EO). Essa condição favorece a ocorrência de ataques das ERO a componentes celulares, podendo resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares, como os lipídios, membranas, proteínas e ácidos nucleicos, que alteram a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (FINKEL; HOLBROOK, 2000). O estresse oxidativo está presente em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogénico em muitas dessas condições (NARENDHIRAKANNAN; HANNAH, 2013).

### 2.3.2 Estresse Oxidativo e Anemia Falciforme

O estresse oxidativo prejudica a membrana dos eritrócitos e a produção de espécies reativas é significativamente maior em hemoglobinopatias quando comparadas com pessoas normais. A desnaturação da molécula de Hb, processo que ocorre devido à falcização da hemácia, libera ferro e este, por sua vez, aumenta a quantidade de radicais livres. Desse modo, há oxidação de lipídeos e proteínas e disfunção mitocondrial. O estresse oxidativo contínuo induz uma resposta inflamatória, lesionando as células e estimulando o processo de apoptose.

Os doentes falciforme possuem níveis mais baixos de antioxidantes, o que corrobora ainda mais com o quadro de EO e suas consequências (BHAGAT; PATRA; THAKUR, 2012; VICHINSKY, 2012).

### *2.3.3 Dano oxidativo em biomoléculas*

O estresse oxidativo contribui para inúmeros danos em lipídeos, proteínas e até mesmo no DNA, alterando a integridade da membrana das células. Tudo isso corrobora com processos de apoptose e necrose que, muitas vezes, estão diretamente relacionados à patogenia de diversas doenças, como as doenças degenerativas, por exemplo (CACABELOS, 2017; CHEN; LIU, 2017). Pequenos danos podem ser prontamente reparados pelos antioxidantes na célula; entretanto, uma grande depleção de antioxidantes pode levar à morte celular (MILLER; SHAW; LANGRISH, 2012).

A peroxidação lipídica é a principal lesão celular causada pelo EO. Como resultado, há perda da fluidez e do potencial da membrana, aumento da permeabilidade e eventual ruptura que conduz à liberação das organelas do citoplasma. Na peroxidação, um átomo de hidrogênio é retirado de uma cadeia lipídica poli-insaturada, formando um radical que vai reagir com outros lipídeos e gerar subprodutos, como o malondialdeído (MDA), que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). Esses subprodutos são conhecidos como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e, por isso, podem ser usadas para avaliar o dano lipídico (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

O dano oxidativo às proteínas são alvos imediatos das espécies reativas. Quando as cadeias laterais das proteínas são oxidadas, produzem-se grupamentos carbonila (aldeídos e cetonas), os quais servem como marcador mais comum de dano oxidativo às proteínas (VASCONSELOS et al., 2007). Esses grupamentos são marcadores amplamente aceitos como medida do dano oxidativo pois são estáveis quimicamente, fator muito importante tanto para a sua detecção, como para seu armazenamento. (FINKEL; HOLBROOK, 2000; LEVINE et al., 1990).

Espécies reativas, principalmente o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), atacam o açúcar desoxirribose e as bases purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (timina, citosina e uracila), com ataque preferencial à guanina, gerando 8-hidroxi- ou 8-oxoguanina, mutagênicas. Esse ataque tem como consequência a quebra da cadeia de DNA, ligação cruzada entre as fitas e modificações nas suas bases gerando mutações e apoptose

(ARUOMA, 1998). O dano ao DNA pode ser quantificado através da determinação da frequência de micronúcleos, que são fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não conseguem se envolver com o fuso mitótico e ficam para trás quando a célula se divide e são visíveis no microscópio (SCHMID, 1975).

Estudos mostram que os danos causados pelo estresse oxidativo exercem um importante papel na progressão de doenças degenerativas (CHEN; LIU, 2017), cardiovasculares (GRACIA; LLANAS-CORNEJO; HUSI, 2017), nos processos de mutagênese e carcinogênese (NARENDHIRAKANNAN; HANNAH, 2013; VALKO et al., 2006), entre outros. Justifica-se, portanto, o aprofundamento cada vez maior dentro dessa área do conhecimento para que se possa entender melhor certas doenças e melhorar a qualidade de vida das pessoas.

#### *2.3.4 Antioxidantes*

Para combater ou neutralizar a intensa produção de radicais livres, os organismos desenvolveram um complexo mecanismo de reparo físico e químico: o sistema de defesa antioxidante. Segundo Gutteridge & Halliwell (2000), um antioxidante é qualquer substância que, mesmo presente em baixas concentrações quando comparada com a de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação do referido substrato. Eles são responsáveis pela manutenção da homeostasia oxidativa, retardando ou inibindo a oxidação de substratos passíveis de serem oxidados e, portanto, reduzindo o dano celular. Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos e podem atuar independentemente ou associados, dependendo do grau de lesão e da localização do dano celular (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009; VALKO et al., 2007).

##### *2.3.4.1 Defesas enzimáticas*

O sistema de defesa enzimático envolve a ação conjunta de, principalmente, três enzimas principais: a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e a Glutathione Peroxidase (GPx). Esse sistema de enzimas constitui a primeira linha de defesa endógena de neutralização das ERO no nosso organismo. Com elas, as células conseguem manter reduzidas as quantidades do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e de peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ),

diminuindo, por conseguinte, reações oxidativas e a formação de outras moléculas altamente reativas, como o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) (MILLER; SHAW; LANGRISH, 2012).

A SOD pode ser encontrada tanto na mitocôndria como no citosol e no meio extracelular. Conforme pode ser analisada a Figura 5, a SOD é responsável pela dismutação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esse mesmo peróxido de hidrogênio é decomposto pela enzima CAT, hemoproteína citoplasmática, formando água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e  $\text{O}_2$ . A GPx, uma selenoenzima, catalisa a mesma reação da CAT; no entanto, ela utiliza um cofator, a glutatona reduzida (GSH), que atua como doadora de elétrons e é convertida a glutatona oxidada (GSSG) (HALLIWELL, 1994; VASCONSELOS et al., 2007).

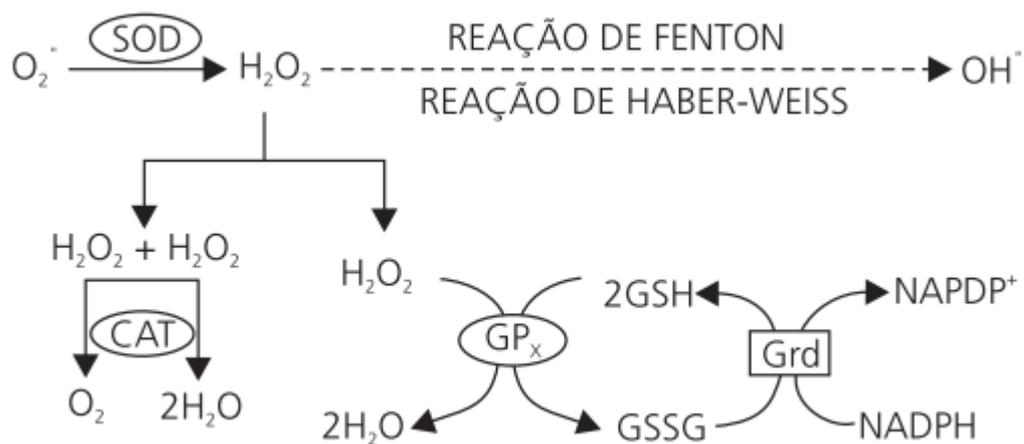


FIGURA 5 - Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.  
Fonte: Adaptado de BARBOSA et al., 2010.

#### 2.3.4.2 Defesas não-enzimáticas

O sistema de defesa antioxidante não enzimático pode ter origem endógena ou ser obtido pela dieta. Os antioxidantes não enzimáticos endógenos são representados pela glutatona (GSH), ácido úrico e transferrina, e os exógenos são representados pelo ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, flavonóides, entre outros (PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; HALLIWELL, 2011; RAO P et al., 2011). O consumo de alimentos na dieta que conferem valor nutritivo pode garantir uma maior proteção do nosso organismo, ajudando a neutralizar espécies reativas e, conseqüentemente, a minimizar danos oxidativos (HALLIWELL, 2006).

## 2.4 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) é uma metaloenzima e catalisa a dismutação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). Ela possui 3 isoformas (SOD1, SOD2 OU SOD3), dependendo da sua localização e do metal que a compõe (HALLIWELL, 1994).

Tanto sua isoforma 1 como sua isoforma 3 são dependentes de cobre (Cu) e zinco (Zn). A SOD1 é encontrada no citoplasma, compartimentos nucleares e lisossomos de células de mamíferos. Já a SOD3 é uma enzima extracelular, sendo que uma das suas principais características é a sua grande afinidade pela heparina. A SOD3 foi primeiramente detectada em plasma humano, linfas e fluido cérebro-espinhal e ela está presente em células e tecidos específicos, onde sua atividade pode exceder a das outras isoformas (BRAMBILLA et al., 2008; ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002).

A SOD2 é uma enzima mitocondrial dependente de manganês (MnSOD) e é encontrada somente em mitocôndrias de células aeróbicas (KIM, 2010). Ela é altamente expressa no coração, cérebro, fígado e rins de mamíferos, e é codificada por um gene que contém cinco éxons e que está localizado na posição 25 do braço longo do cromossomo 6 (6q25) e é a isoforma mais importante da superóxido dismutase (CHURCH et al., 1992). A MnSOD desempenha um papel fundamental na promoção da diferenciação celular e tumorigênese (CHE et al., 2016; GALLAGHER et al., 2009).

A atividade da SOD dependente de manganês é desencadeada diretamente pela presença de ox-LDL, radicais livres e fumo, que contém várias substâncias oxidantes em sua composição (CHE et al., 2016; VALKO et al., 2007; ZELKO; MARIANI; FOLZ, 2002). Por ser produzida no citoplasma, essa enzima necessita ser transferida para dentro da mitocôndria para que, então, possa se tornar ativa e exercer a sua função. Todo esse processo de passagem para dentro da mitocôndria é coordenado por uma sequência peptídica presente no início da proteína MnSOD, em sua forma inativa; e é exatamente nessa sequência específica que um dos principais polimorfismos desse gene da MnSOD acontece (WISPÉ et al., 1989).

## 2.5 Polimorfismo Ala16Val da MnSOD

O polimorfismo Ala16Val é resultado de uma mutação que substitui uma citosina por uma timina na sequência de nucleotídeos responsável pelo transporte da MnSOD para dentro

da mitocôndria, fazendo com que o códon original GCT (alanina) seja convertido para GTT (valina) (Figura 6). A partir desse polimorfismo, três genótipos podem ser descritos: genótipo AA, genótipo AV e genótipo VV (ROSENBLUM; GILULA; LERNER, 1996; WISPÉ et al., 1989).

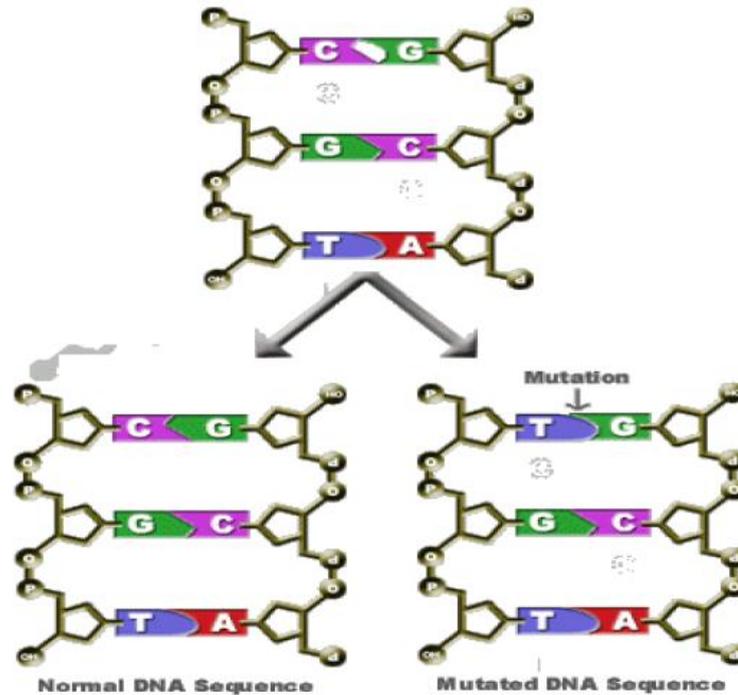


FIGURA 6 – Polimorfismo Ala16Val da MnSOD.  
Fonte: Adaptado de ROSENBLUM; GILULA; LERNER, 1996.

O alelo valina (V) influi na conformação da sequência da proteína e acaba por dificultar o transporte e a entrada da enzima para dentro da mitocôndria, onde a MnSOD se tornará ativa e poderá exercer seu papel. O alelo Ala codifica uma estrutura proteica do tipo  $\alpha$ -hélice na proteína, que acaba permitindo o transporte da MnSOD do citosol para dentro da mitocôndria de forma eficiente. Já o alelo valina (alelo variante) codifica uma estrutura  $\beta$ -hélice pregueada, o que torna mais difícil o transporte da superóxido dismutase para a mitocondrial e não permite que a enzima fique em sua forma ativa (SHIMODAMATSUBAYASHI et al., 1996). Portanto, indivíduos portadores do alelo Val (V) possuem uma eficiência enzimática menor do que aqueles portadores do alelo Ala (A) e, conseqüentemente, sua capacidade antioxidante é reduzida, resultando em um aumento no estresse oxidativo dos mesmos (DUARTE et al., 2010; POURVALI; ABBASI; MOTTAGHI, 2016).

Estudos prévios sugerem que esse polimorfismo da MnSOD está associado em indivíduos

obesos, com uma maior frequência do genótipo VV, sugerindo uma razão de chance de obesidade 1,5 vezes maior nesses indivíduos, do que em indivíduos AA e AV (MONTANO et al., 2009).

Complementando o que já foi exposto, Duarte e colaboradores (2010), em um estudo com pacientes hipercolesterolêmicos, demonstraram que os portadores do alelo VV são mais predispostos a ter aumento do estresse oxidativo. Essa predisposição é representada no estudo através do aumento nos níveis de TBARS e carbonilação de proteínas nesses indivíduos.

Em outros estudos, o polimorfismo Ala16Val MnSOD e seu alelo V aparece como um dos fatores de risco para doença cardiovascular como aterosclerose e angina. Entre outros fatores relacionados, juntamente com o polimorfismo, estão a hiperlipidemia, cigarro e a idade, indo de encontro com o que já é conhecido a respeito do estresse oxidativo ter um papel muito importante em doenças cardiovasculares (FUJIMOTO; KOBAYASHI; OGASAWARA, 2010; SOUIDEN et al., 2016).

Estudos mais recentes, como o de Atilgan e colaboradores (2014), vem mostrando evidências de que esse polimorfismo da MnSOD pode estar ligado com processos carcinogênicos. Nesse caso, o genótipo Ala/Ala foi encontrado em 76% dos pacientes com câncer de células renais, em comparação à 54% do grupo controle, demonstrando que esse polimorfismo pode ser um fator, dentre muitos outros, predisponente para esse tipo de câncer. A possível relação entre o genótipo Ala/Ala e câncer vem sendo mostrada em alguns estudos.

Em contrapartida, Despotovic e colaboradores (2015), compararam a presença do polimorfismo Ala16Val MnSOD em pessoas com asma e o alelo Val foi significativamente mais alto em comparação ao grupo controle. Nesse estudo, eles também sugerem um papel protetor do alelo Ala.

Justifica-se, então, o objetivo do presente trabalho: avaliar a presença do polimorfismo Ala16Val da MnSOD em portadores do traço falciforme, associando-o à biomarcadores de estresse oxidativo. Este estudo poderá servir como base para o aprofundamento e melhor entendimento da complexidade desta hemoglobinopatia.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar a presença do polimorfismo da Ala16Val MnSOD em portadores do traço falciforme e avaliar a sua associação com biomarcadores de estresse oxidativo.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o perfil demográfico e sócio econômico dos portadores do traço falciforme (HbAS);
- Determinar a concentração de HbS nos portadores do traço falciforme;
- Obter o perfil hematológico e a contagem total de plaquetas;
- Quantificar os níveis de ferro plasmático;
- Quantificar as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx;
- Determinar o dano oxidativo nos lipídeos, proteínas e DNA;
- Obter o *status* antioxidante total (TAS);
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo Ala16Val da MnSOD;
- Verificar a associação da presença do polimorfismo Ala16Val da MnSOD com os biomarcadores de estresse oxidativo.

**PARTE II**

**MANUSCRITO**

## PARTE III

### 4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que o portador do traço falciforme (HbAS):

- Possui reduzida atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx;
- Possui níveis diminuídos de ácido ascórbico, GSH e TAS;
- Apresentam aumento do dano oxidativo a biomoléculas, representada pelo grupamento carbonil, TBARS e frequência de micronúcleo;
- Não foi estabelecido associação do polimorfismo Ala16Val MnSOD com os biomarcadores de estresse oxidativo nesses portadores.

## 5 PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como perspectivas futuras:

- Aumentar a população de estudo;
- Verificar a penetrância gênica dos alelos do polimorfismo da MnSOD;
- Verificar a presença de outros polimorfismos nestes indivíduos;
- Associar o portador do traço falciforme com outros polimorfismos, possibilitando uma maior compreensão das vias de estresse oxidativo nestes indivíduos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO, E. V. et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador , Bahia , Northeast Brazil Hemoglobinopatias em recém-nascidos de Salvador , Bahia , Nordeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 292–298, 2005.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and plutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzimology**, v. 77, p. 373–382, 1981.

AKINSHEYE, I. et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 19–28, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2002. 143 p.

ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; DE MARQUI, A. B. T. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 52–56, 2017.

ARRUDA, M. M. et al. Antioxidant vitamins C and E supplementation increases markers of haemolysis in sickle cell anaemia patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **British Journal of Haematology**, v. 160, n. 5, p. 688–700, 2013.

ARUOMA, O. I. Free Radicals , Oxidative Stress , and Antioxidants in Human Health and Disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p. 199–212, 1998.

ATILGAN, D. et al. The Relationship between ALA16VAL Single Gene Polymorphism and Renal Cell Carcinoma. **Advances in Urology**, v. 2014, 2014.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BEHERA, S. et al. Vitamin A status and hematological values in sickle cell disorder cases. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 66, n. 7–8, p. 169–74, 2012.

BETTATI, S.; MOZZARELLI, A.; PERUTZ, M. F. Allosteric mechanism of haemoglobin: rupture of salt-bridges raises the oxygen affinity of the T-structure. **Journal of Molecular**

**Biology**, v. 281, p. 581–585, 1998.

BHAGAT, S.; PATRA, P. K.; THAKUR, A. S. Association of inflammatory biomarker C-reactive protein, lipid peroxidation and antioxidant capacity marker with HbF level in sickle cell disease patients from Chattisgarh. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 394–399, 2012.

BIEDRZYCKI, O.; GILLESPIE, H.; LUCAS, S. Sudden death in a patient newly diagnosed with diabetes having hyperosmolar non-ketotic acidosis with sickle cell trait. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, p. 882–883, 2006.

BRAGA, J. A. P. Medidas gerais no tratamento das doenças falciformes / General measures in the treatment of sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 233–238, 2007.

BRAMBILLA, D. et al. The role of antioxidant supplement in immune system, neoplastic, and neurodegenerative disorders: a point of view for an assessment of the risk/benefit profile. **Nutrition Journal**, v. 7, n. 29, p. 1–9, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação-Geral de Atenção Especializada. Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 92 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Doença Falciforme: Condutas Básicas para o Tratamento. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 63 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Síntese de evidências para políticas de saúde: Melhorando o cuidado de adolescentes com doença falciforme. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 47 p.

CACABELOS, R. Parkinson ' s Disease : From Pathogenesis to Pharmacogenomics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 551, 2017.

CARLOS, A. M. et al. Hemoglobinopathies in newborns in the southern region of the Triângulo Mineiro , Brazil . Cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 133, n. 5, p. 439–444, 2015.

CASTILHOS, L. G. et al. Increased oxidative stress alters nucleosides metabolite levels in sickle cell anemia. **Redox Report**, v. 16, p. 1–9, 2017.

CHAKRAVORTY, S.; WILLIAMS, T. N. Sickle cell disease: a neglected chronic disease of increasing global health importance. **Archives of disease in childhood**, v. 100, p. 48–53, 2015.

CHE, M. et al. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 1, p. 143–149, 2016.

CHEN, L.; LIU, B. Relationships between Stress Granules , Oxidative Stress , and Neurodegenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

CHIRICO, E. N. et al. Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, p. 1445–1453, 2012a.

CHIRICO, E. N. et al. Exercise training blunts oxidative stress in sickle cell trait carriers. **Journal of Applied Physiology**, v. 112, p. 1445–53, 2012b.

CHURCH, S. L. et al. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in Situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. **Genomics**, v. 14, n. 3, p. 823–825, 1992.

COHEN, R. T.; KLINGS, E. S.; STRUNK, R. C. Sickle cell disease: wheeze or asthma? **Asthma Research and Practice**, v. 1, n. 14, p. 1–9, 2015.

COX, D. G.; TAMIMI, R. M.; HUNTER, D. J. Gene × Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. **BMC Cancer**, v. 6, n. 217, p. 1–3, 2006.

CREARY, S. et al. Hydroxyurea therapy for children with sickle cell disease: describing how caregivers make this decision. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 372, p. 1–7, 2015.

DAS, S. K. et al. Effects of physical stress on peroxide scavengers in normal and sickle cell trait erythrocytes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 139–147, 1993.

DAVIS JR., C. J.; MOSTOFI, F. K.; SESTERHENN, I. A. Renal medullary carcinoma. The seventh sickle cell nephropathy. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 1995.

DESPOTOVIC, M. et al. Gene Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha and Antioxidant Enzymes in Bronchial Asthma. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 2, p. 251–256, 2015.

DEWITT, M. A. et al. Selection-free genome editing of the sickle mutation in human adult hematopoietic stem/progenitor cells. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 360, 2016.

DINIZ, D. et al. Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006 Prevalence of sickle cell trait and sickle cell anemia among newborns in the Federal District, Brazil, 2004 to 2006. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 188–194, 2009.

DUARTE, M. M. M. F. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 13–14, p. 1118–1123, 2010.

EICHNER, E. R. Sickle Cell Trait in Sports. **Current Sports Medicine Reports**, v. 9, n. 6, p. 347–351, 2010.

EMBURY, S. H. **Sickle cell disease. In: Hematology**. New York: Churchill Livingstone, 1995.

FASOLA, F. et al. Total antioxidants status and some hematological values in sickle cell disease patients in steady state. **Journal of the National Medical Association**, v. 99, n. 8, p. 891–894, 2007.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 3, p. 203–208, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–247, 2000.

FUJIMOTO, H.; KOBAYASHI, H.; OGASAWARA, K. Association of the manganese superoxide dismutase polymorphism with vasospastic angina pectoris. **Journal of Cardiology**, v. 55, n. 2, p. 205–210, 2010.

GALLAGHER, C. J. et al. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. **Free**, v. 46, n. 1, p. 20–24, 2009.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 2017, p. 419–425, 2017.

GIZI, A. et al. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant-antioxidant status. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 46, n. 3, p. 220–225, 2011.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE COLLABORATORS, 2013. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743–800, 2015.

GÖRLACH, A. et al. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved? **Redox Biology**, v. 6, p. 372–385, 2015.

GRACIA, K. C.; LLANAS-CORNEJO, D.; HUSI, H. CVD and Oxidative Stress. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 22, 2017.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 899, p. 136–147, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, v. 344, p. 721–724, 1994.

\_\_\_\_\_. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3C, p. 14–22, 1991.

\_\_\_\_\_. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. 3, p. 179–184, 2001.

HIERSO, R. et al. Effects of oxidative stress on red blood cell rheology in sickle cell patients. **British Journal of Haematology**, v. 166, n. 4, p. 601–606, 2014.

JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 1189–125, 2001.

JEONG, E. et al. Metabolic Stress, Reactive Oxygen Species, and Arrhythmia. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 454–463, 2012.

KARK, J. A. et al. Sickle-Cell Trait as a Risk Factor for Sudden Death in Physical Training. **New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 781–787, 1987.

KIM, A. Modulation of MnSOD in Cancer: Epidemiological and Experimental Evidences. **Official Journal of Korean Society of Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 83–93, 2010.

KOTILA, T. R. Sickle Cell Trait: A Benign State? **Acta Haematologica**, v. 136, p. 147–151, 2016.

KUNZ, J. B. et al. Significant prevalence of sickle cell disease in Southwest Germany : results from a birth cohort study indicate the necessity for newborn screening. **Annals of Hematology**, v. 95, p. 397–402, 2016.

LERVOLINO, L. G. et al. Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 49–54, 2010.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464–478, 1990.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**, v. 674, p. 137–147, 2009.

LUTZ, B. et al. Updated Mechanisms of Sickle Cell Disease-Associated Chronic pain. **Translational Perioperative and Pain Medicine**, v. 2, n. 2, p. 8–17, 2015.

MANFREDINI, V. et al. Blood Antioxidant Parameters in Sickle Cell Anemia Patients in Steady State. **Journal of the National Medical Association**, v. 100, n. 8, p. 897–902, 2008.

MAO, C. et al. MnSOD Val16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: A meta-analysis involving 8,962 Subjects. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, n. 7, p. 975–979, 2010.

MATHEW, R. et al. Hematological disorders and pulmonary hypertension. **World Journal of Cardiology**, v. 8, n. 12, p. 703–718, 2016.

MILLER, M. R.; SHAW, C. A.; LANGRISH, J. P. From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. **Future Cardiology**, v. 8, n. 4, p. 577–602, 2012.

MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 6, p. 480–487, 2008.

MONTANO, J. A. E. et al. Association between manganese superoxide dismutase ( MnSOD ) gene polymorphism and elderly obesity. **Molecular and Celullar Biochemistry**, v. 328, p. 33–40, 2009.

NAGA, M. B. S. S. et al. Buccal micronucleus cytome assay in sickle cell disease. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 6, p. 62–64, 2016.

NAIK, R. P.; HAYWOOD JR., C. Sickle cell trait diagnosis: clinical and social implications. **American Society of Hematology**, v. 2015, n. 1, p. 160–167, 2015.

NARENDHIRAKANNAN, R. T.; HANNAH, M. A. C. Oxidative stress and skin cancer: An overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 110–115, 2013.

NUZZO, D. V. P. DI; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 347–354, 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.

PAULING, L. et al. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Science**, v. 110, p. 543–548, 1949.

PIEL, F. B. et al. Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. **Nature Communications**, v. 1, n. 104, p. 1–7, 2010.

POURVALI, K.; ABBASI, M.; MOTTAGHI, A. Role of Superoxide Dismutase 2 Gene Ala16Val Polymorphism and Total Antioxidant Capacity in Diabetes and its Complications. **Journal of Medical Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 48–56, 2016.

QASIM, M. et al. Relationship of oxidative stress with elevated level of DNA damage and homocysteine in cardiovascular disease patients. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 6, p. 2297–2302, 2016.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; PAIVA-E-SILVA, R. B. A Portaria nº 822 / 01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 1195–1199, 2003.

RAY, D. et al. Antioxidant vitamin levels in sickle cell disorders. **The Nationall Medical Journal of India**, v. 20, n. 1, p. 11–13, 2007.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of**

**Haematology**, v. 156, n. 4, p. 433–445, 2011.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 376, p. 2018–2031, 2010.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

RODRIGUES, D. O. W. et al. Genetic determinants and stroke in children with sickle cell disease. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 6, p. 602–608, 2016.

ROSENBLUM, J. S.; GILULA, N. B.; LERNER, R. A. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 4471–4473, 1996.

SANTA'ANA, P. G. et al. Clinical and laboratory profile of patients with sickle cell anemia. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, v. 39, n. 1, p. 40–45, 2017.

SAXENA, P. et al. Sickle Cell Trait Causing Splanchnic Venous Thrombosis. **Case Reports in Hepatology**, v. 2015, p. 10–13, 2015.

SCHACTER, L. et al. Altered amount and activity of superoxide dismutase in sickle cell anemia. **FASEB Journal**, v. 2, n. 3, p. 237–243, 1988.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9, 1975.

SERJEANT, G. R. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 350, p. 725–730, 1997.

SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. et al. Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 226, p. 561–565, 1996.

SOMMER, C. K. et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias : experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1709–1714, 2006.

SOUIDEN, Y. et al. MnSOD and GPx1 polymorphism relationship with coronary heart disease risk and severity. **Biological Research**, v. 49, n. 2, p. 1–12, 2016.

STEINBERG, M. H. et al. Perspectives Fetal hemoglobin in sickle cell anemia : a glass half full ? **Blood**, v. 123, n. 4, p. 481–486, 2014.

SUNDARARAJAN, S. K.; NATARAJAN, P. S.; KANCHANA. Micronucleus Assay in Urothelial Cells in Cancer Cervix. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 3, p. 1–3, 2017.

TAUFER, M. et al. Is the Val16Ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with the aging process? **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical science**, v. 60, n. 4, p. 432–438, 2005.

TEWARI, S. et al. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. **Haematologica**, v. 100, n. 9, p. 1108–1116, 2015.

VALKO, M. et al. Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VASCONSELOS, S. M. L. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VIANA-BARACIOLI, L. M. S. et al. Comparison of oxidative stress and the frequency of polymorphisms in the HFE gene between hemoglobin S trait blood donors and sickle cell disease patients. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3446–3454, 2011.

VICHINSKY, E. Emerging “A” therapies in hemoglobinopathies: agonists, antagonists, antioxidants, and arginine. **American Society of Hematology**, p. 271–275, 2012.

VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in  $\beta$ -thalassaemia and sickle cell disease. **Redox Biology**, v. 6, p. 226–239, 2015.

WAILOO, K. Sickle Cell Disease - A History of Progress and Peril. **The New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 9, p. 805–807, 2017.

WALTER, M. F. et al. Serum levels of thiobarbituric acid reactive substances predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: A longitudinal analysis of the PREVENT study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 10, p. 1996–2002, 2004.

WISPÉ, J. R. et al. Synthesis and processing of the precursor for human mangan- superoxide dismutase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 994, n. 1, p. 30–36, 1989.

WHO. World Health Organization. Sickle-cell disease and other haemoglobin disorders. 2011 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/en/>>, Acesso em: 21 fev.2017.

WU, R. et al. Significance of serum total oxidant/antioxidant status in patients with colorectal cancer. **Plos One**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2017.

ZELKO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 3, p. 337–349, 2002.