

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

KAREN SIMONE ROMANELLO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PEROXIRREDOXINAS
EM PACIENTES TALASSÊMICOS E COM ANEMIA FALCIFORME**

SÃO CARLOS

2013

KAREN SIMONE ROMANELLO

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PEROXIRREDOXINAS
EM PACIENTES TALASSÊMICOS E COM ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

SÃO CARLOS

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R758ae Romanello, Karen Simone.
Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em
pacientes talassêmicos e com anemia falciforme / Karen
Simone Romanello. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
117 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2013.

1. Genética. 2. Peroxirredoxinas. 3. Anemia falciforme. 4.
Talassemia. I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

**“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PEROXIRREDOXINAS EM
PACIENTES TALASSÊMICOS E COM ANEMIA FALCIFORME”**

Dissertação de Mestrado de

KAREN SIMONE ROMANELLO

Banca Examinadora

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

.....

Profª. Dra. Débora Gusmão Melo

.....

Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

.....

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre me dar força e guiar meus passos nos momentos difíceis.

Aos meus pais Vera e Valentim por me darem todo o suporte necessário para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Professor Dr. Anderson Ferreira da Cunha por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho e por tudo que me ensinou durante esses anos.

Ao Professor Dr. Iran Malavazi por toda a sua preciosa contribuição para a realização desse trabalho.

À todos os meus colegas e ex- colegas de laboratório por todos os momentos compartilhados, com certeza eu aprendi muito com cada um de vocês.

À Maria Augusta, pela amizade durante esses anos e por tudo que me ensinou quando eu cheguei ao LBGA.

À Karina e a Sheila, minhas companheiras de trabalho, não existem palavras para realmente agradecer-las e descrever a importância que vocês tiveram para a conclusão desse projeto. Muito Obrigada!

Ao Luciano, por me dar força em todos os momentos e pela sua enorme paciência.

À todos os nossos colaboradores do HEMOPE e da UNICAMP.

Aos pacientes e voluntários que participaram deste trabalho, sem os quais nada disso teria sido possível.

Aos meus amigos pela força e por compreenderem todas as minhas ausências.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução.

À todos os funcionários do DGE que sempre foram muito solícitos quando precisei.

À CAPES e a FAPESP pelo amparo financeiro na forma de bolsa e manutenção do projeto.

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são geradas pela redução incompleta do oxigênio durante processos metabólicos, exposição a agentes externos e como resposta secundária a várias doenças, quando em excesso podem causar danos a tecidos e células. Durante o processo de evolução, as células desenvolveram vários mecanismos antioxidantes. Um desses mecanismos compreende as peroxirredoxinas (PRDXs), que se destacadas pela sua abundância e grande reatividade com seus substratos. Em seres humanos já foram descritas seis diferentes PRDXs localizadas em diferentes compartimentos celulares. Nos eritrócitos, a PRDX2 é terceira proteína mais abundante, indicando um possível papel no desenvolvimento e manutenção destas células. No entanto, existem poucos estudos relacionando estas proteínas com doenças eritróides, especialmente anemias hemolíticas, que apresentam elevados níveis de EROS, como a beta talassemia (BT) e a anemia falciforme (AF). Este estudo avaliou o papel das PRDXs em reticulócitos de pacientes com as doenças descritas acima, comparando com reticulócitos de indivíduos saudáveis, utilizando PCR em tempo real e Western blot para análise proteica. Nossos resultados mostraram que o nível de transcritos e de proteínas PRDX1 foram aumentados em pacientes BT e diminuídos em pacientes com anemia falciforme. As análises de transcrição da PRDX2 não mostraram diferenças em ambas as doenças, contudo na análise de western blot foi observada diminuição desta proteína em pacientes com anemia falciforme, indicando um possível processo de regulação pós-transcricional deste gene nesta doença. Os níveis de transcrição da PRDX5 não apresentaram diferenças em nenhuma das doenças. A PRDX6 mostrou redução dos níveis de RNAm e proteicos em BT e AF. Além de sua atividade de detoxificação de EROS, a PRDX6 atua como fosfolipase A₂ na renovação dos fosfolipídios de membrana. A diminuição desta enzima encontrada em ambos os pacientes poderia indicar que o reparo da membrana das células eritróides pode estar prejudicado conduzindo à hemólise observada nestes pacientes. Este é o primeiro estudo relacionando a expressão gênica de peroxirredoxinas nestas anemias hemolíticas. Os resultados podem contribuir para compreender melhor o papel destas proteínas e na identificação de novos alvos que podem ajudar no tratamento destas doenças e melhorar a sobrevivência destes pacientes.

Palavras-chave: peroxirredoxinas, anemia falciforme, talassemias.

ABSTRACT

Reactive Oxygen Species (ROS) are generated by the incomplete reduction of oxygen during metabolic processes, exposure to external agents and as a secondary response to several diseases and when in excess, can cause injury to tissues and cells. During the evolution process, cells have developed several antioxidant mechanisms. One of such mechanisms encompasses the peroxiredoxins (PRDXs), which are highlighted for their abundance and high reactivity with their substrates. In humans, six different PRDXs have been described as located in different cellular compartments. In erythrocytes, PRDXs, particularly PRDX2, is the third most abundant protein, indicating its possible role in the cell development and their maintenance. However, there are few studies connecting these proteins to erythroid diseases, especially in hemolytic anemias, that have a high ROS production, such as beta thalassemia and sickle cell disease (SCD). This study evaluated the role of PRDXs in reticulocytes of patients with the diseases described above, compared to reticulocytes of health blood donors, using Real Time PCR and proteins will be analyzed by Western blot. Our results showed that the levels of transcript and PRDX1 protein were increased in BT patients and decreased in SCD. The PRDX2 transcript showed no differences in both diseases but in western blot analysis a decrease in PRDX2 protein was observed in SCD, indicating a possible post transcription regulation process for this gene in SCD. The levels of PRDX5 transcript did not present difference in any of the diseases. A reduction in mRNA and protein levels for PRDX6 was observed in BT and SCD patients. Besides its action in the detoxification of ROS, PRDX6 acts also as a phospholipase A₂ regulating the phospholipid turnover at the cell membrane. The decrease of this enzyme found in both patients could indicate that the cell membrane of the erythroid cells were not renovated leading to hemolysis observed in these patients. This is the first study correlating gene expression of peroxiredoxins in these hemolytic anemias. The results could contribute in better understand the role of these protein and in a identification of new targets that could help in the management of diseases and improve the survival of these patients.

Keywords: peroxiredoxins, sickle cell disease, thalassemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Locais de hematopoese durante o desenvolvimento humano.....	12
Figura 2. Alterações morfológicas durante a eritropoiese em seres humanos.....	13
Figura 3. Representação da estrutura da molécula de hemoglobina.....	15
Figura 4. Grupamento dos genes de α e β globina e a produção de diferentes hemoglobinas durante o desenvolvimento humano.....	17
Figura 5. Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....	20
Figura 6. Diferentes haplótipos encontrados em associação com a anemia falciforme.....	22
Figura 7. Representação diagramática das deleções gênicas na alfa talassemia.....	25
Figura 8. Diagrama da reação em cadeia de peroxidação lipídica.....	34
Figura 9. Mecanismos de reação das peroxirredoxinas.....	46
Figura 10. Lâmina de leucócitos e esfregaço de reticulócitos.....	58
Figura 11. Gel desnaturante de agarose à 1,2%, com amostras de RNA de reticulócitos.....	59
Figura 12. Teste de cDNA com o primer da beta actina.....	61
Figura 13. Determinação da concentração ótima dos primers forward e reverse PRDX1.....	63
Figura 14. Curva de melting PRDX1.....	63
Figura 15. NTCs (no-template controls) PRDX1.....	64
Figura 16. Teste de Eficiência da PRDX1 300F/300R.....	65
Figura 17. Curva de melting da PRDX1.....	66
Figura 18. Análises dos níveis de espécies reativas de oxigênio.....	73
Figura 19. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com anemias hemolíticas.....	77
Figura 20. Análise de western blotting em controles e pacientes com anemia falciforme.....	78
Figura 21. Análise de western blotting beta talassêmicos.....	79
Figura 22. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em culturas de indivíduos saudáveis e beta talassêmicos.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos das Mutações de Ponto mais Frequentes que Causam Talassemias, Segundo sua Localização na Molécula, o Defeito Funcional que Provocam e o Resultado sobre a Síntese de Globinas.....	27
Tabela 2. Matriz para Padronização da Concentração Ótima de Primers Foward e Reverse.....	62
Tabela 3. Sequências e concentrações ótimas dos primers utilizados no real-time PCR (qRT-PCR).....	64
Tabela 4. Parâmetros de importância para os primers caracterizados.....	66
Tabela 5. Anticorpos utilizados na técnica de western blotting.....	70
Tabela 6. Faixa Etária dos grupos analisados.....	74
Tabela 7. Gênero dos indivíduos estudados.....	74
Tabela 8. Haplótipos dos pacientes com anemia falciforme.....	74
Tabela 9. Genótipos dos pacientes com beta talassemia maior.....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-ANE -	4-hidroxi-2-noneal
A -	Adenina
AA-	Aminoácido
AF -	Anemia Falciforme
Arg -	Arginina
ASK1 -	<i>Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1</i>
ATP -	Trifosfato de adenosina
BAC -	Gene constitutivo beta actina
Ben-	Haplótipo Benin
BFU- E -	<i>Burst- Forming Unit- Erythroid</i>
C -	Citosina
Cam -	Haplótipo Camarões
CAR -	Haplótipo Bantu ou República Centro Africana
Cat -	Catalase
CypA -	Ciclofilina A
cDNA -	DNA complementar
CEP -	Comitê de ética em pesquisa
CFU- E -	<i>Colony- Forming Units – Erythroid</i>
CuZnSOD -	Superóxido Dismutase Cobre e Zinco
Cys _P -	Cisteína peroxidásica
Cys _R -	Cisteína de resolução
DF-	Doença falciforme
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EDTA -	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS -	Óxido nítrico sintase
EPO -	Eritropoetina
EROs -	Espécies reativas de oxigênio
G -	Guanina
GAPDH -	Gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
Gpx -	Glutathione peroxidase
GSTpi -	Glutathione S-transferase PI
GSH-	Glutathione
Hb -	Hemoglobina
HbF -	Hb fetal
HbS -	Hemoglobina S
HCM-	Hemoglobina corpuscular média
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IgG -	Imunoglobulina G
IL-1 -	Interleucina 1
IL-6 -	Interleucina 6
JNK -	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
kDa -	Kilodáltons
LCR -	Região controladora do locus
LDL-	<i>Low-density lipoprotein</i>

MAD -	Malondialdeído
MCP-	Morte celular programada
MetHb-	Metahemoglobina
MnSOD -	Superóxido dismutase manganês
MIF -	Migração dos macrófagos
NADPH –	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NO –	Óxido Nítrico
Nox-	Oxidases
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
qRT-PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PHHF -	Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal
PRDX -	Peroxirredoxina
Pro -	Prolina
PTEN -	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RNA –	Ácido Ribonucleico
RNA _m –	RNA mensageiro
RPM -	Rotações por minuto
Sen -	Haplótipo Senegal
SOD-	Superóxido Desmutase
Srx -	Sulfirredoxina
T -	Timina
<i>t</i> -BOOH -	tert-butil hidroperóxido
TGF-β1 -	<i>Transforming Growth Factor Beta1</i>
Thr -	Treonina
TLR4 -	Toll-like receptor 4
Trx -	Tiorredoxina
TrxRs -	Tiorredoxinas Redutases
VCAM-1 -	Molécula de Adesão do Endotélio Vascular-1
VCM-	Volume Corpuscular Médio
VSMC -	Células Vasculares do Músculo Liso

LISTA DE SIMBOLOS

α -	Alfa
β -	Beta
δ -	Delta
ε -	Épsilon
γ -	Gama
ζ -	Zeta
θ -	Teta
α^1 -	Alfa 1
α^2 -	Alfa 2
$\psi \alpha^1$ -	Pseudogene Alfa 1
$\psi \alpha^2$ -	Pseudogene Alfa 2
$\psi \beta$ -	Pseudogene Beta
$\psi \zeta^1$ -	Pseudogene Zeta
γ^A -	Gama Adenina
γ^G -	Gama Glicina
O_2 -	Oxigênio
-CH= -	Radicais Metanílicos
Fe^{++} -	Ferro Divalente
μg -	Micrograma
μL -	Microlitro
μM -	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. A Célula Eritrocitária.....	12
1.2. A Hemoglobina	14
1.3. Hemoglobinopatias	17
1.4. Anemia Falciforme	18
1.5. Talassemias.....	22
1.5.1. Alfa Talassemia	23
1.5.2. Beta Talassemia.....	26
1.5.2.1. Beta Talassemia Menor	28
1.5.2.2. Beta Talassemia Maior	29
1.5.2.3. Beta Talassemia Intermediária	30
1.6. Anemias Hemolíticas e Estresse Oxidativo.....	31
1.7. Defesas Celulares contra o Estresse Oxidativo	41
1.7.1. Antioxidantes Enzimáticos	41
1.7.1.1. Superóxido Dismutase.....	41
1.7.1.2. Catalase.....	42
1.7.1.3. Glutathione Peroxidase.....	43
1.7.1.4. Peroxirredoxinas.....	43
1.8. Relevância Biológica das Peroxirredoxinas	47
1.8.1. Sinalização Celular Mediada por Hidroperóxidos	48
1.8.2. Prevenção do Desenvolvimento de Tumores	50
1.8.3. Peroxirredoxinas, Inflamação e Imunidade	51
2. JUSTIFICATIVA	53
3. OBJETIVOS.....	55
3.1. Objetivo geral	55
3.2. Objetivos Específicos	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.1. Pacientes e controles.....	56
4.2. Aspectos éticos da pesquisa.....	56
4.3. Separação de Reticulócitos	56
4.4. Extração de RNA.....	58

4.5. Síntese de DNA complementar (cDNA)	60
4.6. Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	61
4.7. Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real.....	62
4.7.1. Concentração de Primer	62
4.7.2. Eficiência de Reação	65
4.8. Análise dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	67
4.8.1. Separação de Células Vermelhas.....	67
4.8.2. Determinação do conteúdo de EROs nos eritrócitos	67
4.9. Western blotting	68
4.9.1. Extração e quantificação de proteínas	68
4.9.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS.....	68
4.10. Cultura de células CD34 ⁺	70
4.11. Análise estatística	71
5. RESULTADOS	72
5.1. Comparação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio.....	72
5.2. Características dos grupos analisados	73
5.3. Análise da expressão gênica da família de peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com anemias hemolíticas	76
5.4. Análise proteica das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos saudáveis e com anemias hemolíticas.....	78
5.5. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em culturas de indivíduos saudáveis e beta talassêmicos	79
6. DISCUSSÃO	81
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	91
9. ATIVIDADES COMPLEMENTARES	92
9. REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	94

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Célula Eritrocitária

A eritropoese é um processo regulado precisamente, no qual células tronco hematopoéticas diferenciam-se em células progenitoras eritróides pelo estímulo do hormônio eritropoetina (EPO). Em seres humanos adultos o processo ocorre na medula óssea, durante a vida intra-uterina a hematopoiese primitiva ocorre inicialmente no saco vitelino. Após o primeiro mês gestação, o fígado passa a ser o principal local de hematopoiese no período fetal. O baço também produz células sanguíneas nesse período. A partir do quarto mês intra-uterino tem início a hematopoiese medular, que aumenta a medida que a produção hepática diminui. Após o nascimento, a produção começa a ser mais específica, sendo produzida nos ossos longos e medula óssea na fase da infância e restringindo-se apenas a medula ao final deste período, sendo, portanto o único local de formação de células hematológicas durante todo o resto da vida do indivíduo (figura 1) (BONDURANT e KOURY, 1999; DESSYPRIS, 1999; DA CUNHA et al., 2012).

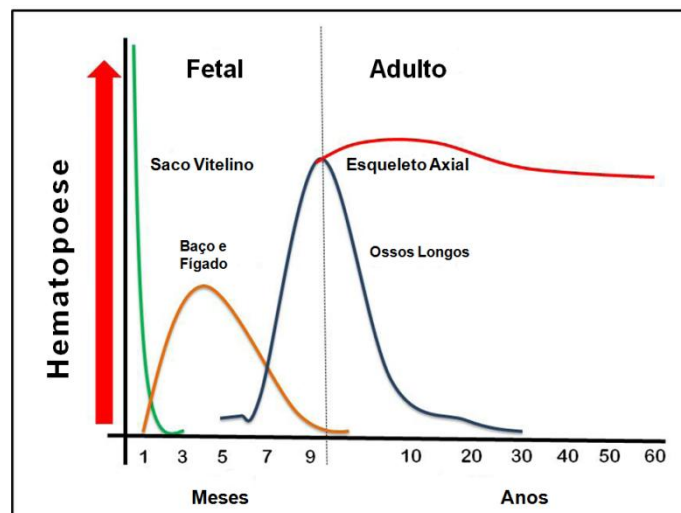


Figura 1. Locais de hematopoiese durante o desenvolvimento humano. Durante as primeiras semanas de desenvolvimento a hematopoiese ocorre no saco vitelino, após o primeiro mês de gestação passa a acontecer no fígado e no baço e a partir do quarto mês de vida intra-uterina nos ossos longos. Após o nascimento e durante a vida adulta o local de hematopoiese é a medula óssea do esqueleto axial (Figura extraída de DA CUNHA et al., 2012).

In vitro, após o estímulo da eritropoetina, as células passam por várias modificações que levam à formação dos eritrócitos. A primeira etapa se inicia quando a unidade formadora de crescimento rápido- eritróide (BFU- E – *burst- forming unit- erythroid*) dá origem à unidade formadora de colônia- eritróide (CFU- E – *colony- forming units – erythroid*), que se diferencia na primeira célula morfológicamente identificável como sendo da linhagem eritróide, o proeritroblasto, o qual passará por sucessivas modificações que levam a célula a diferenciar-se em eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo e eritroblasto ortocromático. Nesta fase, o núcleo torna- se picnótico e é extrudido da célula formando o reticulócito, que é uma célula anucleada, aproximadamente 20% maior que os eritrócitos maduros e que ainda contém resíduos de organelas no citoplasma como o retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos com RNA mensageiro. Sendo assim, o reticulócito ainda possui alguma capacidade de síntese proteica; cerca de 10 a 20% da síntese de hemoglobina completa-se nesta fase. Além disso, por apresentar mitocôndrias também tem certa capacidade de respiração aeróbica. Os reticulócitos são liberados na circulação e se desenvolvem em eritrócitos maduros dentro de dois dias (figura 2) (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; HOFFMAN et al., 2008; TSIFTSOGLU; VIZIRIANAKIS; STROUBOULIS, 2009; DA CUNHA et al., 2012).

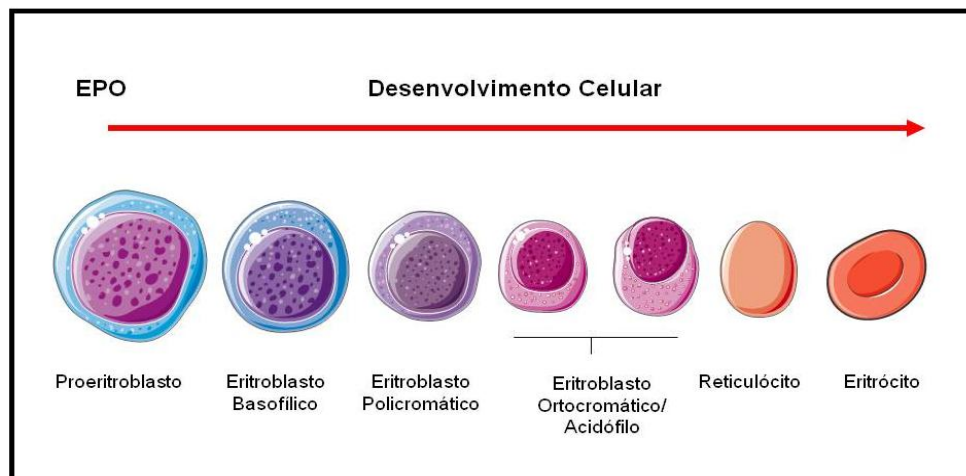


Figura 2. Alterações morfológicas durante a eritropoiese em seres humanos. Após o estímulo da EPO a célula eritróide sofre várias alterações morfológicas que levam à formação de eritrócitos maduros. Para mais detalhes ver o texto. Figura extraída de DA CUNHA et al., 2012.

Em condições normais, o tempo de vida dos eritrócitos é de aproximadamente 120 dias. Após este período, os eritrócitos sofrem várias alterações morfológicas, causadas principalmente pela redução de sua atividade metabólica e pela oxidação da hemoglobina (GHAFFARI, 2008). Estas alterações são reconhecidas pelo sistema mononuclear fagocitário que removem as células da circulação sanguínea à medida que a maioria dos componentes celulares são reciclados e utilizados para a produção de novas células. O sistema mononuclear fagocitário é constituído por células fagocíticas (macrófagos e monócitos) presentes no fígado e no baço que são os principais responsáveis pela remoção dos eritrócitos da circulação. O aumento acelerado da destruição dos eritrócitos é a característica mais importante encontrada em várias doenças hemolíticas como a anemia falciforme e as talassemias, que mais adiante serão discutidas em detalhes (TELEN e KAUFMAN, 1999; HOFFMAN et al., 2008).

1.2. A Hemoglobina

A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigênio do pulmão para os tecidos e de dióxido de carbono dos tecidos para o pulmão. Esta função é desempenhada pela molécula de hemoglobina (Hb), uma proteína tetramérica que constitui 95% das proteínas totais dos eritrócitos. A hemoglobina possui estrutura globular e quaternária formada por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas, sendo duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β), cada uma delas associada a um grupo prostético heme, formado por quatro núcleos pirrólicos, unidos entre si por radicais metanílicos ($-\text{CH}=\text{}$), contendo um átomo de ferro divalente (Fe^{++}) capaz de se ligar de modo reversível à molécula de oxigênio (O_2) (figura 3) (PERUTZ et al., 1960; STEINBERG e BRUGNARA, 2003).

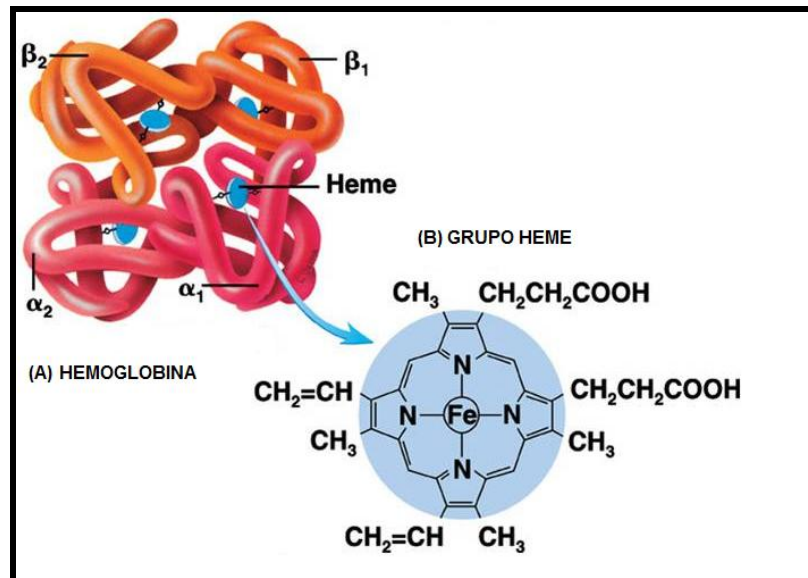


Figura 3. Representação da estrutura da molécula de hemoglobina adulta A1. A hemoglobina é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas do tipo alfa e duas do tipo beta, cada uma delas associada a um grupamento heme, contendo um átomo de ferro ao qual se liga o oxigênio de modo reversível. (Disponível em: <http://www.baileybio.com/plogger/?level=picture&id=490>).

A síntese das cadeias globínicas é controlada por genes distintos, localizados em dois grupamentos cromossômicos diferentes, α e β . O grupamento α está situado no braço curto do cromossomo 16 (16p13.3) em uma região aproximadamente de 25 Kb (ORKIN; ANTONARAKIS; KAZAZIAN, 1983; HONIG e ADAMS III, 1986), e possui um gene zeta embrionário (ζ_2), os pseudogenes psi zeta ($\psi\zeta_1$), psi alfa 2 ($\psi\alpha_2$), psi alfa 1 ($\psi\alpha_1$), dois genes alfa (α_1 e α_2 , que não apresentam diferenças em sua região codificante) e um gene teta (θ) de função indeterminada, arranjados no sentido $5' \rightarrow 3'$, na mesma ordem em que são expressos durante o desenvolvimento ontogenético (WEATHERALL, 2001; HIGGS, 2008). Pseudogenes são genes que apresentam sequências homólogas aos genes estruturais ativos, entretanto, contêm mutações que inibem sua expressão (figura 4) (BONINI-DOMINGOS, 2006).

O grupamento β está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p15.5) numa região de aproximadamente 50 Kb, e é composto pelo gene embrionário épsilon (ϵ), pelos genes gama-alanina (γ^A) e gama-glicina (γ^G) (que variam apenas em glicina ou alanina na posição 136) e são característicos do período fetal, pelo pseudogene beta ($\psi\beta$) e pelos genes

delta (δ) e beta (β) que são ativados apenas no final do período fetal e se expressam completamente após pós-nascimento, estes genes estão dispostos no cromossomo também na ordem em que são expressos (figura 4) (ANTONARAKIS; KAZAZIA JUNIOR; ORKIN, 1985; GROSVELD; DILLON; HIGGS, 1993; SCHECHTER, 2008).

No decorrer do desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem mudanças na expressão desses genes, que são os responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobinas humanas (DZIERZAK, 2001). O primeiro tetrâmero de hemoglobina, predominante nas quatro semanas iniciais do período embrionário, é composto por duas cadeias zeta e duas cadeias épsilon ($\zeta_2\epsilon_2$) que formam a Hb Gower 1. Após esse período, as cadeias alfa e gama começam a ser sintetizadas, formando as hemoglobinas Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$), presentes até a décima segunda semana do período embrionário, estas são substituídas pela hemoglobina Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), a mais importante Hb da vida intra-uterina, que predomina aproximadamente até a trigésima semana de gestação, quando ocorre o aumento da síntese das cadeias de globina β que progressivamente substitui as cadeias γ formando a hemoglobina do adulto, a hemoglobina A₁ ($\alpha_2\beta_2$) que aumenta gradativamente até que, no sexto mês de vida pós-natal, constitui aproximadamente 97% do conteúdo de hemoglobina. Há também outra hemoglobina encontrada no adulto normal formada pela combinação das globinas α e δ denominada hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$), representando 2– 3% da hemoglobina total. A síntese de hemoglobina fetal pode não cessar totalmente e seu nível se mantém entre 0 – 1% (figura 4) (WEATHERALL e CLEGG, 1981; ANTONARAKIS; KAZAZIA JUNIOR; ORKIN, 1985; HONIG e ADAMS III, 1986; MIGLIACCIO e PAPAYANNOPOULOU, 2001; STEINBERG, 2005). O fenômeno de troca das cadeias globínicas é conhecido como “switching” e envolve mecanismos de ativação e inativação, que incluem interações de fatores de transcrição em estágios específicos, sítios hipersensíveis à DNase I (HS-40) no grupamento de genes α , a região controladora do locus (LCR) no grupo de genes β , sequências cis que regulam positiva ou negativamente a transcrição e os fatores de transcrição eritróides ou não-eritróides também podem estar envolvidos (NAGEL e STEINBERG, 2001; STAMATOYANNOPOULOS, 2005; BANK, 2006; RIBEIRO et al., 2009).

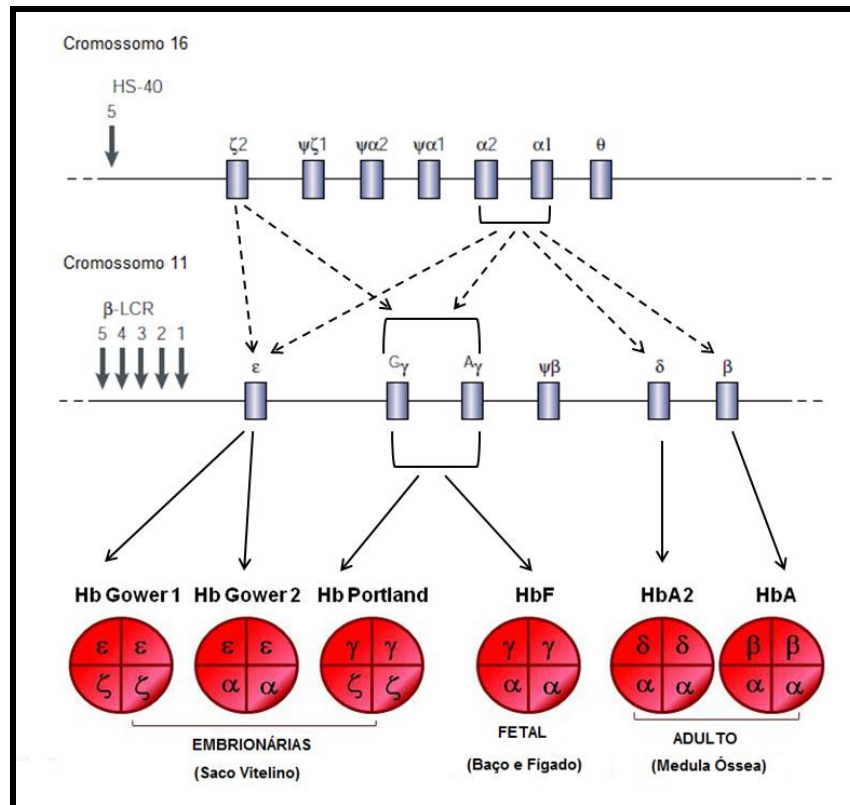


Figura 4. Grupamento dos genes de α e β globina e a produção de diferentes hemoglobinas durante o desenvolvimento humano. Os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas estão organizados em dois grupamentos gênicos localizados em cromossomos diferentes. O grupamento α localiza-se no braço curto do cromossomo 16, é constituído pelos genes $\zeta 2$, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e θ e pelos pseudogenes $\psi\zeta 1$, $\psi\alpha 2$, $\psi\alpha 1$. O grupamento β está situado no braço curto do cromossomo 11, e possui os genes ϵ , γ^A e γ^G (que variam na posição 136 em apenas uma guanina ou alanina), pelo e pelos genes delta δ e β e o pseudogene $\psi\beta$. Durante o desenvolvimento ontogenético, ocorrem mudanças na expressão desses genes, formando os diferentes tipos de hemoglobinas humanas. Os mecanismos envolvidos na troca das cadeias globínicas incluem sítios hipersensíveis à DNase I (HS-40) no grupamento α e a região controladora do locus (LCR) no grupo de genes β (figura adaptada de WEATHERALL, 2001a).

1.3. Hemoglobinopatias

Mutações que alteram a expressão dos genes da hemoglobina normal resultam em hemoglobinopatias, as quais representam as formas mais comuns de anemia hemolítica hereditária. Estas alterações são um grupo heterogêneo de doenças genéticas, que de modo geral, podem ser divididas em três grupos: variantes estruturais (alteram a estrutura da

proteína sem afetar sua taxa de síntese) e alterações no ritmo de síntese, com a supressão parcial ou total da produção de uma ou mais cadeias globínicas, o que resulta em menor sobrevivência das hemácias e conseqüente anemia crônica, ou ainda, uma anomalia que se caracteriza pela persistência na produção de cadeias γ durante a vida adulta, chamada de Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal (PHHF) (grupo de condições clinicamente benignas) (BUNN e FORGET, 1986; BERTHOLO e MOREIRA, 2006; WATANABE, 2007; SONATI e COSTA, 2008).

As hemoglobinopatias hereditárias são um grupo de alterações autossômicas e monogênicas comumente encontradas no mundo, com aproximadamente 1.423 diferentes alelos mutantes caracterizados em nível molecular, a maior parte não possui fenótipos com manifestações clínicas. Dentre os mutantes que apresentam fisiopatologia, os efeitos são bastante variáveis e dependem do tipo de herança (homozigota ou heterozigota), assim como das interações genéticas e ambientais, com manifestações que variam de imperceptíveis até letais (LEONELI et al., 2000; OLD, 2007; HUISMAN et al., 2010).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 7% da população mundial seja portadora dos diferentes distúrbios hereditários da hemoglobina, ou seja, cerca de 270 milhões de indivíduos. Com base nestes dados, estima-se que aproximadamente meio milhão de crianças nasçam por ano com algum tipo de alteração nas cadeias globínicas (WEATHERALL e CLEGG, 2001b). Do ponto de vista clínico, as principais são as doenças falciformes (DF) e as talassemias, que afetam populações com origens no continente africano, região mediterrânea, sudoeste asiático, oriente médio e extremo oriente (KHATTAB; RAWLINGS, ALI, 2006; SONATI e COSTA, 2008).

1.4. Anemia Falciforme

A anemia falciforme é uma das desordens hematológicas herdadas mais comumente em todo o mundo e atinge expressiva parcela da população em diferentes países. Estudos antropogenéticos sugerem que esta patologia surgiu há aproximadamente 50 a 100 mil anos no centro-oeste africano, Índia e leste asiático (EDELSTEIN, 1986). A anemia falciforme é distúrbio genético hereditário, autossômico recessivo, que causa malformação das

hemácias, que assumem forma de foice. Esta doença ocorre devido à substituição de uma única base nitrogenada no códon 6 do gene de beta globina, onde uma adenina (A) é substituída por uma timina (GAG→GTG), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina. Esta substituição provoca modificações estruturais na molécula de hemoglobina, culminando no surgimento de uma hemoglobina anômala, denominada hemoglobina S (HbS) (SERJEANT e SERJEANT, 2001; STEINBERG et al., 2001).

A hemoglobina S (α_2/β^S_2) tem propriedades físico-químicas diferentes da hemoglobina normal devido à perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina (em razão da perda do ácido glutâmico). Adicionalmente, a hemoglobina mutante também apresenta diferente estabilidade e solubilidade, demonstrando uma forte tendência à polimerização quando na sua forma de desoxiemoglobina, que resulta em alterações na estrutura da hemácia, levando a deformação e o enrijecimento da membrana celular, que serão responsáveis pela oclusão vascular e a lesão tecidual que representam os principais eventos da doença ligados as manifestações clínicas do paciente acometido (figura 5) (DEAN e SCHECHTER, 1978; BUNN e FORGET, 1986; ROSSE et al., 2000).

Em condições de baixa tensão de oxigênio, a hemoglobina S tem sua conformação molecular modificada devido à presença da valina, que interage com o receptor fenilalanina (β -85) e leucina (β -88) na molécula de hemoglobina S adjacente. Esta interação de caráter hidrofóbico leva a formação de polímeros compostos por 14 fibras de desoxiemoglobinas, enoveladas entre si, em um processo chamado de nucleação, que evolui com o alongamento e alinhamento de mais fibras, gerando uma estrutura multipolimérica, na forma de um eixo axial no interior da célula, com isso os eritrócitos perdem sua forma bicôncava e assumem a forma de foice (figura 5) (BUNN, 1997; GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2003).

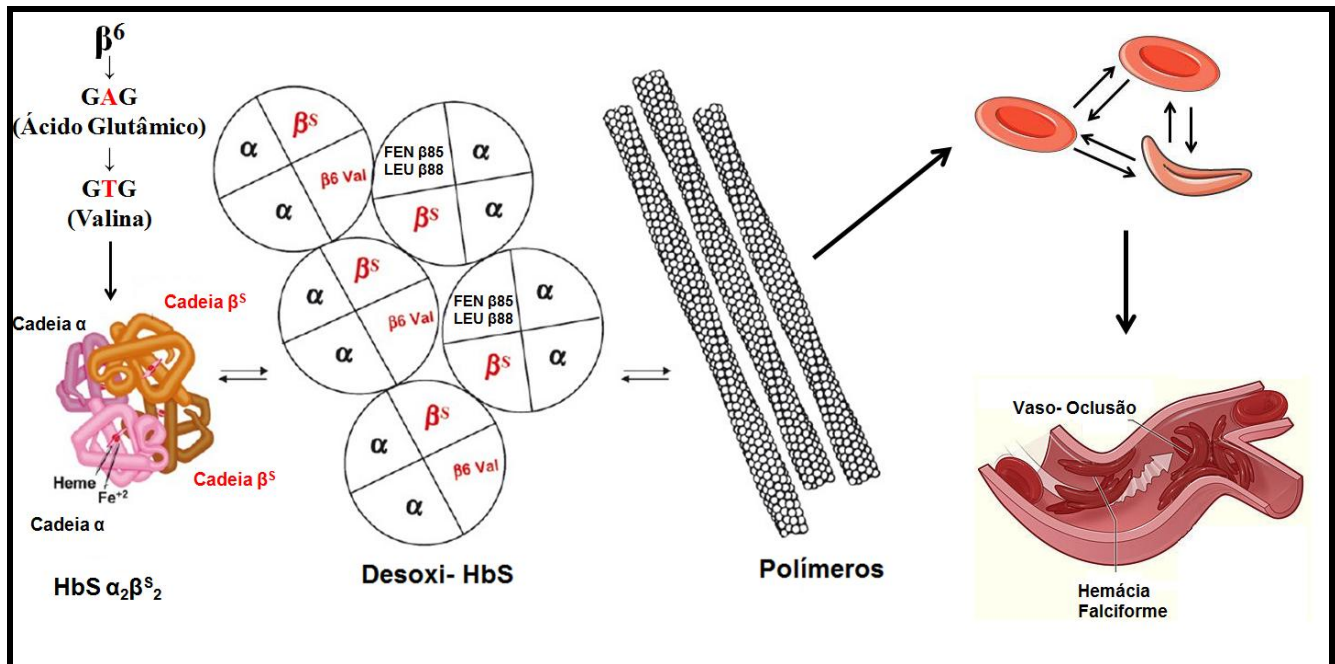


Figura 5. Fisiopatologia da anemia falciforme. A substituição do ácido glutâmico por um resíduo de valina no códon 6 do gene de beta globina resulta no surgimento de uma hemoglobina anômala, denominada HbS, que quando desoxigenada tem sua conformação molecular modificada devido à presença da valina, que interage com o receptor fenilalanina (β -85) e leucina (β -88) na molécula de hemoglobina S adjacente, formando polímeros no interior das hemácias que assumem forma de foice. Os eritrócitos falcizados aderem facilmente ao endotélio causando oclusão vascular e a lesão tecidual que representam os principais eventos da doença ligados as manifestações clínicas da anemia falciforme (figura adaptada de ODIÈVRE et al., 2011).

O fenômeno vaso-oclusivo é a principal causa de morbidade nos indivíduos com anemia falciforme. A vaso-oclusão ocorre principalmente nos órgãos com circulação sinuosa, onde o fluxo de sangue é mais lento, a tensão de oxigênio é baixa ou ainda, naqueles órgãos onde há um suprimento sanguíneo arterial terminal limitado. A hipóxia causada pela obstrução vascular leva a infartos teciduais, crises álgicas ou danos teciduais crônicos (LABIE e ELION, 1999).

A vaso-oclusão, especialmente em vasos pequenos, é o principal evento fisiopatológico ligado a origem dos sinais e sintomas apresentados no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme, tais como crises álgicas; crises hemolíticas; úlceras de membros inferiores; síndrome torácica aguda; seqüestro esplênico; priapismo; necrose asséptica de fêmur; retinopatia; insuficiência renal crônica; autoesplenectomia; acidente vascular cerebral, entre outros (BALLAS e MOHANDAS, 1996). Alguns fatores estão

associados à gravidade e evolução clínica dos pacientes com anemia falciforme, entre eles destacam-se os níveis de Hb fetal (HbF), o haplótipo ligado ao grupo de genes da globina β^S e a coexistência com a α talassemia (STEINBERG et al., 2001).

Os níveis de HbF são importantes moduladores clínicos da anemia falciforme e estão inversamente relacionados com a gravidade clínica da doença. A HbF inibe a polimerização da hemoglobina e, conseqüentemente, a falcização dos eritrócitos, reduzindo os sintomas da doença (SERJEANT e SERJEANT, 2001).

Os haplótipos do grupamento β também estão associados com a evolução clínica da doença e são compostos pela presença de sítios sensíveis a endonucleases de restrição distribuídos ao longo dos genes de beta globina. São classificados em cinco tipos de acordo com a origem e área geográfica onde são predominantes. O haplótipo Benin (Ben) originado na costa oeste Africana alcança o norte da África (Argélia e Tunísia), oeste da Arábia e sul da Europa (Portugal, Itália e Grécia). O Bantu ou República Centro Africana (CAR) foi identificado na África Oriental e Centro Sul. Os haplótipos Senegal (Sen) e Camarões (Cam) estão associados à África Atlântico Ocidental e à Costa Ocidental Africana, respectivamente. O haplótipo Árabe (asiático) ocorre na Índia e leste da Arábia, por isso é chamado também de haplótipo Indo-Árabe (figura 6) (NAGEL, 1984; SUTTON; BOUHASSI; NAGEL, 1989; Zago; SILVA JUNIOR; FRANCO, 1999).

Os haplótipos têm importante papel na regulação da síntese da Hb Fetal, na relação entre a concentração de HbS e HbF no adulto e na taxa de redução da HbF durante a infância. O haplótipo Ben apresenta níveis médios de HbF e curso clínico moderado da doença. O CAR, mostra níveis diminuídos de HbF e quadro clínico mais grave e os haplótipos Sen e Indo-Árabe, estão associados a níveis elevados de HbF e curso clínico menos grave da doença (NAGEL, 1984; POWARS, 1991; RAHGOZAR et al., 2000).

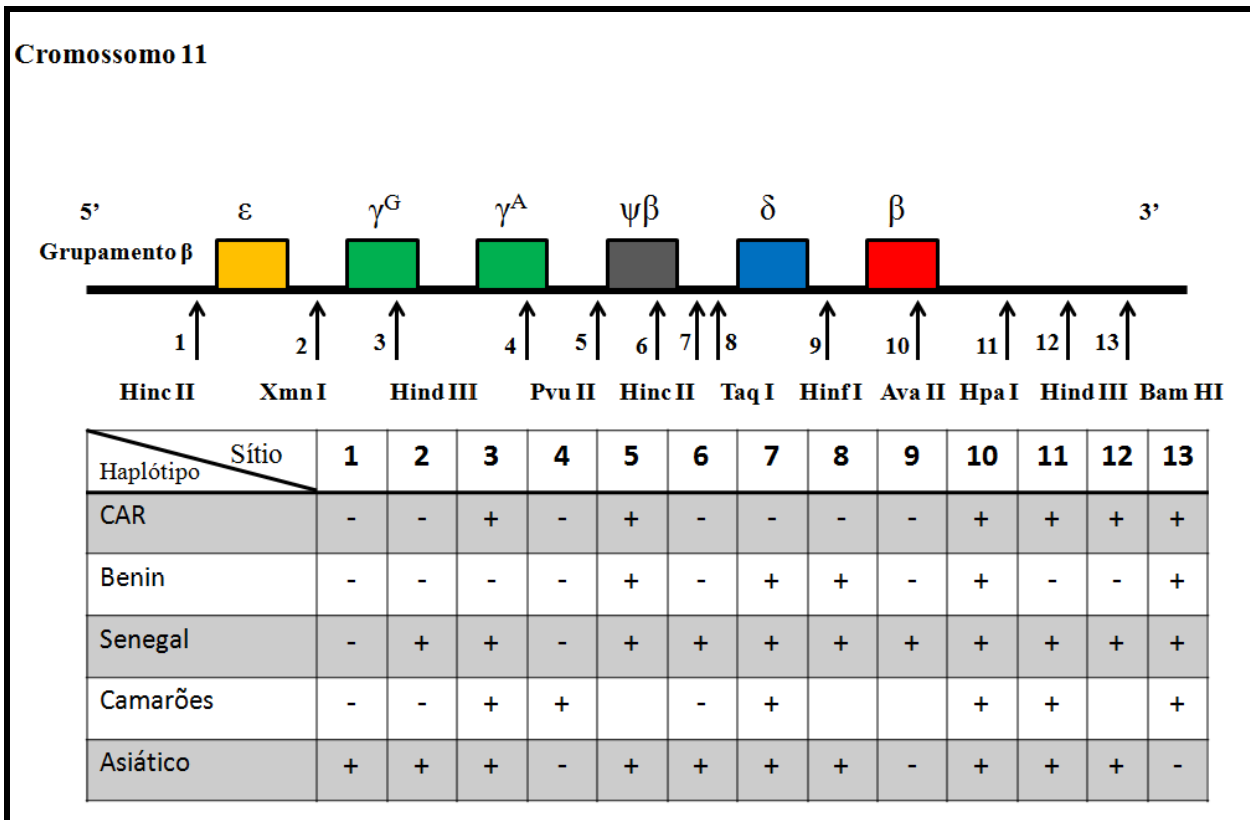


Figura 6. Diferentes haplótipos encontrados em associação com a anemia falciforme. Utilizando diferentes enzimas de restrição, vários haplótipos podem ser encontrados ao longo dos genes de beta globina. São classificados em cinco tipos de acordo com a origem e área geográfica onde são predominantes e estão associados com a evolução clínica da doença, visto que, têm importante papel na regulação da síntese da Hb Fetal, na relação entre a concentração de HbS e HbF no adulto e na taxa de redução da HbF durante a infância. O sinal + indica susceptibilidade à ação da enzima, enquanto o sinal de - indica resistência a digestão por endonuclease (figura adaptada de GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

1.5. Talassemias

O termo talassemia foi usado pela primeira vez para designar uma anemia frequentemente encontrada em indivíduos italianos, das costas gregas e ilhas próximas. Hoje, o termo é usado para se referir a defeitos hereditários na biossíntese das cadeias de globina (HOFFMAN et al., 2008; CAO e GALANELLO, 2010).

As talassemias são um grupo de doenças hereditárias caracterizadas por alterações na síntese de uma ou mais subunidades das cadeias de globina com conseqüente produção deficiente de hemoglobina. As características clínicas associadas a talassemia ocorrem

devido a produção desequilibrada de globina, o que leva a eritropoiese ineficaz e consequente anemia hemolítica. Indivíduos talassêmicos podem ser assintomáticos ou apresentar manifestações clínicas que podem variar de uma anemia hipocrômica e microcítica até alterações que se tornam incompatíveis com a vida (THEIN, 1998).

As talassemias são classificadas de acordo com a cadeia de globina cuja síntese é afetada em: talassemias α , β , δ , γ e $\delta\beta$, sendo as talassemias α e β as mais frequentes de maior importância clínica. Portanto, as cadeias de α globina estão ausentes ou diminuídas em pacientes com α -talassemia, e a produção de β globina está alterada em indivíduos beta talassêmicos, o mesmo ocorre em outros tipos de talassemias. Esta classificação também é importante para subdividir os pacientes de acordo com o nível de produção de cada cadeia de globina, que pode ser reduzida (por exemplo, talassemia α^+ ou β^+) ou ausente (por exemplo, talassemia α^0 ou β^0) (HOFFMAN et al., 2008).

A anemia falciforme associada com a α -talassemia promove manifestações clínicas mais brandas, uma vez que, a redução na disponibilidade de cadeias α diminui sua incorporação nas moléculas HbS, levando a uma diminuição de sua concentração. Os pacientes apresentam redução da hemólise, quantidades maiores de Hb, aumento da expectativa de vida, hemácias mais hidratadas e mais deformáveis em comparação a indivíduos não talassêmicos (STEINBERG, 2005; SONATI e COSTA, 2008).

1.5.1. Alfa Talassemia

A alfa talassemia é uma desordem hereditária de distribuição mundial causada pela deficiência total ou parcial na síntese das cadeias de alfa da hemoglobina, que resulta em comprometimento do processo de hemoglobinizacão, gerando eritrócitos hipocrômicos e microcíticos e a formação de hemoglobinas anômalas formadas pelos tetrâmeros das cadeias cuja síntese está preservada (β_4 e γ_4) (BUNN E FORGET, 1986).

Visto que, existem dois genes alfa por genoma haplóide, totalizando quatro numa célula diplóide normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), as talassemias alfa são classificadas em α^+ ($-\alpha$) e α^0 ($--$), de acordo com o número de genes acometidos no cromossomo, levando à redução parcial ou total da síntese de cadeias α (HIGGS, 1993; KATTAMIS et al., 1996). Esta patologia tem como principal mecanismo molecular a deleção de um ou mais genes que sintetizam as

cadeias α (FORGET e PEARSON, 1995; WEATHERALL e CLEGG, 1999). A talassemia α^0 é resultado de grandes deleções que removem total ou parcialmente o grupamento gênico alfa e/ou seu elemento regulatório (HS 40), fazendo com que os genes α não sejam expressos (KATTAMIS et al., 1996; WEATHERALL e CLEGG, 2001b).

Os portadores são classificados de acordo com o número de genes afetados, quando um gene é afetado é denominado traço talassêmico α^+ heterozigoto ($-\alpha/\alpha$) ou portador silencioso, resultando em uma talassemia praticamente assintomática, com alterações laboratoriais mínimas ou ausentes. O acometimento de dois genes corresponde ao traço talassêmico α^+ homozigoto ($-\alpha/-\alpha$), com perda de um gene alfa em cada cromossomo e ao traço talassêmico α^0 heterozigoto ($--/\alpha\alpha$), referente à perda de dois genes alfa no mesmo cromossomo. Os indivíduos acometidos apresentam anemia, hemácias hipocrômicas e microcíticas e a presença de Hb Bart's (γ_4) ao nascimento (5% a 10%) (figura 7) (CANÇADO, 2006).

A interação das formas α^0 e α^+ ($--/\alpha$), com deleção de três genes alfa causa a doença da Hb H, que é caracterizada pela presença de tetrâmeros de beta globina (β_4), que se encontram em excesso, são instáveis e suscetíveis à oxidação, precipitando na hemácia causando destruição precoce dos eritrócitos, devido à diminuição da meia vida dessas células, e aumentando o nível de apoptose (CHENG et al., 2005; RIBEIRO et al., 2008). Os pacientes acometidos com esta forma da doença tem 25% a 50% de Hb Bart's ao nascimento e 5% a 30% de HbH na vida adulta. O quadro clínico e laboratorial apresenta anemia, microcitose, hipocromia, hemácias policromatófilas e hemácias em alvo, icterícia e esplenomegalia. A forma mais grave da doença é a homozigose da talassemia α^0 ($--/--$) que afeta os quatro genes da alfa globina causando a síndrome da hidropisia fetal com Hb Bart's (γ_4) a qual é letal, com morte intra-uterina ou logo após o nascimento (figura 7) (CANÇADO, 2006).

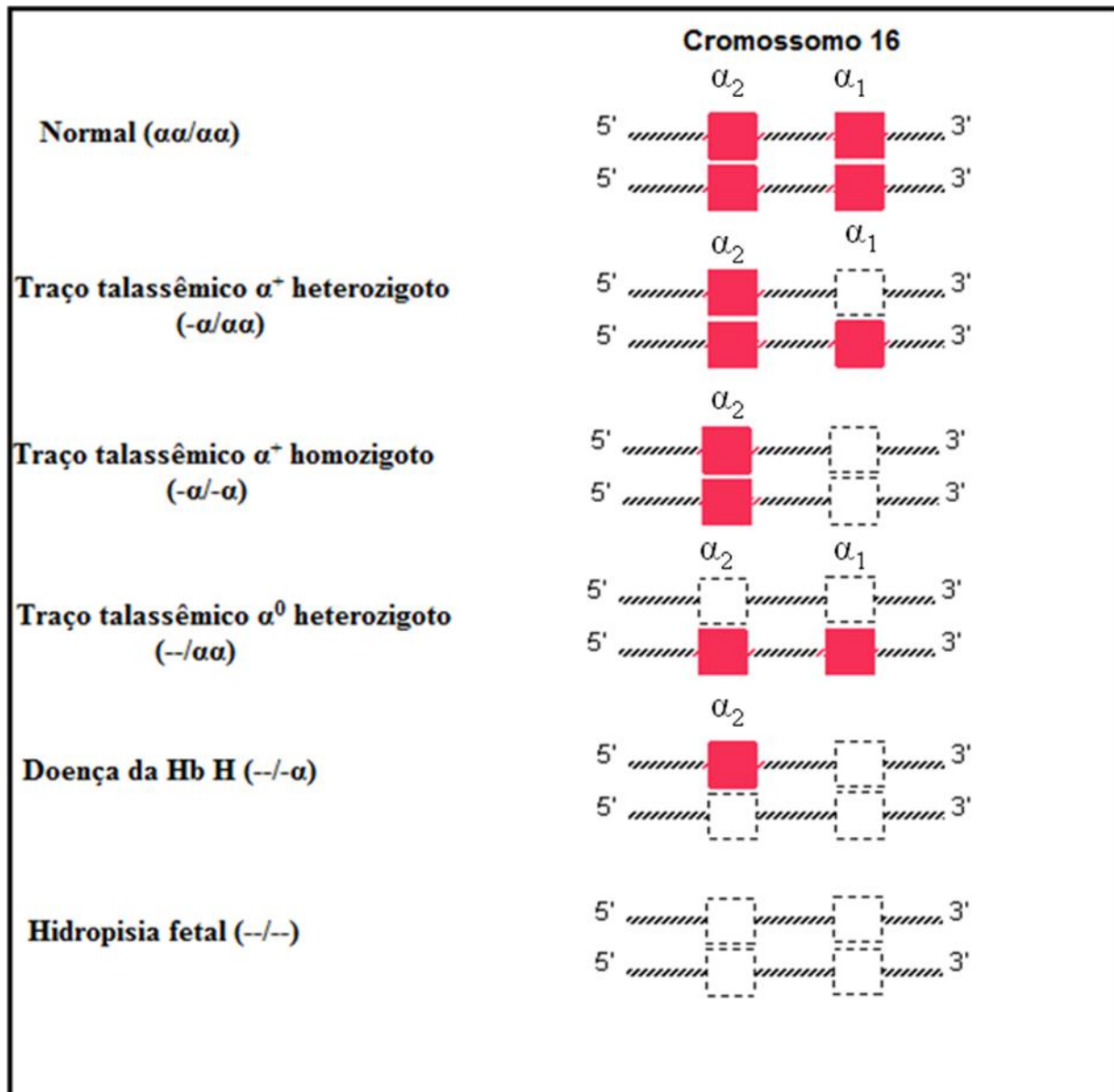


Figura7. Representação diagramática das deleções gênicas na alfa talassemia. Em um genoma diplóide normal existem quatro genes alfa ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), sendo as α talassemias classificadas de acordo com o número de genes acometidos, em α^+ ($-\alpha$) e α^0 ($--$) o que leva à redução parcial ou total da síntese de cadeias α . Os portadores classificam-se de acordo com o número de genes afetados: um gene é afetado é denominado traço talassêmico α^+ heterozigoto ($-\alpha/\alpha\alpha$), dois genes acometidos corresponde ao traço talassêmico α^+ homozigoto ($-\alpha/-\alpha$), com perda de um gene alfa em cada cromossomo e ao traço talassêmico α^0 heterozigoto ($--/\alpha\alpha$), referente à perda de dois genes alfa no mesmo cromossomo. A deleção de três genes alfa corresponde a interação α^0 e α^+ ($--/-\alpha$) causando a doença da Hb H, caracterizada pela presença de tetrâmeros de beta globina (β_4), quando quatro genes são afetados ocorre a homozigose da talassemia α^0 ($--/--$), a qual é a forma mais grave da doença causando a síndrome da hidropisia fetal com HbBart's (γ_4) que é letal, com morte intra-uterina ou logo após o nascimento (figura adaptada de SINGER, 2009).

1.5.2. Beta Talassemia

A beta talassemia é uma doença hematológica de caráter hereditário que resulta de uma alteração quantitativa da síntese de beta globinas, sendo classificadas como talassemias beta zero (ou talassemia β^0) quando a síntese de globinas beta está ausente, e talassemias beta mais (ou talassemia β^+) quando há redução na taxa de síntese, levando a menor produção de hemoglobina, originando uma anemia de graus variados, de característica microcítica e hipocrômica (WEATHERALL, 2006).

Atualmente, mais de 200 mutações foram descritas como associada a esta doença. A deleção total do gene de beta globina raramente é observada em beta talassêmicos, sendo a maioria das mutações causadas por substituições, deleções ou inserções de nucleotídeos nos exons, introns e regiões promotoras dos genes β . As mutações podem ser divididas naquelas que afetam a transcrição de RNAm (mutações na região promotora), aquelas que atingem o processamento do RNAm (mutações nas regiões de splicing e recombinações deficientes) e aquelas que afetam a tradução (codon de terminação) (CAO e GALANELLO, 2010). Além disso, outras mutações podem alterar o sinal de poliadenilação, dificultando a adição da cauda de poli (A) ao RNAm, que se torna mais instável (tabela 1) (HOFFMAN et al., 2008).

Tabela 1. Exemplos das mutações de ponto mais frequentes que causam talassemias, segundo sua localização na molécula, o defeito funcional que provocam e o resultado sobre a síntese de globinas (Extraído de ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005)	
<i>Defeito</i>	<i>Tipo de Talassemia</i>
mRNA não- funcional	
1.Códon de Término Prematuro CD 15 G→A, CD 17 A→T, CD 35 C→A, CD 39 C→T, CD 43 G→T, CD 121 A→T	β^0
2.Pequena Deleção com Deslocamento de Bases (<i>frameshift</i>) CD 5 -CT, CD 6 -C, CD 8/9 +G, CD 16 -C, CD 35 -C, CD 41/42 -TTCT, CD 76 -C, CD 109/110 1nt del	β^0
3.Mutação do Códon de Início ATG ATG→AGG, ATG→ACG	β^0
Processamento Anormal do RNA	
1.Mutações Internas nos Íntrons IVS-1 nt 110 G→A, IVS-2 nt 705 T→G, IVS-2 745 C→G IVS-1 nt 116 T→G, IVS-2 nt 654 C→T	β^+
2.Ativação de Sítios Crípticos de <i>Splicing</i> CD 19 A→G, CD 26 G→A, CD 27 C→T	β^{+*}
3.Mutações nos Limites Exon- Íntron IVS-1 nt 1 G→A, IVS-1 nt 1 G→T, IVS-1 nt 2 T→G, IVS-2 nt 849 A→G, IVS-2 nt 849 A→C IVS-1 nt 5 C→G, IVS-1 nt 5 G→T, IVS-1 nt 128 T→G, IVS-2 nt 843 T→G	β^0 β^+
4.Redução da Transcrição do mRNA (mutações na região promotora) -101 C→T, -92 C→T, -88 C→T, -31 A→G, -30 T→A, -28 A→C	β^+
Mutações do Sítio de Poliadenilação do mRNA (AATAAA) AACAAA, AATAAG, AATGAA, AATAGA, A (del AATAA)	β^+
Mutações Estruturais (cadeias alongadas ou hiperinstáveis) CD 49 +TG (Hb Agnana), CD 110 TC (Hb Showa- Yakushiji), CD 114 -CT +G (Hb Genebra)	β^+
<i>* Nestes casos, a mutação na região codificadora determina a troca de um aminoácido na cadeia e a síntese de hemoglobinas com estrutura anormal (denominadas, respectivamente, Hb Malay, HbE e Hb Knossos), e devido ao defeito no processamento, a hemoglobina mutante é produzida em ritmo reduzido</i>	

A talassemia β tem maior prevalência em populações originárias da Região Mediterrânea e do Sudeste Asiático. No Brasil, a frequência de portadores na população caucasiana é de aproximadamente 1%, sendo os alelos β^0 39 (C→T), β^+ -IVS-I-6 (T→C), β^+ -IVS-I-110 (G→A) e β^0 -IVS-I-1 (G→A) responsáveis por quase todos os casos nas Regiões Sul e Sudeste; na Região Nordeste, além destes, o alelo β^+ -IVSI-5 (G→C) representa 9,3% dos

alelos encontrados em β -talassêmicos. A mutação β^0 CD39 apresenta frequência de 50 a 60% no Sudeste brasileiro, não chegando a 5% no Nordeste, sendo a β^+ -IVS-I-6 predominante nesta população (ARAÚJO et al., 2003; WENNING e SONATI, 2007; SONATI e COSTA, 2008).

Clinicamente, as talassemias são classificadas em menor ou traço talassêmico β (geralmente os indivíduos são assintomáticos); maior ou anemia de Cooley (anemia grave, com dependência de transfusões sanguíneas regulares) e intermediária (formada pelos fenótipos clínicos intermediários entre o traço talassêmico e a talassemia maior) (SONATI e COSTA, 2008).

1.5.2.1. Beta Talassemia Menor

A beta talassemia menor se caracteriza pela heterozigose das formas β^0 ou β^+ , na qual a redução da síntese de beta globina não é bastante acentuada, mas o suficiente para causar discreta anemia microcítica e hipocrômica. Os indivíduos acometidos normalmente são assintomáticos, e geralmente não necessitam de tratamento, entretanto os portadores podem apresentar anemia em algumas situações como na infância, gravidez e estresse fisiológico. As manifestações clínicas, quando presentes, variam entre os diferentes grupos raciais, tais como astenia, cansaço e esplenomegalia. A importância do diagnóstico está relacionada à necessidade de aconselhamento genético e a prevenção da administração errônea de compostos de ferro aos portadores (BANK, 2005; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; HUISMAN et al., 2001; SONATI e COSTA, 2008).

Os achados laboratoriais referentes à beta talassemia menor incluem aumento da concentração de Hb A₂ (>4%-7%) em 90% dos portadores, diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM) e do volume corpuscular médio (VCM), alterações na morfologia dos eritrócitos, especialmente, microcitose e hipocromia com presença de esquizócitos, dacriócitos e pontilhados basófilos. A concentração de hemoglobina se apresenta em torno de 9 a 11 g/dL e o nível de Hb F pode estar elevado em aproximadamente cinquenta por cento dos casos, geralmente de 1 a 3% e raramente mais que 5% (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; WEATHERALL, 2006).

1.5.2.2. Beta Talassemia Maior

A beta talassemia maior resulta da homozigose tanto do tipo β^+ quanto do β^0 ou da dupla heterozigose β^+/β^0 . A grave deficiência ou ausência da síntese de beta globina causa grave anemia (Hb < 6,0g/dL) em virtude da ineficiência da eritropoese e ao sequestro das hemácias no baço. O desequilíbrio na produção de cadeias beta faz com que as cadeias alfa em excesso formem complexos instáveis que irão precipitar causando destruição celular prematura. Os efeitos da doença não são notados até o sexto mês de vida aproximadamente, visto que neste período a hemoglobina predominante é a HbF. Após este período, a doença se manifesta como grave anemia (Hb entre 3-5g/dL) e icterícia. A destruição precoce das células eritróides que ocorre na medula óssea e na periferia estimula a proliferação e maturação dos eritroblastos, levando a expansão medular e consequentes deformidades ósseas (WEATHERALL e CLEGG, 1981; MAGGIO; CARONIA; RUSSO, 2000).

Os pacientes com beta talassemia maior apresentam caquexia, fadiga, insuficiência cardíaca congestiva como consequências diretas da anemia e, em virtude da expansão da eritropoese extramedular, além das anormalidades ósseas, estes apresentam esplenomegalia, compressão da medula espinhal e retardo do crescimento. A hemólise crônica leva a litíase biliar, formação de úlceras em membros inferiores e hipertensão pulmonar. A maior parte dos acometidos precisa regularmente de transfusões, que ao longo dos anos resultam em sobrecarga de ferro em tecidos e órgãos, gerando complicações cardíacas, hepáticas e endócrinas como a pigmentação escura e metálica da pele, diabetes, hipopituitarismo, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo, cirrose, arritmias cardíacas e miopatia, principais causas de morte, por isso a terapia de quelação deve ser iniciada o mais cedo possível. Adicionalmente, alguns pacientes podem portar doenças infecciosas como complicações das recorrentes transfusões (CAPPELLINI et al., 2008; SONATI e COSTA, 2008).

1.5.2.3. Beta Talassemia Intermediária

O fenótipo da beta talassemia intermediária pode ser influenciado por diversos fatores, entre eles a interação de um gene beta talassêmico leve com um que causa beta talassemia grave, a associação dos genótipos β^0 e β^+ e também mutações no gene alfa. Indivíduos heterozigotos $\beta^0\beta^+$ podem apresentar manifestações clínicas que variam de leves a graves. Esta variação fenotípica acontece quando a expressão de um gene altera a expressão do outro gene (AESSOPOS; BERDOUKAS; TSIRONI, 2007). De modo geral, a forma mais comum de beta talassemia intermediária é causada por mutações β^+ (β^+/β^+) e as mutações mais frequentes são -101 (C→T), -87 (C→T), -88 (C→T), -29 (A→G) e a IVS-I-6 (T→C) (FORGET, 2001).

Clinicamente, os portadores apresentam um quadro mais favorável quando comparados aos indivíduos com beta talassemia maior. Os pacientes mostram anemia crônica moderada com níveis de hemoglobina de 6-9 g/dL, não dependendo de transfusões regulares. Normalmente, os sintomas e o reconhecimento da anemia ocorrem mais tarde, geralmente, após o segundo ano de vida (WEATHERALL, 1990).

Os achados clínicos mais frequentes incluem as deformidades ósseas faciais, úlceras em membros inferiores, icterícia intermitente, episódios recorrentes de litíase biliar e esplenomegalia progressiva. Com o avançar da idade, os acometidos podem apresentar complicações em virtude da expansão medular, dentre elas anormalidades ósseas, retardo no crescimento, infertilidade, sobrecarga de ferro tecidual devido ao aumento da absorção gastrointestinal de ferro resultante da anemia e hipercoagulabilidade. Alguns pacientes desenvolvem hipertensão pulmonar grave semelhante à encontrada em outras anemias hemolíticas crônicas. Outra complicação importante que pode ocorrer nesta patologia é a osteoporose. É de grande importância a distinção entre beta talassemia intermediária e maior, visto que, é ela quem determinará o tratamento ministrado (BANK, 2005; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; WEATHERALL, 2006; SONATI e COSTA, 2008).

1.6. Anemias Hemolíticas e Estresse Oxidativo

Hemólise é a destruição ou remoção dos eritrócitos da circulação antes da sua duração normal de 120 dias e na maioria das vezes apresenta-se como anemia quando a produção de eritrócitos não pode acompanhar o ritmo de sua destruição. Juntamente com a anemia, uma característica da hemólise é a reticulocitose, uma resposta normal da medula óssea para a perda periférica de células vermelhas do sangue (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004). O estresse oxidativo é responsável por agravar os sintomas de muitas doenças, incluindo anemias hemolíticas. Embora não seja a etiologia primária destas doenças, o dano oxidativo desempenha para as células eritróides um papel crucial na hemólise devido a eritropoiese ineficaz na medula óssea e a curta sobrevivência das células vermelhas na circulação (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

O estado oxidativo das células é determinado pelo equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Pró-oxidantes são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS). As espécies reativas de oxigênio são produtos gerados pela redução incompleta do oxigênio molecular durante processos metabólicos, exposição a agentes externos como cigarro, radiação, carcinógenos, drogas e ozônio, e internos, como durante a resposta inflamatória, atividade da NADPH oxidase, xantina oxidase e da cadeia transportadora de elétrons (MASAKI, 2010). Estes compostos participam em diversos processos celulares como envelhecimento, proliferação e sinalização em células saudáveis, entretanto quando as EROS excedem a capacidade antioxidante das células, estas são responsáveis por oxidações de biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, causando danos a organelas celulares e morte celular (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

EROs tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) surgem durante o metabolismo aeróbico normal (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é a principal fonte de ATP nas células e, portanto, é essencial para a vida. Durante a fosforilação oxidativa, um pequeno número de elétrons "vazam", reduzindo o oxigênio molecular a $O_2^{\cdot -}$. Dados na literatura apontam que cerca de 0,1 a 1% de todo o produto da cadeia transportadora de elétrons escapam na forma de $O_2^{\cdot -}$, o qual pode ser convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD).

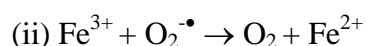
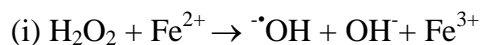
Estas moléculas através de reações que envolvem metais de transição como as reações de Fenton e Haber Weiss (descritas abaixo) podem formar $\cdot\text{OH}$ que por sua vez, é altamente reativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Vários processos patológicos estão associados à formação desequilibrada dessas moléculas (STADTMAN, 1990).

Moléculas como $\text{O}_2^{\cdot -}$ que são carregadas e o $\cdot\text{OH}$ que é altamente reativo, normalmente ficam confinadas no local onde são geradas. Neste contexto, o H_2O_2 , por não possuir carga e ser moderadamente reativo, transitam pelas membranas celulares e atingir diferentes compartimentos celulares ou mesmo em células que se encontram fisicamente próximas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Adicionalmente ao H_2O_2 , outros hidroperóxidos como os hidroperóxidos de lipídeo (L-OOH) e peroxinitritos (ONOO^-), também possuem grande importância biológica.

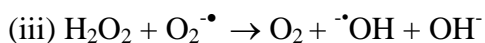
Peróxido de Hidrogênio

Apesar do H_2O_2 não ser muito reativo, ele é capaz de oxidar tióis de proteínas, promovendo a formação de vários produtos, entre eles dissulfetos inespecíficos entre proteínas, que pode resultar em agregação e conseqüentemente perda da atividade. Por outro lado, pode reagir com metais dando origem ao radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o qual é extremamente reativo e ataca rapidamente as biomoléculas no local onde é formado. Este radical pode ser formado através da reação de Fenton que envolve a redução do H_2O_2 pelo íon de um metal de transição como o Fe^{2+} (reação i). O metal oxidado produzido na reação de Fenton pode ser reduzido pelo $\text{O}_2^{\cdot -}$, (ii). A soma das reações (i) e (ii) corresponde a reação de Haber-Weiss (iii) que é catalisada por metais. Reações similares podem também ocorrer com peróxido derivados de lipídeo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Reação de Fenton



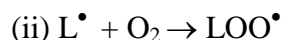
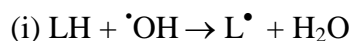
Reação de Harber-Weiss



Como evidenciado na reação acima, o ferro tem um papel crucial na geração de $\cdot\text{OH}$. Este metal é encontrado em diversas formas moleculares e em grande abundância no organismo humano, ligado a uma grande variedade de proteínas, participando dessa forma de inúmeras reações bioquímicas de oxi-redução. De fato, na presença de ferro a toxicidade de H_2O_2 pode ser potencializada em até 1000 vezes (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

Hidroperóxidos de Lipídeos e Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica pode ocorrer em qualquer lipídeo que possua uma insaturação ou que seja poliinsaturado como os ácidos graxos de cadeia longa, fosfolipídeos, glicolipídeos bem como a molécula de colesterol (GIROTTI, 2008). O esquema abaixo sintetiza o processo de peroxidação lipídica.



A primeira etapa deste processo é denominada de iniciação e se caracteriza pelo ataque de uma espécie reativa como o $\cdot\text{OH}$, capaz de abstrair o átomo de H de um metileno ($-\text{CH}_2-$) (i). Uma vez que o hidrogênio possui somente um elétron a abstração deixa um elétron desemparelhado na última camada do carbono formando o radical alquila ($-\cdot\text{CH}-$), este se combina com o O_2 para formar o radical peroxil (ii) o qual é capaz de abstrair um átomo de H de outro lipídeo insaturado (resultando em um novo radical alquil), para formar um peróxido de lipídeo e desta forma iniciar uma reação em cadeia (GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Esta etapa da reação é denominada de propagação. Assim como para o H_2O_2 a presença de Fe^{2+} estimula a peroxidação através da decomposição do peróxido de lipídeo LOOH gerando as espécies radiculares alcoxil ($\text{LO}\cdot$) e peroxil ($\text{LO}_2\cdot$) (iv) (figura 8).

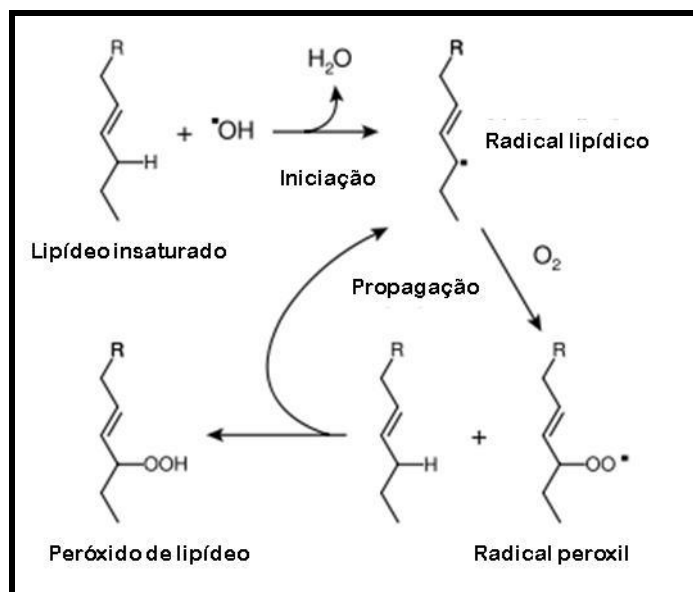


Figura 8. Diagrama da reação em cadeia de peroxidação lipídica.

As constantes para esta reação são de $1.5 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ na presença Fe^{2+} e são significativamente maiores que as alcançadas pela reação de Fenton para H_2O_2 as quais possuem taxas de $76 \times 10 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Graças à grande intimidade entre os lipídeos presentes na membrana plasmática e as proteínas de membrana, as quais podem chegar até 50% de sua composição, a peroxidação lipídica causa danos substanciais às proteínas constituintes (GUTTERIDGE, 1995). A peroxidação lipídica das membranas biológicas ocasiona perda de fluidez, queda do potencial de membrana, aumento da permeabilidade ao H^+ e outros íons que resultam na ruptura e extravasamento do conteúdo celular (GIROTTI, 2008). Adicionalmente, alguns produtos da fragmentação lipídica são citotóxicos (ESTERBAUER, 1993; CATALA, 2009). Já foi demonstrado que a incubação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) com eritrócitos submetidos a estresse oxidativo, faz com que as LDL ganhem progressivamente peróxidos de colesterol (ChOOH) advindos da membrana eritrocitária (VILA; KORYTOWSKI; GIROTTI, 2002). Do ponto de vista da saúde humana, este fenômeno pode ter grande importância uma vez que os LOOH podem gerar reações em cadeia na presença de metais de transição e possuir um importante papel arterogênico (STEINBERG et al., 1989; GIROTTI, 2008).

Óxido Nítrico e a Formação de Peroxinitrito

O óxido nítrico (NO^\bullet) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) também possuem elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica e, portanto também são espécies radicalares. O interesse biológico inicial NO^\bullet se deu pela descoberta que o tecido vascular endotelial e outras células do corpo são capazes de produzir pequenas quantidades a partir do aminoácido (AA) arginina (MONCADA e HIGGS, 1991; HALLIWELL, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Esta espécie química está relacionada com processos celulares de grande importância como vaso constrição/vaso dilatação, agregação plaquetária, inibição da adesão celular, resposta do sistema imunológico, dentre outros (MONCADA e HIGGS, 1991; DESSY et al., 2004). Entretanto, o NO^\bullet pode reagir com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar um intermediário bastante reativo o peróxido de nitrito (ONOO^-). Esta espécie é um poderoso oxidante capaz de causar danos em diversas biomoléculas e em pHs acídicos pode se decompor em dióxido de nitrogênio (NO_2^\bullet) e $^\bullet\text{OH}$ independente da catálise realizada por metais de transição (GUTTERIDGE, 1995; SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007) de acordo com a reação abaixo:



No interior das membranas o peroxinitrito pode reagir com proteínas integrais e/ou periféricas através de centros metálicos protéicos, ou tióis. Ainda no interior das membranas biológicas, esta molécula pode se decompor em NO_2 e $^\bullet\text{OH}$ os quais atuarão na peroxidação lipídica e nitrosilação de lipídeos, proteínas e DNA. No caso do DNA reagindo especialmente com purinas formando 8-oxo e 8-nitroguanina. A reação de NADH com peroxinitrito pode resultar na formação de NAD^+ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ (GOLDSTEIN e CZAPSKI, 2000).

Como mencionado anteriormente, na maioria das células as EROs são geradas em grande parte pela mitocôndria durante o processo de respiração (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007), entretanto, apesar do eritrócito não possuir mitocôndrias, as EROs são produzidas constantemente em razão das grandes tensões de O_2 e altas quantidade de ferro presentes no grupamento heme da hemoglobina (DUMASWALA et al., 1999; CIMEN, 2008).

A glicose é a única fonte de energia nos eritrócitos maduros, esta é transportada de forma facilitada para o interior da célula onde é prontamente convertida a glicose 6 fosfato. Entre 80-90% deste carboidrato é convertido pela glicólise anaeróbica gerando lactato e o restante é oxidado pela via das pentoses. Este metabolismo tem importância significativa para a manutenção da homeostase REDOX da célula eritrocitária, uma vez que adicionalmente a geração de moléculas de elevado valor energético como o ATP e o NADH, são geradas grandes quantidades de NADPH que são utilizados para a manutenção de altos níveis de glutathione (GSH) bem como fornecer equivalentes redutores para as enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase e peroxirredoxinas, as quais serão abordadas em maiores detalhes nos tópicos seguintes, desta forma este metabolismo atua protegendo os grupos sulfidrilas das proteínas incluindo a Hb e os lipídeos de membrana (BAYNES, 2005).

O O_2 é considerado uma fonte das EROs que agem como mediadores da hemólise oxidativa, uma vez que adição de um elétron é capaz de gerar o radical ânion super-óxido (SCOTT et al, 1989). A espécie $O_2^{\bullet-}$ é formada principalmente através de duas fontes: 1) auto-oxidação da hemoglobina (Hb) em metahemoglobina (MetHb) a qual gera $O_2^{\bullet-}$ (GIULIVI e DAVIES, 1990) e 2) Através da oxidação do Ferro hemicromo (Fe^{3+}) que indica que o elétron foi perdido durante sua oxidação através de fontes externas como drogas, por exemplo (HEBBEL et al., 1982). Esta espécie é capaz de atacar diretamente as membranas das células vermelhas causando alterações nos lipídeos e na estrutura das proteínas (CLASTER et al., 1984).

Sendo assim a fonte primária de EROs no eritrócito é a própria proteína carreadora de O_2 , ou seja a Hb que sofre auto-oxidação produzindo o $O_2^{\bullet-}$. Considerando que a concentração de Hb no interior do eritrócito é muito alta, ao redor de 5mM, mesmo uma pequena parcela que sofre auto-oxidação pode produzir altos níveis de EROs. A redução ocasional do O_2 em $O_2^{\bullet-}$ é acompanhada da oxidação do átomo de ferro da hemoglobina, formando a metahemoglobina, a qual não é mais capaz de transportar O_2 . Dessa forma, caso ocorra o rompimento desta célula estes elementos possuirão um grande potencial de danificar outros componentes da circulação e tecidos (JOHNSON et al., 2005). No caso do transporte de oxigênio, o ferro necessita estar na sua forma reduzida, caso isto não ocorra este pode se desprender da Hb. Nos eritrócitos humanos aproximadamente 3% do total das

moléculas de Hb se transformam em MetHb diariamente, através de reações de Hb com O_2 . Esta MetHb pode ser reduzida pela via NADH citocromo ou pela via 5-metHb redutase e metHb redutase dependente de NADPH (KENNETT et al., 2005).

Nas hemácias o $O_2^{\bullet-}$ é dismutado pela SOD, gerando grandes quantidades de H_2O_2 que é capaz de se difundir livremente pela célula, ao contrário do $O_2^{\bullet-}$ que necessita de canais aniônicos para sair (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Este composto também pode vir de fontes extracelulares devido à alta permeabilidade desta ERO na membrana do eritrócito. Neste contexto, um fato de grande importância é que o eritrócito é considerado um “coletor” e decompositor universal de H_2O_2 dos organismos de uma vez que possui acesso a praticamente todos os tecidos do corpo, além do número destas células ser extremamente abundante (AGAR et al., 1986; BROWN et al., 1989; AOSHIBA et al., 1999; WINTERBOURN e HAMPTON, 2008; XU et al., 2008).

Desta forma a Hb está constantemente sob o efeito do H_2O_2 , resultando em oxidações protéicas que podem ser utilizadas como sinais seletivos para proteólise nos eritrócitos (GIULIVI e DAVIES, 2001). Além disso, existem evidências que o aumento do H_2O_2 está diretamente relacionado com a peroxidação lipídica e hemólise através da formação de um complexo ligado covalentemente entre espectrina e Hb que promove diversas modificações na forma e deformabilidade da membrana além de interferir na organização dos fosfolipídeos da superfície celular (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008). O quadro descrito acima ocorre devido à reação de Fenton onde o H_2O_2 reage com o Ferro gerando o radical $\cdot OH$. Em razão da abundância do O_2 no meio celular dos eritrócitos, este metal parece ser de grande importância na formação de espécies radicalares. Esta reação pode resultar na formação de complexos Fe-O, denominados de íons ferril ou preferril os quais possuem um poder oxidante extremamente elevado (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

Durante o processo de diferenciação eritrocitária, produzida a partir de células tronco da medula óssea, particularmente a partir da formação dos eritroblastos ortocromáticos, estas células perdem importantes organelas como núcleo, mitocôndria e ribossomos (VOLPE, 1993; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001). Desta forma, os eritrócitos não possuem a capacidade de se dividir, realizar síntese proteica, realizar a fosforilação oxidativa ou mesmo sintetizar novas membranas biológicas. Neste contexto,

todos os lipídeos encontrados na célula eritrocitária madura são pertencentes a bicamada lipídica sintetizada durante o processo de maturação e consistem de fosfolipídeos e colesterol na proporção molar de 1.2 : 1, sendo que ~50% deles são insaturados (TELEN e KAUFMAN, 1999).

Estas células possuem uma vida média de 100-120 dias, as quais serão posteriormente fagocitadas no baço, fígado e medula óssea. O envelhecimento destas células parece ser um processo multifatorial sendo que os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente esclarecidos (CAPRARI et al., 1999). Uma das explicações seria a teoria do envelhecimento através de EROs, na qual a degradação destas células viriam como resultado de danos oxidativos acumulados em biomoléculas com o passar do tempo de vida (TANG, 1997; INOUE et al., 2004; MULLER et al., 2007).

Em situação normal, a destruição dos eritrócitos acontece na mesma razão que a eritropoese de forma a manter o número de eritrócitos circulantes. Este processo é resultado principalmente da formação de agregados de proteínas de banda 3, que é uma das proteínas mais abundantes na membrana do eritrócito, e que são estabilizados por moléculas de hemoglobina oxidada, conhecida como hemicromo. Isso causaria a perda da assimetria dos lipídeos de membrana através do reconhecimento desses agregados como antígenos por anticorpos IgG e do sistema complemento (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001). Diversos estudos mostram que eritrócitos humanos expostos ao estresse oxidativo apresentam diversas alterações celulares como denaturação oxidativa da Hb, lipídeos de membrana peroxidados e diversas proteínas de membrana agregadas, formando complexos de alto peso molecular. Por isso, a morte celular programada (MCP) de eritrócitos é bastante aumentada em diversas doenças hematológicas como, por exemplo, na anemia falciforme, beta talassemia e deficiência de G6PD (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008; PANDEY e RIZVI, 2010; RUSANOVA et al., 2010).

Neste contexto, nos eritrócitos, os lipídeos polinsaturados do interior da membrana, estão localizados um ambiente altamente rico em O₂ e Hb a qual por sua vez, é rica em Ferro, o que as tornam altamente susceptíveis a danos oxidativos. As EROs podem portanto iniciar a peroxidação lipídica levando a perda progressiva da fluidez da membrana e consequente morte celular (CLASTER et al., 1984). Recentemente foi demonstrado que o tratamento dos eritrócitos com peróxido orgânico (tert-butil hidroperóxido/*t*-BOOH)

aumenta o metabolismo da célula promovendo o aumento da síntese de NADH e NADPH, os quais podem ser diretamente utilizados para a redução de moléculas (Glutathione) ou enzimas antioxidantes, como as Peroxirredoxinas (PRDX) (OGASAWARA; FUNAKOSHI; ISHII, 2008). Adicionalmente, foi demonstrado *in vitro* que a adição de ácido ascórbico ao meio contendo eritrócitos submetidos a estresse oxidativo com *t*-BOOH protege as hemácias contra danos oxidativos. Curiosamente, é sabido que o ácido ascórbico é capaz de reduzir as PRDX do tipo 1-Cys, como a PRDX6, entretanto, esta relação não foi investigada (MONTEIRO et al., 2007; KRUKOSKI et al., 2009).

Outra informação importante é que proteínas de membrana como, por exemplo, a cálcio ATPase, que é responsável pela manutenção do gradiente de Ca^{2+} intra/extra-celular nestas células, possui diversos grupamentos sulfidríla que quando oxidados resultam na perda da atividade enzimática que está diretamente relacionada com o decréscimo da deformabilidade e destruição prematura do eritrócito (SHALEV et al., 1981). Os peroxinitritos e espécies reativas contendo nitrogênio também apresentam grande relevância para a célula eritrocitária, uma vez que o óxido nítrico (NO) é o terceiro gás mais abundante transportado juntamente com O_2 e CO_2 pelas células eritrocitárias. Conforme mencionado anteriormente, o NO é um importante componente em diversos processos/sistemas atuando na resposta imunológica e processos inflamatórios, crescimento e diferenciação celular, e também influenciando de forma bastante relevante no sistema circulatório, uma vez que está relacionado, como mencionado anteriormente, com a inibição de agregação plaquetária e nos processo de vaso-constricção e vaso dilatação (HAN et al., 2003; GLADWIN; CRAWFORD; PATEL, 2004; GUNDUZ; OZTURK; SOZMEN, 2004; ROMERO; DENICOLA; RADI, 2006).

Recentemente foi demonstrado que o eritrócito é capaz de sintetizar óxido nítrico (NO) utilizando o aminoácido arginina como substrato, de modo similar às células endoteliais, o qual deve contribuir na regulação do tônus vascular (KLEINBONGARD et al., 2006; KLEINBONGARD; KEYMEL; KELM, 2007; ULKER et al., 2009). Nesse sentido este gás tem sido muito estudado como alternativa terapêutica em diversas doenças, como por exemplo, na anemia falciforme para reduzir a adesão celular de hemoglobinas ao vaso, evitando assim a vaso-oclusão que é o principal aspecto fisiopatológico nesta doença

(CONRAN et al., 2004; CANALLI et al., 2008; CONRAN, FRANCO-PENTEADO; COSTA 2009).

Já foi demonstrado que a Hb é importante no controle do tônus vascular mediado pelo NO. Na circulação os eritrócitos são os maiores responsáveis pelo sequestro de NO, justamente por conter altos níveis de Hb, seja através de reações diretas com os grupamentos prostéticos da hemoglobina ou através de resíduos de cisteína das cadeias α da molécula (KLEINBONGARD et al., 2006; KLEINBONGARD; KEYMEL; KELM, 2007; ULKER et al., 2009). A adição de um grupo NO a tióis protéicos (RSNO) forma um nitroso tiól em um processo denominado de S-nitrosilação e já foi demonstrado que a S-nitrosilação da hemoglobina é facilitada pela alteração conformacional da molécula induzida pelo O_2 . Assim ao reagir com a Hb ligada ao Oxigênio ($Hb Fe^{+2} O_2$) o NO é convertido a nitrato, ao passo que na reação sem o oxigênio ($Hb Fe^{+2}$) forma $Hb Fe^{+2} NO$. O gradiente de O_2 das arteríolas promove a transição alostérica na Hb o qual libera NO e promove o aumento do fluxo sanguíneo (ZHANG et al., 2005; GRUBINA et al., 2007). Desta forma o consumo de NO é fortemente regulado pela hemoglobina, sendo que esta pode consumi-lo em altas quantidades.

Recentemente foi descrito que em células cerebrais de pacientes com a doença Parkinson que a PRDX2 sofre S-nitrosilação dos resíduos envolvidos na decomposição de hidroperóxidos o que leva a perda da função peroxidásica (FANG et al., 2007; DIESEN; HESS; STAMLER, 2008). Entretanto nenhuma associação entre nitrosilação de peroxirredoxinas e doenças hematológicas foi descrita até o momento.

A modulação das EROs parece ter uma relação muito estreita com a fisiopatologia de diversas doenças hematológicas, principalmente nas anemias hemolíticas, tais como alfa e beta talassemias e na anemia falciforme. Nestas patologias, o ambiente celular é extremamente pro-oxidante seja por conta da geração ineficiente de NADPH, seja pela formação de MetHb resultando em danos oxidativos e consequente hemólise das células que por sua vez favorecem a formação dessas espécies em outros tipos celulares (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

1.7. Defesas Celulares contra o Estresse Oxidativo

Ao longo da evolução, as células desenvolveram mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio, aperfeiçoando diferentes sistemas protetores e reparadores. Esses sistemas de defesa são classificados em três categorias:

I) os sistemas quelantes de metais, os quais previnem a formação de EROs inibindo reações como a de Fenton. Dentre os representantes desta classe, encontram-se as metalotioneínas (Met);

II), os compostos de baixo peso molecular e as enzimas antioxidantes, os quais são capazes de reagir com EROs antes que haja dano às biomoléculas. Nesta categoria também estão incluídas as proteínas antioxidantes superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutatona peroxidase e as peroxirredoxinas (PRDX);

III) os sistemas de reparo, que representam a última defesa contra o estresse oxidativo. Estes são capazes de remediar os danos causados por ERO às biomoléculas.

1.7.1. Antioxidantes Enzimáticos

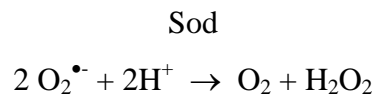
Os antioxidantes enzimáticos removem cataliticamente as EROs, evitando os efeitos deletérios causados pela oxidação. Alguns pontos importantes devem ser ressaltados em relação às enzimas antioxidantes:

1.7.1.1. Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima antioxidante amplamente encontrada em organismos eucarióticos e procarióticos. Suas isoformas são classificadas de acordo com o cofator inorgânico ligado a região proteica. Em eucariotos podem ser encontradas duas isoformas de SOD, uma contendo cobre e zinco (CuZnSOD) localizada no citosol e outra com manganês (MnSOD) encontrada na matriz mitocondrial (FRIDOVICH, 1995; STURTZ et al., 2001).

A SOD catalisa a transformação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, através de alternadas redução e oxidação do metal do sítio ativo,

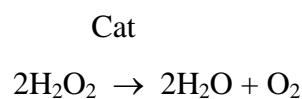
atuando, dessa forma, como primeira linha de defesa antioxidante. No caso de deficiência da SOD ou do aumento da produção do superóxido, este preferencialmente reage com óxido nítrico e produz peroxinitrito (ONOO⁻), que é um potente agente oxidante e nitrosante o qual pode provocar dano direto a proteínas, lipídios e DNA (JOHNSON e GIULIVI; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). A reação de dismutação do O₂^{•-} através da Sod é representada a seguir:



O peróxido de hidrogênio produzido pode ser decomposto por uma série de enzimas celulares. Entre elas estão a catalase (Cat), as glutathiona peroxidases (Gpx) e as peroxirredoxinas (PRDX), as quais atuam em conjunto com as Sod.

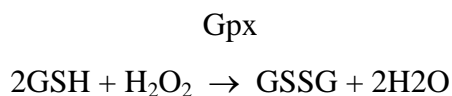
1.7.1.2. Catalase

A catalase (Cat) é uma enzima com função de catalisar a redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. São enzimas tetraméricas com subunidades de aproximadamente 50 kDa, que contêm um grupamento prostético (heme) que atua como centro redox (JAYAKUMAR; RAMESH; GERALDINE, 2006). Esta heme-enzima é extremamente eficiente e pode decompor milhões de moléculas de H₂O₂ por segundo (~10⁷ M/Sec) (YOUNG e WOODSIDE, 2001). Em mamíferos a atividade da catalase é bastante elevada nos eritrócitos, protegendo a hemoglobina através da remoção de mais da metade do peróxido de hidrogênio gerado em eritrócitos humanos normais, que estão expostos a concentrações de oxigênio substanciais (GAETANI et al., 1989). A reação de decomposição de H₂O₂ por meio da Cat está representada na equação bioquímica abaixo.



1.7.1.3. Glutationa Peroxidase

As glutations peroxidases são enzimas que possuem a selenocisteína em seu sítio ativo e catalisam a conversão de H_2O_2 e peróxidos orgânicos em água e seus respectivos alcoóis através da conversão de glutaciona reduzida (GSH), um tripeptídeo antioxidante (γ -L-Glutamil-L-cisteinil-L-glicina) abundante nas células, em glutaciona oxidada (GSSG), possuindo ação antioxidante, tanto no citosol quanto na membrana citoplasmática. Após, a molécula de GSH é reduzida pela enzima glutaciona redutase, que utiliza NADPH como cofator para essa redução (HERBETTE; ROECKEL-DREVET; DREVET, 2007; FOURQUET et al., 2008; JO; CHOI; CHOI, 2008). O mecanismo proposto para decomposição do peróxido de hidrogênio pela glutaciona peroxidase está representado abaixo:



1.7.1.4. Peroxirredoxinas

As peroxirredoxinas (PRDXs) são uma família de pequenas enzimas antioxidantes (22–27 kDa) que catalisam a redução de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito, esta atividade é exercida por um resíduo de cisteína altamente reativo presente em seu sítio catalítico. Todas as PRDXs possuem uma cisteína conservada próxima a sua região N-terminal, denominada cisteína peroxidásica (Cys_P) e a maioria apresenta um segundo resíduo de cisteína próximo a região C-terminal designado de cisteína de resolução (Cys_R) (NEUMANN; CAO; MANEVICH, 2009).

Estreitamente relacionados com a Cys_P se encontram três outros resíduos de aminoácidos conservados entre as diferentes PRDXs. Estes são a treonina (Thr), a arginina (Arg) e a prolina (Pro) (WOOD et al., 2003). A cisteína peroxidásica, a treonina e a prolina estão localizadas em um motivo catalítico PxxxTxxC (onde P designa Prolina; T, Treonina; C, Cisteína e x designa qualquer aminoácido), o qual é conservado em todas as subfamílias

de PRDXs. A conservação deste motivo indicaria que a disposição espacial destes três resíduos pode desempenhar um papel importante na atividade de peroxidase da enzima (HALL et al., 2011).

Em seres humanos já foram descritas seis isoformas de PRDXs as quais podem ser encontradas em diferentes compartimentos da célula: no citosol (PRDX1-2 e PRDX4-6), complexo de Golgi (PRDX1-4), mitocôndria (PRDX3 e PRDX5), peroxissomo (PRDX5) e no núcleo (PRDX1) (WOOD et al., 2003; KANG et al., 2005; LIU et al., 2008). Estas enzimas podem ser divididas em três subclasses, baseadas no mecanismo e no número de cisteínas envolvidas na catalise enzimática: PRDXs 2- Cys típica (PRDX1-4), são homodiméricas e contém ambos os resíduos de cisteína N-terminal e C-terminal conservados; PRDX 2- Cys atípica (PRDX5), é funcionalmente monomérica e possui um resíduo de cisteína N-terminal conservado e outro C-terminal não conservado; PRDX 1- Cys (PRDX6), contém apenas um resíduo de cisteína conservado na região N-terminal e não requer nenhuma cisteína adicional para a função catalítica (WOOD et al., 2003; RHEE; CHAE; KIM, 2005).

A redução dos peróxidos se inicia pelo ataque da cisteína peroxidásica (Cys_P-SH), a um átomo de oxigênio do peróxido, que leva à clivagem heterolítica da ligação O-O. É formado, então, um ácido sulfênico na cisteína peroxidásica (Cys_P-SOH). A etapa subsequente depende do tipo de peroxirredoxina (MONTEIRO et al., 2007). Nas enzimas PRDXs 1- Cys, que possuem apenas a Cys_P , o ácido formado durante a oxidação é reduzido por um tiol externo. Nas PRDXs 2- Cys típicas o ácido sulfênico formado na Cys_P reage com a Cys_R de outra subunidade da enzima formando uma ligação dissulfeto intermolecular estável que pode ser reduzida por um redutor tiol dependente. No caso das PRDXs 2-Cys atípicas, a Cys_R está localizada na mesma cadeia polipeptídica e a reação com a Cys_P resulta na formação de uma ligação dissulfeto intramolecular, a qual também pode ser reduzida por um redutor tiol dependente (figura 9) (NETTO e STADTMAN, 1996; KNOOPS et al., 2011).

Para que as PRDXS possam decompor outra molécula de peróxido, precisam ser novamente reduzidas. Com exceção da PRDX6, que tem como seu redutor fisiológico a glutathiona (GSH), todas as outras PRDXS são reduzidas pela tioredoxina (Trx), a qual possui duas cisteínas vicinais localizada em um motivo Cys-X-X-Cys (HOLMGREN et al.

2010; OLIVEIRA et al. 2010). Após a redução das PRDX, as cisteínas de Trx são oxidadas à dissulfeto e são reduzidas pelas tioredoxinas redutases (TrxRs) utilizando equivalentes redutores provenientes do NADPH (figura 9) (HOLMGREN e LU, 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Quando as PRDXs 2-Cys típicas são expostas a altas concentrações de peróxido a CysP fica superoxidada, assumindo a forma de cisteína ácido sulfínico (CP-SO₂H) ou ácido sulfônico (CP-SO₃H) após o ataque do ácido sulfênico (CP-SOH) por outras moléculas de peróxido, não possibilitando a formação do dissulfeto com a CysR. Estas enzimas superoxidadas se oligomerizam e formam decâmeros ou oligômeros de maior massa molecular que podem apresentar atividade de chaperona molecular e ter função de sinalizador celular (JANG et al., 2004; RHEE; CHAE; KIM, 2005; VIVANCOS et al., 2005).

A superoxidação resulta na perda da função de peroxidase dessas enzimas, visto que, a Trx não pode reduzir estes intermediários. Contudo, outra enzima de baixo peso molecular dependente de ATP, Mg²⁺ e um tiól, denominada sulfiredoxina (Srx) consegue reativar a atividade peroxidásica das PRDXs. Entretanto, a Srx é capaz de reduzir somente a cisteína ácido sulfínico (CP-SO₂H) (figura 9), não sendo conhecido até o momento, nenhum redutor biológico para a forma CP-SO₃H (BITEAU; LABARRE; TOLEDANO, 2003).

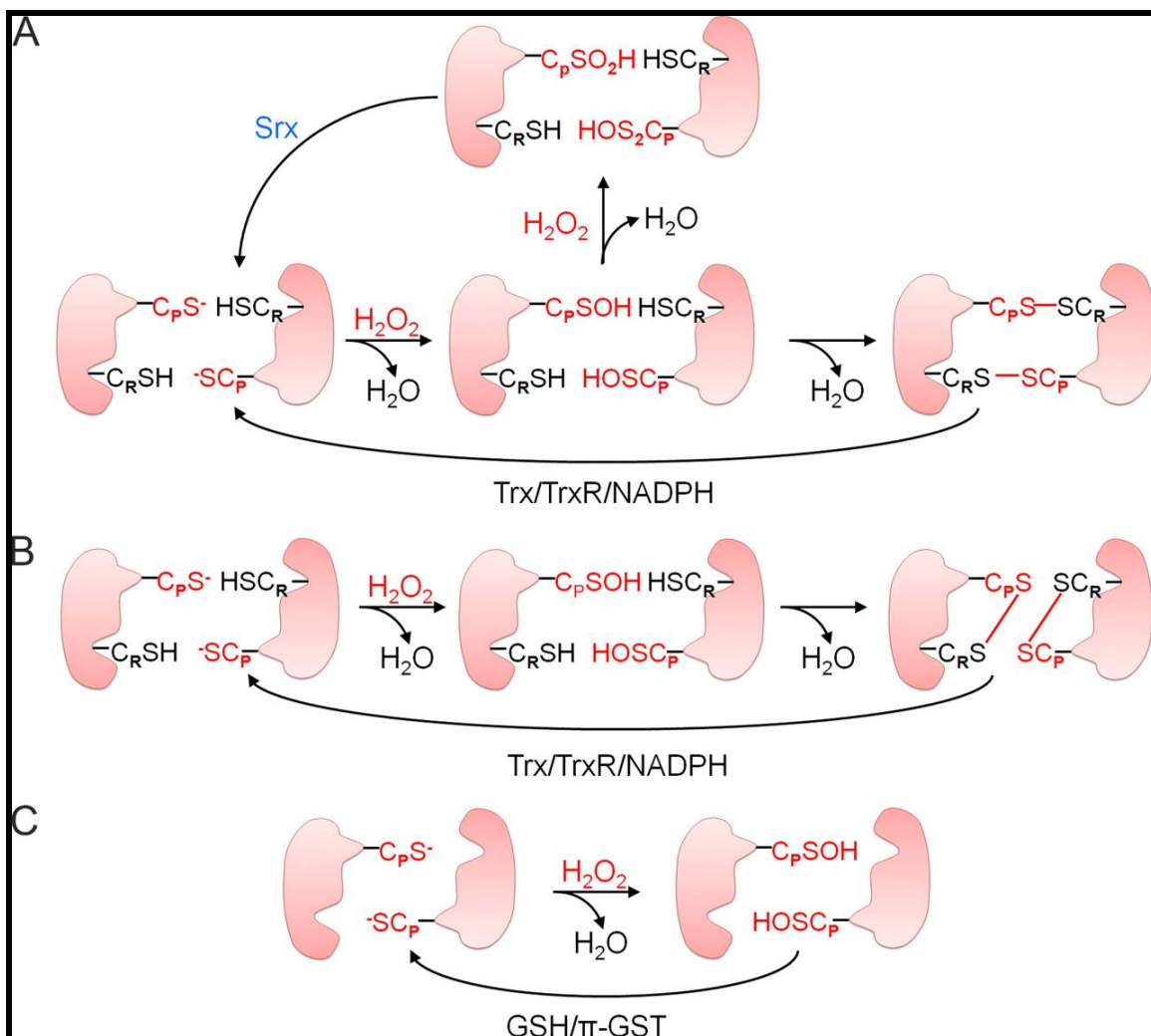


Figura 9. Mecanismos de reação das peroxirredoxinas. Inicialmente, a Cys_P-SH ataca um átomo de H₂O₂ formando ácido sulfênico na Cys_P (Cys_P-SOH). A próxima etapa depende do tipo de peroxirredoxina: nas PRDXs 2-Cys típicas o ácido sulfênico formado na Cys_P reage com a Cys_R de outra subunidade da enzima formando uma ligação dissulfeto intermolecular que pode ser reduzida pela Trx (A). No caso das PRDXs 2-Cys atípicas, a Cys_R está localizada na mesma cadeia polipeptídica e a reação com a Cys_P resulta na formação de uma ligação dissulfeto intramolecular, a qual também pode ser reduzida pela Trx (B). Nas enzimas PRDXs 1-Cys, que possuem apenas a Cys_P, o ácido formado durante a oxidação é reduzido por um tiol externo como a GSH (C). Adicionalmente, quando as PRDXs 2-Cys típicas são expostas às elevadas concentrações de peróxido a Cys_P fica superoxidada e assume a forma de cisteína ácido sulfínico (CP-SO₂H) ou ácido sulfônico (CP-SO₃H), os quais não são reduzidos pela Trx, necessitando de outro redutor, a sulfirredoxina. Entretanto, esta enzima é capaz de reduzir somente a forma CP-SO₂H, não sendo conhecido redutor biológico para CP-SO₃H até o momento (A). Figura extraída de RHEE et al., 2012.

1.8. Relevância Biológica das Peroxirredoxinas

Dentre as três classes de enzimas celulares capazes de decompor os hidroperóxidos, as PRDX e as Gpx se destacam uma vez que além de decompor H_2O_2 , estas enzimas são capazes de decompor hidroperóxidos de lipídeos e peroxinitrito, o que aponta uma grande versatilidade na proteção celular contra hidroperóxidos. Entretanto, as PRDX se destacam ainda mais pela abundância e grande reatividade com os substratos (KANG et al., 2005). Já foi demonstrado em *Saccharomyces cerevisiae* que a peroxirredoxina citosólica Tsa1 possui aproximadamente 378.000 cópias por célula, representando quase 1% do total de proteínas solúveis da célula, uma quantidade muito superior a encontrada para as outras enzimas decompositoras de peróxidos como a Cat (~900 cópias/célula) e a Gpx (~10000 cópias/célula) (GHAEMMAGHAMI et al., 2003). Esta abundância não é exclusiva de leveduras uma vez que em humanos as peroxirredoxinas estão entre as 10 proteínas mais expressas em determinados tipos celulares (WOOD et al., 2003; RHEE; CHAE; KIM, 2005) como por exemplo no eritrócito, onde a peroxirredoxina 2 (PRDX2), que pode ser encontrada tanto na forma de dímeros (peroxidásica) quanto na forma decamérica, é tão abundante que foi identificada nestas células, antes mesmo que a atividade antioxidante desta proteína fosse descrita (HARRIS, 1969). Particularmente, nestas células esta proteína é tão representativa que só perde em concentração para as globinas (LOW; HAMPTON; WINTERBOURN, 2008).

Trabalhos iniciais apontaram que as eficiências catalíticas para decomposição de H_2O_2 das PRDX ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) eram menores que a da catalase ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ou glutathione peroxidase ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (PARK et al., 2000). Porém, estudos recentes demonstram que a constante de segunda ordem da PRDX com peróxidos pode alcançar entre $10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (PARSONAGE et al., 2005; OGUSUCU et al., 2007; MANTA et al., 2009; HORTA et al., 2010). Além disso, já foi demonstrado que as PRDX são capazes de decompor peróxidos orgânicos e peroxinitrito com alta eficiência, sendo que os últimos com eficiência de até $1.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (CHA; YUN; KIM, 2000; OLIVEIRA et al., 2006; JÖNSSON; ELLIS; POOLE, 2007; MANTA et al, 2009; HORTA et al., 2010). Diversos estudos apontam uma íntima relação da regulação da expressão das PRDX pela exposição ou produção intracelular de H_2O_2 , LOOH e ONOOH (MEISSNER et al., 2007; NEUMANN e FANG,

2007; YANG et al., 2007; MOROT-GAUDRY-TALARMAIN, 2009; STACEY et al., 2009). Adicionalmente, as PRDX são consideradas enzimas ubíquas, pois são largamente distribuídas entre os mais diversos organismos, desde Archaea até eucariotos superiores (BARRANCO-MEDINA et al., 2007; DUBBS e MONGKOLSUK, 2007; NAKAMURA et al., 2008). Além da grande distribuição entre diferentes organismos, estas proteínas apresentam várias isoformas na célula podendo ser encontradas nos mais diversos compartimentos celulares (BARRANCO-MEDINA et al., 2007; KIM et al., 2009; SENSI et al., 2009).

Além da atividade de peroxidase, outras funções têm sido atribuídas aos membros da família de PRDXs, as quais estão brevemente resumidas abaixo.

1.8.1. Sinalização Celular Mediada por Hidroperóxidos

Durante muito tempo os hidroperóxidos foram considerados como sub-produtos inevitáveis e indesejados da existência aeróbia. Dado os danos infligidos pelo H_2O_2 acreditava-se que a sua rápida eliminação seria o melhor para a célula. Entretanto, uma série de estudos tem descrito que algumas EROs endógenas, em especial o H_2O_2 , em quantidades moderadas possuem capacidade de atuar como um segundo mensageiro nas sinalizações de processos como proliferação, diferenciação e migração celular em praticamente todos os tipos celulares eucarióticos incluindo plantas, fungos e mamíferos (KANG et al., 2005; RHEE, 2006; SEMIGHINI e HARRIS, 2008).

De fato oxidantes como o H_2O_2 e LOOH podem ser produzidos por enzimas especializadas denominadas de NADPH oxidases (Nox) e lipoxigenases (Lox), respectivamente (BRASH, 1999; KUHN e THIELE, 1999; KUHN e BORCHERT, 2002). Contribuindo para esta visão de extrema regulação dos sinais via hidroperóxido, alguns trabalhos têm demonstrado que o H_2O_2 não perpassa a membrana simplesmente por difusão, sendo que este pode ser um processo muito mais refinado e conta com canais que auxiliam seu transporte de forma ordenada e em níveis adequados, seja de forma intra ou extracelular (BIENERT; SCHJOERRING; JAHN, 2006; MATIAS et al., 2007). O H_2O_2 pode ser produzido de forma transitória em resposta a ativação de diversos receptores da superfície celular, podendo ativar ou inativar fatores de transcrição, canais de membrana ou

enzimas metabólicas como também modular vias dependentes de cálcio e vias de fosforilação (KANG, et al. 2005; RHEE, 2006; FORMAN, 2007).

Em relação aos LOOH, já foi demonstrado que estes também são capazes de ativar reguladores de expressão e estão associados à diferenciação e especialização celular uma vez que durante o processo de diferenciação ou maturação celular ocorre o remodelamento ou mesmo destruição de membranas celulares e organelas subcelulares (Rapoport, 1986; KLOMSIRI et al., 2005; IWAI; NAGANUMA; KUGE, 2010). Neste contexto, o remodelamento de membranas também está envolvido em eventos como tráfego intracelular de vesículas, fagocitose, apresentação de antígeno, “uptake” mediado por receptores, dentre outros processos que necessitam da desestabilização da membrana de forma temporal e espacial (KUHN e BORCHERT, 2002).

Como mencionado anteriormente, em razão do aumento de sua solubilidade (comparado com seus precursores) estas espécies podem migrar de seu local de origem de forma espontânea ou facilitado por proteínas transportadoras de lipídeos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Acredita-se que uma das formas de ação dos hidroperóxidos na sinalização celular, ocorra através da oxidação de tióis protéicos. A oxidação de tióis de proteínas pode alterar sua atividade, sua estrutura tridimensional e conseqüentemente suas características de ligação aos seus substratos ou mesmo a outras proteínas. Entretanto para se alcançar os critérios de sinalização é necessário que o processo seja rápido e reversível e que haja uma oxidação preferencial de proteínas e resíduos específicos (WINTERBOURN e HAMPTON, 2008). No entanto, para que a mensagem seja interpretada corretamente é necessário que os níveis de hidroperóxidos sejam extremamente regulados, uma vez que uma hiperoxidação ou mesmo uma hipoxidação dos alvos celulares poderia tornar todo o processo comprometido. Desta forma, a modulação de seus níveis é de suma importância para que ocorra uma resposta celular adequada nos processos em que participa (STONE e YANG 2006; FOURQUET et al., 2008).

Neste contexto as PRDXs possuem características fundamentais que as coloca como grandes candidatas na transdução de sinais por hidroperóxidos graças à grande variedade de peróxidos a qual é capaz de decompor, sua abundância, sua elevada atividade e a ocorrência de alterações estruturais que é dependente do grau de oxidação. Estas alterações parecem estar relacionadas com interações com parceiros biológicos distintos (VIVANCOS et al.,

2005; KUMSTA e JAKOB, 2009). Contribuindo para estas observações, diversos trabalhos apontam que as PRDX1 e PRDX2 humanas são capazes de se associar a membrana celular, lembrando que estas enzimas são capazes de efetuar transições estruturais como resultado de hiperoxidação ou choque térmico (CHA; YUN; KIM, 2000; MURPHY et al., 2004).

O papel destas proteínas na transdução de sinal não aparenta ser exclusivamente citosólico, uma vez as isoformas humanas, com exceção da PDRX3, já foram encontradas no compartimento nuclear e parecem estar relacionadas com a ativação de fatores de transcrição, como por exemplo, na regulação da atividade de NF-kappaB, uma proteína envolvida na regulação de processos inflamatórios e câncer (YAMAMOTO e GAYNOR, 2001; KINNULA et al., 2002; KABE et al., 2005; HANSEN; MORIARTY-CRAIGE; JONES, 2007). Adicionalmente, a PDRX4 humana pode ser exportada pela célula para o meio extracelular, o que sugere participação destas proteínas na decomposição ou transdução de sinal no meio extracelular. Em relação ao crescimento celular, diversos trabalhos revelam que a ativação das proteínas MAPK é bastante acentuada quando expostas a agentes oxidantes. Dentre elas a p38 está envolvida com interrupção do ciclo celular e apoptose em diversos tipos celulares e sua atividade é fortemente induzida por NOOH ou H₂O₂ (ELIGINI et al., 2001; EL-REMESSY et al., 2005). Recentemente, foi demonstrado em *Schizosaccharomyces pombe* que a relação das PRDX com MAPK pode ser extremamente íntima. Foi descrito que a PRDX desta levedura (SpTsa1p) é capaz de formar um dissulfeto intramolecular com Sty1. Neste contexto a MAP quinase Sty I e seu ativador Wis I (MAPKK) são necessários para o controle do ciclo celular, assim como os seus respectivos correspondentes em mamíferos, JNK e p38 são ativados por diversos estresses como o osmótico, térmico e o oxidativo.

1.8.2. Prevenção do Desenvolvimento de Tumores

Foi demonstrado que a PRDX1 protege as células da tumorigênese tanto pela redução das EROs e dos danos oxidativos no DNA quanto pela ligação à moléculas como o PTEN e o c-Myc. A PRDX1 se liga ao supressor tumoral PTEN protegendo-o contra a supressão de sua atividade de fosfatase lipídica, o que ocorre sob estresse oxidativo. O

PTEN é uma fosfatase que age como um supressor tumoral ao neutralizar uma das vias promotoras de câncer mais críticas existentes: a via PI3K-Akt. Foi demonstrado que o Akt é altamente ativo em células deficientes de PRDX1. Por outro lado, a deficiência de PTEN provoca diminuição das PRDX 1, 2, 5 e 6; isso sugere que a PRDX e o PTEN agem juntos para manter os níveis antioxidantes celulares e suprimir a via PI3K-Akt (CAO; SCHULTE; KNIGHT, 2009). A interação da PRDX1 com c-Myc para inibir suas atividades transcricionais também é importante para proteger as células de transformações, uma vez que a superexpressão do gene regulador Myc leva à tumorigênese (EGLER et al., 2005).

1.8.3. Peroxirredoxinas, Inflamação e Imunidade

Estudos recentes abriram uma porta para explorar o papel das PRDXs na inflamação e na imunidade inata. Foi demonstrado que a PRDX1 é secretada a partir de algumas células após a estimulação com algumas citocinas, tais como TGF- β 1, IL-1 e oncostatina M, uma subfamília de IL-6, embora o mecanismo preciso subjacente à sua secreção não seja conhecido. Portanto, a PRDX1 pode ser encontrada no plasma e outros fluídos corporais e parece desempenhar um papel chave na modulação da inflamação, imunidade e reparação tecidual *in vivo*, em parte devido à sua interação com o receptor de superfície celular TLR4 (toll-like receptor 4). Riddell et al. 2010, demonstrou que a PRDX1 extracelular se liga a TLR4 e atua como um fator pró-inflamatório, o que desencadeia a ativação de NF-kappaB e outras vias de sinalização, que induz a produção de várias citocinas importantes em reações de reparo, imunidade e inflamação. Interessantemente, as peroxirredoxinas expressas em protozoários e helmintos podem modular a resposta imune do hospedeiro, em parte através da interação com o TLR4, para sua sobrevivência e progressão no hospedeiro. As PRDXs extracelulares 1 e 2 são conhecidas por aumentar a atividade de células natural killer e suprimir a replicação de vírus nas células (ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012).

Adicionalmente, a PRDX1 pode se ligar ao fator inibitório da migração dos macrófagos (MIF) através de uma ligação dissulfeto e inibir parcialmente sua atividade de tautomerase. MIF por sua vez, também inibe a atividade de peroxidase da PRDX1, contudo o papel biológico dessa associação ainda permanece por esclarecer. MIF é um fator pró-

inflamatório derivado das células T responsável pela inibição da migração de macrófagos. É expresso em várias células, incluindo linfócitos, macrófagos, células epiteliais e endoteliais e quando presente no meio intracelular afeta sinalização para suprimir a apoptose. Contudo, MIF pode ser secretado para o meio extracelular onde atua como citocina causando aumento da inflamação. Embora não haja provas publicadas, é razoável assumir que a PRDX1 extracelular poderia associar-se com MIF secretada causando supressão do aumento da inflamação mediado por MIF.

Ainda com relação à regulação do processo inflamatório, a Ciclofilina A (CypA) é um regulador da inflamação que se liga a todas as PRDXs de mamíferos da PRDX1 a PRDX6 e melhora a sua atividade antioxidante tiol-específica. A CypA é secretada por células vasculares do músculo liso (VSMC) através de uma via vesicular sob condições de stress oxidativo e medeia a remodelação vascular através da promoção da inflamação e da proliferação de VSMC. A CypA é regulada numa variedade de condições inflamatórias, tais como artrite reumatóide, doença auto-imune e cancro. Curiosamente, a CypA e a PRDX1 são secretadas a partir de condrócitos articulares humanos por estimulação quer com IL-1 ou oncostatina M. A CypA coexiste com a PRDX1, PRDX5 e PRDX6 em fluidos do lavado bronco-alveolar de camundongos. Estes resultados sugerem que tanto as PRDXs e a CypA podem afetar mutuamente suas funções e modular as reações inflamatórias no espaço extracelular (ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

A produção de espécies reativas de oxigênio parece ter uma estreita relação com a fisiopatologia de doenças hematológicas, principalmente anemias hemolíticas como a beta talassemia e a anemia falciforme. Nestas patologias, o ambiente celular é extremamente pro-oxidante resultando em danos oxidativos e consequente hemólise das células que por sua vez favorecem a formação dessas espécies em outros tipos celulares (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008). Neste contexto, a eficiência do sistema antioxidante como as PRDXs, que se destacam pela abundância e grande reatividade com seus substratos, podem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção dessas células. Entretanto, poucos trabalhos abordam esta problemática até o momento. Os poucos trabalhos existentes na literatura revelam que a importância destas proteínas deve ser acentuada nos eritrócitos.

Como exemplos, Neumann e colaboradores (2003) realizaram experimentos diminuindo a expressão de PRDX1 em ratos, e apesar de serem viáveis e férteis tinham uma reduzida expectativa de vida por apresentarem anemia hemolítica severa e cânceres malignos aos nove meses de vida aproximadamente. A partir desse trabalho foi sugerido que a anemia era causada pelo aumento de EROs nos eritrócitos e a participação de tal gene como supressor de tumor (NEUMANN et al., 2003).

Focando esse mesmo assunto, Neumann e Fang (2007) escreveram uma revisão sobre a atividade das peroxidases como supressores de tumor, que sugere uma característica preventiva de tumor de alguns desses genes, dentre eles PRDX1, PRDX3 e PRDX5, e concluíram que ao mesmo tempo em que as PRDXs regulam os níveis de hidroperóxidos, são também reguladas por eles (NEUMANN e FANG 2007). Também em 2003, Lee e colaboradores estudaram ratos com deficiência em PRDX2, que é altamente expressa em todos os tipos celulares normais, e eles apresentaram doença hemolítica. Também foi detectado um aumento no nível de EROs em frações mais densas de glóbulos vermelhos. Nesse estudo identificou-se que a função antioxidante da PRDX2 é um fator crítico para a fisiologia dos glóbulos vermelhos (LEE et al., 2003). Tais resultados sugerem que PRDX2 desempenha um papel importante na proteção das células vermelhas ao estresse oxidativo em ratos. Em relação a PRDX3, localizada nas mitocôndrias, foi demonstrado por Yang e

colaboradores (2007), que a diferenciação de células eritroleucêmicas humanas pode ser regulada por essa proteína, uma vez que seus resultados mostraram aumento desta PRDX na fase final da diferenciação eritróide em células de K562, contudo os mecanismos pelos quais esta proteína regula a diferenciação eritróide são desconhecidos. Também foi investigada uma linhagem celular de K562 que superexpressava PRDX3 e outra com mutantes dominantes negativos para esta enzima, os resultados mostraram que os níveis intracelulares de EROs foram menores na linhagem que superexpressava a PRDX3, evidenciando seu papel na remoção destes compostos. Ainda neste estudo, foi demonstrado que os níveis de expressão de beta globina e GATA- 1 foram significativamente aumentados nas células que surexpressavam PRDX3 (YANG et al., 2007).

Curiosamente, apesar dos resultados relevantes descritos acima, não há nenhuma análise sistemática do envolvimento destas proteínas durante o processo de diferenciação destas células e nem mesmo em doenças eritrocitárias, entretanto os argumentos citados anteriormente sugerem que o envolvimento destas proteínas pode ser bastante relevante. Em trabalho realizado anteriormente utilizando a metodologia de SAGE (Sequential Analysis of Gene Expression) foi possível constatar que existe aparentemente uma grande variação da expressão das PRDXs durante a diferenciação eritrocitária, em especial da PDRX2 (DA CUNHA et al., 2010). A análise dos dados sugere também uma expressão diferencial das PDRX1, PDRX2- PDRX5, entretanto são necessárias análises adicionais envolvendo metodologias como PCR de tempo real e western blot para confirmar e aprofundar os resultados obtidos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo central deste trabalho é avaliar a relação entre a expressão das diferentes peroxirredoxinas e os níveis de EROs gerados em reticulócitos e eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, alfa e beta talassemias, comparando com indivíduos saudáveis.

3.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar o estado REDOX (produção de espécies reativas de oxigênio) em eritrócitos de pacientes com anemia falciforme, alfa* e beta talassemias, comparando com indivíduos saudáveis.
2. Avaliar por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), o perfil de expressão gênica dos seis membros das peroxirredoxinas em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme, alfa* e beta talassemias, comparando com indivíduos saudáveis.
3. Verificar a abundância protéica das peroxirredoxinas, através de western blotting em hemácias de pacientes comparando com controles
4. Estabelecer a provável relação entre a produção destas proteínas e o quadro clínico observado nestes pacientes

***Não foi possível analisar pacientes com alfa talassemia devido a não obtenção de um número significativo de amostras que possibilitassem a análise estatística dos dados.**

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Pacientes e controles

Foram selecionados pacientes com anemia falciforme e beta talassemia diagnosticados pelo Hemocentro da UNICAMP e da Fundação HEMOPE. Para a extração de reticulócitos, o sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA e mantidos refrigerado até o momento do processamento. Amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram usadas como controles, este grupo foi composto por doadores voluntários.

Alguns dados, como idade, sexo, tabagismo, alcoolismo, ou qualquer atividade que pode estar relacionada com o aumento de EROs foram solicitados aos pacientes e controles (modelo da ficha anexo 1). Todos os indivíduos somente foram incluídos no estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2) aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e Fundação HEMOPE (número da aprovação descrito abaixo).

4.2. Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – CEP em 11/05/2011 e homologado na V Reunião ordinária, em 24/05/2011 (registro CEP: 427/2011). Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – Hemope (registro CEP: 028/2011).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que foi assinado por todos os participantes desse estudo, também foi aprovado pelos conselhos citados.

4.3. Separação de Reticulócitos

As amostras de sangue periférico (4mL) foram coletadas em tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) e transferidas para tubo Falcon de 15mL. Após centrifugação em 3.000 rpm, 10 minutos a 4°C, o plasma foi descartado e foi adicionado 5x o volume de

solução de lise de hemácias (0.144M NH₄Cl; 0.01M NH₄HCO₃). As amostras foram incubadas 30 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo hemácias lisadas e reticulócitos foi transferido para novo tubo, homogeneizado com 1/10 de volume de uma solução de Sucrose/KCl (1.5M C₁₂H₂₂O₁₁; 0.15M KCl, filtrada ou preparada com H₂O tratada com DEPC) e centrifugado novamente 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo agora apenas reticulócitos foi transferido para novo tubo, tratado com 700µl de Ácido acético 10% e centrifugado 5.000 rpm 20 minutos a 4°C. O precipitado (*pellet*) foi então ressuspensionado e homogeneizado em 1mL de Trizol® (Invitrogen), que rompe as células, dissolvendo os componentes celulares sem comprometer a integridade do RNA. Para testar a eficiência da extração e verificar possíveis contaminações com leucócitos foi feita uma lâmina com o esfregaço do *pellet* obtido ao fim da extração (figura 10A) e como forma de comparação foi preparada uma lâmina com leucócitos (figura 10B). Ambas as lâminas foram coradas com panótico que permite a diferenciação entre estes dois tipos celulares pela coloração diferencial. Posteriormente, uma lâmina também preparada com *pellet* resultante da extração de reticulócitos foi corada com azul de crezil brilhante, evidenciando a eficiência do protocolo de extração (10 C e D).

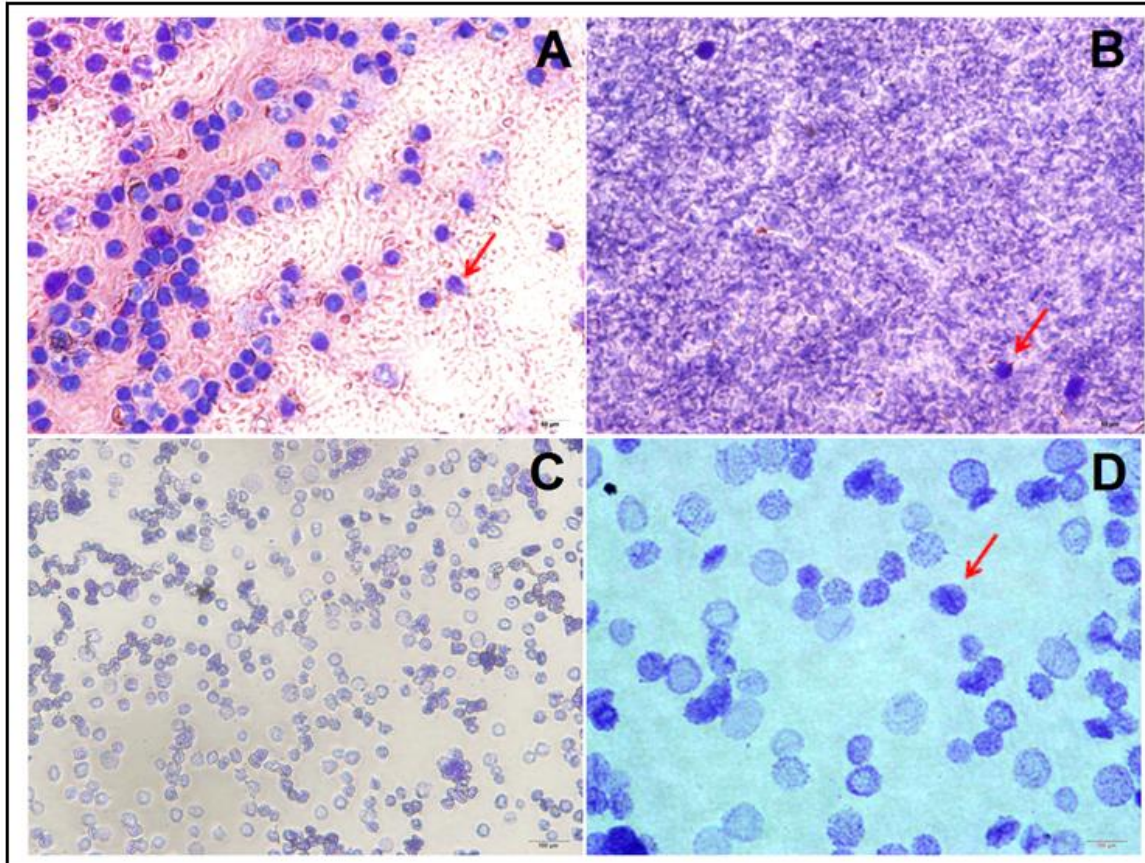


Figura 10. Lâmina de leucócitos e esfregaço de reticulócitos. A) Durante o processo de separação dos reticulócitos há uma fase na qual os leucócitos são precipitados, para efeitos comparativos foi preparada uma lâmina utilizando este precipitado. B) Para verificar possíveis contaminações com leucócitos durante a extração de reticulócitos foi preparada uma lâmina com o esfregaço do *pellet* resultante após a extração. As lâminas A e B foram coradas com panótico, um corante utilizado para corar leucócitos. Os resultados obtidos mostraram a presença de uma quantidade irrisória de leucócitos na lâmina B, descartando a contaminação do *pellet*. As lâminas apresentadas nas imagens C e D também foram preparadas com o esfregaço do *pellet* obtido com a extração de reticulócitos executada de acordo com o protocolo descrito acima e coradas com azul de cresil brilhante, utilizado para corar reticulócitos. A figura C possibilita a visualização dos resquícios de RNA precipitado que formam grânulos. Estes grânulos desaparecem quando o reticulócito completa a diferenciação para eritrócito maduro.

4.4. Extração de RNA

Para obtenção do RNA de reticulócitos utilizou-se o método de extração com o Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra contendo reticulócitos e Trizol® foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que

houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, foram adicionados 200µL de clorofórmio (CHCl₃) e vortexado, sendo realizada nova incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a 12.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500µL de isopropanol gelado. Após homogeneização, foi realizado nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 15.000g à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionado 1mL de etanol gelado a 75%, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 15.000g à 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo então ressuspendido em água livre de RNase e incubado a 55°C por 10 minutos e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e avaliadas quanto à integridade em gel desnaturante de agarose. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S (figura 12). Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

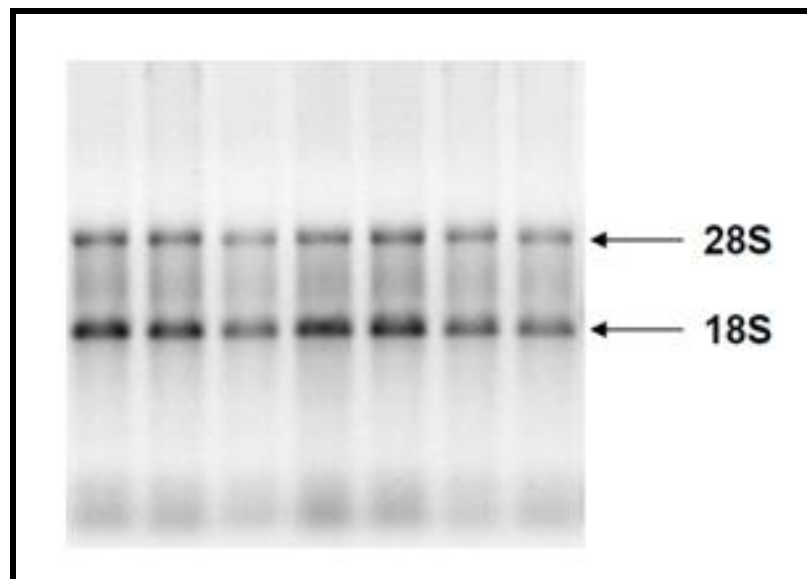


Figura 11- Gel desnaturante de agarose à 1,2%, com amostras de RNA de reticulócitos de pacientes com anemia falciforme, onde pode-se ver as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A visualização das subunidades permite a confirmação de integridade do material. As mesmas análises foram realizadas para todos os RNAs extraídos.

4.5. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para retirar possíveis contaminações do RNA com moléculas de DNA, 1,0µg de cada RNA extraído foi tratado com 1,0 µL da enzima *DNaseI* (Fermentas, ThermoScientific), 1,0 µL *DNaseI reaction buffer com MgCl₂* 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, MgCl₂ 20mM, KCl 500mM), num volume final de 10µL. A reação foi incubada por 30 min à temperatura de 37°C e paralisada com a adição de 1,0 µL de EDTA 50mM e incubação por 10 min a 65°C.

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA tratado com *DNaseI*, através da reação de transcrição reversa, usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems). À amostra de RNA tratada, foi adicionado 2,0 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2,0 µL de 10X RT Random Primers, 1,0 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL), 1,0 µL de RNase Inhibitor, 3,2 µL de Nuclease-free H₂O. A síntese de cDNA foi feita a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos. A reação foi paralisada através de incubação a 85°C por 5 minutos. Para verificar a eficiência da reação da transcriptase reversa em sintetizar moléculas de cDNA foi realizada uma amplificação por PCR- RT utilizando iniciadores para o gene endógeno beta actina. A amplificação adequada deste gene indica uma boa síntese de cDNA como evidenciado na figura 12.

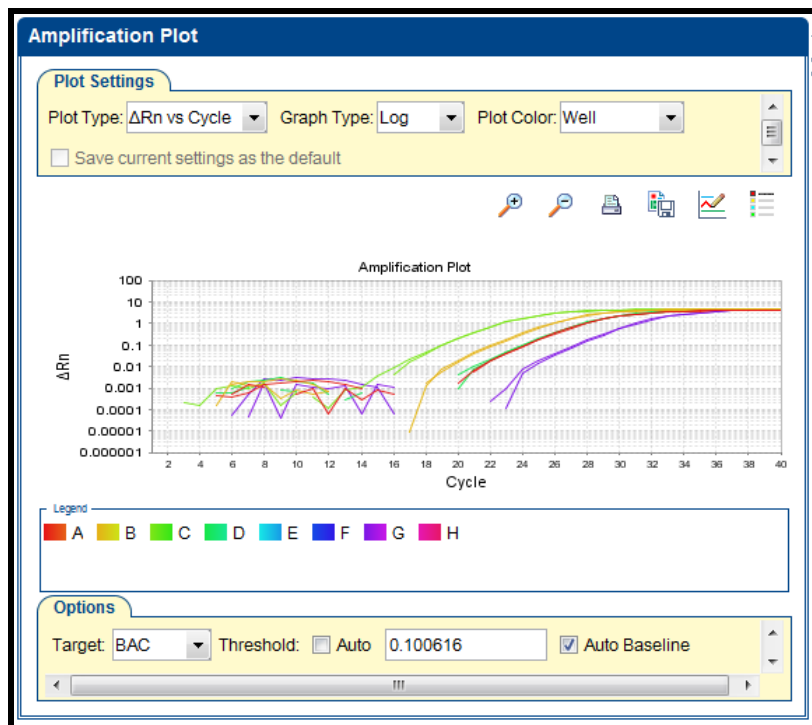


Figura 12. Teste de cDNA com o *primer* da beta actina. Após a síntese de cDNA as amostras foram testadas por PCR- RT utilizando o *primer* da beta actina. A amplificação desse gene confirmava a viabilidade da amostra para análises futuras.

4.6. Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) onde foi utilizado o reagente SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), que emite sinal de fluorescência ao intercalar com DNA dupla- fita. Os primers foram desenhados através do programa "Primer Express" (Applied Biosystems) e analisados no programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para verificação das condições de formação de estruturas como *hairpins* e *dimers*. Como controle, *primers* para amplificação do gene da β -actina. Em todos os casos foram feitos controles negativos, com água estéril substituindo a amostra. As amostras foram amplificadas em duplicatas. As reações foram preparadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa usado foi: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após a amplificação, a curva de melting foi determinada, através da

variação de temperatura de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e novamente 95°C por 15s. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na tabela 3.

A quantificação dos resultados se baseia na derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As amostras estudadas tiveram a expressão relativa determinada. Os dados de Ct foram exportados para uma planilha no programa *Excel (Microsoft Corporation)* e, então, analisados. O ΔCt foi calculado utilizando as diferenças na média de Ct entre os genes alvos e seus controles endógenos. Após, o $\Delta\Delta Ct$ foi calculado em relação a uma situação considerada como referência, que constitui a amostra calibradora. Em seguida, procede-se calculando o $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.7. Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real

4.7.1. Concentração de Primer

A concentração ótima do *primer* utilizado na qRT-PCR, deve ser mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers (forward e reverse)* nas concentrações finais apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Matriz para Padronização da Concentração Ótima de *Primers Forward e Reverse*

<i>Primer Forward</i> (nM)	<i>Primer Reverse</i> (nM)			
		100	150	300
100		100/ 100	100/ 150	100/ 300
150		150/100	150/ 150	150/ 300
300		300/100	300/ 150	300/ 300

A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), maior ΔRn (variação de fluorescência) e não apresentou formação de dímeros, mesmo nos poços com NTCs (*no-template controls*). Na tabela 3 estão listadas as sequências e concentrações ótimas dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo. As figuras 13, 14 e 15 mostram o exemplo do *primer PRDX1*, em que a

concentração que apresentou as melhores condições foi 300 *Foward* / 300 *Reverse*. O mesmo procedimento foi realizado para todos os *primers* de PRDXs e para o gene endógeno β -actina.

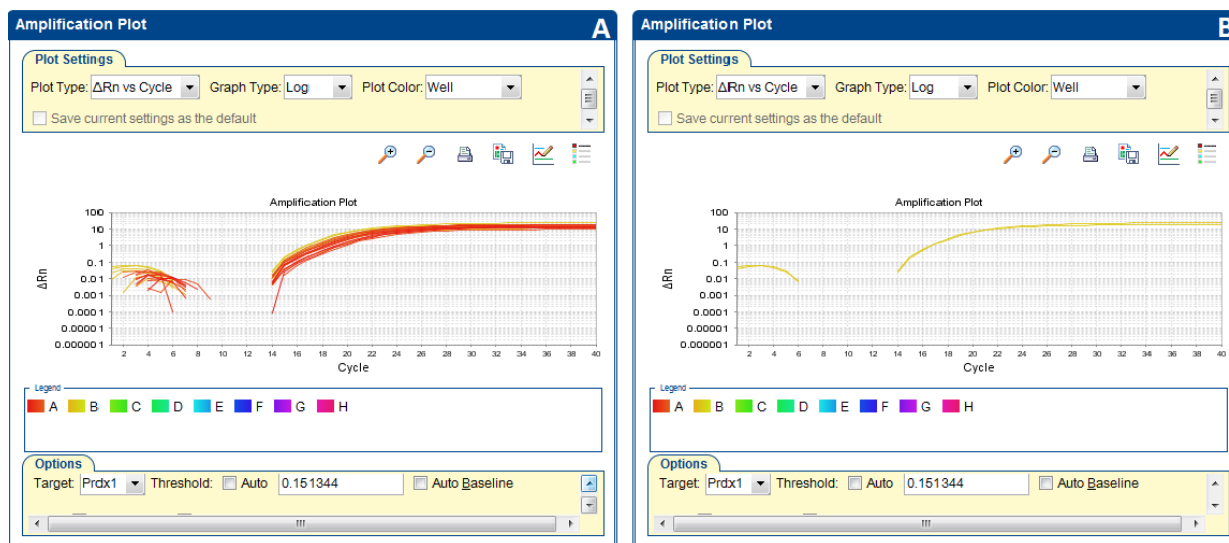


Figura 13. Determinação da concentração ótima dos *primers foward e reverse PRDX1*. A) curvas para as diferentes concentrações listadas na Tabela 1. B) duplicata da curva para a concentração escolhida (300F/300R), a qual apresentou menor C_t , maior ΔRn , sem formação de dímeros.

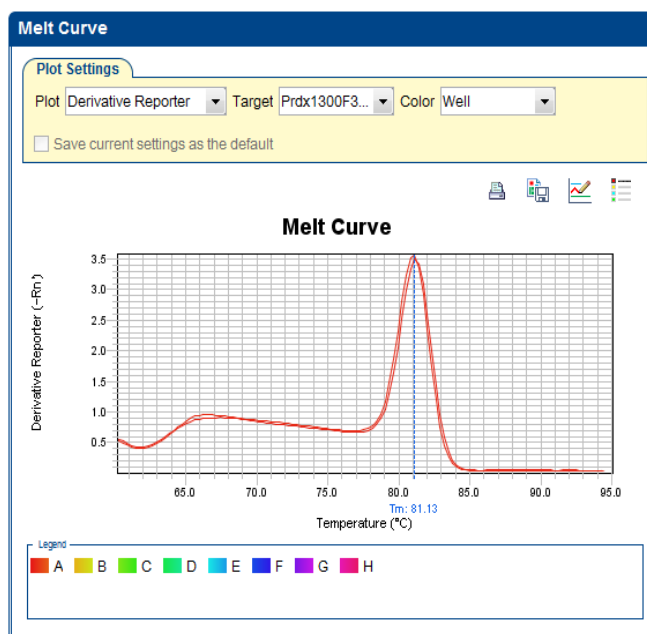


Figura 14. Curva de *melting PRDX1*. O pico único que aparece na figura próximo a 81°C mostra a especificidade da amplificação, em que picos a temperaturas distintas indicariam bandas inespecíficas ou ocorrência de dímeros.

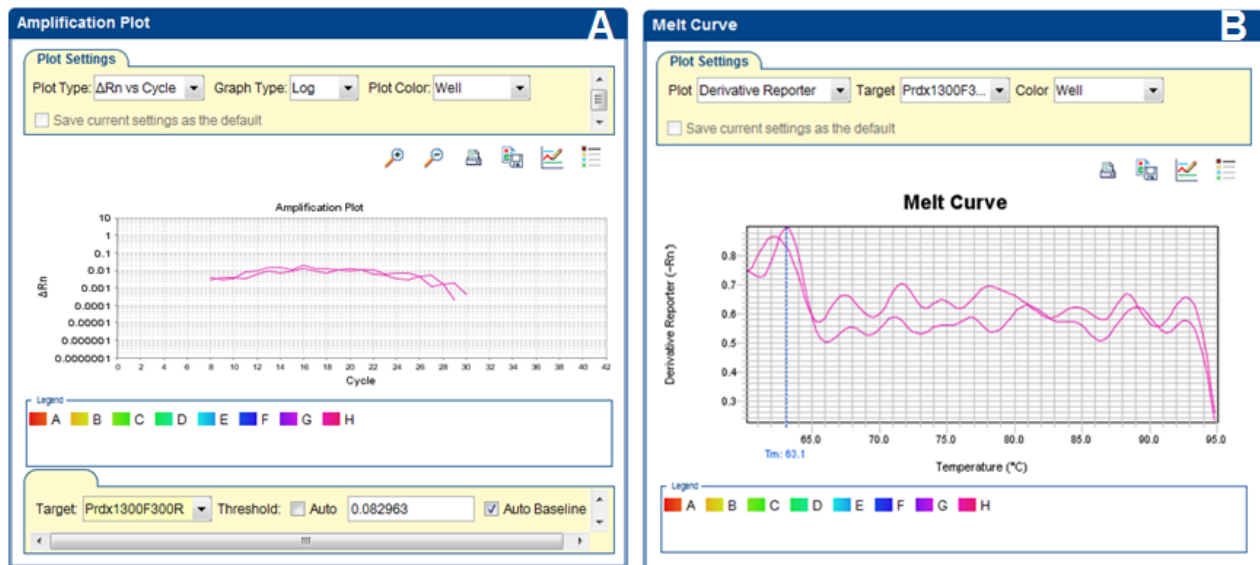


Figura 15. NTCs (*no-template controls*) *PRDX1*. A) A ausência de amplificação no controle negativo indica que não há contaminação do *primer*. B) A Curva de *melting* confirmando a ausência de contaminantes.

Tabela 3. Sequências e concentrações ótimas dos primers utilizados no real-time PCR (qRT-PCR)

Primer	Sequência	Concentração
PRDX1F	TGTAATGACCTCCCTGTTGG	300nM
PRDX1R	TATCACTGCCAGGTTTCCAG	300nM
PRDX2F	CTGTTAATGATTTGCCTGTGGG	100nM
PRDX2R	TGGGCTTAATCGTGTCCTG	300nM
PRDX3F	TCCCACTTTAGCCATCTTGC	100nM
PRDX3R	GTAGTCTCGGGAAATCTGCTTAG	300nM
PRDX4F	CGTTTGGTTCAAGCATTCCAG	300nM
PRDX4R	CTTTTGGCGACAGACTTGAAG	150nM
PRDX5F	AGAAGGGTGTGCTGTTTGG	100nM
PRDX5R	TCATTAACACTCAGACAGGCC	100nM
PRDX6F	TGCCACCCAGTTGATTG	100nM
PRDX6F	TTCACCAAAGAGCTCCCATC	100nM
β ACTINA - F	AGGCCAACC GCGAGAAG	150nM
β ACTINA - R	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	150nM

4. 7. 2. Eficiência de Reação

Para que a reação de qRT-PCR seja confiável e reprodutiva são necessárias condições ótimas de reação, onde as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo de amplificação, ocorrendo duplicação da amostra. Após determinadas às concentrações ideais dos *primers* foram realizadas diluições seriadas de uma amostra conhecida para avaliar a eficiência do experimento, a qual é indicada pela inclinação (*slope*) da curva padrão. Utilizou-se diluições seriadas de amostras de cDNA de cultura de K562 (linhagem celular eritroleucêmica Ph⁺), que apresenta expressão de todos os genes analisados. Uma eficiência de 100% resulta em uma curva padrão com *slope* de -3,32. A eficiência de amplificação é dada pela fórmula $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Outros parâmetros como R² e Y- intercept (ponto em que a curva corta o eixo Y) também são obtidos neste experimento e foram cuidadosamente avaliados. Para ser considerado eficiente, um *primer* deve apresentar valor de eficiência entre 95 – 105%, R² ≥ 0,99, *slope* próximo a -3,32 e Y-intercept maior que 32. A curva de *melting* também foi analisada para verificar a formação de dímeros ou amplificações inespecíficas, representadas pelo aparecimento de mais de um pico. Depois de obtidos e analisados os parâmetros citados é determinado um *threshold* que será utilizado nas análises posteriores (figura 16).

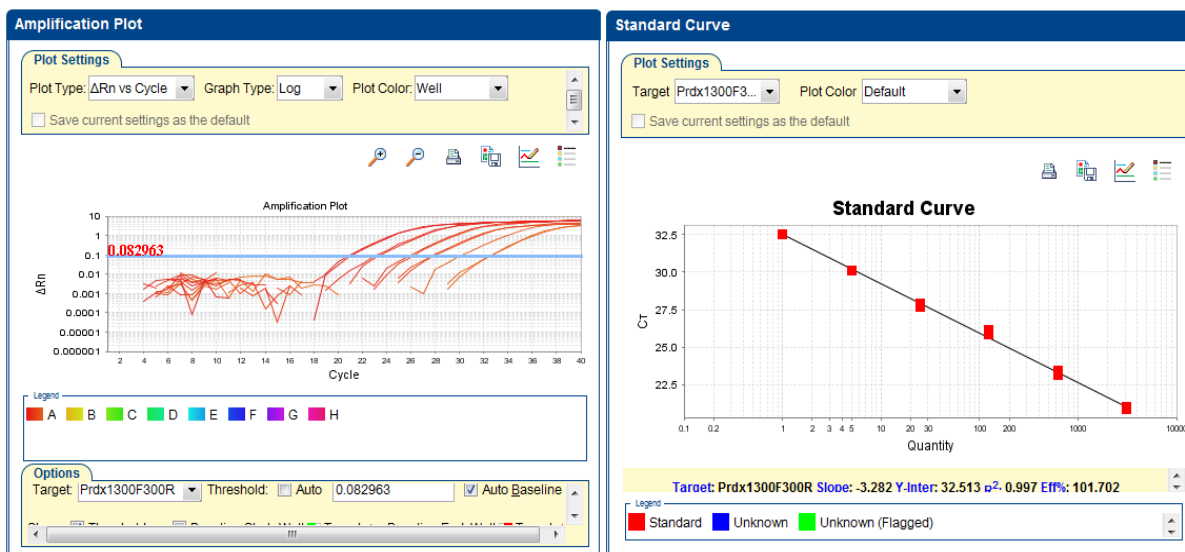


Figura 16. Teste de Eficiência da PRDX1 300F/300R. A partir da análise feita é possível obter a eficiência do *primer*, no caso exemplificado de 101,702%, com um R² de 0,997, em um *threshold* de 0,082963.

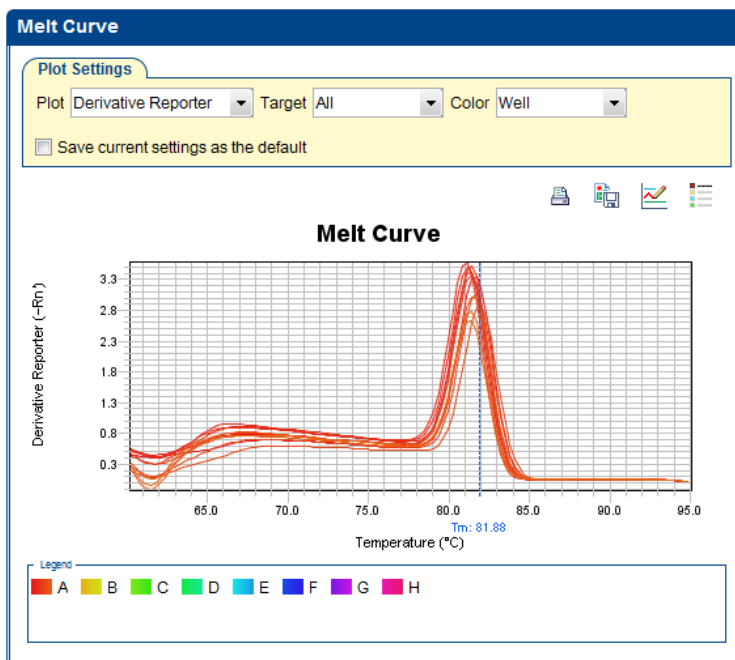


Figura 17. Curva de *melting* da *PRDX1*. O pico único que aparece na figura próxima a 82°C mostra a especificidade da amplificação, em que picos a temperaturas distintas indicariam bandas inespecíficas ou ocorrência de dímeros.

Para todos os *primers* citados anteriormente foi realizado o mesmo procedimento, e na tabela 4 está identificado os parâmetros de maior importância.

Tabela 4. Parâmetros de importância para os *primers* caracterizados.

<i>Primer</i>	Threshold	Eficiência(%)	Slope
BAC	0,100616	97,441	-3,385
PRDX1	0,082963	101,702	-3,382
PRDX2	0,068407	98,044	-3,37
PRDX3	0,036544	95,097	-3,445
PRDX4	0,034823	95,112	-3,445
PRDX5	0,103905	98,27	-3,364
PRDX6	0,064225	100,324	-3,314

4.8. Análise dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Estudos relatam que existe uma forte correlação entre os níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e a expressão das peroxirredoxinas, como já descrito anteriormente.

4.8. 1. Separação de Células Vermelhas

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo com EDTA e centrifugadas por 10 minutos a 500g para remoção do plasma e “buffycoat” leucocitário. As células foram lavadas 3 vezes e ressuspensas em PBS (Salina fosfatada tamponada) e centrifugadas a 700g, 600g e 480g respectivamente, sendo então, ressuspensas com 1 mL de PBS para contagem de células vermelhas no contador automático Cell-Dyn 1700 (ABBOT, IL, USA). A concentração final foi ajustada para 4×10^8 cel/mL. Para determinação da produção de ROS, as células vermelhas foram ressuspensas em PBS (1X) em uma concentração de 1×10^6 células/mL.

4.8.2. Determinação do conteúdo de EROs nos eritrócitos

As células foram incubadas com 0,5 μ L de 2,7- Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Invitrogen, Life Technologies). O DCFH-DA difunde-se para dentro das células, e no citosol é deacetilado por esterases intracelulares, produzindo um composto não fluorescente DCFH. A oxidação do DCFH por EROs produz um composto altamente fluorescente 2,7 diclorofluoresceína (DCF). Desta forma através da fluorescência, a produção de EROs pode ser quantificada (Amer et al. 2003; Amer et al. 2004). Após incubação das células vermelhas (30 minutos) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C, as células foram centrifugadas (5 minutos a 1600 rpm) lavadas e ressuspensas em PBS (1X). O conteúdo de EROs nas células foi analisado por citometria de fluxo (FACS-calibur, Becton-Dickinson, Immunofluorometry systems, Mountain View, CA, USA) com aquisição de 10.000 eventos, utilizando o programa CellQuest para análise da intensidade média de fluorescência (MFI).

4.9. Western blotting

A análise diferencial da abundância protéica foi avaliada através da técnica de western blotting para verificar se existe correlação entre os níveis de RNA mensageiro e a das proteínas.

4.9.1. Extração e quantificação de proteínas

As proteínas totais foram extraídas da papa de hemácias de pacientes e controles. Amostras de sangue periférico (4mL) foram coletadas em tubo com EDTA e transferidas para tubo Falcon de 15mL. Após centrifugação em 3.000 rpm, 10 minutos a 4°C, o plasma e o buffy coat foram descartados e foi adicionado 5x o volume de solução de lise de hemácias (0.144M NH₄Cl; 0.01M NH₄HCO₃). As amostras foram incubadas 40 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 12.000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo hemácias lisadas foi transferido para novo tubo e as proteínas foram quantificadas no espectrofotômetro iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio- Rad) de acordo com o método de Bradford. Após estabelecer a mesma concentração de proteínas para todas as amostras (50 µg/poço), foram adicionados a elas tampão desnaturante de Laemmli (100mM tris-HCl pH6.8, 4% p/v SDS, 20% v/v glicerol, 0,2% de azul de bromofenol) e estas foram desnaturadas em banho-maria a 100°C por 5 min.

4.9.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras. Os géis de poliacrilamida utilizados na eletroforese possuíam 4 % (gel de entrada) ou 12% (gel de separação), com 1,0 mm de espessura. Foram adicionados 50µg de proteína por poço.

A eletroforese foi realizada com o marcador de peso molecular (10 – 170kd) PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), para possibilitar a identificação por peso molecular das proteínas de interesse. A corrida foi realizada a 150

volts, em um tempo de aproximadamente 1 hora e 30 min. (The Mini Trans-Blot cell - Bio-Rad). O tampão de corrida utilizado (750ml) era composto por Trisma base (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1 g%). Após a corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% v/v metanol) por 30 minutos, a membrana e os filtros de transferência também foram incubados no tampão citado acima por 5 minutos.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio- Rad) a 15 Volts durante 50 minutos pelo método semi- seco (Trans-Blot SD semi-dry cell – Bio-Rad). Em seguida, a membrana foi bloqueada overnight com 9% p/v de leite desnatado em TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, pH=8, contendo 0,1% v/v de Tween 20). Ao fim do bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T por 4X de 5 min. cada e incubada com anticorpo primário (listados na tabela 5) por 4 horas em temperatura ambiente sob agitação, a seguir a membrana foi novamente lavada com TBS-T por 4X de 5 min. cada e incubada com anticorpo secundário conjugado com a enzima HRP (listados na tabela 5) por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação. Todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão TBS-T.

Depois de lavada (TBS-T por 4X de 5 min. cada), a membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent - GE Healthcare) por quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante. As bandas foram visualizadas e fotografados usando o aparelho ChemiDoc da Bio-Rad ou imediatamente expostas a filme Hiperfilm, por curtos intervalos de tempo para obtenção de uma imagem radiográfica adequada. A análise quantitativa por densitometria foi realizada através do programa Image LabTM Software (Bio- Rad).

Tabela 5. Anticorpos utilizados na técnica de western blotting

Anticorpo	Tipo	Reatividade	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor
<i>Primários</i>					
Anti- PRDX1	Monoclonal	Human	Mouse	1: 5.000	Abnova
Anti- PRDX2	Monoclonal	Human	Mouse	1: 5.000	Abnova
Anti- PRDX3	Monoclonal	Human	Mouse	1: 5.000	Abnova
Anti- PRDX4	Monoclonal	Human	Mouse	1: 5.000	Abnova
Anti- PRDX5	Monoclonal	Human	Mouse	1: 5.000	Abnova
Anti- PRDX6	Monoclonal	Human	Mouse	1: 5.000	Abnova
Anti- GAPDH	Policlonal	Human, Dog, mouse	Goat	1: 4.500	Biorbyt
<i>Secundários</i>					
Goat anti-Mouse IgG (HRP)	Policlonal	Mouse	Goat	1: 20.000	Biorbyt
Rabbit anti-Goat IgG (HRP)	Policlonal	Goat	Rabbit	1: 20.000	Biorbyt

4.10. Cultura de células CD34⁺

Para simular esse processo de diferenciação celular in vitro, utilizamos o método de cultura de células CD34⁺. Para isso, células mononucleares de sangue periférico obtidas a partir da coleta de sangue de doadores e pacientes, foram isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque. A camada de células da interface do gradiente foi coletada e o isolamento das células CD34⁺ foi feito utilizando o Kit Indirect CD34⁺ Progenitor Cell Isolation Kit (MACS cell isolation kit) seguindo as orientações do fabricante. Estas células foram cultivadas em meio Metil Celulose H4230 (Stem cell technologies), adicionado de 20 ng/ul de IL-3, 3 U de Eritropoetina (EPO) e 50 ng/ul de Stem Cell factor na temperatura de 37°C, numa atmosfera úmida com 5% de CO₂ por sete dias. Em seguida as células foram coletadas e cultivadas em meio líquido Alfa-MEM (Invitrogen) suplementado com 30% de Soro Fetal Bovino, e adição de BSA, holo-transferrina humana, beta-mercaptoetanol, EPO (2U/ml). Foram retiradas amostras no início meio e fim, nas fases de

proeritroblasto (7º dia de cultura), eritroblasto basofílico (10º dia) e eritroblasto ortocromático (13º dia), respectivamente, do processo de proliferação para a extração de RNA para análises do perfil de expressão da família das peroxirredoxinas.

4.11. Análise estatística

Os dados são apresentados com média \pm SEM e foram comparados com teste *t* Mann Withney utilizando o GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Comparação dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio

Para efetuar as análises dos níveis de espécies reativas de oxigênio as amostras de sangue periférico necessitam ser processadas, de acordo com o protocolo já descrito na seção de materiais e métodos, imediatamente após a coleta. Portanto, os experimentos de citometria de fluxo foram gentilmente realizados em parceria com a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Os níveis de EROs foram mensurados no sangue periférico de três diferentes grupos: um grupo composto por indivíduos saudáveis (control; n=3), os quais representaram o grupo controle, um grupo de pacientes com beta talassemia (Btal; n=3) e um grupo de pacientes com anemia falciforme (SCD; n=3). As células foram incubadas com DCFH-DA, que se difunde para o interior das células, onde é deacetilado produzindo DCFH, um composto não fluorescente, mas que ao ser oxidado por espécies reativas de oxigênio produz DCF, que é altamente fluorescente, permitindo assim, que a produção de EROs seja quantificada com base na intensidade da fluorescência emitida. Os resultados obtidos mostraram significativo aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio em pacientes beta talassêmicos, $410 \pm 17,3$ quando comparados ao grupo controle de indivíduos saudáveis, $48,8 \pm 6,39$. Nossos dados também apresentaram um aumento, apesar de menos acentuado, em pacientes com anemia falciforme, $87,4 \pm 21,9$ também em relação ao grupo controle (figura 18). Estes achados corroboram os dados obtidos por Bezerra (2009), que analisou a produção de EROs em diferentes tipos de células do sanguíneas (neutrófilos, células mononucleares e eritrócitos) de pacientes com anemia falciforme e beta talassemia. Os resultados mostraram aumento na produção de EROs em todos os tipos celulares em ambas anemias hemolíticas.

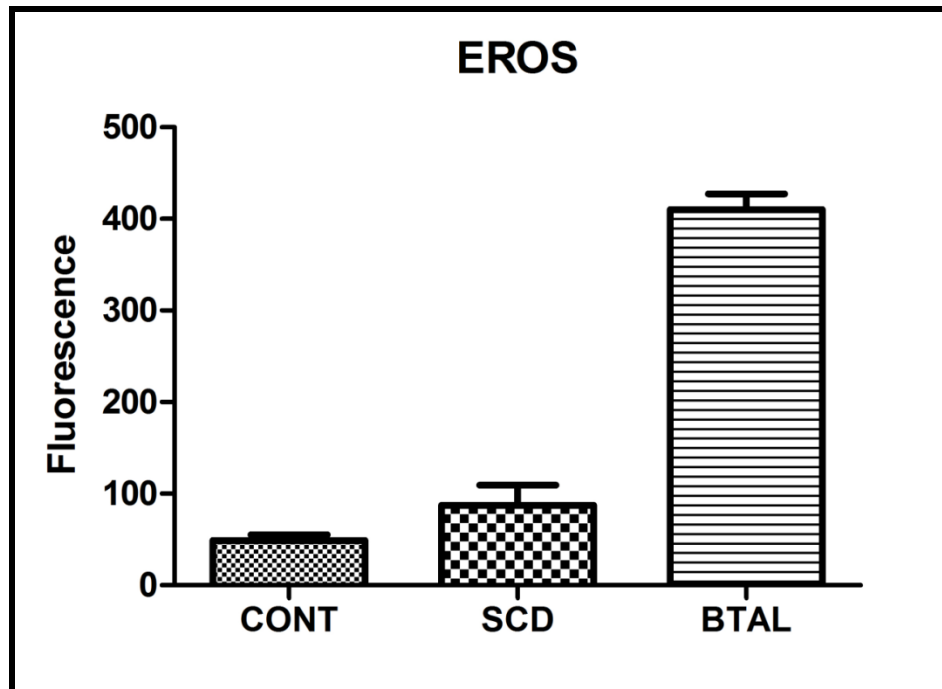


Figura 18. Análises dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Em comparação ao grupo controle os níveis de EROS mostraram acentuado aumento em beta talassêmicos, enquanto que em pacientes falciformes estes índices apresentaram um aumento menos acentuado.

5.2. Características dos grupos analisados

Foram avaliados 13 indivíduos sadios que representaram o grupo controle, 17 pacientes com anemia falciforme, 12 com beta talassemia intermediária; 6 com beta talassemia maior e 5 com beta talassemia menor. Os dados apresentados abaixo foram obtidos com base nas informações fornecidas pelos participantes deste estudo e pelo biomédico responsável pela coleta das amostras de sangue periférico e foram registrados em uma ficha de avaliação com modelo disponível no anexo 1.

Os dados da tabela 6 apresentam as idades mínimas e máximas para um cada um dos grupos em estudo assim como suas idades médias seguidas de erro padrão. A tabela 7 se refere ao gênero dos indivíduos de cada grupo.

Tabela 6. Faixa Etária dos grupos analisados

GRUPOS	IDADES	IDADE MÉDIA
Controle	22 a 42	28 ± 1,67
Falciforme	3 a 47	19, 23 ± 2,78
βintermediária	8 a 62	36,3 ± 5,36
βmaior	3 a 34	23,33 ± 5,30
βmenor	24 a 60	33,6 ± 6,66

Tabela 7. Gênero dos indivíduos estudados

GRUPOS	MASCULINO	FEMININO	TOTAL
Controle	6	7	13
Falciforme	7	10	17
βintermediária	6	6	12
βmaior	3	3	6
βmenor	3	2	5

A tabela 8 lista os haplótipos dos indivíduos com anemia falciforme que participaram do presente estudo. Sendo, CAR= Bantu ou República centro africana; Ben= Benin; Cam= Camarões; Sen= Senegal; ATP= Atípico.

Tabela 8. Haplótipos dos pacientes com anemia falciforme

HAPLÓTIPOS	Nº DE INDIVÍDUOS
CAR/CAR	3
BEN/BEN	1
CAR/BEN	3
CAR/CAM	1
CAR/ATP	1
NÃO GENOTIPADOS	8

Os pacientes beta talassêmicos foram divididos em três grupos de acordo com sua classificação fenotípica, são eles: beta talassêmicos menores, maiores e intermediários. Com relação ao genótipo, nenhum dos indivíduos com beta talassemia menor foi genotipado até o momento. O grupo de pacientes com beta talassemia intermediária era composto exclusivamente por indivíduos portadores da mutações IVS- I- 6/IVS- I- 6 (β^+/β^+). As mutações e respectivos genótipos dos beta talassêmicos maiores estão relacionadas na tabela 9.

Tabela 9. Genótipos dos pacientes com beta talassemia maior

MUTAÇÃO	GENÓTIPO	Nº DE INDIVÍDUOS
CD39/CD39	β^0/β^0	1
IVS- I- 5/IVS- I- 6	β^+/β^+	1
IVS- I- 6/ IVS- I- 5	β^+/β^+	1
IVS- I- 6/IVS- I- 110	β^+/β^+	1
IVS- I- 1/IVS- I- 6	β^0/β^+	1
NÃO GENOTIPADOS	$\beta^?/\beta^?$	1

Outras informações também foram solicitadas aos pacientes e controles:

- tabagismo, alcoolismo, outros: nenhuma informação relevante foi relatada por qualquer um dos grupos.
- prática regular de atividades físicas: controles = 4 de 13; falciforme = 8 de 17; β inter = 3 de 12; β maior = 4 de 6; β menor = 1 de 5.
- patologias associadas: controle = nenhum relato; falciforme = 3 (2 AVCs e 1 cardiopata); β inter = 4 (cardiopatas); β maior = nenhum relato; β menor = 2 (hipertensos).
- medicação: controle = nenhum relato; falciforme = 15 (7 ácido fólico; 3 ácido fólico + quelante de ferro; 5 ácido fólico + hidroxiuréia); β inter = 10 (4 ácido fólico; 1 hidroxiuréia; 3 ácido fólico + quelante de ferro; 1 ácido fólico + hidroxiréia; 1 quelante de ferro + hidroxiuréia); β maior = 6 (2 quelante de ferro; 4 ácido fólico + quelante); β menor = nenhum relato. Adicionalmente, foi relatado o uso de medicação específica para as patologias associadas citadas, como anti-hipertensivos e remédios para o tratamento de doenças cardiovasculares.

5.3. Análise da expressão gênica da família de peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos sadios e com anemias hemolíticas

As análises de expressão gênica das peroxirredoxinas foram feitas por PCR em tempo real, que permite o monitoramento óptico da fluorescência do produto de PCR ciclo a ciclo e pode ser usada na quantificação da expressão gênica. Contudo, em todos os grupos estudados detectou-se a expressão apenas das isoformas das *PRDXS* 1, 2, 5 e 6. As isoformas de *PRDX3* e *PRDX4* não foram encontradas nos reticulócitos de nenhum dos grupos. As amostras foram amplificadas em duplicatas e em todos os ensaios foram feitos controles negativo para verificar possíveis contaminações. A quantificação dos resultados foi realizada utilizando a derivação da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

A expressão gênica das peroxirredoxinas foi analisada nos reticulócitos dos seguintes grupos: indivíduos sadios (cont; n= 13), pacientes com anemia falciforme (SCD; n= 17), pacientes com beta talassemia intermediária (Binter; n= 12), beta talassemia maior (Bmaj; n= 6) e beta talassemia menor (Bminor; n= 5). Os resultados obtidos mostram aumento na expressão da *PRDX1* em pacientes beta talassêmicos intermediários e maiores e diminuição em pacientes com anemia falciforme quando comparados ao grupo controle (figura 19A). Em relação à *PRDX2*, não foi encontrado diferença significativa em indivíduos com anemia falciforme, beta talassemia intermediária e maior, contudo, relevante diferença foi encontrada em beta talassêmicos menor em relação ao grupo controle. É importante salientar que apesar de não encontrarmos uma diferença significativa, observamos uma importante redução na expressão deste gene em pacientes intermediários (figura 19B). Com relação à *PRDX5* não foi observada diferença significativa em nenhuma das anemias (figura 19C). Ambas as doenças mostraram redução da expressão da *PRDX6*, exceto em pacientes com beta talassemia menor (figura 19D).

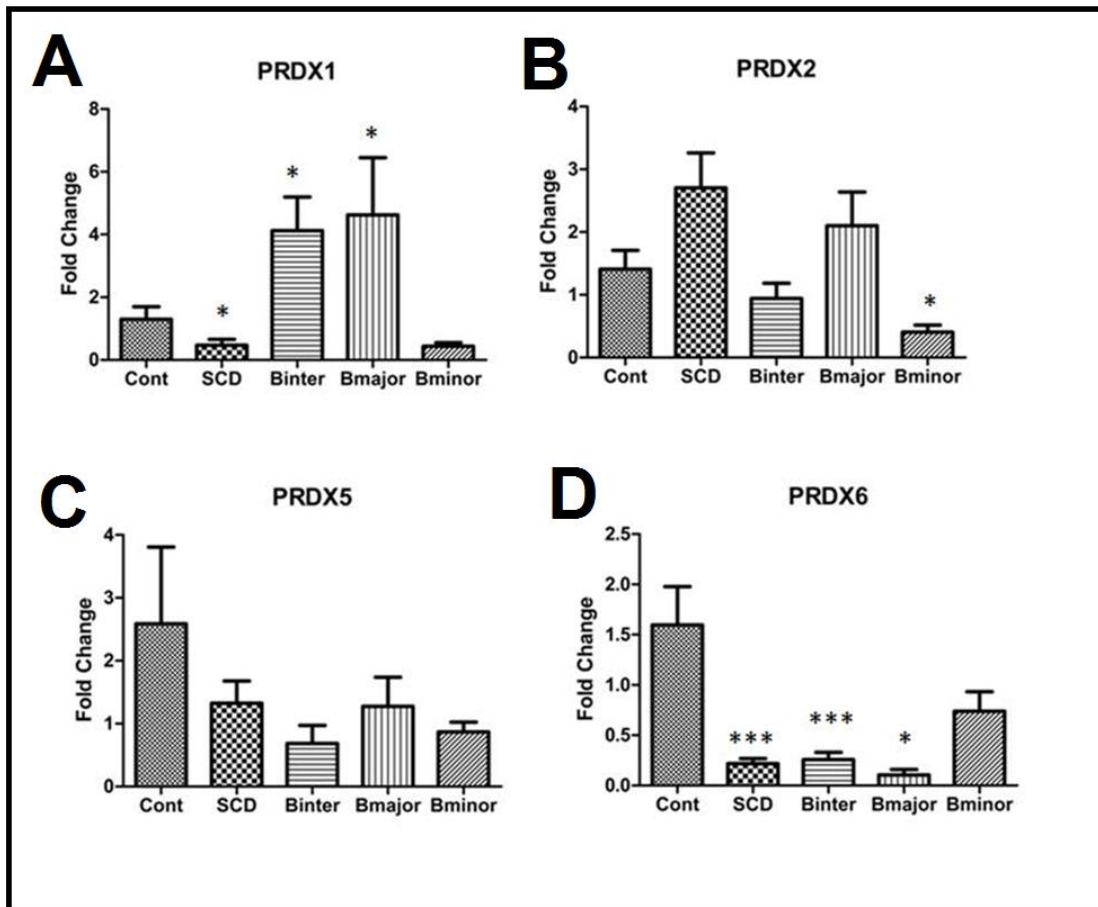


Figura 19. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com anemias hemolíticas. (A) a *PRDX1* mostrou aumento em pacientes beta talassêmicos intermediários (Binter = $4,12 \pm 1,07$; $*p=0,04$) e maiores (Bmaj = $4,62 \pm 1,82$; $*p=0,03$) e diminuição em pacientes com anemia falciforme (SCD = $0,47 \pm 0,18$; $*p=0,013$) quando comparados ao grupo controle (cont). (B) a *PRDX2* não apresentou diferença significativa em indivíduos com anemia falciforme ($2,70 \pm 0,55$; $p=0,17$), beta talassemia intermediária ($0,94 \pm 0,24$; $p=0,20$) e maior ($2,10 \pm 0,53$; $p=0,31$), contudo, relevante diferença foi encontrada em beta talassêmicos menor ($0,40 \pm 0,11$; $*p=0,018$) em relação ao grupo controle ($1,49 \pm 0,29$). (C) Para a *PRDX5* não foi observada diferença significativa em nenhuma das anemias: cont ($2,58 \pm 1,22$); SCD ($1,32 \pm 0,35$; $p=0,42$); Binter ($0,68 \pm 0,28$; $p=0,06$); Bmaj ($1,27 \pm 0,46$; $p=0,62$); Bminor ($0,87 \pm 0,15$; $p=0,92$). (D) Ambas as doenças mostraram redução da expressão da *PRDX6*, cont ($1,59 \pm 0,38$), anemia falciforme ($0,21 \pm 0,04$; $***p=0,0002$), beta talassemia intermediária ($0,25 \pm 0,07$; $***p=0,0008$), beta talassemia maior ($0,10 \pm 0,05$; $*p=0,01$) exceto em pacientes com beta talassemia menor ($0,73 \pm 0,19$; $p=0,13$).

5.4. Análise proteica das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos saudáveis e com anemias hemolíticas

Foram analisadas as peroxirredoxinas 1, 2 e 6; a PRDX3, PRDX4 e PRDX5 não foram detectadas no lisado celular de pacientes e controles. Como controle endógeno foi utilizado o GAPDH. A comparação da expressão proteica das peroxirredoxinas em indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme, sugere a redução na expressão das PRDXS 1 e 2 e uma potencial redução da PRDX6 em pacientes falciformes. As comparações entre controles, pacientes com beta talassemia intermediária, maior e menor, sugerem redução na expressão das proteínas de PRDX1 e PRDX6 em beta talassêmicos intermediários e aumento da PRDX2 em pacientes com beta talassemia maior e menor. Não foram detectadas diferenças aparentes na expressão da PRDX2 entre controles e beta talassêmicos intermediários e também na expressão das PRDXS 1 e 6 quando comparados indivíduos saudáveis e beta talassêmicos maiores e menores. Estes dados estão demonstrados na figura 20 e 21 respectivamente.

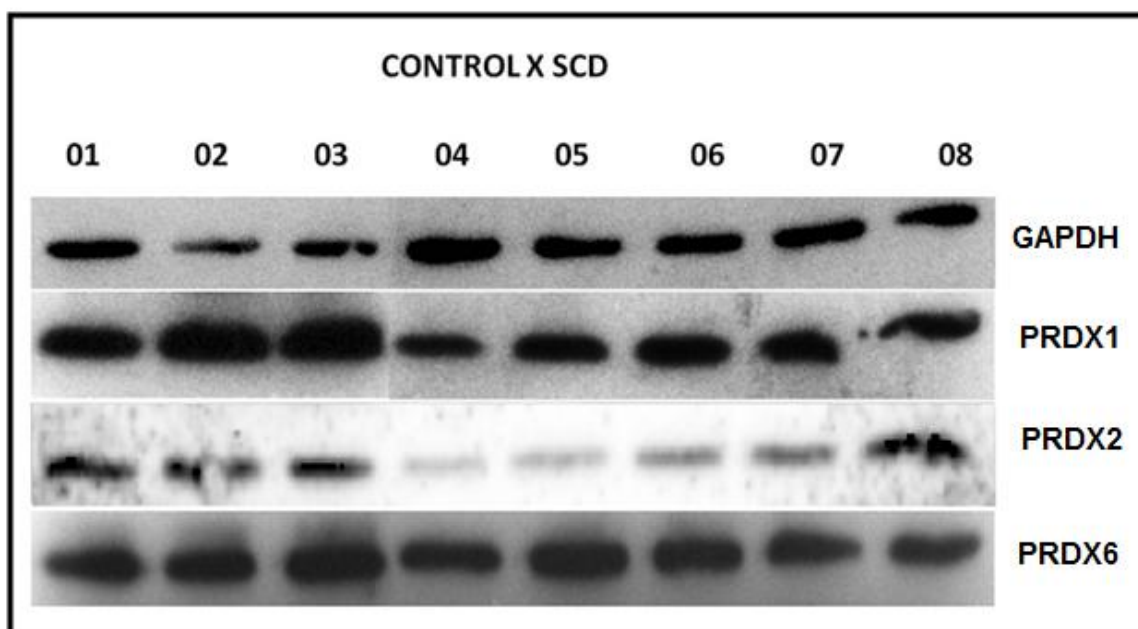


Figura 20. Análise de western blotting em controles e pacientes com anemia falciforme. Nossos resultados sugerem uma redução na expressão das PRDXS 1 e 2 e uma potencial redução da PRDX6 em pacientes falciformes (4-8) em comparação com o grupo controle de indivíduos saudáveis (1-3).

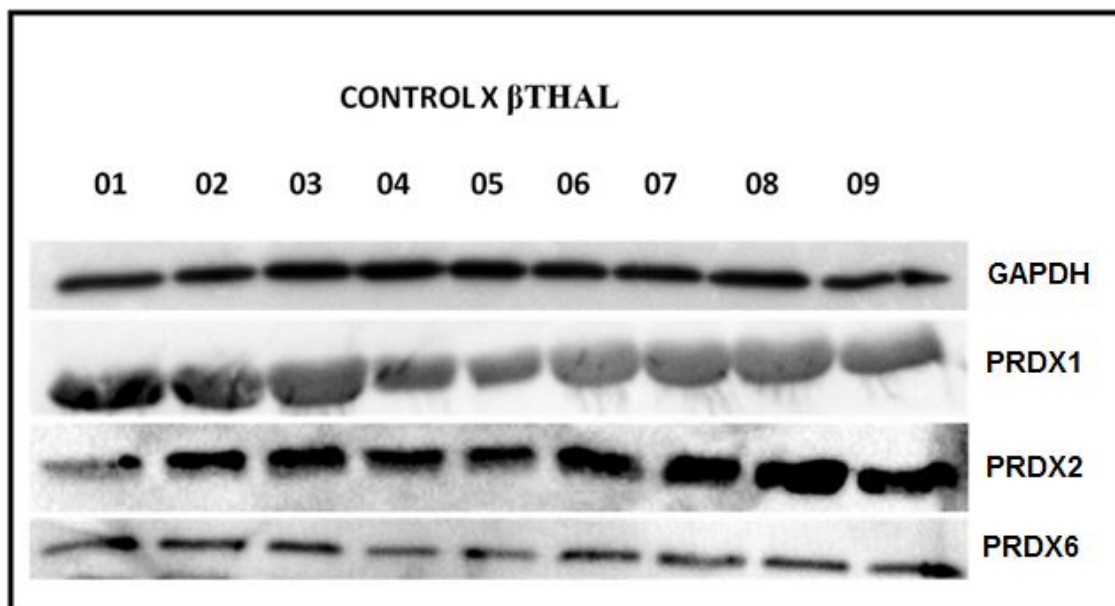


Figura 21. Análise de western blotting beta talassêmicos. Os resultados comparativos da expressão proteica entre os controles (1-3), beta talassêmicos intermediários (4-5), maiores (6-7) e menores (8-9), sugerem redução na expressão de PRDX1 e PRDX6 em pacientes com beta talassemia intermediária e aumento da PRDX2 em beta talassêmicos maiores e menores.

5.5. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em culturas de indivíduos saudios e beta talassêmicos

As análises de cultura celular foram gentilmente realizadas em parceria com a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Foram feitas culturas de células CD34⁺ de indivíduos saudáveis e beta talassêmicos e retiradas amostras para análise no 7º, 10º e 13º dia. As análises do perfil de expressão gênica da família de peroxirredoxinas mostraram expressão similar para a *PRDX1* e *PRDX6* em ambos os grupos. A *PRDX2* mostrou aumento de expressão no 10º e 13º dia em controles e pacientes, contudo esse aumento foi sugestivamente mais acentuado em controles. Com relação à *PRDX3*, esta aumentou em controles no 10º e decaiu no 13º, enquanto que em talassêmicos sua expressão foi constante. A *PRDX5* apresentou redução no 7º em relação ao controle, porém a partir do 10º os perfis de expressão tornaram-se similares. A *PRDX4* não foi detectada em nenhum dos grupos estudados. Estes resultados estão expostos na figura 22.

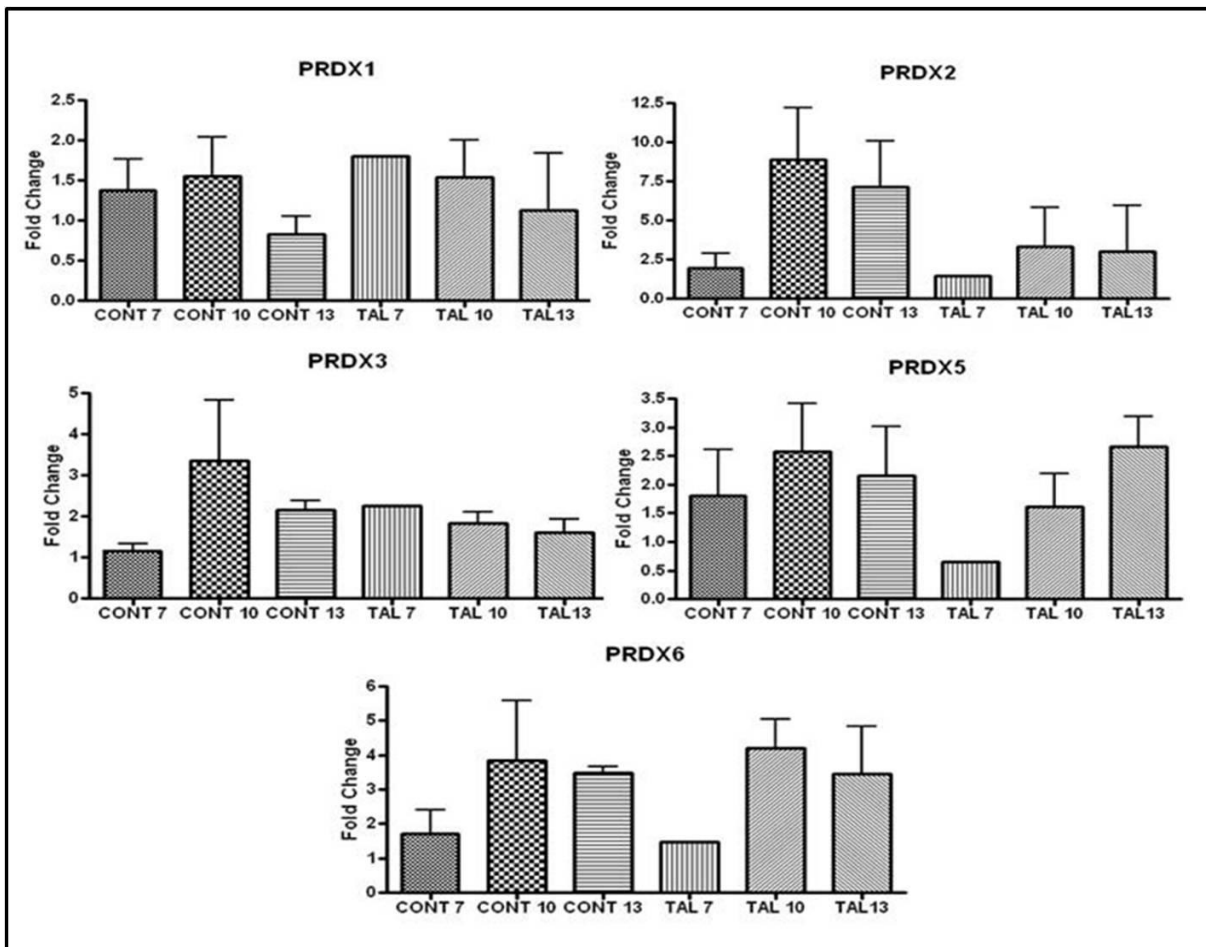


Figura 22. Análise da expressão gênica das peroxidredoxinas em culturas de indivíduos sadios e beta talassêmicos. As análises do perfil de expressão gênica das peroxidredoxinas mostrou expressão similar para as *PRDXS* 1 e 6. A *PRDX2* mostrou menor aumento em células de talassêmicos em relação ao grupo controle. A *PRDX3* apresentou aumento em controles no 10º e decaiu no 13º, enquanto que em talassêmicos sua expressão foi constante. Já a *PRDX5* mostrou redução no 7º quando comparada ao controle, contudo a partir do 10º os perfis de expressão tornaram-se similares. A *PRDX4* não foi detectada em nenhum dos grupos analisados.

6. DISCUSSÃO

Como já descrito anteriormente, as EROs podem causar profundas lesões nos eritrócitos, diminuindo seu período de vida útil, especialmente em paciente com anemia falciforme e talassemias. Supõe-se que os eritrócitos falciformes se encontrem constantemente sob estresse oxidativo e, portanto liberem produtos de degradação da HbS como os complexos Fe^{2+} e Fe^{3+} , os quais atacam a membrana do eritrócito, catalisando a destruição de hidroperoxidos lipídicos e formando os radicais alcoxil e peroxil (BECKER et al., 2004). A formação destes radicais agrava as lesões em virtude dos sucessivos processos de novos ciclos de peroxidação lipídica, levando a liberação de aldeídos como o malondialdeído (MAD) e alquenos como o 4-hidroxi-2-noneal (4-ANE) (DAILLY et al., 1998; CESQUINI et al., 2003).

Existe uma taxa "fisiológica" normal de formação de meta-hemoglobina nos glóbulos vermelhos que proporciona uma fonte contínua para a produção de superóxido que por sua vez gera peróxido de hidrogênio como subproduto da dismutação (FREEMAN e CRAPO, 1982). Observou-se que em preparações de hemoglobina obtidas a partir de células vermelhas de pacientes com anemia falciforme (HbS) que a auto-oxidação da hemoglobina é 1,7 vezes mais rápida do que na hemoglobina normal (HbA) (HEBBEL et al., 1988; ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). Além disso, foi relatado que os eritrócitos falcizados geram, aproximadamente, duas vezes mais ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e produtos de oxidação de lipídios em comparação com os eritrócitos contendo HbA (HEBBEL et al., 1982; ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

Corroborando com a literatura, nossos resultados também evidenciam um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio em pacientes acometidos com anemia falciforme em comparação com indivíduos saudáveis. São crescentes as evidências que apontam a resposta ao estresse oxidativo como responsável pelo agravamento da fisiopatologia de disfunções secundárias em decorrência da anemia falciforme (STUART e NAGEL, 2005; BELCHER et al., 2010). Vários mecanismos moleculares têm sido propostos para contribuir para os elevados níveis de oxidantes em pacientes com anemia falciforme, alguns destes incluem os níveis excessivos de hemoglobina livre que catalisam a reação de Fenton (CHIRICO e PIALOUX, 2012), as recorrentes lesões causadas pelo

processo isquemia-reperfusão que promovem a ativação do sistema xantina-xantina oxidase e, como anteriormente citado, a maior oxidação da HbS gerando espécies reativas de oxigênio (OSAROGIAGBON et al., 2000; ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000). Além disso, a resposta pró-inflamatória crônica em pacientes falciformes, a qual é induzida pelo constante recrutamento de neutrófilos e monócitos também desempenha um importante papel na geração das EROs (RAMOS et al., 1992; QUEIROZ e LIMA, 2013). Sendo assim, as EROs podem não somente ser marcadores potenciais da gravidade da doença falciforme, mas também importantes alvos para a terapia antioxidante (NUR et al., 2011; QUEIROZ e LIMA, 2013).

Nossos resultados apontam também para um aumento exacerbado da produção de EROs em pacientes beta talassêmicos. Nesses pacientes, o excesso de cadeias de alfa globina desemparelhadas nos eritrócitos formam tetrâmeros instáveis que se dissociam em monômeros e depois, seguidos por uma alteração de sua estrutura terciária, são oxidados, primeiramente a metahemoglobina e após para hemicromos que precipitam com o tempo. Os passos seguintes incluem a liberação do grupamento heme e do ferro e a precipitação de frações da proteína globina, incluindo a membrana plasmática. O resultado dessa cadeia de eventos, catalisada pelo ferro livre, aumenta a formação de EROs com uma variedade de efeitos deletérios sobre os lipídios e proteínas de membrana, incluindo a oxidação da proteína de membrana 4.1 e a diminuição da proporção de espectrina / banda 3 (FIBACH, RACHMILEWITZ, 2008).

Ao se comparar culturas de precursores eritróides beta talassêmicos e normais, ambas cultivadas sob iguais condições e concentrações de ferro, pode-se observar aumento nos níveis de EROS nos glóbulos vermelhos de talassêmicos, principalmente nos estágios finais de maturação (FIBACH, RACHMILEWITZ, 2008). Estes resultados indicam que o aumento na geração de EROs se deve a fatores ambientais como o excesso de ferro, bem como por fatores intracelulares, tais como a instabilidade da hemoglobina e a liberação do grupamento heme. Adicionalmente, o estresse oxidativo desenvolvido em precursores eritróides talassêmicos foi associado ao aumento da apoptose manifestado pela externalização da fosfatidilserina, sugerindo que o estresse oxidativo é responsável pela eritropoese ineficaz (FIBACH, RACHMILEWITZ, 2008). Outros estudos prévios demonstraram que em eritrócitos beta talassêmicos a autooxidação da hemoglobina, a

liberação do grupo heme e a geração de $O_2^{\bullet-}$ é aproximadamente oito vezes maior que em eritrócitos com Hb normal (BUNN e JANDL, 1967; BRUNORI et al., 1975; JOSHI et al. 1983; SCOTT et al., 1993).

Como dito anteriormente, os níveis de EROs encontrados no sangue periféricos de pacientes beta talassêmicos em nosso trabalho corroboram os achados citados acima, visto que, em comparação ao grupo de indivíduos sadios os níveis de espécies reativas de oxigênio mostraram acentuado aumento no grupo de beta talassêmicos. Outra contribuição para o estresse oxidativo nos glóbulos vermelhos é a sobrecarga de ferro causada pela terapia de transfusões sanguíneas, especialmente em pacientes beta talassêmicos maiores. Conforme esta carga aumenta, ocorre um acúmulo de ferro no organismo, uma vez que a capacidade de ligação da transferrina é limitada (cada transferrina é capaz de se ligar a apenas 2 átomos de ferro), isto pode causar sobrecarga de ferro nos tecidos, danificando órgãos vitais, como coração, fígado, e glândulas endócrinas. Então, esta sobrecarga de ferro é responsável pelo efeito mais danoso das talassemias, tornando a terapia quelante o maior foco na terapêutica dessa doença (KUSHNER; PORTER; OLIVIERI, 2001; RIVELLA, 2009).

Neste contexto, a eficiência do sistema antioxidante é de vital importância neste tipo celular e dentre as três classes de enzimas celulares capazes de decompor peróxidos (catalase, glutatona e peroxirredoxinas), as peroxirredoxinas destacam-se pela abundância e grande reatividade com seus substratos. Além disso, vários estudos tem relatado a correlação dos níveis de EROs com a expressão destas enzimas. Nos glóbulos vermelhos a PRDX2 é a terceira proteína mais abundante e provavelmente um dos principais citoprotetores eritrocitários contra o estresse oxidativo (JOHNSON; GOYETTE; RAVINDRANATH, 2005). Adicionalmente, os eritrócitos também possuem as isoformas das PRDX1 e PRDX6, porém em menor quantidade que a PRDX2 (LOW et al., 2007). A PRDX1 apresenta 91% de homologia com a PRDX2, também é citosólica, tem o mesmo mecanismo catalítico e semelhante cinética de reação (CHAE et al., 1999). Muitos estudos têm demonstrado que a PRDX1 possui funções como regulador celular em cascatas de sinalização mediadas por peróxido de hidrogênio (KANG et al., 1998; NEUMANN; CAO; MANEVICH, 2009) e que pode proteger as células da morte celular induzida por EROs (BAE et al., 2007; KIM et al., 2008).

De modo geral, a expressão gênica da *PRDX1* é positivamente regulada pelos níveis celulares de estresse oxidativo. Esta regulação ocorre via fator de transcrição NF-E2 fator relacionado 2 (Nrf2), o qual permanece inativo quando a proteína Keap1, sensível ao estresse oxidativo, se liga ao seu domínio N-terminal. Sob condições de estresse oxidativo essa interação é desfeita e Nrf2 migra para o núcleo, onde ativa a transcrição da *PRDX1* (ITOH et al.,1999). Além da *PRDX1*, Nrf2 regula positivamente outras enzimas antioxidantes e proteínas, tais como heme oxigenase-1 (HO-1), que é a enzima que catalisa a degradação do grupo heme (ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012).

Os dados de análise da expressão gênica da *PRDX1* em reticulócitos de pacientes com beta talassemia intermediária e maior obtidos neste estudo mostraram significativo aumento na expressão deste gene quando comparados ao grupo controle composto por indivíduos saudáveis, estes achados reforçam as informações acima visto que, também neste estudo foram observados níveis bastante elevados de EROs como já descritos em detalhes anteriormente. Contudo, a análise da expressão proteica mostrou diminuição dos níveis desta proteína em beta talassêmicos intermediários e não apresentou diferença no grupo com beta talassemia maior, sugerindo o envolvimento de mecanismos adicionais de regulação, além do estresse oxidativo, que ainda não foram elucidados.

No caso de pacientes com anemia falciforme, os resultados obtidos tanto pelas análises de expressão gênica quanto por western blotting mostraram redução nos níveis de *PRDX1* em relação ao grupo controle. Estes achados podem estar relacionados ao fato da *PRDX1* também ter sua expressão modulada por lipopolissacarídeos via cascata de transdução de sinal dependente de óxido nítrico (NO) (IMMENSCHUH et al.,1999). Diversos estudos têm sugerido que a biodisponibilidade de NO encontra-se reduzida na anemia falciforme (ASLAN e FREEMAN, 2007; SONATI e COSTA, 2008). O NO é produzido no endotélio vascular pela enzima endotelial óxido nítrico sintase (eNOS) a partir da arginina e tem a função de regular a vasodilatação, atua como mediador da resposta imune e anti- inflamatório impedindo a liberação de histamina, também suprime a expressão de molécula de adesão do endotélio vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e E-selectina e que estão aumentadas na anemia falciforme (WU et al., 2000; COLEMAN, 2002; LEE et al., 2002). Sabe-se que a destruição dos eritrócitos causa a liberação de hemoglobina no plasma e esta converte o NO em nitrato inativo. A lise

de eritrócitos libera arginase que destrói a arginina, contribuindo para a diminuição da concentração de NO (FIGUEIREDO, 2007). Em condições baixas concentrações de arginina, a eNOS é desacoplada em suas subunidades, produzindo EROs ao invés de NO, reduzindo ainda mais a biodisponibilidade de NO e aumentando o estresse oxidativo em pacientes com AF (XIA et al., 1996).

Adicionalmente, foi demonstrado que a PRDX1 pode ser secretada das células após ser estimulada com algumas citocinas, tais como TGF- β (fator de crescimento de células T-beta) e IL-1 (interleucina-1) (CHANG et al., 2006; CATTERALL et al., 2006) que encontram-se elevadas nos indivíduos com anemia falciforme (VILAS-BOAS et al., 2012; KEIKHAEI et al., 2013), isto também pode estar relacionado a diminuição dos níveis proteicos observados no presente estudo. Além disso, um trabalho recentemente realizado por Han et al., 2012a, utilizando camundongos *knockout* para PRDX1 (PRDX1^{-/-}) demonstrou que a deficiência desta proteína diminui a capacidade fagocitária dos macrófagos para a remoção de eritrócitos danificados pelo estresse oxidativo. No mesmo trabalho também foram descritos os efeitos aditivos da deficiência de PRDX1 em concomitância com a deficiência de PRDX2 em camundongos. A maioria dos camundongos PRDX1^{-/-}/2^{-/-} morreu dentro de 48 horas, sem uma razão clara, contudo os poucos que sobreviveram apresentaram anemia mais severa com níveis mais elevados de formação de corpos de heinz e EROs do que camundongos PRDX1^{-/-} e PRDX2^{-/-} (HAN et al., 2012a).

Paralelamente, a PRDX1 pode ligar-se a várias proteínas. No citoplasma, a PRDX1 tem funções anti-apoptóticas através de interações diretas ou indiretas com reguladores chave de apoptose tais como ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), p66^{shc}, GSTpi (*Glutathione S-transferase pi*)/ JNK (*jun N-terminal kinase*) e c-Abl (KIM; KIM; LEE, 2008; GERTZ et al., 2009; KIM et al., 2006; WEN e VAN ETTEN, 1997), a redução desta proteína observada em ambas as anemias hemolíticas estudadas no presente trabalho sugerem que estas interações podem estar prejudicadas e conseqüentemente, seu papel na proteção contra a morte celular induzida pelo estresse oxidativo.

Com relação à PRDX2, esta teve sua importância demonstrada em um estudo realizado com camundongos PRDX2 *knockout*. Foi visto que, estes apresentavam elevados níveis de espécies reativas de oxigênio, aumento da formação de corpos de heinz e severa

anemia hemolítica, sugerindo que esta enzima tem um importante papel na manutenção das células vermelhas do sangue. Deste modo, o equilíbrio no balanço redox regulado pela PRDX2 nos eritrócitos pode ser estimado como estreitamente associado às patologias hematológicas, como a diminuição do tempo de vida dos eritrócitos e a instabilidade da hemoglobina (LEE et al. 2003). Recentemente, Han et al., 2012b relataram a capacidade da PRDX2 em sua forma decamérica, de interagir com a Hb nos eritrócitos de camundongos. Sob condições de elevado estresse oxidativo a Cys_P da PRDX2, fica superoxidada assumindo a forma de decâmeros que se ligam a Hb protegendo-a da desnaturação e da agregação induzidas pelo dano oxidativo. Adicionalmente, foi demonstrado que a ligação entre a PRDX2 e a Hb está severamente prejudicada nas hemácias de pacientes com talassemia e anemia falciforme, resultando no aumento significativo da agregação de Hb por ataque de EROs (HAN et al., 2012b). Nossos dados de análise de expressão gênica mostraram uma diminuição significativa em pacientes com beta talassemia menor e uma importante tendência de diminuição em pacientes beta talassêmicos intermediários, não apresentando diferenças em pacientes falciformes e beta talassêmicos maiores. Entretanto, a análise proteica apresentou diminuição dessa isoforma em falciformes e aumento em beta talassêmicos maiores e menores. Contudo, Matte e colaboradores demonstraram que as quantidades de PRDX2 associadas à membrana foi significativamente reduzida em camundongos beta talassêmicos (MATTE et al. 2010). Em contraste, Moore et al., 1997, observaram um aumento de PRDX2 ligada a membrana de células falciformes densas (MOORE et al., 1997). Sendo assim, parece importante determinar o papel da PRDX2 em diferentes localizações subcelulares, sua estrutura e os níveis de expressão sob condições de estresse oxidativo. Além disso, essa aparente incongruência dos resultados encontrados entre a expressão dos genes e a produção de proteínas, sugere alguma alteração pós transcricional até o momento não elucidada. Dessa maneira esforços em entender o estado de oligomerização e oxidação dessas enzimas poderão contribuir em um melhor entendimento de nossos resultados (Esses experimentos estão atualmente em desenvolvimento no nosso laboratório).

A PRDX5 foi encontrada em reticulócitos normais e de pacientes, porém não foi detectada no lisado celular de nenhum dos grupos estudados. Esses achados podem ser justificados com base na localização desta proteína que é predominante na mitocondrial e

nos peroxissomos, os quais são perdidos durante a maturação do eritrócito. Com relação aos reticulócitos, estes ainda contêm resíduos de organelas e RNA no citoplasma, isto permitiu que a expressão gênica da *PRDX5* fosse mensurada neste tipo celular. Apesar disso, fica evidente a importância desta proteína durante a proliferação das células eritróides, uma vez que existe uma alteração no perfil de produção destas proteínas quando se compara os resultados em culturas de pacientes talassêmicos com cultura de controles. Em controles o pico de expressão, parece condizente ao pico de produção de hemoglobina, enquanto que em cultura de pacientes talassêmicos existe um aumento gradativo desta expressão aumentando na fase final de diferenciação. Como em culturas “in vitro” não existe a troca de hemoglobinas, é possível observar a produção de beta globina em todos os momentos. Como esta produção é prejudicada em pacientes talassêmicos estes resultados sugerem que este aumento esteja relacionado a uma tendência em proteger as células dos danos oxidativos causado pela tetramerização das cadeias alfa.

As isoformas de *PRDX3* e *PRDX4* não foram encontradas em reticulócitos e/ou lisado celular, tanto de indivíduos saudáveis quanto de pacientes de ambas as doenças. Possivelmente, em virtude da ausência ou dos reduzidos níveis de RNAm para estes genes presentes nos reticulócitos destes grupos. Com relação à ausência destas isoformas no lisado celular, está pode estar ligada a localização mitocondrial da *PRDX3* e ao fato da *PRDX4* ser excretada para o meio extracelular.

Dentre todas as isoformas, a *PRDX6* é única, uma vez que é uma enzima bifuncional com atividade de fosfolipase A_2 em adição à atividade de peroxidase. Esta atividade de fosfolipase A_2 não é afetada pela oxidação da cisteína e contribui para a reparação de fosfolípidos oxidados pela clivagem de ácidos graxos oxidados (MANEVICH e FISHER, 2005). Nagy et al., 2006, realizaram um estudo a fim de explorar o potencial papel da *PRDX6* na atenuação das espécies reativas de oxigênio geradas durante o processo de isquemia/ reperfusão no miocárdio utilizando camundongos *PRDX6*^{-/-}. Foi observado que os corações dos animais *PRDX6*^{-/-} eram mais sensíveis as injúrias causadas pela isquemia e reperfusão, e apresentavam maiores níveis de estresse oxidativo, evidenciados pela presença de quantidade maiores de malondialdeído. Estes resultados sugerem um papel não redundante da *PRDX6*, que pode ser atribuído à sua capacidade de reparar membranas celulares, na lesão de isquemia/ reperfusão do miocárdio, visto que, a glutathiona peroxidase

e a catalase não puderam compensar sua deficiência (NAGY et al., 2006). Os dados que obtivemos sugerem redução da PRDX6 em pacientes com anemia falciforme e com beta talassemia intermediária, sugerindo que o reparo de membrana pode estar prejudicado nestas células. O mecanismo responsável pela *downregulation* da expressão da PRDX6 na anemia falciforme e beta talassemia intermediária ainda é obscuro.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos, observamos que:

- Há um aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio em pacientes beta talassêmicos e com anemia falciforme, embora nestes últimos esse aumento seja menos acentuado. Os principais fatores responsáveis pelo estresse oxidativo nestas anemias são a instabilidade da hemoglobina e o excesso de ferro livre.

- A análise do perfil de expressão gênica dos membros da família de peroxirredoxinas mostrou aumento da expressão da *PRDX1* em pacientes beta talassêmicos intermediários e maiores e diminuição em pacientes com anemia falciforme. Com relação a *PRDX2* foi observada uma diminuição significativa em pacientes com beta talassemia menor e uma importante tendência a diminuição em pacientes beta talassêmicos intermediários, não apresentando diferenças em pacientes falciformes e beta talassêmicos maiores. As isoformas de *PRDX3* e *PRDX4* não foram encontradas nos reticulócitos de nenhum dos grupos estudados, possivelmente devido a ausência ou níveis bastante reduzidos de RNAm para estes genes presentes neste tipo celular. Para a *PRDX5* não foram observadas diferenças significativas em ambas às doenças, porém ao se comparar culturas celulares de pacientes beta talassêmicos com indivíduos normais são encontradas evidências da importância desta enzima, visto que existe uma alteração no perfil de produção desta proteína na cultura de beta talassêmicos em um provável tentativa de proteger estas células contra os danos oxidativos causados pela tetramerização das cadeias de alfa globina. A *PRDX6* apresentou diminuição em ambas às doenças, exceto em pacientes com beta talassemia menor.

-Não foi possível analisar pacientes com alfa talassemia devido a não obtenção de um número significativo de amostras que possibilitassem a análise estatística dos dados.

- A análise da abundância proteica das peroxirredoxinas no lisado celular de pacientes com anemia falciforme sugerem a redução na expressão da *PRDX1* e *PRDX2* e uma potencial redução da *PRDX6*. Em pacientes beta talassêmicos nossos dados sugerem a redução nos níveis de *PRDX1* e *PRDX6* em pacientes beta talassêmicos intermediários e aumento da *PRDX2* em pacientes com beta talassemia maior e menor. Não foram encontradas diferenças aparentes na expressão da *PRDX2* entre indivíduos sadios e beta

talassêmicos intermediários, assim como na expressão das PRDXS 1 e 6 em indivíduos beta talassêmicos maiores e menores. As aparentes incongruências dos resultados encontrados entre a expressão gênica e a produção proteica, sugere o envolvimento de mecanismos adicionais de regulação ainda não elucidados. Assim, esforços em entender em entender o estado de oligomerização e oxidação dessas enzimas poderão contribuir em um melhor entendimento de nossos resultados. Assim como em reticulócitos a PRDX3 e PRDX4 não foram detectas e adicionalmente a PRDX5 também não foi encontrada em nenhum dos grupos estudados, possivelmente devido a localização das PRDXS 3 e 5 ser predominantemente mitocondrial e ao fato da PRDX4 ser secretada para o meio extracelular.

- A variação dos níveis da expressão gênica e proteica observadas entre as diferentes patologias e suas subclassificações, no caso da beta talassemia, fornecem indícios de que a expressão das diferentes peroxirredoxinas pode estar vinculada ao quadro clínico observado nestes pacientes, contudo estudos adicionais são necessários para melhor estabelecer essa relação, bem como os seus mecanismos moleculares subjacentes. A análise de genes associados às peroxirredoxinas pode fornecer dados adicionais que contribuam na elucidação de tais mecanismos.

- Este foi o primeiro estudo relacionando de maneira sistemática a expressão gênica das peroxirredoxinas com estas anemias hemolíticas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os trabalhos futuros darão continuidade ao presente estudo, visando elucidar pontos ainda não esclarecidos e melhor caracterizar o papel das peroxirredoxinas nas anemias hemolíticas estudadas. Sendo assim, algumas das principais diretrizes são:

- Analisar o estado de oxidação das PRDXs 2-Cys típicas, a formação de decâmeros e oligômeros, assim como seus redutores fisiológicos, a tiorredoxina e a sulfirredoxina.

- Verificar possíveis diferenças entre os níveis proteicos das peroxirredoxinas associados à membrana eritrocitária em relação aos níveis citoplasmáticos encontrados.

- Relacionar a expressão proteica e gênica destas enzimas aos diferentes haplótipos encontrados em pacientes com anemia falciforme, ampliando para isso o número de indivíduos estudados para cada haplótipo.

- Analisar pacientes beta talassêmicos intermediários com mutações mais severas, visto que todos os indivíduos com beta talassemia intermediária participantes do nosso estudo apresentavam a mutação IVS- I- 6 em homozigose (β^+/β^+) que geralmente tem uma evolução mais branda.

- Analisar genes descritos na literatura como associados ou reguladores das peroxirredoxinas em pacientes e culturas celulares com inibição e/ou superexpressão das diferentes isoformas desta enzima.

- Avaliar a expressão gênica e proteica das demais enzimas antioxidantes encontradas nos eritrócitos: Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Peroxidase.

9. ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Participação na publicação do capítulo Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia. In: LOGIE, C. **Point Mutation**. 1. Ed. Intech, 2012. 352p. (anexo 3).

Link de acesso: <http://www.intechopen.com/books/point-mutation>

9. REFERÊNCIAS

AESSOPOS, A.; BERDOUKAS, .V; TSIRONI, M. The heart in transfusion dependent homozygous thalassaemia today prediction, prevention and management. **Eur J Haematol.** v.80, n.2, p. 93-106, 2008.

AGAR, N. S. et al. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? **J Clin Invest.** v.77, n.1, p. 319-321, 1986.

ANTONARAKIS S. E.; KAZAZIA JUNIOR, H.; ORKIN, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin cluster. **Human Genet.** v. 69, n.1, p. 1-14, 1985.

AOSHIBA, K. Y. et al. Red blood cells inhibit apoptosis of human neutrophils. **Blood.** v. 93, n.11, p. 4006-4010, 1999.

ARAÚJO, A.S. et al. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. **Hemoglobin.** v.27, n.4, p. 211-217, 2003.

ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B.A. Reactive species in sickle cell disease. **Ann N Y Acad Sci.** v.899, p. 375–391, 2000.

ASLAN, M.; FREEMAN, B.A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radic Biol Med.** v.43, n.11, p. 1469-1483, 2007.

BAE, J. Y. et al. Peroxiredoxin I and II inhibit H₂O₂-induced cell death in MCF-7 cell lines. **J. Biol. Chem.** v.101, n.4, p. 1038-1045, 2007.

BALLAS, S. K.; MOHANDAS, N. Pathophysiology of vaso- occlusion. **Hematology/Oncology Clinics of North America.** v.10, n.6, p. 1221–1239, 1996.

BANK, A. Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's a sample as α , β , γ , δ . **J. Clin. Invest.** v.115, n.6, p. 1470-1473, 2005.

BANK A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. **Blood.** v.107, n.2, p. 435-443, 2006.

BANK A. On the road to gene therapy for beta-thalassemia and sickle cell anemia. **Pediatr Hematol Oncol.** v.25, n.1, p. 1-4, 2008.

BARRANCO-MEDINA, S. T. et al. Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxiredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. **Plant Physiol Biochem** v.45, n.10-11, p. 729-739, 2007.

BAYNES, J. W. Oxygen and life. In: BAYNES, J.W.; DOMONICZAK, M.H. **Medical Biochemistry**, Philadelphia: Elsevier, 2005. p. 497–506.

BECKER, K. et al. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 163-189, 2004.

BELCHER, J.D. et al. Heme degradation and vascular injury. **Antioxid Redox Signal**. v.12, n.2, p. 233–248, 2010.

BERTHOLO, L. C.; MOREIRA H. W. Focalização isoelétrica na identificação das hemoglobinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 42 n. 3, p. 163-168, 2006.

BEZERRA, M.A.C. **Determinação das propriedades adesivas e funcionais em glóbulos vermelhos, neutrófilos e plaquetas de pacientes com hemoglobinopatia SC, S/β Talassemia e Talassemia intermediária**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T.P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochim Biophys Acta**. v.1758, n.8, p.994-1003, 2006.

BITEAU, B.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M.B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. **Nature**. v. 425, n.6961, p. 980–984, 2003.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias**. São José do Rio Preto, SP: Editora HN, v.1, 2006.

BOUNDURANT, M.C.; KOURY, M.J. Origin and development of blood cells. In: **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th ed. 1999. p. 145- 168.

BRASH, A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **J Biol Chem**. v. 274, n.34, p. 23679-23682, 1999.

BROWN, J. M. et al. Erythrocytes decrease myocardial hydrogen peroxide levels and reperfusion injury. **Am J Physiol**. v. 256, n.2 Pt 2, p. 584-588, 1989.

BRUNORI, M. G. et al. Formation of superoxide in the autoxidation of the isolated α and β chains of human hemoglobin and its involvement in Hemichrome precipitation. **Eur. J. Biochem**. v.53, n.1, p. 99- 104, 1975.

BUNN, H.F.; JANDL, J.H. Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin. **J. Biol. Chem**. v. 243, n.3 p. 465-475, 1967.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects**. W.B. Saunders Company, 1986. 690 p.

BUNN, H.F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med**. v. 337, n.11, p. 762-769, 1997.

CANALLI, A. A. et al. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. **Haematologica**. v.93, n.4, p. 605-609, 2008.

CANÇADO, R.D. Talassemias alfa. **Rev. bras. hematol. hemoter**. v.28, n.2, p. 81-87, 2006.

CAO, J.; SCHULTE, J.; KNIGHT, A. PRDX1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. **EMBO J**. v. 28, n.10, p. 1505–1517, 2009.

CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. **Genet Med**. v. 12, n.2, p. 61-76, 2010.

CAPPELLINI, N. et al. **Guidelines for the clinical management of thalassemia**. Thalassaemia International Federation (TIF), 2000, 111p.

CAPRARI, P. A. et al. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Exp Gerontol**. v.34, n.1, p. 47-57, 1999.

CATALA, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chem Phys Lipids**. v.157, n.1, p. 1-11, 2009.

CATTERALL, J.B. et al. Development of a novel 2D proteomics approach for the identification of proteins secreted by primary chondrocytes after stimulation by IL-1 and oncostatin M. **Rheumatol.**, Oxford, v. 45, n.9, p. 1101–1109, 2006.

CHA, M.K.; YUN, C.H.; KIM, I.H. Interaction of human thiol-specific antioxidant protein 1 with erythrocyte plasma membrane. **Biochemistry**. v.39, n.23, p. 6944-6950, 2000.

CHAE, H. Z. et al. Characterization of three isoformas of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. **Diabetes. Res. Clin. Pract.** v.45, n.2-3, p. 101-112, 1999.

CHANG, J.W. et al. Transforming growth factor- β 1 induces the non-classical secretion of peroxiredoxin-I in A549 cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v.345, n.1, p. 118–123, 2006.

CHENG, M. L. et al. Antioxidant deficit and enhanced susceptibility to oxidative damage in individuals with different forms of alpha-thalassaemia. **Br J Haematol**. v.128, n.1, p. 119-127, 2005.

CESQUINI, M. et al., t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 3-4, p. 124-129, 2003.

CHIRICO, E.N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**. v.64, n.1, p. 72–80, 2012.

CLASTER, S. et al. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. **Blood**. v. 64, n.5, p. 1079-1084, 1984.

CIMEN, M. Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clin Chim Acta**. v. 390, n.1-2, p. 1-11, 2008.

COLEMAN, J.W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clin Exp Immunol**. v.129, n.1, p. 4-10, 2002.

CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin**. v.33, n.1, p. 1-16, 2009.

CONRAN, N. C. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. **Br J Haematol**. v.124, n.4, p. 547-554, 2004.

DA CUNHA, A. F. et al. Global gene expression reveals a set of new genes involved in the modification of cells during erythroid differentiation. **Cell Prolif**. v.43, n.3, p. 297-309, 2010.

DA CUNHA, A. F. et al. Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia. In: LOGIE, C. **Point Mutation**. Intech, 2012. 352p.

DAILLY, E. et al. Role of Bilirubin in the Regulation of the Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Activity of Plasmain Sickle Cell Disease. **Biochemical and Biophysical Communications**, v. 248, n.2, p. 303-306, 1998.

DEAN, J.; SCHECHTER, A. N. Sickle cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. **N. Engl. J. Med**. v.299, n.14, p. 752-63, 1978.

DESSY, C. et al. Endothelial beta3-adrenoceptors mediate vasorelaxation of human coronary microarteries through nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization. **Circulation**. v.110, n.8, p. 948-954, 2004.

DESSYPRIS, E.N. Erythropoiesis. In: **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th ed. 1999. p. 169- 193.

DHALIWAL, G.; CORNETT, P. A.; TIERNEY, L. M. Jr. Hemolytic anemia. **Am Fam Physician**. v.69, n.11, p. 2599-2606, 2004.

DIESEN, D. L.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Hypoxic vasodilation by red blood cells: evidence for an s-nitrosothiol-based signal. **Circ Res**. v.103, n.5, p. 545-553, 2008.

DUBBS, J. M.; MONGKOLSUK, S. Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense. **Subcell Biochem**. v.44, p. 143-193, 2007.

DUMASWALA, U. J. et al. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. **Free Radic Biol Med.** v.27, n.9-10, p. 1041-1049, 1999.

DZIERZAK, E. A developmental approach to hematopoiesis. In: STEINBERG, M.H. et al. **Disorders of hemoglobin.** Cambridge, UK. 2001. 1268p.

EDELSTEIN, S. J. **The sickle cell from myths to molecule.** Boston: Harvard University Press, 1986.

EGLER, R. A. et al. Regulation of reactive oxygen species, DNA damage, and c-Myc function by peroxiredoxin 1. **Oncogene.** v.24, n.25, p. 8038–8050, 2005.

EL-REMESSY, A. B. et al. Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration. **J Cell Sci.** v.118, n.1, p. 243-252, 2005.

ELIGINI, S. et al. Induction of cyclo-oxygenase-2 in human endothelial cells by SIN-1 in the absence of prostaglandin production. **Br J Pharmacol.** v.133, n.7, p.1163-1171, 2001.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **Am J Clin Nutr.** v.57, n.5, p. 779-785, 1993.

FANG, J. et al. S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci.** v.104, n.47, p. 18742-18747, 2007.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia. **Curr Mol Med.** v.8, p. 609-619, 2008.

FIGUEIREDO, M. S. Modifiers factors of clinical severity in sickle cell anemia. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v.29, n.3, p. 215-217, 2007.

FORGET, B. G.; PEARSON, H. A. Hemoglobin Synthesis and the Thalassemias. In: HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. **Blood: principles and practice of hematology.** Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1995. p. 1525-1578.

FORGET, B. G. Molecular mechanisms of β Thalassemia. In: STEINBERG, M. H. et al. **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management.** New York: Cambridge University, 2001. p. 252-276.

FORMAN, H. Use and abuse of exogenous H_2O_2 in studies of signal transduction. **Free Radic Biol Med.** v.42, n.7, p. 926-932, 2007.

FOURQUET, S. et al. The dual functions of thiol-based peroxidases in H_2O_2 scavenging and signaling. **Antioxid Redox Signal.** v.10, n.9, p. 1565-1576, 2008.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.** v.47, n.5, p. 412–425, 1982.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** v. 64, p. 97-112, 1995.

GAETANI, G.F. et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. **Blood.** v.73, n.1, 334–339, 1989.

GLADWIN, M.T.; CRAWFORD, J.H.; PATEL, R.P. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. **Free Radic Biol Med.** v.36, n.6; p. 707-717, 2004.

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.39, n.1, 2003.

GHAFFARI, S. Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. **Antioxid Redox Signal.** v.10, n.11, p. 1923-1940, 2008.

GERTZ, M. et al. Identification of peroxiredoxin 1 as a novel interaction partner for the lifespan regulator protein p66Shc. **Aging (Ablany NY).** v.1, n.2, p. 254–265, 2009.

GHAEMMAGHAMI, S. et al. Global analysis of protein expression in yeast. **Nature.** v.425, n.6959, p. 737-741, 2003.

GIROTTI, A. W. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. **Free Radic Biol Med.** v.44, n.6, p. 956-968, 2008.

GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. A novel antioxidant role for hemoglobin. The comproportionation of ferrylhemoglobin with oxyhemoglobin. **J Biol Chem.** v.265, n.32, p. 19453-19460, 1990.

GIULIVI, C.; DAVIES, K. J. Mechanism of the formation and proteolytic release of H₂O₂-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in hemoglobin and red blood cells. **J Biol Chem.** v.276, n.26, p. 24129-24136, 2001.

GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Reactivity of peroxynitrite versus simultaneous generation of (*)NO and O(2)(*)(-) toward NADH. **Chem Res Toxicol.** v.13, n.8, p. 736-741, 2000.

GROSVELD, F; DILLON, N.; HIGGS, D. The regulation of human globin gene expression. **Baillière's Clin. Haematol.** v.6, n.1. p. 31-55, 1993.

GRUBINA, R. et al. Concerted nitric oxide formation and release from the simultaneous reactions of nitrite with deoxy- and oxyhemoglobin. **J. Biol. Chem.** v.282, n.17, p.12916–12927, 2007.

GUNDUZ, K.; OZTURK, G.; SOZMEN, E. Y. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase activities and plasma nitrite and nitrate levels in patients with Behcet disease and recurrent aphthous stomatitis. **Clin Exp Dermatol.** v.29, n.2, p.176-179, 2004.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem.** v.41, n.12 Pt 2, p.1819-1828, 1995.

HALL, A. et al. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. **Antioxid Redox Signal.** v.15, n.3, p. 795-815, 2011.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem.** v.97, n.6, p. 1634-1658, 2006.

HALLIWELL, J.; GUTTERIDGE, M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4 ed. Oxford University Press. Oxford, UK. 2007. 900p.

HAN, T. H. et al. Regulation of nitric oxide consumption by hypoxic red blood cells. **Proc Natl Acad Sci.** v.100, n.21, p. 12504-12509, 2003.

HAN, Y. H. et al. Peroxiredoxin I deficiency attenuates phagocytic capacity of macrophage in clearance of the red blood cells damaged by oxidative stress. **BMB Reports.** v.45, n.10, p. 560-564, 2012a.

HAN, Y.H. et al. Peroxiredoxin II is essential for preventing hemolytic anemia from oxidative stress through maintaining hemoglobin stability. **Biochem Biophys Res Commun.** v.426, n3, p. 427-32, 2012b.

HANSEN, J. M.; MORIARTY-CRAIGE, S.; JONES, D. P. Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-1 differentially regulate NF-kappaB activities. **Free Radic Biol Med.** v.43, n.2, p. 282-288, 2007.

HARRIS, J. R. Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghosts. **J Mol Biol.** v.46, n.2, p. 329-335, 1969.

HEBBEL, R. P. et al. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. **Clin. Invest.** v.70, n.6, p. 1253-1259, 1982.

HEBBEL, R.P. et al. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.83, n.1, p. 237-241, 1988.

HERBETTE, S.; ROECKEL-DREVET, P.; DREVET, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. **Febs J.** v.274, n.9, p. 2163-2180, 2007.

HIGGS, D. R. β -thalassemia. **Baillière's Clin. Haematol.** v.6, n.1, p. 117-150, 1993.

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G. Long-range regulation of alpha globin gene expression during erythropoiesis. **Curr. Opin. Hematol.** v.15, n.3, p. 176-183, 2008.

- HOFFMAN, R. et al. **Hematology: Basic Principles and Practice**. 2nd ed. New York, Churchill Livingstone – ELSEVIER, 2008.
- HOLMGREN, A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. **Antioxid Redox Signal**. v.2, n.4, p. 811-820, 2000.
- HOLMGREN, A.; LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. **Biochem Biophys Res Commun**. v.396, n.1, p. 120-124, 2010.
- HONIG, G. R.; ADAMS III, J. G. **Human hemoglobin genetics**. New York: Springer Verlag, 1986. 467p.
- HORTA, B. B. et al. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: catalytic mechanism and high reactivity. **J Biol Chem**. v.285, n.21, p. 16051-16065, 2010.
- HUISMAN H, J. et al. HbVar: A HbVar: A relational database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations at the globin gene server. **Hum Mutat**. v.19, n.3, p. 225- 233, 1996.
- IMMENSCHUH, S. et al. Up-regulation of heme-binding protein 23 (HBP23) gene expression by lipopolysaccharide is mediated via a nitric oxide-dependent signaling pathway in rat Kupffer cells. **Hepatology**. v.30,n.1, p.118–127, 1999.
- INOUE, M. et al. Free radical theory of apoptosis and metamorphosis. **Redox Rep**. v.9, n.5, p. 237-247, 2004.
- ITOH, K. et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant response elements by Nrf2 through binding to the amino terminal Neh2 domain. **Genes Dev**. v.13,n.1, p. 76–86, 1999.
- ISHII, T., WARABI, E., YANAGAWA, T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v.50, n 2, p. 91-105, 2012.
- IWAI, K.; NAGANUMA, A; KUGE, S. Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkylhydroperoxides to induce disulfide bond formation in the Cad1 transcription factor. **J Biol Chem**. v.285, n.14, p. 10597-10604, 2010.
- JANG, H. H. et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell**. v.117, n.5, p. 625-635, 2004.

JAYAKUMAR, T.; RAMESH, E.; GERALDINE, P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats. **Food Chem Toxicol.** v.44, n.12, p.1989-1996, 2006.

JO, P.G.; CHOI, Y.K.; CHOI, C.Y. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** v.147, n.4, p. 460-469, 2008.

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Mol Aspects Med.** v.26, n.4-5, p. 340-352, 2005.

JOHNSON, R. M. et al. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. **Free Radic Biol Med.** v.39, n.11, p. 1407-1417, 2005.

JÖNSSON, T.J.; ELLIS, H.R; POOLE, L.B. Cysteine reactivity and thiol-disulfide interchange pathways in AhpF and AhpC of the bacterial alkyl hydroperoxide reductase system. **Biochemistry.** v.46, n.19, p. 5709-5721, 2007.

JOSHI, W.,L. et al. Increased sensitivity of isolated alpha subunits of normal human hemoglobin to oxidative damage and crosslinkage with spectrin. **J. Lab. Clin. Med.** v.102, n.1, p. 46-52, 1983.

KABE, Y. et al. Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. **Antioxid Redox Signal.** v.7, n.3-4, p. 395-403, 2005.

KANG, S. W. et al. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. **J. Biol. Chem.** v.273, n.11, p. 6297-6302, 1998.

KANG, S. W. et al. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. **Trends Mol Med.** v.11, n.12, p. 571-578, 2005.

KANIAS, T.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells--the struggle with hemoglobin oxidation. **Febs J.** v. 277, n.2, p. 343-356, 2010.

KATTAMIS, A. C. et al. Human β -thalassemia syndromes: detection of molecular defects. **Am. J. Hematol.** v. 53, p. 81-91, 1996.

KEIKHAEI, B. et al. Altered levels of pro-inflammatory cytokines in sickle cell disease patients during vaso-occlusive crises and the steady state condition. **Eur Cytokine Netw.** v.24, n.1, p. 45-52, 2013.

KENNETT, E. C. et al. Investigation of methaemoglobin reduction by extracellular NADH in mammalian erythrocytes. **Int J Biochem Cell Biol.** v.37, n.7, p. 1438-1445, 2005.

KIM, Y. J. et al. Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex. **Cancer Res.** v.66, n.14, p. 7136–7142, 2006.

KIM, S. Y.; KIM, T. J.; LEE, K. Y. A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway. **FEBS Lett.** v.582, n.13, p. 1913–1918, 2008.

KIM, S. U. et al. Peroxiredoxin I is an indicator of microglia activation and protects against hydrogen peroxide-mediated microglial death. **Biol. Pharm. Bull.** v.31, n.5, p. 820-825, 2008.

KIM, K., M. Yu, et al. (2009). Expression of human peroxiredoxin isoforms in response to cervical carcinogenesis. **Oncol Rep.** v.21, n.6, p.1391-1396, 2009.

KINNULA, V. L. et al. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. **J Pathol.** v.196, n.3, p. 316-323, 2002.

KHATTAB, A. D; RAWLINGS, B., ALI, I. S. Care of patients with haemoglobin abnormalities: history and biology. **Br J Nurs.** 2006; v.15, n.18, p. 994-8, 2006.

KLEINBONGARD, P.; KEYMEL, S.; KELM, M. New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood. **Thromb Haemost.** v.98, n.5, p. 970-974, 2007.

KLEINBONGARD, P. et al. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. **Blood.** v.107, n.7, p. 2943-2951, 2006.

KLOMSIRI, C. et al. Novel roles of ohrR-ohr in Xanthomonas sensing, metabolism, and physiological adaptive response to lipid hydroperoxide. **J Bacteriol.** v.187, n.9, p. 3277-3281, 2005.

KNOOPS, B. et al. Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. **Antioxid Redox Signal.** v.15, n.3, p. 817-829, 2011.

KRUKOSKI, D. W. et al. Effect of vitamin C, deferoxamine, quercetin and rutin against tert-butyl hydroperoxide oxidative damage in human erythrocytes. **Hematology.** v.14, n.3, p. 168-172, 2009.

KUHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radic Biol Med.** v.33, n.2, p. 154-172, 2002.

KUHN, H.; THIELE, B. J. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. **FEBS Lett.** v.449, n.1, p. 7-11, 1999.

KUMSTA, C.; JAKOB, U. Redox-regulated chaperones. **Biochemistry**. v.48, n.22, p. 4666-4676, 2009.

KUSHNER, J.P., J.P. PORTER & N.F. OLIVIERI. Secondary iron overload. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**. p. 47–61, 2001.

LEE, T. H. et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. **Blood**. v.101, n.12, p. 5033-5038, 2003.

LABIE, D.; ELION, J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia. **Pathol Biol**. v.47, n.1, p. 7-12, 1999.

LEE, S. K. et al. Exogenous nitric oxide inhibits VCAM-1 expression in human peritoneal mesothelial cells. Role of cyclic GMP and NF-kappaB. **Nephron**. v.90, n.4, p. 447-54, 2002.

LEONELI, G. G. et al. Hemoglobinas anormais e dificuldade diagnóstica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.22, n.3, 2000.

LIU, H. et al. Increased RhoGDI2 and peroxiredoxin 5 levels in asthmatic murine model of beta2-adrenoceptor desensitization: a proteomics approach. **Chin Med J (Engl)**. v.121, n.4, p. 355-362, 2008.

LOW, F. M. et al. Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. **Blood**. v.109, n.6, p. 2611-2617, 2007.

LOW, F.M.; HAMPTON, M.B.; WINTERBOURN, C.C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. **Antioxid Redox Signal**. v.10, n.9, p. 1621-1630, 2008.

MAGGIO, A.; CARONIA, F.; RUSSO, G. **Clinica e terapia della talassemia**. Limena: Libreria Universitaria, 2000. p. 61-94.

MANEVICH, Y.; FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. **Free Radic Biol Med**. v.38, n.11, p. 1422–1432, 2005.

MANTA, B. et al. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. **Arch Biochem Biophys**. v.484, n.2, p. 146-154, 2009.

MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. **J Dermatol Sci**. v.58, n.2, p. 85-90, 2010.

MATTE A. et al. Peroxiredoxin-2 expression is increased in beta-thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** v.49, n.3, p. 457–466, 2010.

MATIAS, A. C. et al. Down-regulation of fatty acid synthase increases the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* cells to H₂O₂. **Free Radic Biol Med.** v.43, n.10, p. 1458-1465, 2007.

MEISSNER, U. et al. Formation, TEM study and 3D reconstruction of the human erythrocyte peroxiredoxin-2 dodecahedral higher-order assembly. **Micron.** v.38, n.1, p. 29-39, 2007.

MIGLIACCIO, A. R.; PAPAYANNOPOULOU, T. Erythropoiesis. In: STEINBERG, M. H. et al. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management.** Cambridge University Press, 2001. p. 52-71.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur J Clin Invest.** v.21, n.4, p. 361-374, 1991.

MONTEIRO, G. et al. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proc Natl Acad Sci.** v.104, n.12, p. 4886-4891, 2007.

MOORE R.B. et al. Calpromotin, a cytoplasmic protein, is associated with the formation of dense cells in sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.** v.56, n.2, p. 100-106, 1997.

MOROT-GAUDRY-TALARMAIN, Y. Physical and functional interactions of cyclophilin B with neuronal actin and peroxiredoxin-1 are modified by oxidative stress. **Free Radic Biol Med.** v.47, n.12, p. 1715-1730, 2009.

MULLER, F. L. et al. Trends in oxidative aging theories. **Free Radic Biol Med.** v.43, n.4, p. 477-503, 2007.

MURPHY, S. C. et al. Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. **Blood.** v.103, n.5, p. 1920-1928, 2004.

NAGEL, R.L. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. **Einstein Q.J.Biol.Med.** v.2, n.1, p. 53-62, 1984.

NAGEL, R. L.; STEINBERG, M. H. Genetics of β^S gene: origins, genetic, epidemiology, and epistasis in sickle cell anemia. In: STEINBERG, M. H. et al. **Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology and clinical management.** Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 711-755.

NAGY, N. et al. Targeted disruption of peroxiredoxin 6 gene renders the heart vulnerable to ischemia-reperfusion injury. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v.291, n.6, p.2636-2640, 2006.

NAKAMURA, T. et al. Oxidation of archaeal peroxiredoxin involves a hypervalent sulfur intermediate. **Proc Natl Acad Sci.** v.105, n.17, p. 6238-6242, 2008.

- NETTO, L. E.; STADTMAN, E. R. The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical chain of reactions. **Arch Biochem Biophys.** v.333, n.1, p. 233-242, 1996.
- NEUMANN, C. A. et al. Essential role for the peroxiredoxin PRDX1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. **Nature.** v.424, n.6948, p. 561-565, 2003.
- NEUMANN, C. A.; FANG, Q. Are peroxiredoxins tumor suppressors? **Curr Opin Pharmacol.** v.7, n.4, p. 375-380, 2007.
- NEUMANN, C. A.; CAO, J.; MANEVICH, Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. **Cell Cycle.** v.8, n.24, p. 4072-4078, 2009.
- NUR, E. et al. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **Am J Hematol.** v.86, n.6, p. 484-9, 2011.
- ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. **Indian J Med Res.** v.134, p. 532-537, 2011.
- OGASAWARA, Y.; FUNAKOSHI, M.; ISHII, K. Glucose metabolism is accelerated by exposure to t-butylhydroperoxide during NADH consumption in human erythrocytes. **Blood Cells Mol Dis.** v.41, n.3, p. 237-243, 2008.
- OGUSUCU, R. et al. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. **Free Radic Biol Med.** v.42, n.3, p. 326-334, 2007.
- OLD, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.** v. 67, n. 1, p. 71-86, 2007.
- OLIVEIRA, M. A. Structural insights into enzyme-substrate interaction and characterization of enzymatic intermediates of organic hydroperoxide resistance protein from *Xylella fastidiosa*. **J Mol Biol.** v.359, n.2, p. 433-445, 2006.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. **Biochemistry.** v.49, n.15, p. 3317-3326, 2010.
- ORKIN, S. H.; ANTONARAKIS, S. E.; KAZAZIAN, J. R. Polymorphism and molecular pathology of the human beta globin gene. **Prog Hematol.** v.13, p. 49-73, 1983.
- OSAROGIAGBON, U.R. et al. Reperfusion injury pathophysiology in sickle transgenic mice. **Blood.** v.96, n.1, p. 314-20, 2000.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev.** v.87, n.1, p. 315-424. 2007.

PANDEY, K. B; RIZVI, S. I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. **Oxid Med Cell Longev.** v.3, n.1, p. 2-12, 2010.

PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal.**, v. 9, n. 7, p. 755-806, 2007.

PARK, S. H. et al. Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. **Clin Cancer Res.** v.6, n.12, p. 4915-4920, 2000.

PARSONAGE, D. et al. Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin. **Biochemistry.** v.44, n.31, p. 10583-10592, 2005.

PERUTZ, M. F. et al. Structure of hemoglobin. **Nature.** v.185, p. 416-420, 1960.

POWARS, R.D. β^S -gene-cluster haplotypes in sickle cell anemia. In: NAGEL, R.L. Hemoglobinopathies, **Hematology/Oncology Clinics of North America.** v.5, n.3, p. 475-93, 1991.

QUEIROZ, R. F.; LIMA, E.S. Oxidative stress in sickle cell disease. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v.35, n.1, p. 16-17, 2013.

RAHGOZAR, S. et al. Beta S gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. **American Journal of hematology.** v.65, n.3, p. 192-195, 2000.

RAMOS, C. L. et al. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **J Biol Chem.** v.267, n.12, p. 8307-12, 1992.

RAPOPORT, S. M. **The reticulocyte.** Boca Raton, FL.; CRC Press Inc, 1986.

RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radic Biol Med.** v.38, n.12, p.1543-1552, 2005.

RHEE, S. G. Cell signaling. H_2O_2 , a necessary evil for cell signaling. **Science.** v.312, n.5782, p. 1882-1883, 2006.

RHEE, S. G. et al. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. **J Biol Chem.** v.287, n.7, p. 4403-10, 2012.

RIDDELL, J. R. et al. Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. **J Immunol.** v.184, n.2, p. 1022-1030, 2010.

RIBEIRO, D. M.; SONATI, M. F. Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia. **Genet Mol Res.** v.7, n.4, p. 1045-1053, 2008.

RIBEIRO, D. M. et al. Influence of the polymorphisms of the alpha-major regulatory element HS-40 on in vitro gene expression. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 42, n. 9, p. 783-796, 2009.

RIVELLA, S. Ineffective erythropoiesis and thalassemias. **Curr Opin Hematol.** v.16, n.3, p. 187-194, 2009.

ROMERO, N.; DENICOLA, A.; RADII, R. Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite. **IUBMB Life.** v.58, n.10, p. 572-580, 2006.

ROSSE, W.F. et al. New views of sickle cell disease, pathophysiology and treatment. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.** p. 2-17, 2000.

RUSANOVA, I. et al. Oxidative Stress Status, Clinical Outcome, and beta-Globin Gene Cluster haplotypes in Sickle Cell Pediatric Patients. **Eur J Haematol.** v.85, n.6, p. 529-537, 2010.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood,** v.112, n.10, p. 3927-3938, 2008.

SCHRODER, E. et al. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 angstrom resolution. **Structure.** v.8, n.6, p. 605-615, 2000.

SCOTT, M. D. et al. Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense. **Blood.** v.74, n.7, p. 2542-2549, 1989.

SCOTT MD, et al. Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. **J. Clin. Invest.** v.91, n.4, p.1706-1712, 1993.

SEMIGHINI, C. P.; HARRIS, S. D. Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. **Genetics.** v.179, n.4, p. 1919-1932, 2008.

SENSI, M. et al. Peptides with dual binding specificity for HLA-A2 and HLA-E are encoded by alternatively spliced isoforms of the antioxidant enzyme peroxiredoxin 5. **Int Immunol.** v.21, n.3, p. 257-268, 2009.

SERJEANT, G.R.; SERJEANT, B.E. **Sickle cell disease.** Oxford University Press, New York. 3 ed, 2001.

SHALEV, O. et al. Abnormal erythrocyte calcium homeostasis in oxidant-induced hemolytic disease. **Blood.** v.58, n.6, p.1232-1235, 1981.

SINGER, T. S. Variable Clinical Phenotypes of α -Thalassemia Syndromes. **TheScientificWorldJOURNAL.** v.9, p. 615-625, 2009.

SONATI, M. F; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. **J Pediatr.** v.84, n.4, 40-51, 2008.

STACEY, M. M. et al. Chloramines and hypochlorous acid oxidize erythrocyte peroxiredoxin 2. **Free Radic Biol Med.** v.47, n.10, p. 1468-1476, 2009.

STADTMAN, E. R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radic Biol Med.** v.9, n.4, p. 315-325, 1990.

STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. **Exp. Hematol.** v.33, n.3, p. 259-271, 2005.

STEINBERG, D. et al. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med.** v.320, v.14, p. 915-924, 1989.

STEINBERG, M.H. et al. **Disorders of Hemoglobin.** Cambridge University Press. 2001.

STEINBERG, M. H, BRUGNARA, C. Pathophysiological-Based Approaches to Treatment of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Medicine.** v.54, p. 89-112, 2003.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** v.129, n.4, p. 465-81, 2005.

STEINBERG, M. H. et al. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. In: Hoffman, R. et al. **Hematology: Basic Principles and Practice.** 4 ed. Livingstone: Elsevier Churchill, 2005. p. 442-454.

STONE, J. R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. **Antioxid Redox Signal.** v.8, n.3-4, p. 243-270, 2006.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet.** v.364, n.9442, p. 1343-1360, 2004.

STURTZ, L. A. et al. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. **J. Biol. Chem.** v.276, n.41, p. 38084–38089, 2001.

SUTTON, M.; BOUHASSI, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase Chain Reaction Amplification Applied to the determination of b-like globin gene cluster haplotypes. **Am.J.Hematol.** v.32, n.1, p. 66-69, 1989.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat Rev Drug Discov.** v.6, n.8, p. 662-680, 2007.

TANG, T. K. Free radical theory of erythrocyte aging. **J Formos Med Assoc.** v.96, n.10, p. 779-783, 1997.

THEIN, S. L. Beta-thalassaemia. **Baillieres Clin Haematol.** v.11, n.1, p.91-126, 1998.

TELEN, M.; KAUFMAN, R. The mature erythrocyte. In: GREER, J. P. et al. **Wintrobe's Clinical Hematology.** Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p. 217-247.

TSIFTSOGLU, A. S.; VIZIRIANAKIS, I. S.; STROUBOULIS, J. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. **IUBMB Life.** v.61, n.8, p. 800-830, 2009.

ULKER, P. et al. Mechanical stimulation of nitric oxide synthesizing mechanisms in erythrocytes. **Biorheology.** v.46, n.2, p.121-132, 2009.

VILA, A.; KORYTOWSKI, W.; GIROTTI, A. W. Spontaneous transfer of phospholipid and cholesterol hydroperoxides between cell membranes and low-density lipoprotein: assessment of reaction kinetics and prooxidant effects. **Biochemistry.** v.41, n.46, p.13705-13716, 2002.

VILAS-BOAS, W. et al. Sickle cell disease: Only one road, but different pathways for inflammation. **Advances in Bioscience and Biotechnology.** v.3, n.4, p. 538-550, 2012.

VIVANCOS, A. P. et al. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H₂O₂-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. **Proc Natl Acad Sci.** v.102, n.25, p. 8875-8880, 2005.

VOLPE, E. Blood and circulation. In: DUBUQUE, W. **Biology and Human Concerns.** p. 253-265, Wm.C.Brown, 1993.

YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. **J Clin Invest.** v.107, n.2, p. 135-142, 2001.

YANG, H. Y. et al. The role of peroxiredoxin III on late stage of proerythrocyte differentiation. **Biochem Biophys Res Commun.** v.359, n.4, p.1030-1036, 2007.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **J Clin Pathol.** v.54, n.3, p. 176-186, 2001.

WATANABE, A. M. **Prevalência da anemia falciforme no estado do Paraná.** Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Departamento de Clínica Médica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. **The Thalassaemia syndromes**. 3 ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1981.

WEATHERALL, DJ. The Thalassaemias In: Williams, W. J. et al. **Hematology**. 4 Ed. New York: McGraw Hill Book Company, 1990.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Genetic disorders of hemoglobin. **Semin. Hematol.**, v. 36, n. 4, p. 24-37, 1999.

WEATHERALL, D.J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. **Nat. Rev. Genet.** v.2, n.4, p. 245-255, 2001a.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v.79, n.8, p.704-712, 2001b.

WEATHERALL, D. J. Disorders of globin synthesis: The thalasseмии. In: LICHTMAN, M. A. et al. **Williams Hematology**. 7 ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. p. 633-666.

WEN, S. T.; VAN ETTEN, R. A. The PAG gene product, a stress-induced protein with antioxidant properties, is an Abl SH3-binding protein and a physiological inhibitor of c-Abl tyrosine kinase activity. **Genes Dev.** v.11, n.19, p. 2456-67, 1997.

WENNING, M. R.; SONATI, M. F. Hemoglobinopatias hereditárias. In: LOPES, A.C. **Diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Manole, 2007. p. 310-314.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radic Biol Med.** v.45, n.5, p. 549-561, 2008.

WOOD, Z. A. et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci.** v.28, n.1, p. 32-40, 2003.

WU, G. et al. Arginine nutrition in development, health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v.3, n.1, p. 59- 66, 2000.

XIA, Y. et al. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. **Proc Natl Acad Sci.** v.93, n.13, p.6770-6774, 1996.

XU, Y. et al. Formation of hydrogen peroxide and reduction of peroxynitrite via dismutation of superoxide at reperfusion enhances myocardial blood flow and oxygen consumption in postischemic mouse heart. **J Pharmacol Exp Ther.** v.327, n.2, p. 402-410, 2008.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e práticas**. São Paulo. Editora: Atheneu, 2001. 1442p.

ZAGO, M. A; SILVA JUNIOR, W. A; FRANCO, R. F. Hemoglobinopathies and other hereditary hematological diseases in the brazilian population .**Ciênc. cult.** v.51, n3/4, p. 226-34, 1999.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia**: fundamentos e práticas. São Paulo. Editora: ATHENEU, 2005. 1442p.

ZHANG, J. et al. Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells. **Am J Physiol.** v.288, n.4, p.840 –849, 2005.

ANEXOS**ANEXO 1**

FICHA DE AVALIAÇÃO HEMATOLOGIA (componente do projeto “Avaliação do Papel Biológico de Peroxirredoxinas na Diferenciação Celular Eritróide e em Doenças Genéticas Eritrocitárias.” Coordenador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha).

DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Profissão: _____

Tipo de Anemia: _____

Medicação (se houver): _____

ANTECEDENTES PESSOAIS

() Tabagismo () Alcoolismo () Outros: _____

() Atividade Física. Qual? _____

Frequência (dias por semana): _____

PATOLOGIAS ASSOCIADAS (Hipertensão Arterial, Cardiopatias, Diabetes, etc)

() Sim () Não

Qual/ Quais? _____

Faz uso de medicação para tratamento desta patologia? () Sim () Não

Qual/ Quais? _____

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(resolução 196/96; 340/04; 347/05)**

Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO DE PEROXIRREDOXINAS NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR ERITRÓIDE E EM DOENÇAS GENÉTICAS ERITROCITÁRIAS.

Pesquisadores: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, Prof. Dr. Iran Malavazi, Aderson da Silva Araújo, Marcos André Cavalcanti Bezerra, Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer, Fernando Ferreira Costa, Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira, Karen Simone Romanello, Sheila Tiemi Nagamatsu, Tainá Regina Damaceno Silveira.

Local: UFSCar, HEMOPE e HEMOCENTRO / FCM – UNICAMP.

A finalidade deste projeto é trazer informações para o paciente sobre o estudo “**Avaliação do Papel Biológico de Peroxirredoxinas na Diferenciação Celular Eritróide e em Doenças Genéticas Eritrocitárias.**” Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que o paciente possa ter sobre este termo e sobre o estudo.

Peroxirredoxinas são enzimas responsáveis pela proteção das células contra danos causados por radicais livres. São extremamente abundantes nas células e diversos estudos revelam que estas proteínas estão relacionadas com eventos de proliferação e diferenciação celular. Apesar disso, existem poucos trabalhos relacionando as peroxirredoxinas com a diferenciação eritróide e com anemias hemolíticas como a anemia falciforme, deficiência glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), esferocitose hereditária, hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), alfa e beta talassemias. Portanto, o objetivo deste projeto é avaliar o papel desempenhado por estas enzimas na formação do eritrócito e nas doenças acima citadas, identificando possíveis alvos que auxiliem no manejo da doença e melhora na sobrevivência desses pacientes.

Para participar, caso você queira, deverá doar 2 frascos (4 colheres de sopa cada) de sangue. Essa coleta será feita por um profissional treinado e, no máximo, poderá ficar uma pequena mancha roxa e a região poderá ficar um pouco dolorida. Além disso, serão levantados alguns dados de seu prontuário médico. O material desse estudo, caso você permita, será armazenado no HEMOPE, UNICAMP e UFSCar e somente será utilizado para outros estudos após nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Você terá direito a privacidade e toda informação que for obtida em relação a este estudo permanecerá em sigilo. Os resultados deste projeto poderão ser apresentados em congresso ou em publicações, porém, sua identidade não será divulgada nessas apresentações.

A participação neste estudo é voluntária e você pode recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento sem prejuízos, inclusive retirando o material biológico. Além disso, você terá direito a qualquer esclarecimento sobre o estudo mesmo durante o seu decorrer, basta ligar para o telefone do pesquisador.

Eu, _____, declaro ter recebido todas as informações relativas ao estudo “Avaliação do Papel Biológico de Peroxirredoxinas na Diferenciação Celular Eritróide e em Doenças Genéticas Eritrocitárias”. Autorizo a coleta de amostras de sangue periférico que serão utilizadas nesse estudo.

Outros pontos importantes foram enfatizados:

- 1- Ampla liberdade de recusar-me a participar do estudo ou retirar meu consentimento ou amostra biológica em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo.
- 2- Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.
- 3- Garantia de sigilo que assegure a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.
- 4- Quaisquer reclamações quanto ao andamento do projeto ou dos pesquisadores, posso contatar o CEP do HEMOPE e UFSCar.

Portanto, concordo em participar do estudo autorizando a equipe responsável, à manipulação dos dados e ao armazenamento de material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros depois de submetidos ao CEP e ao CONEP.

Consentimento para participação no estudo:

Autorização para armazenamento de material biológico:

Voluntário/ Responsável

Sim Não

Voluntário/ Responsável

Pesquisador responsável

POINT MUTATION

Edited by **Colin Logie**

Contents

	Preface	IX
	Part 1 Current Views on Point Mutation Theory	1
Chapter 1	Point Mutations, Their Transition Rates and Involvements in Human and Animal Disorders	3
	Viliam Šnábel	
Chapter 2	Bioinformatical Analysis of Point Mutations in Human Genome	15
	Branko Borštnik and Danilo Pumpernik	
Chapter 3	Estimating Human Point Mutation Rates from Codon Substitution Rates	31
	Kazuharu Misawa	
	Part 2 Point Mutation in Viruses: From Drug Resistance to Vaccination	43
Chapter 4	Point Mutations and Antiviral Drug Resistance	45
	José Arellano-Galindo, Blanca Lilia Barron, Yelianezi Vargas-Infante, Enrique Santos-Esteban, Emma del Carmen Herrera-Martínez, Norma Velázquez-Guadarrama and Gustavo Reyes-Teran	
Chapter 5	Point Mutations Associated with HIV-1 Drug Resistance, Evasion of the Immune Response and AIDS Pathogenesis	93
	Makobetsa Khati and Laura Millroy	
Chapter 6	Recombination and Point Mutations in Type G Rotavirus Strains: The Challenges of Vaccine Development	133
	Abid Nabil Ben Salem, Rouis Zyed, Buesa Javier and Aouni Mahjoub	
Chapter 7	Molecular Attenuation Process in Live Vaccine Generation for Arenaviruses	159
	Sandra Elizabeth Gofii and Mario Enrique Lozano	
	Part 3 Point Mutation in Bacteria: Human Activity-Driven Evolution	183
Chapter 8	Mutational Polymorphism in the Bacterial Topoisomerase Genes Driven by Treatment with Quinolones	185
	Maja Velhner and Dragica Stojanović	
	Part 4 Point Mutation in Eukaryote: From Pathogens to Cigarette Smoke	211
Chapter 9	Point Mutation in Surveillance of Drug-Resistant Malaria	213
	Sungano Mharakunwa	
Chapter 10	Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia	227
	Anderson Ferreira da Cunha, Iran Malavazi, Karen Simone Romanello and Cintia do Couto Mascarenhas	
Chapter 11	Point Mutations That Reduce Erythrocyte Resistance to Oxidative Stress	255
	Dmitry Volosnikov and Elena Serebryakova	
Chapter 12	Point Mutations in Ferroportin Disease: Genotype/Phenotype Correlation	285
	Riad Akourm	
Chapter 13	p53: Point Mutations, SNPs and Cancer	301
	Ming Fang, Iva Simeonova and Franck Toledo	
Chapter 14	Transgenerational Effects of Maternal Nicotine Exposure During Gestation and Lactation on the Respiratory System	323
	G. S. Maritz	
Chapter 15	Synthetic Point Mutagenesis	335
	Roman A.G. Schaeken, Joke J.F.A. van Vugt and Colin Logie	

Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia

Anderson Ferreira da Cunha¹, Iran Malavazi¹,
Karen Simone Romanello¹ and Cintia do Couto Mascarenhas²

¹*Departamento de Genética e Evolução,
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
Universidade Federal de São Carlos,*

²*Centro de Hematologia e Hemoterapia,
Universidade Estadual de Campinas,
Brazil*

1. Introduction

Hemolytic anemias are a group of diseases characterized by a reduction in red blood cells (RBC) life span mainly caused by a deregulation in the hemoglobin formation. Among these diseases, Sickle Cell Disease (SCD) and Beta Thalassemia (β Thal) are the most common disorders involved in the premature destruction of RBC. Understanding the molecular mechanisms involved in the outcome of these diseases as well as the metabolic pathways surrounding its onset constitutes a very useful approach to target treatment strategies for such diseases. In this chapter we will discuss the state-of-the-art aspects about this theme highlighting the importance of several point mutations in hemolytic anemia using β thalassemia and sickle cell disease as examples. In addition, the molecular aspects involved in the Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH), also an important disorder caused by point mutations and deletions, and its association with the severity of β Thal and SCD will be also discussed. In this context lies the manifestation of better prognostic to patients having an increase in fetal hemoglobin and SCD or β Thal concomitantly. Therefore a parallel discussion towards the advances currently described in the literature and associations of gene expression and different drugs that increase the production of fetal hemoglobin (HbF) are pointed out as a mechanism to improve the quality of life of SCD and β Thal patients.

Link de acesso: <http://www.intechopen.com/books/point-mutation>