

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

**KAREN SIMONE ROMANELLO**

**ANÁLISE DE GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDOS NO ESTADO REDOX DE  
RETICULÓCITOS E ERITRÓCITOS DE PACIENTES BETA TALASSÊMICOS OU  
COM ANEMIA FALCIFORME**

**SÃO CARLOS**

**2018**

**KAREN SIMONE ROMANELLO**

**ANÁLISE DE GENES E PROTEÍNAS ENVOLVIDOS NO ESTADO REDOX DE  
RETICULÓCITOS E ERITRÓCITOS DE PACIENTES BETA TALASSÊMICOS OU  
COM ANEMIA FALCIFORME**

Tese 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 Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

**Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha**

**SÃO CARLOS**

**2018**



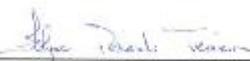
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

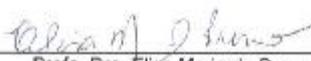
Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa da Tese de Doutorado da candidata Karen Simone Romanello, realizada em 27/06/2018:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Danilo Grünig  
UNESP

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para suportar todos os momentos difíceis;

À minha família por me darem todo o suporte necessário para que eu chegasse até aqui;

Ao meu orientador, Professor Dr. Anderson Ferreira da Cunha, a quem eu sou imensamente grata pela oportunidade de realizar esse trabalho, por todos esses anos de conhecimentos compartilhados, pela generosidade e otimismo inabalável;

Ao Professor Dr. Iran Malavazi que sempre foi muito solícito quando precisei;

Aos meus colegas e ex-colegas de laboratório, especialmente à Karina e ao João, cuja contribuição para esse trabalho tem um valor inestimável, não existem palavras para expressar a minha gratidão a vocês;

Aos meus co-orientados, Caroline, Fernanda, Mariana e Michael, foi um privilégio trabalhar com vocês durante 4 anos, aprendi muito com cada um;

Às nossas técnicas Bruna e Rose pela infinita paciência e por cuidarem tão bem do nosso laboratório;

Aos nossos colaboradores da Fundação HEMOPE, especialmente ao Professor Dr. Marcos André, Igor e Diego, e ao hemocentro de Campinas sem os quais a realização desse trabalho não seria possível;

Aos pacientes e voluntários que participaram deste trabalho;

À todos os funcionários do Departamento de Genética e Evolução que sempre foram muito atenciosos;

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

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

## RESUMO

Embora não seja a etiologia primária de doenças como a beta talassemia e a anemia falciforme, o dano oxidativo desempenha um papel crucial no agravamento dessas enfermidades, contribuindo para a hemólise e a curta sobrevivência das células vermelhas na circulação. Dentre os mecanismos de combate ao estresse oxidativo, estão as defesas antioxidantes enzimáticas como a SOD1, CAT, GPX1 e PRDXs, sendo que estas últimas se destacam pela sua abundância e grande reatividade com seus substratos. Este trabalho teve como objetivo principal associar os níveis das PRDXs 1, 2 e 6 e dos redutores TRX1, TRXR1 e SRX1 com a elevada produção de EROS observada em pacientes com beta talassemia intermediária (BTI) e anemia falciforme. Adicionalmente, analisamos a produção da SOD1, CAT e GPX1, bem como do complexo NRF2/KEAP1/PKC $\delta$ , conhecido por regular a expressão das enzimas envolvidas nesse trabalho. Para fins comparativos, analisamos os níveis proteicos das PRDXs 1, 2 e 6 em pacientes com o fenótipo da beta talassemia maior (BTM). Nossos resultados mostraram níveis significativamente aumentados de PRDX1 em BTI quando comparados a indivíduos saudáveis e BTM, enquanto a PRDX2 mostrou-se mais elevada em BTM. Entretanto, os níveis de superoxidação dessa enzima também são mais altos nesses pacientes, sugerindo que a reciclagem da enzima está limitando o ciclo catalítico geral. Além disso, observamos um aumento nos níveis de TRX1 e SOD1 em BTI em relação aos indivíduos saudáveis, indicando um mecanismo adicional para reduzir os altos níveis de EROS observados nesses pacientes. Nossos dados também sugerem a participação do fator de transcrição NRF2 na regulação das enzimas antioxidantes analisadas neste trabalho. Com relação aos pacientes com anemia falciforme os resultados obtidos quando comparados aos de indivíduos sadios mostraram: redução do conteúdo proteico da PRDX2, indicando maior vulnerabilidade dessas células ao ataque de EROS. No meio extracelular, as PRDXs 1 e 2 mostraram um expressivo aumento nos pacientes analisados. O complexo NRF2/KEAP1/PKC $\delta$  mostrou significativa redução em sua expressão gênica, indicando uma possível limitação da resposta antioxidante nesses pacientes. Nossos dados ampliam o conhecimento da literatura e revelam a regulação de novos alvos que podem ser avaliados para um melhor entendimento destas doenças.

Palavras-chave: beta talassemia, anemia falciforme, antioxidantes, peroxirredoxinas, redutores, 2-Cys PRDX, reguladores da resposta antioxidante.

## ABSTRACT

Although not the primary etiology of diseases such as beta-thalassemia and sickle cell anemia, oxidative damage plays a crucial role in the aggravation of these diseases, contributing to the hemolysis and the short survival of the red cells in the circulation. Among the mechanisms to combat oxidative stress are the enzymatic antioxidant defenses such as SOD1, CAT, GPX1, and PRDXs, and the latter stand out for their abundance and high reactivity with their substrates. The main objective of this study was to associate the levels of PRDXs 1, 2 and 6 and its reducers TRX1, TRXR1 and SRX1 with the high ROS production observed in patients with beta-thalassemia intermedia (BTI) and sickle cell anemia. In addition, we analyzed the production of SOD1, CAT, and GPX1, as well as the NRF2/KEAP1/PKC $\delta$  complex, known to regulate the expression of enzymes involved in this work. For comparative purposes, we analyzed the protein levels of PRDXs 1, 2 and 6 in patients with the beta-thalassemia major phenotype (BTM). Our results showed significantly increased levels of PRDX1 in BTI when compared to healthy subjects and BTM, whereas PRDX2 was shown to be higher in BTM. However, the superoxidation levels of this enzyme are also higher in these patients, suggesting that the recycling of this enzyme is limiting the overall catalytic cycle. In addition, we observed an increase in the levels of TRX1 and SOD1 in BTI compared to healthy individuals, indicating an additional mechanism to reduce the high levels of ROS observed in these patients. Our data also suggest the participation of the NRF2 transcription factor in the regulation of the antioxidant enzymes analyzed in this work. With regard to patients with sickle cell anemia, the results obtained when compared to those of healthy individuals showed: reduction of the protein content of PRDX2, indicating a greater vulnerability of these cells to the EROS attack. In the extracellular environment, PRDXs 1 and 2 showed an expressive increase in the analyzed patients. The NRF2/KEAP1/PKC $\delta$  complex showed a significant reduction in their gene expression, indicating a possible limitation of the antioxidative response in these patients. Our data broaden the knowledge of the literature and reveal the regulation of new targets that can be evaluated for a better understanding of these diseases.

Keywords: beta-thalassemia, sickle cell anemia, antioxidants, peroxiredoxins, reducers, 2-Cys PRDX, antioxidant response regulators.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática do processo de eritropoese.....	17
<b>Figura 2.</b> Representação da estrutura de uma molécula de hemoglobina adulta A <sub>1</sub> normal ...	18
<b>Figura 3.</b> Produção dos diferentes tipos de hemoglobina durante o desenvolvimento ontogenético normal.....	20
<b>Figura 4.</b> Fisiopatologia da anemia falciforme .....	24
<b>Figura 5.</b> Mecanismos associados a vaso-oclusão em pacientes com anemia falciforme .....	25
<b>Figura 6.</b> Haplótipos associação à anemia falciforme.....	27
<b>Figura 7.</b> Mecanismos moleculares que causam beta talassemia.....	29
<b>Figura 8.</b> Mecanismos fisiopatológicos da beta talassemia .....	32
<b>Figura 9.</b> Eventos oxidativos na medula óssea e na circulação.....	42
<b>Figura 10.</b> Representação do mecanismo catalítico da superóxido dismutase 1.....	44
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do mecanismo catalítico da catalase.....	45
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática do ciclo catalítico da glutathione peroxidase.....	46
<b>Figura 13.</b> Representação dos mecanismos catalíticos das PRDXs e seus redutores fisiológicos .....	49
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática da via de sinalização de NRF2 .....	54
<b>Figura 15.</b> Análise produção de EROS em células do sangue .....	68
<b>Figura 16.</b> Análise da expressão gênica das PRDXs 1, 2 e 6 e dos redutores PRDXs 2- Cys em reticulócitos de beta talassêmicos intermediários e indivíduos saudáveis.....	69
<b>Figura 17.</b> Análise dos níveis proteicos das PRDXs 1, 2 e 6 no lisado celular de eritrócitos de pacientes beta talassêmicos intermediários e indivíduos saudáveis .....	70
<b>Figura 18.</b> Análise dos níveis proteicos dos redutores PRDXs 2- Cys no lisado celular de eritrócitos de pacientes beta talassêmicos intermediários e indivíduos saudáveis .....	71
<b>Figura 19.</b> Análise comparativa dos níveis proteicos das PRDXs 1, 2 e 6 entre beta talassêmicos intermediários e maiores .....	73
<b>Figura 20.</b> Análise dos níveis de superoxidação das 2-Cys PRDXs em pacientes com beta talassemia intermediária e maior .....	74
<b>Figura 21.</b> Análise de expressão gênica da <i>SOD1</i> , <i>CAT</i> e <i>GPX1</i> em indivíduos saudáveis e pacientes beta talassêmicos intermediários .....	75
<b>Figura 22.</b> Análise do conteúdo proteico de <i>CAT</i> , <i>GPX1</i> e <i>SOD1</i> .....	76
<b>Figura 23.</b> Análise da expressão gênica de <i>NRF2</i> , <i>KEAP1</i> e <i>PKCδ</i> em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com beta talassemia intermediária.....	77
<b>Figura 24.</b> <i>PRDX1</i> e <i>TRX1</i> na supressão da via apoptótica <i>ASK1</i> , <i>JNK</i> e <i>p66shc</i> .....	79
<b>Figura 25.</b> Determinação dos níveis de EROS em células do sangue periférico de pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis .....	83
<b>Figura 26.</b> Análise de expressão gênica e conteúdo proteico das PRDXs 1, 2 e 6 em indivíduos saudáveis e com anemia falciforme .....	84
<b>Figura 27.</b> Análise de expressão gênica e conteúdo proteico dos redutores 2-Cys PRDXs em indivíduos saudáveis e com anemia falciforme .....	85

<b>Figura 28.</b> Análise dos níveis de PRDX1 e PRDX2 no plasma de indivíduos saudáveis e com anemia falciforme.....	86
<b>Figura 29.</b> Análise da expressão gênica e do conteúdo proteico da SOD1, CAT e GPX1 em indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme .....	87
<b>Figura 30.</b> Análise da expressão gênica do complexo NRF2/KEAP1/PKC $\delta$ , regulador da transcrição de enzimas antioxidantes .....	88
<b>Figura 31.</b> Mecanismo proposto para a superoxidação e degradação da PRDX2 pelo proteossoma .....	91
<b>Figura 32.</b> Representação esquemática da secreção das PRDXs 1 e 2 sua atuação no meio extracelular .....	92
<b>Figura 33.</b> Representação esquemática das conclusões obtidas com relação a beta talassemia .....	94
<b>Figura 34.</b> Representação esquemática das conclusões obtidas com relação a anemia falciforme .....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Exemplos de mutações associadas a beta talassemia .....	30
<b>Tabela 2.</b> Dados hematológicos dos pacientes beta talassêmicos .....	58
<b>Tabela 3.</b> Haplótipos dos pacientes com anemia falciforme .....	59
<b>Tabela 4.</b> Dados hematológicos dos pacientes com anemia falciforme .....	59
<b>Tabela 5.</b> Sequência de <i>Primers</i> .....	64
<b>Tabela 6.</b> Matriz para Padronização da Concentração Ótima de <i>Primers Forward e Reverse</i>	65
<b>Tabela 7.</b> Parâmetros de importância para os <i>primers</i> caracterizados .....	66

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4-ANE -	4-hidroxi-2-noneal
A -	Adenina
AF -	Anemia Falciforme
AP-1-	Activator Protein 1
ARE-	<i>Antioxidant Response Element</i>
Arg -	Arginina
ASK1 -	<i>Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1</i>
ATP -	Trifosfato de adenosina
BAC -	Gene constitutivo beta actina
Ben-	Haplótipo Benin
C -	Citosina
Cam -	Haplótipo Camarões
CAR -	Haplótipo Bantu ou República Centro Africana
CAT -	Catalase
cDNA -	DNA complementar
CEP -	Comitê de ética em pesquisa
CuZnSOD -	Superóxido Dismutase Cobre e Zinco
Cys <sub>P</sub> -	Cisteína Peroxidásica
Cys <sub>R</sub> -	Cisteína de Resolução
DAMPs-	Padrões Moleculares Associados a Danos
DCFH-DA-	2,7- Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
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 -	Glutaciona peroxidase
GSTpi -	Glutaciona S-transferase PI
GSH-	Glutaciona Reduzida
Hb -	Hemoglobina
HbF -	Hb fetal
HbS -	Hemoglobina S
HCM-	Hemoglobina corpuscular média
HPRT1-	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
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
KEAP1-	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LCR -	Região controladora do locus
LDL-	<i>Low-density lipoprotein</i>
LPS-	Lipopolissacarídeos
MAD -	Malondialdeído

MetHb-	Metahemoglobina
MnSOD -	Superóxido dismutase manganês
NADPH –	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NFKB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NO –	Óxido Nítrico
NOX-	Oxidases
NRF2-	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PAMPs-	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
PKCδ-	<i>Protein kinase C delta</i>
qPCR -	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PRDX -	Peroxirredoxina
Pro -	Prolina
RNA –	Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub> –	RNA mensageiro
RPM -	Rotações por minuto
Sen -	Haplótipo Senegal
SOD-	Superóxido Desmutase
SRX -	Sulfirredoxina
T -	Timina
TGF-β1 -	<i>Transforming Growth Factor Beta1</i>
Thr -	Treonina
TLR4 -	Toll-like receptor 4
TRX -	Tiorredoxina
TRXR -	Tiorredoxinas Redutases
VCAM-1 -	Molécula de Adesão do Endotélio Vascular-1
VCM-	Volume Corpuscular Médio
VSMC -	Células Vasculares do Músculo Liso

## LISTA DE SIMBOLOS

$\alpha$ -	Alfa
$\beta$ -	Beta
$\delta$ -	Delta
$\varepsilon$ -	Épsilon
$\gamma$ -	Gama
$\zeta$ -	Zeta
$\alpha^1$ -	Alfa 1
$\alpha^2$ -	Alfa 2
$\gamma^A$ -	Gama Adenina
$\gamma^G$ -	Gama Glicina
$O_2$ -	Oxigênio
$CO_2$ -	Dióxido de Carbono
$-CH=$ -	Radicais Metanílicos
$Fe^{2+}$ -	Ferro Divalente
$\mu g$ -	Micrograma
$\mu L$ -	Microlitro
$\mu M$ -	Micromolar
$O_2^{\cdot-}$	Radical ânion Superóxido
$\cdot OH$	Radical Hidroxila
$RO\cdot$	Radical Alcoxila
$ROO\cdot$	Radical Peroxila
$H_2O_2$	Peróxido de Hidrogênio
$HOCl$	Ácido Hipocloroso
$ROOH$	Hidroperóxidos Orgânicos
$LOO\cdot$	Radical Peroxila
$LO\cdot$	Radical Alcoxila
$NO\cdot$	Óxido Nítrico
$NO_2\cdot$	Dióxido de Nitrogênio
$ONOO^-$	Peróxido de Nitrito
$SO_2H$	Ácido Sulfínico
$SO_3H$	Ácido Sulfônico
$SOH$	Ácido Sulfênico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1. A eritropoese e os eritrócitos .....	16
1.2. Hemoglobina: estrutura e função .....	18
1.3. Hemoglobinopatias hereditárias .....	20
1.4. Anemias hemolíticas .....	21
1.5. Anemia Falciforme.....	22
1.5.1. Fisiopatologia .....	22
1.5.2. Vaso-oclusão .....	24
1.5.3. Fatores moduladores da gravidade da doença.....	26
1.6. Beta Talassemia.....	28
1.6.1. Bases Moleculares.....	28
1.6.2. Fisiopatologia .....	31
1.6.3. Classificação Clínica da Beta talassemia .....	33
1.7. A Célula Eritróide e as Espécies Reativas de Oxigênio.....	35
1.7.1. Ânion Superóxido .....	36
1.7.2. Peróxido de Hidrogênio .....	37
1.7.3. Hidroperóxidos de Lipídeos e Peroxidação Lipídica .....	38
1.7.4. Óxido Nítrico e a Formação de Peroxinitrito .....	39
1.8. Anemias hemolíticas hereditárias e Estresse oxidativo.....	40
1.9. Defesas Celulares contra o Estresse Oxidativo .....	43
1.9.1. Superóxido Dismutase.....	43
1.9.2. Catalase .....	44
1.9.3. Glutathione Peroxidase .....	46
1.9.4. Peroxirredoxinas.....	47
1.10. Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 e a regulação antioxidante .....	53
2. JUSTIFICATIVA.....	55
3. OBJETIVOS.....	56
3.1. Objetivo geral.....	56
3.2. Objetivos Específicos.....	56
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	57
4.1. Aspectos éticos da pesquisa .....	57
4.2. Pacientes e controles .....	57
4.2.1. Pacientes beta talassêmicos e controles .....	57
4.2.2. Pacientes falciformes e controles .....	59

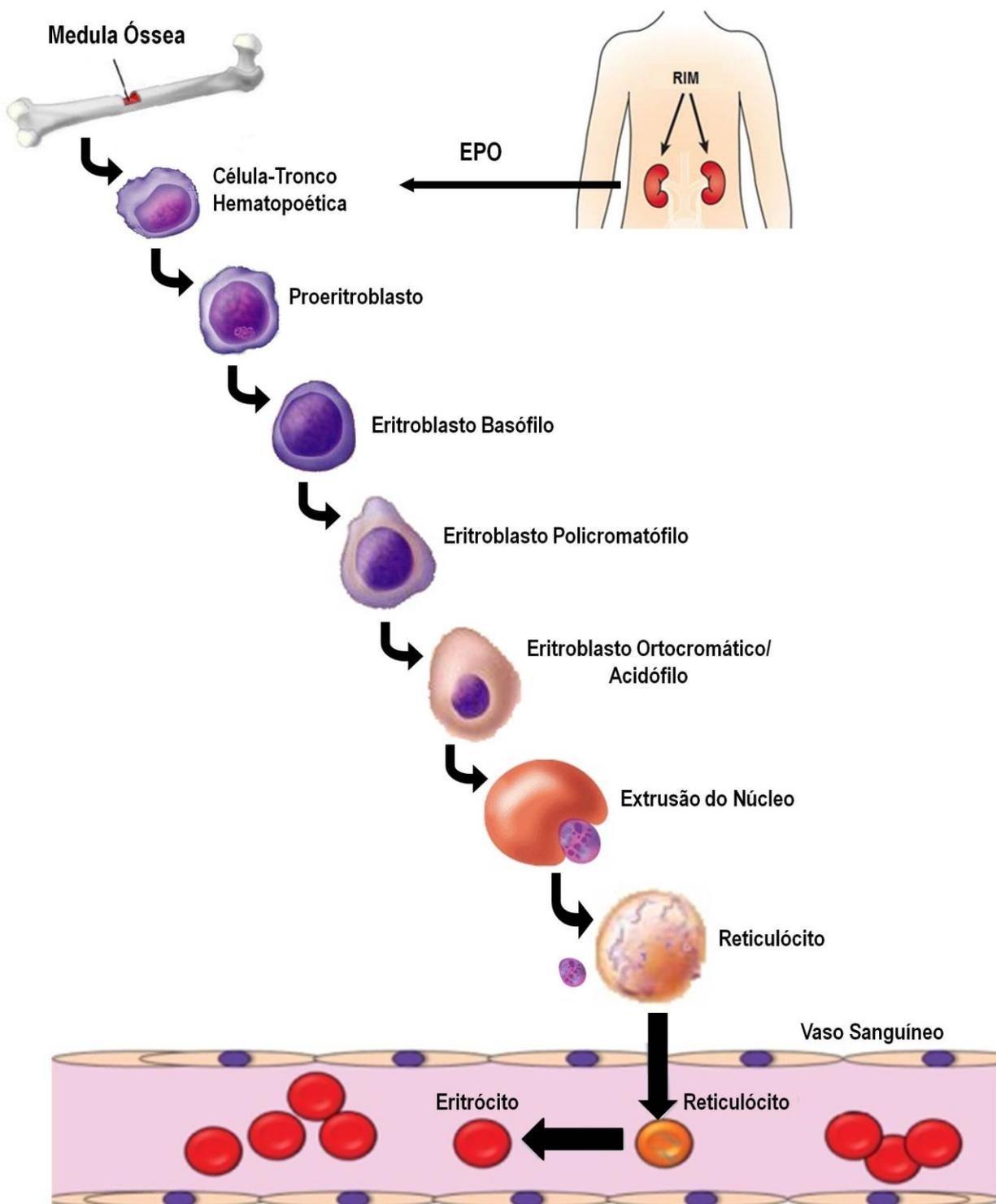
4.3. Separação de Células Vermelhas .....	60
4.4. Isolamento de Neutrófilos e Células Mononucleares do Sangue Periférico .....	60
4.5. Determinação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) .....	61
4.6. Separação de Reticulócitos.....	61
4.7. Extração de RNA .....	62
4.8. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	62
4.9. Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	63
4.10. Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real .....	64
4.10.1. Concentração de Primer .....	64
4.10.2. Eficiência de Reação .....	65
4.11. Western blotting .....	66
4.12. Análise estatística.....	67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	68
5.1. CAPÍTULO 1 - Análise de genes envolvidos no estado redox de reticulócitos e eritrócitos de pacientes beta talassêmicos .....	68
5.1.1. Produção de EROS é aumentada em diferentes tipos de células sanguíneas de pacientes beta talassêmicos .....	68
5.1.2. Transcrição das PRDXs 1, 2 e 6 e dos redutores de PRDXs 2- Cys é alterada em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos intermediários .....	69
5.1.3. Níveis proteicos de PRDX1 são aumentados nos eritrócitos de beta talassêmicos intermediários.....	70
5.1.4. Conteúdo proteico de TRX1 é aumentado nos eritrócitos de beta talassêmicos intermediários.....	71
5.1.5. Conteúdo proteico das PRDXs 1 e 2 varia entre fenótipos da beta talassemia.....	72
5.1.6. Eritrócitos de pacientes com BTM apresentam níveis mais elevados de superoxidação 2-Cys PRDXs, especialmente PRDX2.....	73
5.1.7. Expressão gênica de <i>CAT</i> , <i>GPX1</i> e <i>SOD1</i> é aumentada em beta talassêmicos intermediários.....	75
5.1.8. Conteúdo proteico de SOD1 é maior em pacientes com beta talassemia intermediária.....	75
5.1.9. Complexo de regulação antioxidante NRF2, KEAP1 e PKC $\delta$ é diferencialmente expresso em beta talassêmicos intermediários .....	76
5.1.10. Discussão.....	77
5.2. CAPÍTULO 2 - Análise de genes envolvidos no estado redox de reticulócitos e eritrócitos de pacientes com anemia falciforme .....	83
5.2.1. Níveis de EROS são aumentados em eritrócitos, células mononucleares e neutrófilos de indivíduos com anemia falciforme.....	83
5.2.2. Conteúdo proteico de PRDX2 é reduzido nos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme .....	83

5.2.3. Redutores 2-Cys PRDXs não apresentam diferenças de expressão gênica e conteúdo proteico entre pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis .....	85
5.2.4. PRDX1 e PRDX2 são aumentadas no plasma de pacientes SCD.....	86
5.2.5. Níveis de RNAm de catalase são aumentados nos reticulócitos de pacientes com anemia falciforme .....	87
5.2.6. Níveis de RNAm de <i>NRF2</i> , <i>KEAP1</i> e <i>PKCδ</i> são reduzidos em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme .....	88
5.2.7. Discussão.....	89
6. CONCLUSÃO .....	94
7. REFERÊNCIAS .....	96
ANEXOS.....	97

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A eritropoese e os eritrócitos

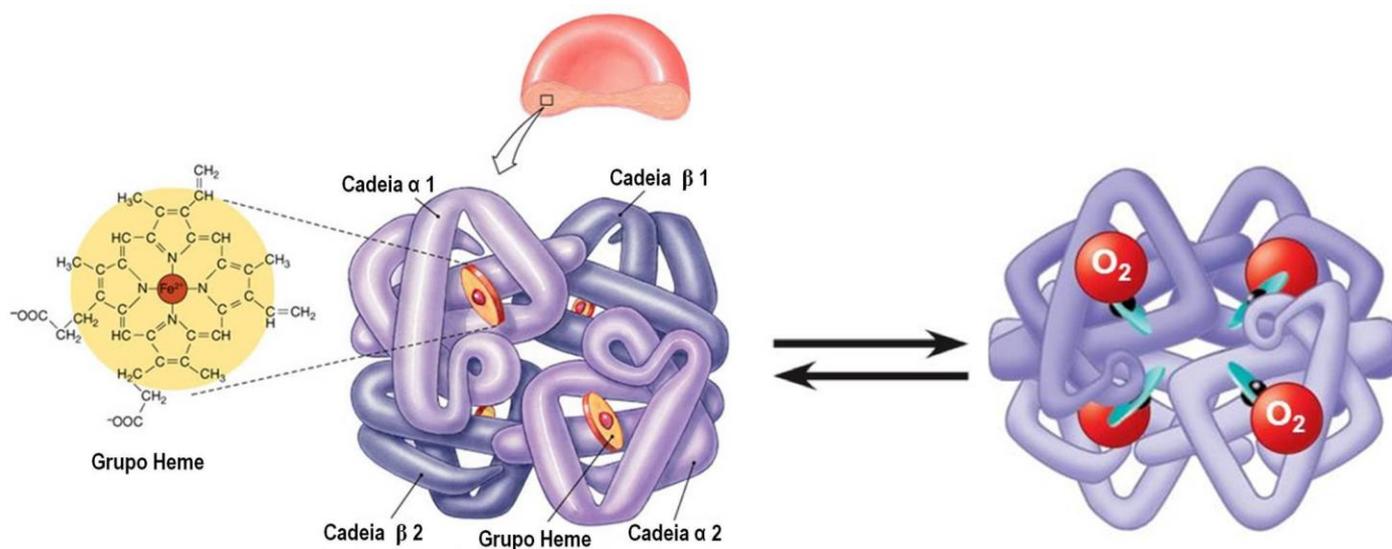
Os eritrócitos são as células presentes em maior quantidade no sangue periférico, representando cerca de 40-45% do volume sanguíneo total e mais de 90% dos elementos figurados. Em humanos, estas células são produzidas na medula óssea por um processo complexo e finamente regulado que envolve uma grande variedade de células em diferentes estágios, denominado eritropoese. O principal fator envolvido na eritropoese é a eritropoetina (EPO), um hormônio secretado pelos rins, que estimula a diferenciação de células-tronco hematopoéticas em proeritroblastos, os quais sofrerão modificações que resultarão na formação dos eritroblastos basófilos. A partir dessas células outros fatores são importantes para participarem da divisão celular, como a vitamina B12 e ácido fólico. Os eritroblastos basófilos dão origem aos eritroblastos policromatófilos, que tem como característica a elevada atividade de síntese de hemoglobina, com ativa participação de ferro. A partir dessa fase as células não se dividem mais e passam por um processo de amadurecimento no qual se transformam em eritroblastos acidófilos ou ortocromáticos, que se caracterizam pela redução do núcleo e alta concentração de hemoglobina. Após, o núcleo é extrudido da célula gerando os reticulócitos, que são células anucleadas que ainda contêm resquícios de organelas como o retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos com RNA mensageiro (RNAm). Dessa forma, os reticulócitos ainda possuem alguma capacidade de síntese proteica; sendo que cerca de 10 a 20% da síntese de hemoglobina celular total completa-se nesta fase. Finalmente, os reticulócitos são lançados na circulação, onde serão maturados tornando-se eritrócitos maduros (hemácias) em um processo que leva de 1 a 2 dias. Uma representação esquemática deste processo pode ser vista na figura 1. Em condições normais, o tempo de vida dos eritrócitos é de aproximadamente 120 dias. Transcorrido esse período, estas células sofrem inúmeras alterações morfológicas que culminam na sua destruição pelo sistema mononuclear fagocitário presente no fígado e no baço (HOFFMAN et al., 2008; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2013; HOFFBRAND, 2013). Apesar de não possuírem núcleo e organelas os eritrócitos são bastante complexos, visto que, possuem uma variedade de proteínas transportadoras, moléculas de adesão, receptores e vias de sinalização que executam funções vitais (GREER et al., 2003).



**Figura 1. Representação esquemática do processo de eritropoese.** A eritropoetina (EPO) estimula a diferenciação de células-tronco hematopoéticas em proeritroblastos, os quais sofrerão várias modificações que resultarão na formação do eritroblastos basófilos, eritroblastos policromatófilos e eritroblastos ortocromáticos/acidófilos, sucessivamente. Em seguida, o núcleo é extrudido da célula dando origem aos reticulócitos, que são lançados na circulação e finalizam seu processo de maturação tornando-se eritrócitos maduros, os quais permanecem na circulação por aproximadamente 120 dias. (Figura adaptada de SINCLAIR, 2013).

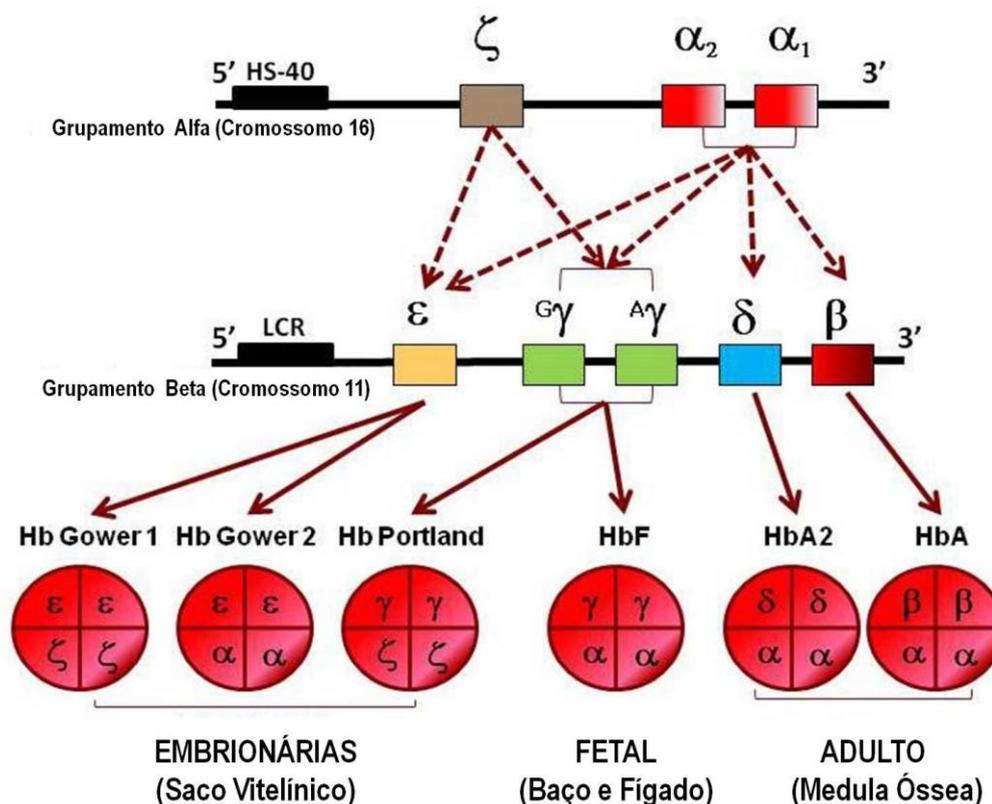
## 1.2. Hemoglobina: estrutura e função

Os eritrócitos têm como funções principais o transporte de oxigênio ( $O_2$ ) dos pulmões aos tecidos, mantendo a perfusão tecidual adequada, e o transporte de gás carbônico ( $CO_2$ ) dos tecidos aos pulmões, além de exercem um papel importante na manutenção do equilíbrio ácido-base (STEINBERG et al., 2009). Estas funções são realizadas pela hemoglobina (Hb), uma proteína tetramérica com peso molecular de 64.450 Da e que corresponde a aproximadamente 95% do total de proteínas presentes nos eritrócitos. A hemoglobina apresenta estrutura globular e quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias globínicas, das quais duas são do tipo alfa ( $\alpha$  ou  $\zeta$ ) e duas do tipo beta ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\gamma^A$  ou  $\epsilon$ ), cada uma delas associada a um grupo prostético heme que contém um átomo de ferro na forma bivalente ( $Fe^{2+}$ ), o que confere a hemoglobina sua capacidade de se ligar de modo reversível à molécula de  $O_2$  (figura 2) (PERUTZ et al., 1960; STEINBERG e BRUGNARA, 2003).



**Figura 2. Representação da estrutura de uma molécula de hemoglobina adulta  $A_1$  normal.** A hemoglobina possui uma estrutura globular e quaternária formada por quatro cadeias globínicas, sendo duas do tipo alfa e duas do tipo beta, cada uma delas associada a um grupamento heme, contendo um átomo de ferro bivalente ao qual se liga o oxigênio de modo reversível, permitindo assim seu transporte dos pulmões aos tecidos. Figura adaptada de Biochemistry for Medics (disponível em: <http://www.namrata.co/category/hemoglobin-and-hemoglobinopathies/structure-of-normal-hemoglobin/>)

A síntese das cadeias globínicas é controlada por genes distintos, localizados em dois grupamentos cromossômicos diferentes, denominados de grupamento  $\alpha$  e  $\beta$ . O grupamento  $\alpha$  está situado no braço curto do cromossomo 16 e é composto pelo gene zeta embrionário ( $\zeta$ ) e dois genes alfa ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , cujos os produtos proteicos são idênticos) (WEATHERALL, 2001; HIGGS e WOOD, 2008). O grupamento  $\beta$  está localizado no braço curto do cromossomo 11 e é formado pelo gene embrionário épsilon ( $\epsilon$ ), pelos genes gama-alanina ( $\gamma^A$ ) e gama-glicina ( $\gamma^G$ ) (que variam apenas em glicina ou alanina na posição 136) e pelos genes delta ( $\delta$ ) e beta ( $\beta$ ) (GROSVELD; DILLON; HIGGS, 1993; SCHECHTER, 2008). Durante o desenvolvimento ontogenético normal ocorrem mudanças na expressão desses genes, produzindo desse modo, diferentes tipos de hemoglobinas, as quais são compostas por diferentes combinações de cadeias polipeptídicas que vão se ajustar às condições fisiológicas distintas (DZIERZAK, 2001). Durante o período embrionário são produzidos três tipos de hemoglobina: Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ), presentes até a décima segunda semana do período embrionário, após esse período são substituídas pela hemoglobina Fetal ( $\alpha_2\gamma_2$ ), que predomina aproximadamente até a trigésima semana de gestação, quando começa a ser progressivamente substituída pelas hemoglobinas adultas, que são: hemoglobina  $A_1$  ( $\alpha_2\beta_2$ ), corresponde a cerca de 97% do total de hemoglobina presente em células eritróides adultas, hemoglobina  $A_2$  ( $\alpha_2\delta_2$ ), representando 2– 3% da hemoglobina total (figura 3). Contudo, a síntese de hemoglobina fetal pode não cessar completamente e manter níveis entre 0 – 1% (ANTONARAKIS; KAZAZIA JUNIOR; ORKIN, 1985; MIGLIACCIO e PAPAYANNOPOULOU, 2001; STEINBERG, 2005). A expressão dos genes de globina nos dois grupamentos é regulada por uma série de fatores, que fazem com que o ritmo de produção das cadeias seja equilibrado, garantindo a correta formação do tetrâmero de hemoglobina em suas diferentes fases (BUNN e FORGET, 1986; WILLIAMS et al., 2001).



**Figura 3. Produção dos diferentes tipos de hemoglobina durante o desenvolvimento ontogenético normal.** A síntese das cadeias globínicas é controlada por um conjunto de genes localizados no grupamento  $\alpha$  do cromossomo 16 e no grupamento  $\beta$  do cromossomo 11. Ao longo do desenvolvimento humano ocorrem mudanças na expressão desses genes, produzindo diferentes tipos de hemoglobinas que resultam da combinação e diferentes cadeias globínicas. Na fase embrionária são produzidas as Hb Gower 1 e 2 e Hb Portland, que são substituídas pela HbF na fase fetal e após pelas hemoglobinas do adulto HbA<sub>1</sub> e HbA<sub>2</sub>. O fenômeno de troca das cadeias globínicas é conhecido como “switching” e envolve mecanismos de ativação e inativação (Figura adaptada de DA CUNHA et al., 2012).

### 1.3. Hemoglobinopatias hereditárias

As hemoglobinopatias são resultantes de alterações estruturais ou reguladoras nos genes responsáveis pela expressão das globinas. Normalmente essas alterações são causadas por mutações de ponto em um único nucleotídeo, podendo também ser originadas por microinserções ou microdeleções que afetam regiões codificantes, códigos de terminação, íntrons e regiões promotoras (HONIG e ADAMS III, 1986; SIGURET e ANDREUX, 1997; STEINBERG et al., 2001; WEATHERALL e CLEGG,

2001). Estas alterações correspondem a um grupo heterogêneo de doenças genéticas, que de modo geral, podem ser divididas em dois grupos:

**1. Variantes estruturais:** geralmente são ocasionadas por mutações de ponto, pequenas inserções ou deleções de bases na região codificadora do gene e levam a substituição de aminoácidos na cadeia proteica, gerando assim uma hemoglobina anormal (BUNN e FORGET, 1986; SONATI e COSTA, 2008). Mais de 1.000 variantes estruturais já foram descritas e a maior parte não possui fenótipos com manifestações clínicas e hematológicas importantes. Dentre as variantes que apresentam fisiopatologia, as que mais se destacam em termos de prevalência e gravidade da doença são a HbS ( $\alpha_2\beta_2$  Glu→Val) e a HbC ( $\alpha_2\beta_2$  Glu→Lys) (HOFFBRAND et al., 2000; WILLIAMS et al., 2001).

**2. Alterações de síntese (talassemias):** ocorrem devido à redução ou ausência na produção de um ou mais tipos de cadeias de globina. São classificadas de acordo com a cadeia cuja síntese está afeta e as mais frequentes e de maior relevância clínica são a  $\alpha$  talassemia, geralmente causada por deleções que removem os genes da  $\alpha$  globina e a  $\beta$  talassemia, normalmente ocasionada por substituições de bases nos éxons, íntrons e regiões promotoras dos genes  $\beta$  (SHAH, 2004; SONATI e COSTA, 2008).

Em geral, as hemoglobinopatias são as doenças monogênicas mais frequentes em todo o mundo e representam as formas mais comuns de anemia hemolítica hereditária (MODELL e DARLISON, 2008).

#### **1.4. Anemias hemolíticas**

Anemias hemolíticas são um grupo de doenças em que a sobrevivência das hemácias na circulação é bastante reduzida e a medula óssea não é capaz de repor as células destruídas por hemólise, levando a redução do número de células vermelhas circulantes e consequente anemia (COSTA; FERTRIN; CONRAN, 2013).

A hemólise pode ocorrer de duas formas: intravascular e extravascular. A hemólise intravascular se refere à destruição de glóbulos vermelhos na circulação com a liberação do conteúdo celular no plasma. Pode ser causada por fatores como: trauma mecânico com lesão endotelial, fixação ou ativação do sistema complemento, lesão direta da membrana celular e destruição da célula por agentes infecciosos. A hemólise extravascular é a forma mais comum de hemólise e ocorre pela remoção e destruição

das hemácias com alterações de membrana pelos macrófagos do baço e do fígado (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004).

Como consequência da hemólise, os indivíduos acometidos por anemias hemolíticas podem apresentar icterícia, devido a maior destruição da hemoglobina com consequente aumento no catabolismo do grupamento heme seguido da elevação de bilirrubina no plasma; reticulocitose, como resposta da medula óssea para a perda periférica de células vermelhas; esplenomegalia, causada pelo excesso de eritrócitos destruídos no sistema fagocitário e urobilinúria, a qual pode acarretar a formação de cálculos biliares (COSTA; FERTRIN; CONRAN, 2013).

As anemias hemolíticas podem ser classificadas etiologicamente em hereditárias e em adquiridas. Dentre as hereditárias, destacamos a anemia falciforme e a beta talassemia, as quais são o foco deste trabalho e serão abordadas em maiores detalhes nos tópicos seguintes.

## **1.5. Anemia Falciforme**

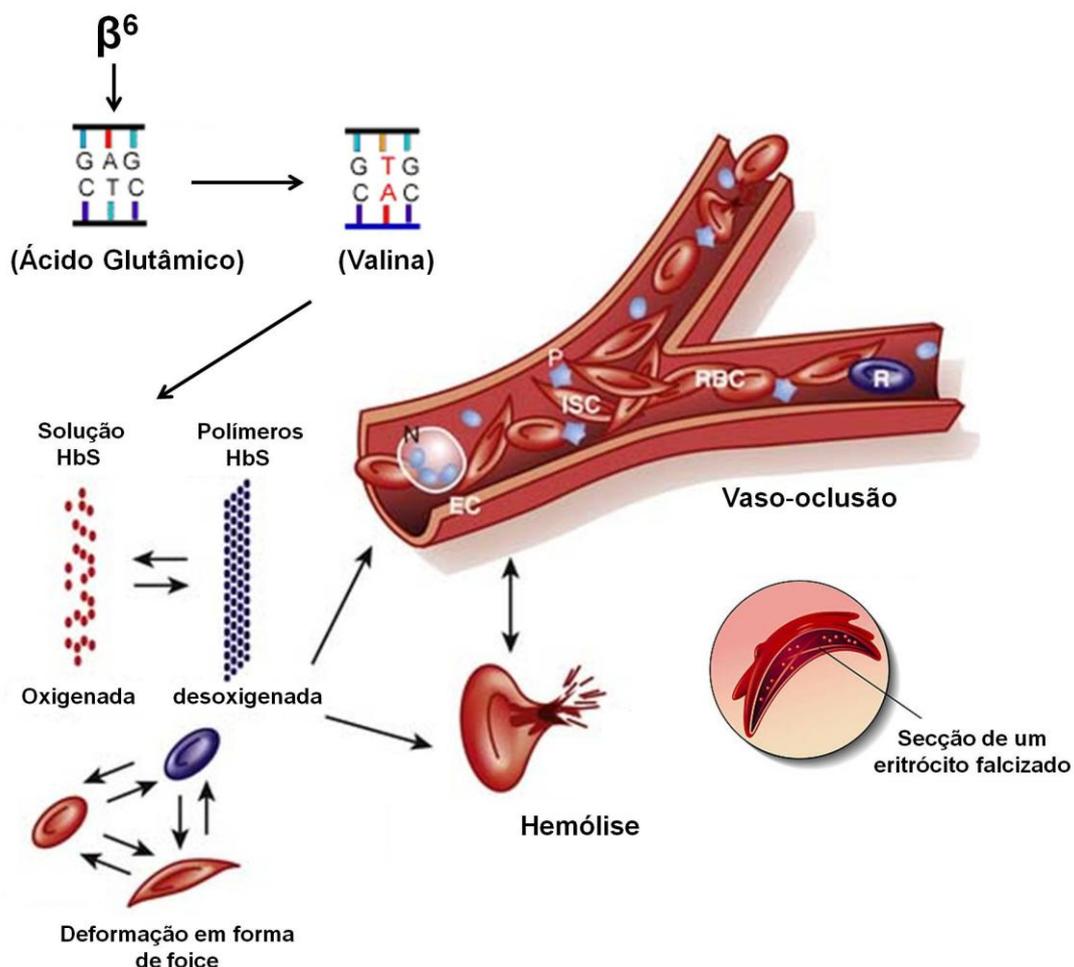
A anemia falciforme (AF) é uma das hemoglobinopatias mais prevalentes em todo o mundo e estima-se que tenha se originado há milhares de anos nos países subsaarianos no centro-oeste da África, Ásia Oriental e algumas regiões da Índia (WEATHERALL, 2008). Sua distribuição correlaciona-se com as regiões endêmicas da malária porque confere aos heterozigotos um efeito protetor contra a infecção pelo *Plasmodium falciparum* (TAYLOR; PAROBK; FAIRHURST, 2012). Os movimentos migratórios, seguidos de miscigenação, levaram esse gene para outras regiões e para outras populações, como é o caso dos países americanos (SONATI e COSTA, 2008). No Brasil tem presença significativa com maior incidência na população afro descendente. De acordo com a Organização Mundial da Saúde estima-se que, anualmente, nasçam no Brasil cerca de 1.900 crianças com anemia falciforme (GUIMARÃES; MIRANDA; TAVARES, 2009).

### **1.5.1. Fisiopatologia**

A anemia falciforme é uma doença monogênica causada por uma mutação pontual no códon 6 do gene da 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 na estrutura da molécula de hemoglobina, levando ao surgimento de uma hemoglobina anômala, denominada hemoglobina S (HbS) (SERJEANT e SERJEANT, 2001; STEINBERG et al., 2001) (figura 4). Na molécula de hemoglobina normal os resíduos de aminoácidos externos são polares, o que confere solubilidade e previne interações entre as moléculas, já os resíduos internos são apolares, proporcionando assim, um ambiente onde o O<sub>2</sub> pode ser ligado sem que a oxidação do grupamento heme ocorra. Tetrâmeros individuais dentro dos eritrócitos não interagem entre si. A maleabilidade da membrana celular faz com que os eritrócitos sejam capazes de sofrer deformação, permitindo que atravessem toda a circulação e carreguem o O<sub>2</sub> para todos os tecidos do corpo (SONATI e COSTA, 2008). Quando a HbS assume a forma desoxigenada, sua conformação molecular é 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 que após sucessivos ciclos de oxigenação/desoxigenação levam a célula a assumir a forma de foice (figura 4) (GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2003).

O processo de falcização danifica a membrana dos eritrócitos, altera a funcionalidade da bomba de sódio e potássio, levando a alterações da permeabilidade e a desidratação celular que contribuem para a destruição prematura destas células e com o quadro de hemólise crônica. Além disso, as células falciformes tornam-se rígidas e indeformáveis, o que aumenta a viscosidade sanguínea e favorece o processo de vaso-occlusão, causando isquemia tecidual e disfunção orgânica (figura 4) (HOFFBRAND, 2008).

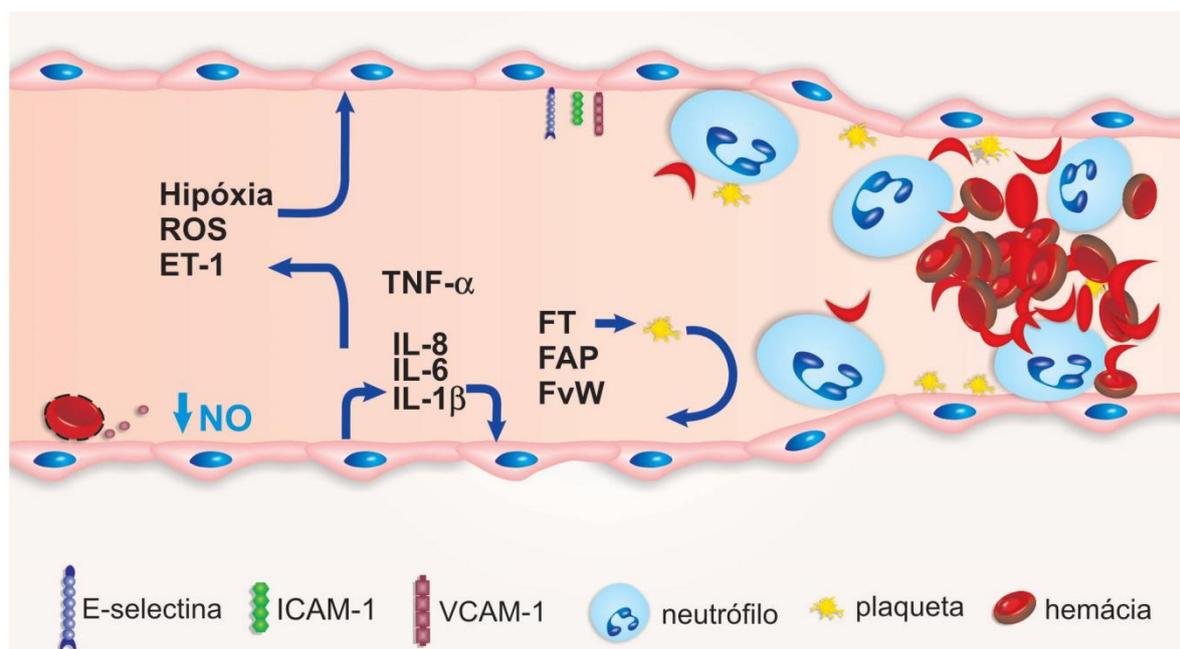


**Figura 4. Fisiopatologia da anemia falciforme.** A substituição do ácido glutâmico por um resíduo de valina no códon 6 do gene de beta globina resulta no surgimento de uma hemoglobina mutante, denominada HbS, a qual na forma desoxigenada realiza interações hidrofóbicas que resultam na formação de polímeros e, após sucessivos ciclos de oxigenação/desoxigenação levam a célula a assumir a forma de foice. Os eritrócitos falcizados são anormalmente rígidos e não deformáveis, contribuindo para a hemólise crônica e a vaso-oclusão (figura adaptada de STEINBERG, 2006). N: neutrófilo; EC: endotélio celular; ISC: células irreversivelmente falcizadas; RBC: eritrócitos; R: reticulócitos; P: plaquetas.

### 1.5.2. Vaso-oclusão

O fenômeno vaso-oclusivo é o principal evento fisiopatológico ligado à origem dos sinais e sintomas apresentados no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme, tais como crises algicas; 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).

A vaso-oclusão é um processo complexo que envolve a interação entre diferentes tipos celulares como: células falcizadas densas e desidratadas, leucócitos ativados, células endoteliais, plaquetas e proteínas do plasma (BALLAS e SMITH, 1992; De FRANCESCHI e CORROCHER, 2004). A liberação de hemoglobina devido à hemólise intravascular somada aos recorrentes processos de isquemia/reperfusão causam danos e a ativação das células endoteliais da parede dos vasos, o que resulta em indução de uma resposta inflamatória vascular e na adesão de células brancas e eritróides à parede dos vasos. Esses eventos associados à redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador e regulador do tônus vascular e ao estresse oxidativo, podem levar a redução do fluxo sanguíneo e a vaso-oclusão (COSTA; FERTRIN; CONRAN, 2013). Maiores detalhes são apresentados na figura 5.



**Figura 5. Mecanismos associados a vaso-oclusão em pacientes com anemia falciforme.** O contato dos eritrócitos falcizados e a hemólise intravascular causam a ativação das células endoteliais na parede do vaso; o heme livre na circulação tem efeitos nocivos além de consumir o NO sintetizado pelas células endoteliais. A presença de espécies reativas de oxigênio (EROS), hipóxia e vasoconstritores como a endotelina-1 (ET-1), contribuem para a ativação das células endoteliais. Indivíduos AF apresentam um estado de hipercoagulabilidade que leva ao aumento nos níveis de marcadores de ativação de trombina, plaquetas e células endoteliais, tais como o fator tecidual (FT), fator de von Willebrand (FvW) e o fator ativador de plaquetas (FAP), que favorece a adesão plaquetária à parede vascular. As células endoteliais ativadas aumentam a expressão das moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) e também liberam mais citocinas e quimiocinas como o IL-8, IL-6 e IL-1 $\beta$ , que juntamente com TNF- $\alpha$ , contribuem para a inflamação vascular e a ativação das células sanguíneas. Os leucócitos e os eritrócitos aderem à parede do vaso devido a sua ativação e expressão de moléculas de adesão. A vasoconstrição e a obstrução física do vaso levam redução do fluxo sanguíneo e a vaso-oclusão (figura retirada de COSTA; FERTRIN; CONRAN, 2013).

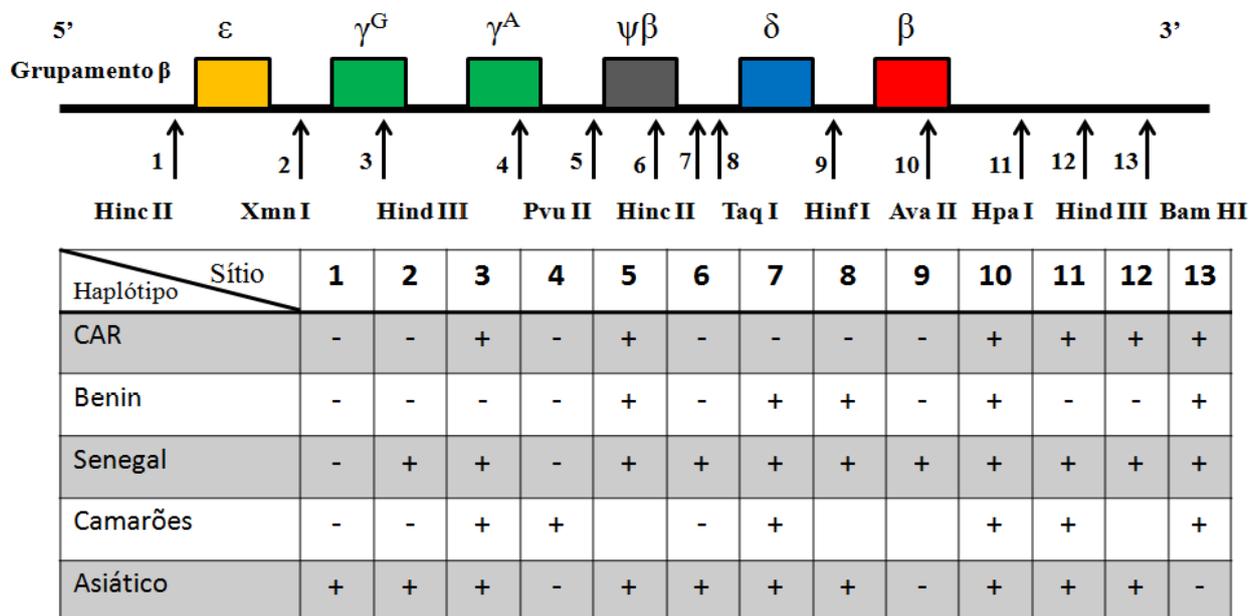
### 1.5.3. Fatores moduladores da gravidade da doença

Apesar de possuírem a mesma alteração molecular, os pacientes com anemia falciforme podem apresentar evoluções clínicas distintas. Alguns fatores estão associados à gravidade e a evolução clínica desses indivíduos, tais como os níveis de Hb fetal (HbF), o haplótipo ligado ao grupo de genes da globina  $\beta^S$ , a coexistência com a  $\alpha$  talassemia e a resposta ao tratamento com hidroxíúreia (HU) (STEINBERG et al., 2001; COSTA; FERTRIN; CONRAN, 2013).

A HbF é o mais importante modulador clínico da anemia falciforme e seu nível de produção está inversamente relacionado com a gravidade clínica da doença. A presença de HbF inibe a polimerização da hemoglobina e, conseqüentemente, a falcização dos eritrócitos, reduzindo os sintomas da doença (SERJEANT e SERJEANT, 2001). Os haplótipos relacionados ao grupamento  $\beta^S$  têm um 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. São um conjunto de polimorfismos encontrados ao longo do grupamento dos genes da beta globina S e podem ser identificados por meio de endonucleases de restrição ou sequenciamento. Os haplótipos são nomeados de acordo com a região geográfica ou grupo étnico no qual foram primeiramente identificados e os principais são: Senegal (Sen) e Asiático (também conhecido como Indo-Árabe), produzem níveis elevados de HbF e, portanto, são associados a uma evolução clínica benigna. Benin (Ben) e Camarões (Cam), que apresentam níveis médios de HbF e curso clínico moderado da doença. Bantu ou República Centro Africana (CAR), mostra níveis diminuídos de HbF e quadro clínico mais grave (figura 6) (NAGEL, 1984; POWARS, 1991; RAHGOZAR et al., 2000).

A anemia falciforme quando associada com a  $\alpha$  talassemia apresenta um quadro clínico mais brando, que varia de acordo com o número de alelos afetados. Essa associação tem como consequência a redução do volume corpuscular médio (VCM) e da hemoglobina corpuscular média (HCM), menor número de reticulócitos, diminuição da anemia hemolítica, inibição da polimerização intracelular da hemoglobina S e diminuição da intensidade de hemólise, em comparação com pacientes que não apresentam  $\alpha$  talassemia associada (TOME-ALVES et al., 2000).

## Cromossomo 11



**Figura 6. Haplótipos associação à anemia falciforme.** Endonucleases de restrição são utilizadas para identificar os diferentes haplótipos ligados ao grupamento  $\beta^S$ . Estes são classificados em cinco tipos principais, nomeados de acordo com a região geográfica onde foram primeiramente identificados. Estão associados com a evolução clínica da doença, uma vez que, têm um papel importante na regulação da síntese da Hb Fetal. O sinal (+) indica susceptibilidade à ação da enzima, enquanto o sinal de (-) indica resistência à digestão por endonuclease (figura adaptada de GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

O tratamento com hidroxiuréia também é um importante modulador da evolução clínica da doença. Esta droga está associada ao aumento nos níveis de HbF, o que leva a uma significativa diminuição na hemólise e, conseqüentemente, resulta na redução do consumo de NO intravascular, além de diminuir a ativação do endotélio. A HU também promove a redução na contagem de leucócitos, reduz a expressão de moléculas de adesão na superfície das células brancas e vermelhas, melhora o estado inflamatório e diminuiu a hipercoagulabilidade nos pacientes (COSTA; FERTRIN; CONRAN, 2013). Com isso, a HU reduz muitos eventos clínicos como os episódios de dor causados pela vaso-oclusão, hospitalizações, síndrome torácica aguda e a necessidade de transfusões (STEINBERG, et al,2010).

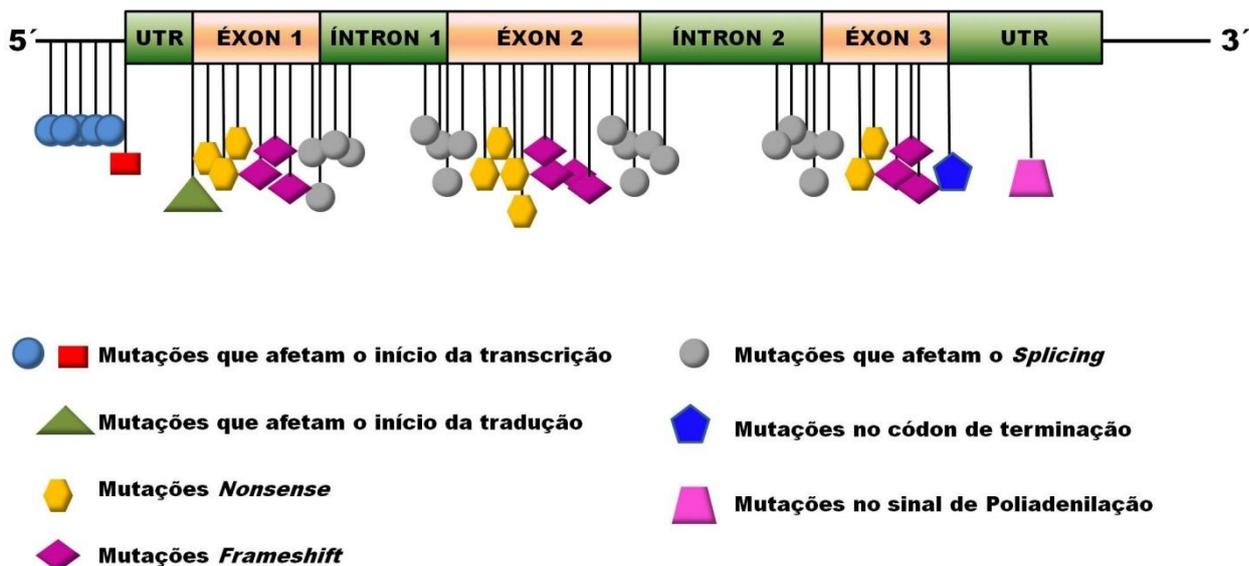
## 1.6. Beta Talassemia

O termo talassemia foi primeiramente utilizado para descrever um tipo de anemia encontrado com frequência em habitantes das regiões mediterrâneas, como as costas grega e italiana e ilhas próximas. Atualmente, é utilizado para se referir a defeitos hereditários na biossíntese das cadeias de globina (HOFFMAN et al., 2008; CAO e GALANELLO, 2010). A beta talassemia é a forma mais importante das talassemias devido à elevada taxa de morbidade e mortalidade (ROCHA et al., 2010).

Estima-se que cerca de 1,5% da população global apresente algum dos fenótipos de beta talassemia (GALANELLO e ORIGA, 2010). No Brasil, calcula-se que em algumas regiões, 1,5% da população caucasoide seja portadora do traço beta talassêmico, sobretudo no sul e sudeste do país. Dados coletados pelo Ministério da Saúde, no período entre 2013 a 2015, nos serviços de assistência hematológica e hemoterápica identificaram 561 pacientes com beta talassemia distribuídos nas cinco regiões geográficas do Brasil. Desse total, 305 possuem beta talassemia maior e 256 beta talassemia intermediária, sendo a região sudeste responsável por 67,0% destes casos. O Nordeste é a segunda região em casos de beta talassemia, correspondendo a 18,0%. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

### 1.6.1. Bases Moleculares

A beta talassemia se caracteriza por uma alteração quantitativa da síntese de cadeias de beta globina, sendo classificada como talassemia beta zero (ou talassemia  $\beta^0$ ) quando a síntese de globinas beta está ausente, e talassemia beta mais (ou talassemia  $\beta^+$ ) quando ocorre a redução na taxa de síntese (WEATHERALL, 2006). Esta patologia apresenta uma grande heterogeneidade, seja em seu aspecto clínico, bioquímico ou molecular. Esta variabilidade está associada a grande quantidade de mutações e alterações gênicas que originam a beta talassemia (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005). Atualmente, mais de 200 mutações foram descritas como associadas a esta doença, sendo que 125 delas são mutações pontuais em importantes regiões funcionais do gene, causadas por diversos mecanismos ou em sequências flanqueadoras do gene (figura 7) (THEIN, 1998).



**Figura 7. Mecanismos moleculares que causam beta talassemia.** 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 beta (figura adaptada de CAO, 2002).

As mutações que causam a beta talassemia podem ser divididas em:

**1. Mutações que afetam a transcrição do RNAm:** ocorrem em regiões promotoras que antecedem aos genes e reduzem a eficiência de transcrição do RNAm, uma vez que diminuem a ligação de fatores de transcrição. Produzem talassemias do tipo  $\beta^+$  (FORGET, 2001; THEIN,1998).

**2. Mutações que afetam o processamento do RNAm:** ocorrem em regiões de *splicing* ou próximas a elas e impedem ou dificultam a retirada dos íntrons, originando talassemia  $\beta^+$  ou  $\beta^0$  (CAO e GALANELLO, 2010).

**3. Mutações que afetam a tradução:** são alterações na fase de leitura que interferem na tradução do RNAm pela introdução de um códon de terminação prematura. Podem ser *frameshifts* quando são causadas pela inserção ou deleção de um único nucleotídeo, ou então *nonsense*, quando ocorre a substituição de bases que também introduzem um códon de terminação prematura. Produzem talassemias  $\beta^0$  (FORGET, 2001; THEIN,1998).

**4. Mutações no sinal de poliadenilação:** dificultam a adição da cauda poli A ao RNAm que se torna assim mais instável, contudo, a maior parte dos transcritos produzidos são normais e geralmente produzem um fenótipo de talassemia  $\beta^+$  leve (FORGET, 2001; THEIN,1998).

Na tabela 1 são apresentados alguns exemplos das mutações mais frequentes que causam beta talassemia, de acordo com sua localização na molécula, o defeito funcional que causam e o resultado na síntese de beta globina. (Tabela adaptada de ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005).

**Tabela 1. Exemplos de mutações associadas a beta talassemia**

<b>DEFEITO</b>	<b>TIPO</b>
<b><i>mRNA não- funcional</i></b>	
<b>1. Códon de Término Prematuro</b> CD 15 (G→A); CD 17 (A→T); CD 35 (C→A); CD 39 (C→T); CD 43 (G→T); CD 121 (A→T)	$\beta^0$
<b>2. Pequena Deleção com Deslocamento de Bases (<i>frameshift</i>)</b> 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	$\beta^0$
<b>3. Mutação do Códon de Início ATG</b> ATG→AGG; ATG→ACG	$\beta^0$
<b><i>Processamento Anormal do RNA</i></b>	
<b>1. Mutações Internas nos Íntrons</b> IVS-1 nt 110 (G→A); IVS-2 nt 705 (T→G); IVS-2 nt 745 (C→G); IVS-1 nt 116 (T→G); IVS-2 nt 654 (C→T)	$\beta^+$
<b>2. Mutações nos Limites Exon- Íntron</b> 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)	$\beta^0$
IVS-1 nt 5 (C→G); IVS-1 nt 5 (G→T); IVS-1 nt 6 (T→C); IVS-1 nt 128 (T→G); IVS-2 nt 843(T→G)	$\beta^+$
<b>3. Redução da Transcrição do mRNA (mutações na região promotora)</b> -101(C→T); -92 (C→T); -88 (C→T); -31 (A→G); -30 (T→A); -28 (A→C)	$\beta^+$
<b>Mutações do Sítio de Poliadenilação do mRNA (AATAAA)</b> AACAAA; AATAAG; AATGAA; AATAGA; A (del AATAA)	$\beta^+$

No Brasil, os alelos  $\beta^0$  CD39 (C→T),  $\beta^+$ -IVS-1-6 (T→C),  $\beta^+$ -IVS-1-110 (G→A) e  $\beta^0$ -IVS-1-1 (G→A) são responsáveis por quase todos os casos nas Regiões Sul e Sudeste; na Região Nordeste, além destes, o alelo  $\beta^+$ -IVS-1-5 (G→C) representa 9,3% dos alelos encontrados em beta talassêmicos. A mutação  $\beta^0$  CD39 apresenta frequência de 50 a 60% no Sudeste brasileiro, não chegando a 5% no Nordeste, sendo a  $\beta^+$ -IVS-1-6 predominante nesta população (ARAÚJO et al., 2003; WENNING e SONATI, 2007; SONATI e COSTA, 2008).

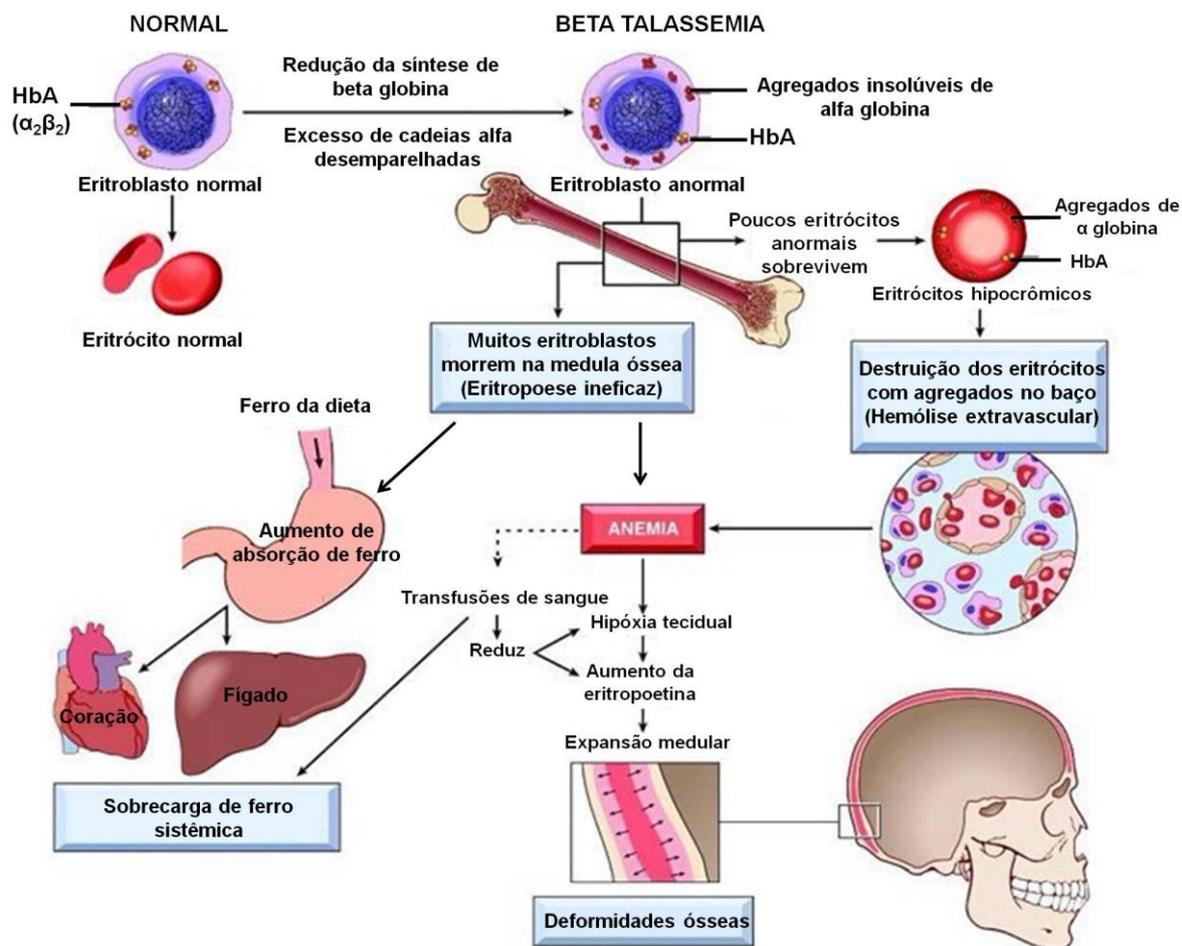
### 1.6.2. Fisiopatologia

O processo fisiopatológico da beta talassemia está relacionado com o desequilíbrio entre a produção de globinas, causado pela diminuição quantitativa de cadeias beta. O excesso de alfa globinas desemparelhadas faz com que estas precipitem nos precursores eritróides da medula óssea, formando corpos de inclusão, que causam danos à membrana e morte celular prematura (OLIVIERI, 1999). A destruição intensa de precursores eritróides resulta em eritropoese ineficaz que é a causa mais importante da anemia na beta talassemia. Os eritrócitos que conseguem chegar ao sangue periférico são microcíticos e hipocrômicos e são rapidamente removidos pelo baço ou sofrem hemólise na circulação, o que contribui para a anemia que caracteriza a doença (figura 8) (THEIN, 2005; WEATHERALL, 1998).

A acentuada destruição dos eritrócitos estimula um aumento na síntese de eritropoetina levando à expansão da medula óssea devido ao aumento da eritropoese. A expansão medular acarreta diversas complicações como as deformidades ósseas características do esqueleto e da face e doenças como a osteoporose, enquanto a intensa destruição dos eritrócitos pode causar icterícia em pacientes com formas mais graves (figura 8) (WEATHERALL, 1998; WEATHERALL, 2001).

Outro importante fator na fisiopatologia da beta talassemia é a sobrecarga de ferro, o qual é proveniente de diversas fontes, tais como o ferro liberado pela hemólise dos eritrócitos, o aumento da absorção gastrintestinal estimulado pela anemia e a necessidade variável de transfusões sanguíneas. Diante desse quadro, a atuação da transferrina é insuficiente o que leva a um aumento nas concentrações de ferro não ligado à transferrina no plasma. O ferro livre atinge vários órgãos, principalmente coração, fígado, pâncreas e a glândula pituitária, causando dano aos tecidos em virtude da formação de radicais livres. A doença cardíaca decorrente desse mecanismo é a causa principal de morte nos portadores da talassemia maior (figura 8) (URBINATI et al., 2006).

É importante ressaltar, que, quanto menor for o desequilíbrio da síntese das globinas, menor será a taxa de alfa globinas livres que precipitam dentro do eritrócito e conseqüentemente, menor será a taxa de eritropoese ineficaz, o grau de anemia e suas complicações clínicas (CAPPELLINI e COMINO, 2000).



**Figura 8. Mecanismos fisiopatológicos da beta talassemia.** A redução na produção de beta globina faz com que as cadeias alfa desemparelhadas precipitem nos eritoblastos causando sua morte prematura e tornando o processo de eritropoese ineficaz. Os poucos eritrócitos que chegam ao sangue periférico são microcíticos e hipocrômicos e rapidamente removidos pelo baço ou sofrem hemólise na circulação, contribuindo para o quadro de anemia. A destruição exacerbada dos eritrócitos promove aumento na produção de eritropoetina, o que resultará em deformidades ósseas causadas pela expansão medular em decorrência do aumento da eritropoese. A sobrecarga de ferro proveniente de diferentes fontes como a hemólise dos eritrócitos, o aumento da absorção gastrointestinal e a necessidade de transfusões sanguíneas também tem impacto na fisiopatologia da doença. O ferro livre acumula-se em diversos órgãos como o coração e o fígado.

(Figura adaptada de doctordconline, disponível em: <http://www.imgrum.org/user/doctordconline>).

### **1.6.3. Classificação Clínica da Beta talassemia**

Clinicamente, a beta talassemia é classificada em menor ou traço beta talassêmico, intermediária e maior ou anemia de Cooley. Esta classificação é embasada fundamentalmente na gravidade da anemia que os indivíduos acometidos apresentam (SONATI e COSTA, 2008).

#### **1.6.3.1. Beta Talassemia Menor**

A beta talassemia menor, também denominada de traço talassêmico, corresponde a heterozigose das formas  $\beta^0$  ou  $\beta^+$ . Os indivíduos portadores do gene normalmente são assintomáticos e geralmente não necessitam de tratamento, apesar de apresentarem microcitose, hipocromia e níveis de hemoglobina levemente abaixo dos níveis normais. A importância do diagnóstico está relacionada à necessidade de aconselhamento genético e a prevenção da administração errônea de compostos de ferro aos portadores (HUISMAN et al., 2001; BANK, 2005; SONATI e COSTA, 2008).

#### **1.6.3.2. Beta Talassemia Maior**

A beta talassemia maior ou anemia de Cooley corresponde à forma mais grave da doença e resulta da homozigose tanto do tipo  $\beta^+$  quanto do  $\beta^0$  ou da dupla heterozigose  $\beta^+/\beta^0$ . A ausência ou acentuada deficiência na síntese de beta globina causa grave anemia ( $Hb < 6,0$  g/dL) em virtude da ineficiência da eritropoese e do sequestro das hemácias no baço. As manifestações surgem durante o primeiro ano de vida com menor ganho de peso, episódios de febre, diarreia, apatia, irritabilidade, palidez e icterícia. Enquanto as reservas metabólicas são utilizadas para expansão do éritron na tentativa de compensar a destruição precoce das células eritróides na medula óssea e na periferia, outras funções, como crescimento, desenvolvimento e resposta imunológica ficam prejudicadas. Em virtude disso, os indivíduos acometidos apresentam baixa estatura, disfunção endócrina, inanição e susceptibilidades a infecções. A hepatoesplenomegalia é um achado clássico e se deve à hemólise crônica e a eritropoese extramedular (WEATHERALL e CLEGG, 1981; MAGGIO, 2000).

O protocolo estabelecido de transfusão sanguínea contribuiu de maneira importante na melhora clínica e sobrevida destes pacientes, sendo esta necessidade

muito frequente, a maioria dos indivíduos necessita receber sangue a cada 3 ou 4 semanas. Junto à transfusão, o paciente também recebe um regime de quelação para o excesso de ferro. O regime de transfusão e quelação deve ter início o mais cedo possível, como forma de evitar deformidades ósseas e danos ao pâncreas, fígado, miocárdio e outros órgãos (CAPPELLINI e COMINO, 2000).

### 1.6.3.3. Beta Talassemia Intermediária

A beta talassemia intermediária se caracteriza por fenótipos clínicos intermediários entre a beta talassemia menor e a maior. Este fenótipo pode ser influenciado por diversos fatores, tais como a homozigose de genes  $\beta^+$  de menor gravidade, a combinação de um gene beta talassêmico leve com um que causa beta talassemia grave, a presença de um defeito adicional que reduza o excesso de cadeias alfa livres, como a alfa talassemia e a persistência hereditária de hemoglobina fetal. Além disso, diferentes indivíduos podem apresentar o mesmo genótipo, porém com evoluções clínicas distintas, devido a fatores moduladores genéticos e ambientais (WEATHERALL, 2001; AESSOPOS; BERDOUKAS; TSIRONI, 2007).

Porém, de modo geral, a forma mais comum de beta talassemia intermediária é causada por mutações  $\beta^+$  ( $\beta^+/\beta^+$ ) e as mutações mais frequentes são -101 (C→T), -87 (C→T), -88 (C→T), -29 (A→G) e a IVS-1-6 (T→C) (FORGET, 2001). A mutação IVS-1-6 (T→C), que compõe a maioria do grupo de estudo utilizado neste trabalho, é também conhecida como forma portuguesa de talassemia, produz uma talassemia  $\beta^+$  leve e faz parte da maioria das mutações leves encontradas em talassêmicos do Mediterrâneo (TREISMAN et al., 1983; TAMAGNINI et al., 1983; THEIN, 1998).

As manifestações clínicas são menos drásticas quando comparadas a indivíduos beta talassêmicos maiores. Os pacientes apresentam 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 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 (BANK, 2005;

ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; WEATHERALL, 2006; SONATI e COSTA, 2008).

A distinção entre beta talassemia maior e intermediária é fundamental na prática clínica, pois define o tipo de tratamento que o paciente receberá. No entanto, essa distinção nem sempre é fácil, uma vez que o quadro clínico pode ser resultante de grande número de combinações moleculares (WEATHERALL, 1990).

### **1.7. A Célula Eritróide e as Espécies Reativas de Oxigênio**

O balanço redox celular é determinado através do equilíbrio entre a produção de agentes pró-oxidantes e antioxidantes. Sendo os pró-oxidantes denominados de espécies reativas de oxigênio (EROS). O termo espécies reativas de oxigênio é utilizado para designar espécies radicalares derivadas do oxigênio como o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), radical alcóxila ( $RO^{\cdot}$ ), radical peróxila ( $ROO^{\cdot}$ ) e também espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e ozônio ( $O_3$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As EROS podem ser geradas por meio de agentes endógenos ou exógenos. Dentre os agentes endógenos estão à via metabólica do citocromo P450, os peroxissomos, a ativação de células inflamatórias e as mitocôndrias, as quais se destacam, uma vez que produzem quantidades consideráveis desses compostos durante a fosforilação oxidativa (VALKO et al., 2006). Estima-se que, aproximadamente 0,1 a 1% de todo o produto da cadeia transportadora de elétrons escapem 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 nas próximas seções) podem formar  $\cdot OH$  que por sua vez, é altamente reativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). 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).

As fontes exógenas incluem a radiação UV, tabagismo, poluentes, drogas, dietas hipercalóricas, solventes industriais, entre outros (MARTELLI e NUNES, 2014). Em condições fisiológicas há um equilíbrio entre a produção de EROS e sua eliminação por sistemas de defesa antioxidantes (IUCHI, 2012). Estes compostos participam de vários

processos celulares, como por exemplo, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio que são gerados por enzimas das famílias de NADPH oxidases e dual oxidases, desempenham funções na remodelagem do citoesqueleto, transdução de sinais, diferenciação, proliferação, migração celular e apoptose (BROWN e GRIENGLING, 2009; LAMBETH e NEISH, 2014; MARTELLI e NUNES, 2014). Entretanto, quando as EROs excedem a capacidade antioxidante das células são responsáveis por oxidações de biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, causando danos a organelas celulares e morte celular (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008). Vários processos patológicos estão associados à formação desequilibrada dessas moléculas (STADTMAN, 1990). A seguir, algumas das mais importantes espécies reativas de oxigênio serão descritas em maiores detalhes.

### 1.7.1. Ânion Superóxido

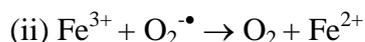
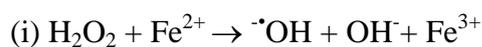
A principal fonte de EROS nos eritrócitos é a própria hemoglobina, que sofre auto-oxidação produzindo o  $O_2^{\cdot-}$ . Este composto é capaz de atacar diretamente a membrana dos eritrócitos causando alterações nos lipídeos e na estrutura das proteínas (CLASTER et al., 1984; GIULIVI e DAVIES, 1990). Visto que, a concentração de hemoglobina no interior do eritrócito é bastante alta, cerca de 5mM, mesmo uma pequena parcela que sofre auto-oxidação pode gerar elevados níveis de EROs. A redução do  $O_2$  em  $O_2^{\cdot-}$  é acompanhada da oxidação do átomo de ferro da hemoglobina, formando a metahemoglobina (MetHb), a qual não é mais capaz de transportar  $O_2$  (JOHNSON et al., 2005).

Para realizar o transporte de oxigênio, o ferro necessita estar na sua forma reduzida, caso isto não ocorra este pode se desprender da Hb. 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). Diariamente, cerca de 3% do total das moléculas de Hb se transformam em MetHb, a qual pode ser reduzida pela via NADH citocromo ou pela via 5-metHb redutase e metHb redutase dependente de NADPH (KENNETT et al., 2005). Através da ação da superóxido dismutase (SOD) ou por dismutação espontânea, o  $O_2^{\cdot-}$  pode ser convertido a  $H_2O_2$ , o qual será abordado em maiores detalhes no tópico seguinte.

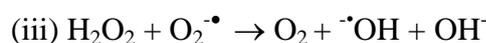
### 1.7.2. Peróxido de Hidrogênio

Embora o  $\text{H}_2\text{O}_2$  não seja muito reativo, ele é capaz de oxidar tióis de proteínas, levando a formação de vários produtos, dentre eles dissulfetos inespecíficos entre proteínas, que pode resultar em agregação e conseqüentemente perda da atividade. Este composto também 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo íon de um metal de transição como o  $\text{Fe}^{2+}$  (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



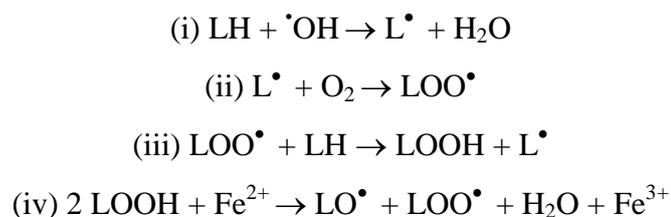
Como evidenciado na reação acima, o ferro tem um papel crucial na geração de  $\cdot\text{OH}$ . Este metal é encontrado em diversas formas moleculares e em grande abundância no organismo humano, ligado a uma grande variedade de proteínas, participando dessa forma de inúmeras reações bioquímicas de oxi-redução. De fato, na presença de ferro a toxicidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser potencializada em até 1000 vezes (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

Além da dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode vir de fontes extracelulares devido à alta permeabilidade desta ERO na membrana do eritrócito. Desta forma a Hb está constantemente sob o efeito do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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).

### 1.7.3. Hidroperóxidos de Lipídeos e Peroxidação Lipídica

Os hidroperóxidos de lipídios (LOOH) são os produtos gerados pela peroxidação lipídica e sua decomposição resulta em produtos de maior reatividade e toxicidade, como os radicais peroxila ( $\text{LOO}^\bullet$ ) ou alcoxila ( $\text{LO}^\bullet$ ) (ESTERBAUER, 1993). Os lipídeos ricos em ácidos graxos poliinsaturados estão entre os alvos mais susceptíveis à peroxidação lipídica (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 ( $-\dot{\text{C}}\text{H}-$ ), este se combina com o  $\text{O}_2$  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 (iii) (GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Esta etapa da reação é denominada de propagação. Assim como para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a presença de  $\text{Fe}^{2+}$  estimula a peroxidação através da decomposição do peróxido de lipídeo LOOH gerando as espécies radicalares alcoxil ( $\text{LO}^\bullet$ ) e peroxil ( $\text{LO}_2^\bullet$ ) (iv), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Nos eritrócitos, a peroxidação lipídica pode causar a polimerização dos componentes da membrana e o aumento da rigidez dos fosfolipídios da bicamada, levando à diminuição de sua deformabilidade, o que por sua vez aumenta a

suscetibilidade destas células à hemólise (LUBIN e CHIU, 1982). Além disso, os hidroperóxidos gerados durante a peroxidação lipídica podem reagir com o ferro no interior do eritrócito e desencadear a formação de mais EROS, que caso essa célula sofra hemólise na circulação podem afetar outras células e tecidos adjacentes (RICE-EVANS, 1991).

#### 1.7.4. Óxido Nítrico e a Formação de Peroxinitrito

O óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) e o dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) também são espécies radicalares, visto que apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Este composto está relacionado com processos celulares de grande importância como vasoconstrição e a vasodilatação, agregação plaquetária, inibição da adesão celular, resposta do sistema imunológico, dentre outros (MONCADA e HIGGS, 1991; DESSY et al., 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Entretanto, o  $\text{NO}^\bullet$  pode reagir com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para formar um intermediário bastante reativo o peróxido de nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Esta espécie é um poderoso oxidante capaz de causar danos em diversas biomoléculas e em pHs ácidos pode se decompor em dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) 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  $\text{NO}_2$  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  $\text{NAD}^+$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (GOLDSTEIN e CZAPSKI, 2000).

### **1.8. Anemias hemolíticas hereditárias e Estresse oxidativo**

O estresse oxidativo tem sido associado ao agravamento de diversas doenças, dentre elas as anemias hemolíticas como a beta talassemia e anemia falciforme. Mesmo não sendo a causa principal destas doenças, o dano causado pelas espécies reativas de oxigênio (EROS) tem um importante papel na hemólise devido à eritropoiese ineficaz na medula óssea e na redução do tempo de vida dos eritrócitos na circulação (FIBACH e RACHMILEWITZ, 2008).

Nessas anemias a auto-oxidação da hemoglobina é bastante pronunciada, pois as moléculas de Hb são altamente instáveis, resultando em maior produção de EROS. A acentuada produção desses compostos favorece a peroxidação lipídica, levando ao aumento na exposição de fosfatidilserina na superfície dos eritrócitos que são removidos pelos macrófagos, acarretando na redução do tempo de vida dessas células na circulação (figura 9). Além disso, as hemoglobinas oxidadas tendem a se desnaturar e precipitar na forma de hemicromos, os quais possuem alta afinidade por algumas proteínas de membrana e irão promover a interrupção da ligação dessas proteínas com proteínas do citoesqueleto, causando perda de estabilidade e tornando o eritrócito mais frágil. Adicionalmente, os danos causados a membrana ocasionam a destruição de enzimas glicólicas e conseqüentemente na redução da produção de NADPH, um importante agente redutor para várias enzimas antioxidantes (VOSKOU et al., 2015).

Em casos de lesões oxidativas extensas, os eritrócitos ao invés de serem removidos por mecanismos controlados podem sofrer hemólise na circulação. O aumento da hemólise já foi observado tanto na anemia falciforme quanto na beta talassemia (SCOTT et al., 1993; CHAVES, LEONART, NASCIMENTO, 2008). Após a hemólise, a hemoglobina é liberada no plasma e ocorrem reações oxidativas que resultam na geração de EROS, liberação do heme e do ferro. Essas moléculas tóxicas podem se intercalar nas membranas celulares e promover o dano oxidativo ao endotélio, células hemopoéticas e vários órgãos. Na beta talassemia e na anemia falciforme os sinais de estresse oxidativo podem ser observados não apenas nos eritrócitos, mas também nos leucócitos, plaquetas, células endoteliais e vários outros tecidos (figura 9) (BEETSCH et al., 1998; AMER et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, o heme e o ferro são moléculas altamente tóxicas. Estes compostos podem se ligar a proteínas plasmáticas como o LDL (lipoproteína de baixa densidade) e causar a sua oxidação, que tem um efeito

significativo na geração de placas ateroscleróticas. As placas ateroscleróticas podem causar a lise dos eritrócitos e a oxidação das moléculas de Hb. O heme e o ferro liberados por essas reações de oxidação podem oxidar ainda mais os componentes da placa, gerando danos adicionais ao endotélio (NAGY et al., 2010).

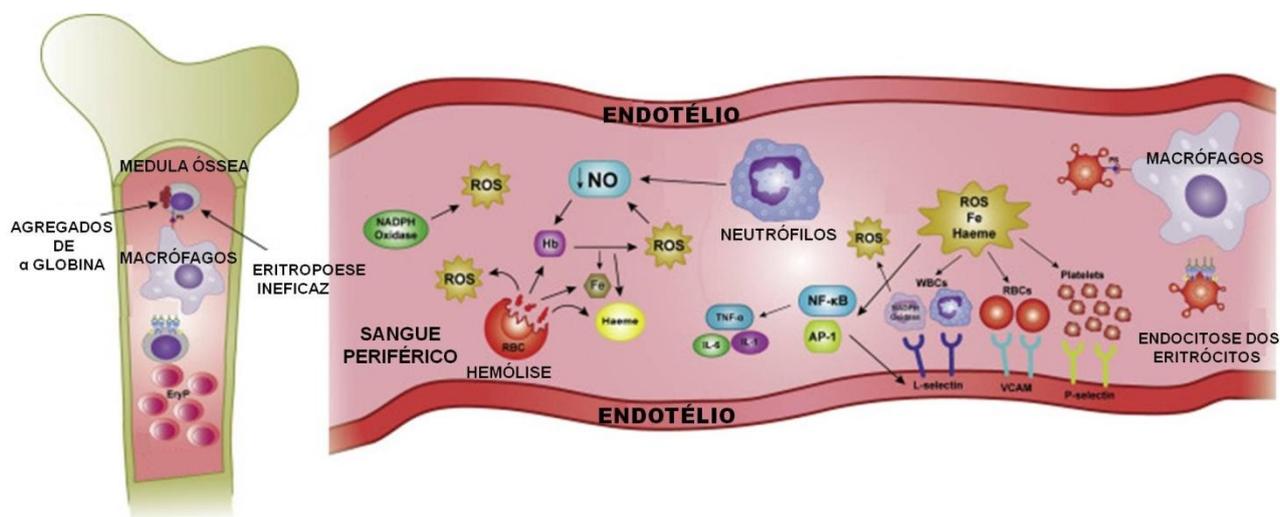
Um importante efeito do heme livre e dos EROS liberados na circulação é promover a inflamação vascular através da ativação de NF $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) e AP-1 (Activator Protein 1), que desencadeiam o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão. Isso resulta em maior adesão dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas ao endotélio, causando ativação e disfunção endotelial (FRENETTE, 2002). O aumento no influxo de leucócitos não é apenas um marcador inflamatório, mas também uma importante fonte de EROS devido à atividade NADPH oxidase, produtora de O $_2^{\bullet-}$ . Além disso, as citocinas produzidas contribuem para a geração de EROS adicionais (figura 9) (GEORGE et al., 2013).

A anemia falciforme e a beta talassemia também são caracterizadas pelo aumento da hipercoagulabilidade, demonstrado pelo aumento dos marcadores de ativação de plaquetária e produção de trombina. O dano oxidativo crônico das plaquetas e a adesão ao endotélio podem levar a sua ativação e agregação. A coagulação e a inflamação são ainda mais exacerbadas porque a biodisponibilidade de NO, um mensageiro intracelular com propriedades vasodilatadoras, antitrombóticas e antiinflamatórias, é reduzida como consequência da hemólise (VOSKOU et al., 2015).

Os eventos relatados acima podem levar a um extenso dano endotelial tanto em pacientes com anemia falciforme quanto beta talassemia, uma vez que ambas apresentam uma hemólise aumentada. No entanto, a hemólise é mais acentuada na anemia falciforme quando comparada com a beta talassemia, podendo causar problemas mais graves. A hemólise juntamente com a falcização dos eritrócitos pode resultar em crises vaso-oclusivas, que é uma característica única da anemia falciforme. Em adição, a vaso-oclusão também leva a lesões de isquemia/reperfusão através do aumento da expressão de várias proteínas plasmáticas e endoteliais que dão origem a mais EROS. Portanto, aparentemente o estresse oxidativo nos eritrócitos falciformes gera um loop de feedback para a produção de mais EROS (MORRIS, 2008).

Já na beta talassemia, a patogênese é atribuída principalmente a eritropoese ineficaz (figura 9) e a sobrecarga de ferro. Recentemente, Dussoit e colaboradores demonstraram que o fator de diferenciação de crescimento 11 (GDF11), uma citocina relacionada a superfamília de TGF $\beta$  (fator transformador de crescimento beta), bloqueia

a diferenciação final de precursores eritróides em um modelo de camundongos beta talassêmicos, devido a precipitação de alfa globina e ao estresse oxidativo. Em adição, GDF11 também induz a apoptose precoce dos eritroblastos, mas, mais importante é que a expressão dessa citocina é induzida pelo estresse oxidativo, indicando a existência de um ciclo de amplificação autocrina que promove a eritropoiese ineficaz (DUSSOIT et al., 2014). Com relação à sobrecarga de ferro, esta já é bem documentada na beta talassemia e é causada por múltiplos fatores como o aumento da desnaturação oxidativa Hb e posterior liberação de ferro, transfusões de sangue recorrentes, especialmente na beta talassemia maior, e a absorção aumentada do trato gastrointestinal. Como descrito anteriormente em maiores detalhes o ferro livre é altamente tóxico e contribui substancialmente na geração e no aumento da reatividade das EROS. O estresse oxidativo afeta negativamente a função biológica dos eritrócitos em vários níveis, tanto na anemia falciforme quanto na beta talassemia e contribui significativamente para a patogênese dessas doenças (VOSKOU et al., 2015).



**Figura 9. Eventos oxidativos na medula óssea e na circulação.** Na medula óssea o principal evento relacionado ao estresse oxidativo é a eritropoiese ineficaz, a qual é mais pronunciada na beta talassemia em virtude da precipitação das cadeias de alfa globina. Na circulação, os danos causados à membrana pela precipitação da Hb desnaturada resultam na exposição da fosfatidilserina e remoção dos eritrócitos através dos macrófagos. A hemólise leva a liberação de Hb, heme e ferro no plasma produzindo dano oxidativo ao endotélio e outras células. As EROS e o heme ativam fatores, que aumentam a produção de citocinas e moléculas de adesão, aumentando a adesão das células sanguíneas ao endotélio. Leucócitos ativados geram mais EROS através da NADPH oxidase, criando um ciclo vicioso de estresse oxidativo e inflamação, o qual é mais acentuado na anemia falciforme. Ocorre a redução na biodisponibilidade de NO devido a Hb livre. Mais detalhes no texto (figura adaptada de VOSKOU et al., 2015).

## 1.9. Defesas Celulares contra o Estresse Oxidativo

Os eritrócitos, assim como as demais células do organismo, possuem mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio. Dentre eles estão às defesas antioxidantes constituídas por enzimas como a superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (E.C. 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GPX) (EC 1.11.1.9) e peroxirredoxinas (PRDXs) (EC 1.11.1.15). Os antioxidantes enzimáticos removem cataliticamente as EROs, evitando os efeitos deletérios causados pela oxidação. A seguir estas enzimas são descritas em maiores detalhes.

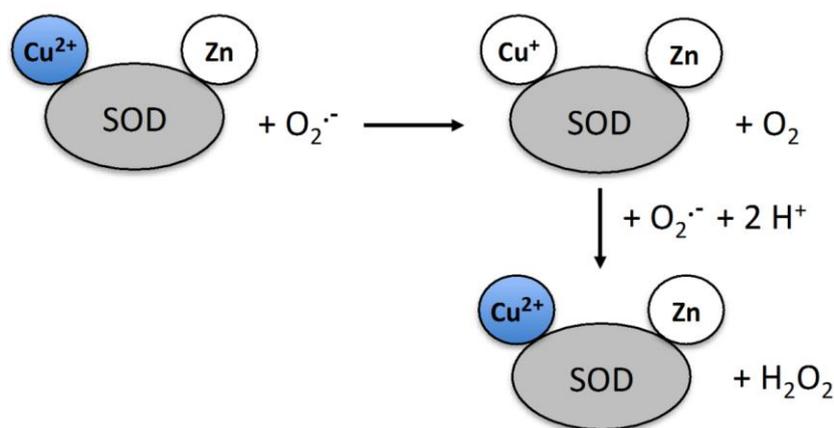
### 1.9.1. Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima amplamente encontrada em organismos eucarióticos e procarióticos. A SOD catalisa a transformação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ) em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), 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, 2005; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

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). Como os eritrócitos maduros não possuem mitocôndrias, estes apresentam apenas a isoforma SOD1 (CuZnSOD). A SOD1 (21q22.11) é um homodímero com peso molecular de aproximadamente 32 kDa, com 153 aminoácidos e um íon de cobre e um de zinco no sítio ativo de cada subunidade (BERTINI; MANGANI; VIEZZOLI, 1998). Apesar do íon de zinco não participar da catálise, ele é importante para estabilizar a estrutura da enzima, assim como uma ligação dissulfeto intramolecular entre a cisteína 57 e a 146, localizada em uma alça da região de contato entre as subunidades (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990, FURUKAWA e O'HALLORAN, 2005; WANG; XU; BORCHELT, 2006). A dismutação espontânea do  $O_2^{\bullet -}$  ocorre a uma constante de velocidade de  $10^5 M^{-1}.s^{-1}$  em um pH 7.0, sendo que este valor pode ser alterado de acordo o pH do meio, já a decomposição catalisada pela SOD apresenta uma constante

de velocidade de  $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  que é mantida em uma ampla faixa de pH (5,3 – 9,5) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; AUGUSTO, 2006). Além de apresentar alta eficiência catalítica, a SOD1 é bastante abundante e corresponde a cerca de 1% do total de proteínas celulares (OKADO-MATSUMOTO e FRIDOVICH, 2001).

A reação de dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  catalisada pela SOD é representada na figura 10 abaixo:



**Figura10. Representação do mecanismo catalítico da superóxido dismutase 1.** A catálise ocorre em dois passos: Uma molécula de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reduz o íon cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) liberando  $\text{O}_2$ . Uma segunda molécula de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reoxida o íon cuproso ( $\text{Cu}^+$ ), formando  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Figura retirada de FRANCO et al., 2013).

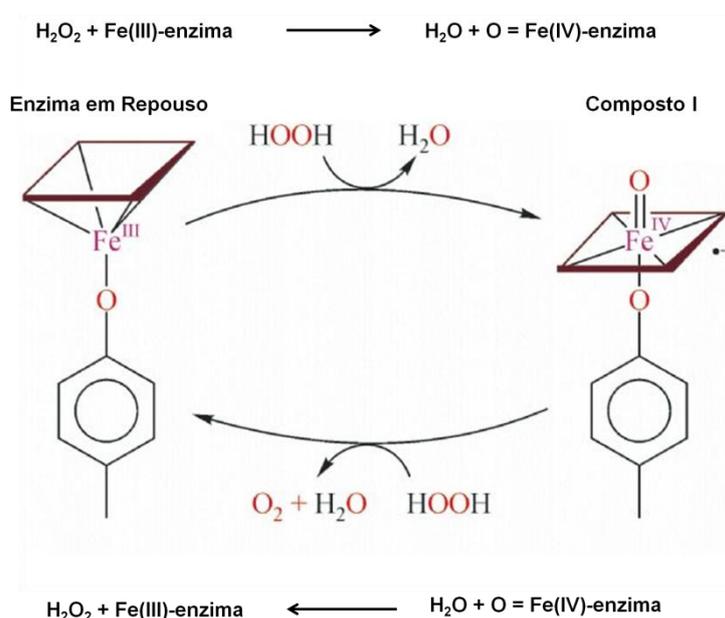
O peróxido de hidrogênio produzido pode ser decomposto por uma série de enzimas celulares, como a catalase, as glutatona peroxidases e as peroxirredoxinas, as quais atuam em conjunto com as SOD.

### 1.9.2. Catalase

A catalase (CAT) (11p13) é uma enzima capaz de catalisar a redução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ). É largamente distribuída entre animais, vegetais e microrganismos, sendo que em animais encontra-se principalmente no fígado, rins e eritrócitos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). É uma enzima tetramérica, com peso molecular de 240 kDa (aproximadamente 500 aminoácidos por tetrâmero) e cada uma de suas subunidades contém um grupamento prostético heme que atua como centro redox (CHELIKANI, FITA, LOEWEN, 2004; JAYAKUMAR; RAMESH; GERALDINE, 2006). Também se liga ao NADPH como um equivalente redutor para evitar sua inativação oxidativa por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BIRBEN et al., 2012). Esta heme-enzima é extremamente eficiente e pode decompor milhões de

moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por segundo ( $\sim 10^7$  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).

O mecanismo de ação da catalase se inicia com a entrada do  $\text{H}_2\text{O}_2$  no sítio ativo da enzima, onde há a transferência de um dos átomos de hidrogênio do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (na forma de próton) a partir de um dos átomos de oxigênio para o outro, mediado por um resíduo de histidina e um de asparagina, polarizando e estendendo a ligação O–O. Esta ligação sofre então uma cisão heterolítica, formando uma molécula de água. O outro átomo de oxigênio, coordenado ao átomo de ferro do grupo heme, forma a espécie  $\text{Fe(IV)=O}$ . Em uma segunda etapa,  $\text{Fe(IV)=O}$  reage com uma segunda molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , removendo um átomo de oxigênio, formando  $\text{O}_2$ , com o ferro retornando ao estado de oxidação inicial da enzima,  $\text{Fe(III)}$  (DOUNCE, 1983; ALFONSO-PRIETO et al., 2009). Este mecanismo está representado na figura 11.

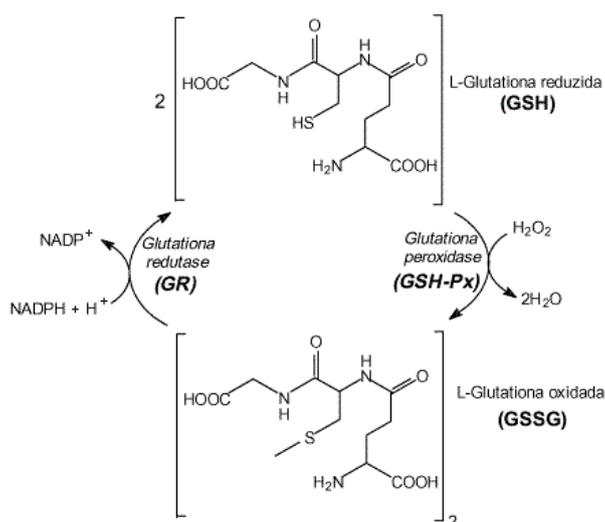


**Figura 11. Representação esquemática do mecanismo catalítico da catalase.** A atuação da catalase na decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é descrita em detalhes no texto acima (Figura adaptada de GOYAL e BASAK, 2010).

A CAT é mais eficaz na presença de altas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No entanto, na presença de baixas concentrações quer de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou outros peróxidos, o sistema glutationa desempenha um papel fundamental (COMHAIR e ERZURUM, 2002).

### 1.9.3. Glutathione Peroxidase

As glutathione peroxidases (GPXs) são uma família de enzimas que possuem uma selenocisteína em seu sítio ativo, são tetraméricas e apresentam peso molecular de aproximadamente 81 kDa (PUNCHARD et al., 1996). Estas enzimas atuam como um complemento para a catalase na redução de  $H_2O_2$ , mas excedem a catalase na sua capacidade de eliminar outras variedades de peróxidos tóxicos (COMHAIR e ERZURUM, 2002). As GPXs catalisam a conversão de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos em água e seus respectivos alcoóis através da conversão de glutathione reduzida (GSH), um tripeptídeo antioxidante ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-L-glicina) abundante nas células, em glutathione oxidada (GSSG), possuindo ação antioxidante, tanto no citosol quanto na membrana citoplasmática. Após, a molécula de GSH é reduzida pela enzima glutathione redutase, que utiliza NADPH como cofator para essa redução (figura 12) (HERBETTE; ROECKEL-DREVET; DREVET, 2007; FOURQUET et al., 2008; JO; CHOI; CHOI, 2008). Como é possível notar, a atividade destas enzimas é altamente dependente da disponibilidade de GSH. Normalmente, a relação GSH: GSSG é mantida muito elevada como resultado da atividade da enzima glutathione redutase (GR) (figura 12). Assim, qualquer mecanismo que interfira na produção de NADPH pode resultar em prejuízo dessa relação e conseqüente redução na atividade das GPXs (YOUNG E WOODSIDE, 2001). Nos eritrócitos humanos apenas a isoforma da glutathione peroxidase 1 é encontrada (GPX1) (3p21.31) no citoplasma (IUCHI, 2012).



**Figura 12. Representação esquemática do ciclo catalítico da glutathione peroxidase.** A atuação da GPX é descrita no texto acima (figura adaptada de Rover Júnior; Höehr; Vellasco, 2001).

#### 1.9.4. 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<sub>P</sub>) e a maioria apresenta um segundo resíduo de cisteína próximo a região C-terminal designado de cisteína de resolução (Cys<sub>R</sub>) (NEUMANN; CAO; MANEVICH, 2009).

Estreitamente relacionados com a Cys<sub>P</sub> 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 Arg está localizada em uma posição distante em sequência no sítio ativo e tem função para a formação do dissulfeto, a qual é descrito adiante em maiores detalhes (TAIRUM et al., 2012). 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 (PRDX4), 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 contêm 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<sub>P</sub>-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<sub>P</sub>-SOH). A

etapa subsequente depende do tipo de peroxirredoxina (MONTEIRO et al., 2007). Nas enzimas PRDXs 1- Cys, que possuem apenas a Cys<sub>P</sub>, o ácido formado durante a oxidação é reduzido por um tiol externo. Nas PRDXs 2- Cys típicas o ácido sulfênico formado na Cys<sub>P</sub> reage com a Cys<sub>R</sub> 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<sub>R</sub> está localizada na mesma cadeia polipeptídica e a reação com a Cys<sub>P</sub> resulta na formação de uma ligação dissulfeto intramolecular, a qual também pode ser reduzida por um redutor tiol dependente (figura 13) (NETTO e STADTMAN, 1996; KNOOPS et al., 2011).

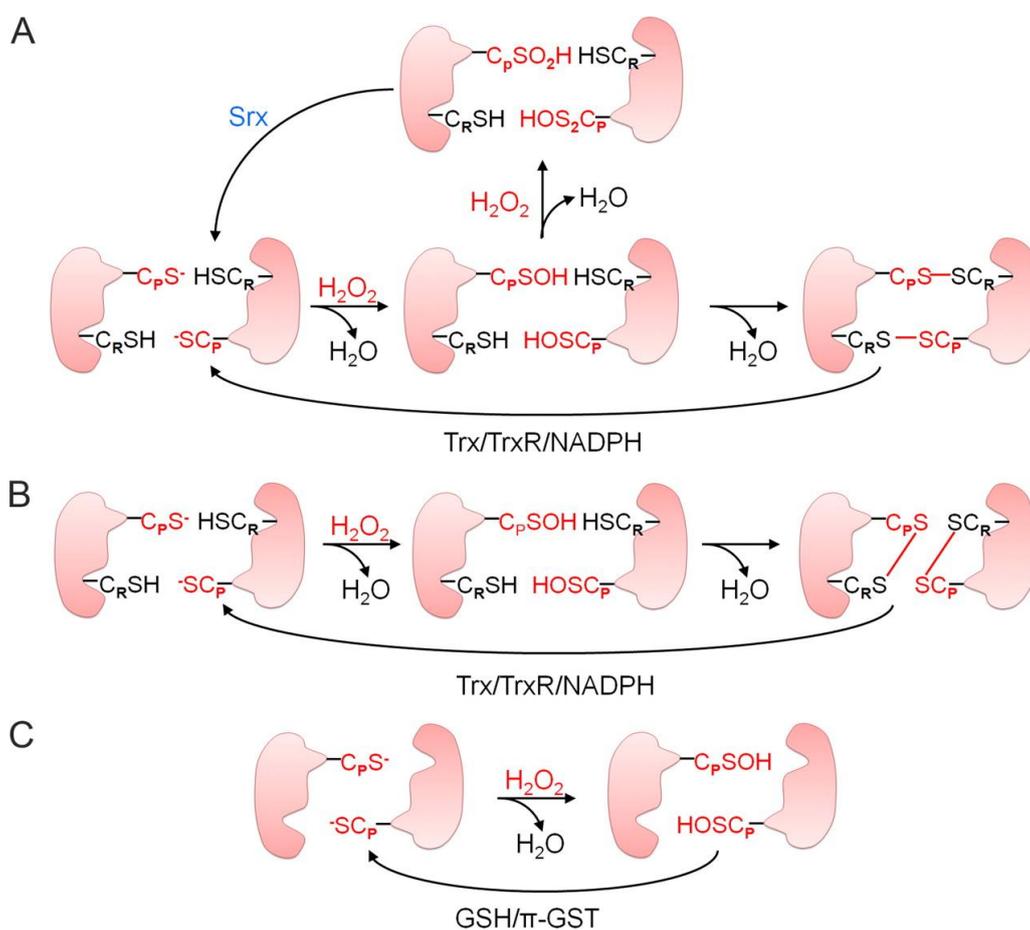
A eficiência catalítica destas enzimas para a decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode alcançar entre 10<sup>7</sup> - 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (HORTA et al., 2010). Além disso, já foi demonstrado que as PRDX são capazes de decompor peróxidos orgânicos e peroxinitrito com alta eficiência, sendo que os últimos com eficiência de até 1.4 × 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (OLIVEIRA et al., 2006; HORTA et al., 2010). Nos eritrócitos, a PRDX2 (13q12) é a terceira proteína mais abundante e provavelmente um dos principais citoprotetores eritrocitários contra o estresse oxidativo. Adicionalmente, os eritrócitos também possuem as isoformas das PRDX1 (1q34.1) e PRDX6 (1q23.3), mas em menor quantidade que a PRDX2 (LOW et al., 2007).

#### **1.9.4.1. Sistema Tiorredoxina e Sulfirredoxina**

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 tiorredoxina (TRX) (9q31.3), a qual possui duas cisteínas vicinais localizada em um motivo Cys-X-X-Cys (HOLMGREN, 2000; OLIVEIRA et al. 2010). Após a redução das PRDX, as cisteínas da TRX são oxidadas à dissulfeto e são reduzidas pela tiorredoxina redutase (TRXR) (12q23-q24.1) utilizando equivalentes redutores provenientes do NADPH (figura 13) (HOLMGREN e LU, 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Quando as PRDXs 2-Cys típicas são expostas a altas concentrações de peróxido a Cys<sub>P</sub> fica superoxidada, assumindo a forma de cisteína ácido sulfínico (CP-SO<sub>2</sub>H) ou ácido sulfônico (CP-SO<sub>3</sub>H) após o ataque do ácido sulfênico (CP-SOH) por outras moléculas de peróxido, não possibilitando a formação do dissulfeto com a Cys<sub>R</sub>. 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 baixa massa molecular dependente de ATP, magnésio ( $Mg^{2+}$ ) e um tiól, denominada sulfirredoxina (SRX) (20p13) consegue reativar a atividade peroxidásica das PRDXs. Entretanto, a SRX é capaz de reduzir somente a cisteína ácido sulfínico ( $C_p-SO_2H$ ) (figura 13), não sendo conhecido até o momento, nenhum redutor biológico para a forma  $C_p-SO_3H$  (BITEAU; LABARRE; TOLEDANO, 2003).



**Figura 13. Representação dos mecanismos catalíticos das PRDXs e seus redutores fisiológicos.**

Inicialmente, a  $Cys_p-SH$  ataca um átomo de  $H_2O_2$  formando  $Cys_p-SOH$ . A próxima etapa depende do tipo de PRDX: nas 2-Cys típicas o SOH formado na  $Cys_p$  reage com a  $Cys_R$  de outra subunidade da enzima formando uma ligação dissulfeto intermolecular (A). Já as 2-Cys atípicas reagem com a  $Cys_R$  da mesma subunidade formando um dissulfeto intramolecular (B), em ambos os casos essa ligação será reduzida pela TRX (A e B). Na PRDX 1-Cys o ácido formado é reduzido por um tiol como a GSH (C). Em caso de superoxidação das PRDXs 2-Cys típicas ( $C_p-SO_2H$ ) estas são reduzidas pela SRX (A) (Figura extraída de RHEE et al., 2012).

#### 1.9.4.2. Peroxirredoxinas e Anemias Hemolíticas

Estudos existentes na literatura revelam que a importância destas proteínas deve ser acentuada nos eritrócitos. Neumann e colaboradores (2003) realizaram experimentos diminuindo a expressão de *PRDX1* em camundongos, e apesar destes serem viáveis e férteis tinham uma reduzida expectativa de vida por apresentarem anemia hemolítica severa e cânceres malignos aos nove meses de vida aproximadamente (NEUMANN et al., 2003). Também em 2003, Lee e colaboradores estudaram camundongos *knockout* para *PRDX2*, e observaram que estes animais apresentavam anemia hemolítica e aumento no nível de EROs em frações mais densas de glóbulos (LEE et al., 2003). Tais resultados sugerem que as PRDXs 1 e 2 desempenham um papel importante na proteção das células vermelhas contra o estresse oxidativo. Ainda com relação a *PRDX2*, um trabalho de De Franceschi e colaboradores demonstrou um aumento nos níveis desta enzima ao analisar culturas de células  $CD34^+$  de beta talassêmicos com a mutação  $CD39 (\beta^0)$  (DE FRANCESCHI et al., 2011). Outro trabalho deste mesmo grupo, utilizando dois modelos de camundongos beta talassêmicos com gravidades distintas, observou que o aumento nos níveis de *PRDX2* era proporcional à gravidade da doença (MATTE et al., 2010).

Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa visando uma análise sistemática do envolvimento das peroxirredoxinas na anemia falciforme e na beta talassemia avaliou os níveis destas enzimas em reticulócitos e eritrócitos de pacientes com as anemias acima citadas, comparando-os com indivíduos sadios (ROMANELLO, 2013). Os resultados obtidos foram bastante promissores e reforçaram os indícios de envolvimento dessas enzimas nas anemias hemolíticas. Dentre os resultados de maior relevância destacamos: o aumento de *PRDX1* em pacientes com beta talassemia intermediária, a redução nos níveis de *PRDX2* em pacientes com anemia falciforme e uma diminuição de *PRDX6* em ambas as anemias hemolíticas analisadas. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar e melhor estabelecer a relação entre essas PRDXs e as anemias estudadas.

#### 1.9.4.3. Peroxirredoxinas e Inflamação

A função das PRDXs não está restrita a sua atividade de antioxidante, essas proteínas participam de cascatas de sinalização mediadas por peróxidos, interagem com uma grande variedade parceiros biológicos e atuam em diversos processos celulares

como proliferação, diferenciação, migração e regulação da expressão gênica (FUJII e IKEDA, 2002; VIVANCOS et al., 2005; KUMSTA e JAKOB, 2009). Estudos recentes abriram uma porta para explorar o papel destas enzimas na modulação de processos inflamatórios, sugerindo que estas podem atuar de três maneiras (KNOOPS et al., 2016), as quais serão brevemente descritas abaixo.

**1. Citoprotetoras contra as elevadas concentrações de EROS geradas durante o processo inflamatório:** o papel citoprotetor das peroxirredoxinas na inflamação foi demonstrado ao se observar que camundongos *knockout* para as PRDXs 2 e 3 eram mais sensíveis ao tratamento com lipopolissacarídeos (LPS), uma endotoxina que induz efeitos inflamatórios. Estes animais apresentavam níveis mais elevados de EROS nos macrófagos e danos oxidativos ao DNA e proteínas quando comparados a camundongos normais (LI et al., 2007; YANG et al., 2007). Em contrapartida, um estudo realizado em um modelo de camundongos com diabetes mellitus tipo 1 que superexpressava a PRDX4, indicou que as células  $\beta$  nas ilhotas de Langerhans eram significativamente mais protegidas contra insultos inflamatórios e a apoptose (DING et al., 2010).

**2. Moduladoras de sinalização redox para controlar funções essenciais de células inflamatórias, como síntese e liberação de mediadores inflamatórios:** diversos estudos tiveram como foco peroxirredoxinas induzíveis em células inflamatórias e seus potenciais papéis como reguladoras na sinalização redox durante o processo inflamatório. Estudos anteriores mostraram que a expressão das PRDXs 1, 2, 4, 5 e 6 é acentuadamente aumentada em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos após o tratamento com interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e LPS (ABBAS et al., 2009; DIET et al., 2007; BAST et al., 2010). A partir desses dados especulou-se que o aumento na expressão de várias peroxirredoxinas poderia representar não somente um mecanismo para proteger as células contra os danos oxidativos, mas também uma forma de controlar efetores celulares sensíveis à modulação redox (KNOOPS et al., 2016). Kim e colegas demonstraram que a expressão da PRDX1 é induzida em células microgliais após o tratamento com LPS por meio da ativação da via de sinalização EROS/p38MAPK e atua na redução da ativação microglial e da produção de NO. Sob essa condição pro-inflamatória, os autores propuseram que a PRDX1 controla a progressão da neuroinflamação pela supressão da ativação microglial através da inibição da via EROS/NFKB/iNOS (KIM et al., 2013). A PRDX6 também mostrou desempenhar um papel interessante na ativação da NADPH-oxidase 2 (NOX2). Em

neutrófilos estimulados a PRDX6 é fosforilada, transloca-se para a membrana e a ativação de sua atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> facilita a montagem e a ativação do complexo NOX2 (CHATTERJEE et al., 2011).

**3. Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e Padrões moleculares associados a danos (DAMPs):** a inflamação é desencadeada quando as células do sistema imune, como os macrófagos, detectam infecções ou lesões nos tecidos. A nível molecular, receptores presentes na superfície celular ou no citoplasma respondem a PAMPs e DAMPs para desencadear a expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, que promovem o recrutamento e a ativação de leucócitos para eliminar o agente infeccioso e detritos do hospedeiro. Várias peroxirredoxinas têm sido propostas para atuar como PAMPs ou DAMPs (KNOOPS et al., 2016). Donnelly e colaboradores relataram que peroxirredoxinas secretadas por parasitas helmintos podem atuar como PAMPs desencadeando o recrutamento de macrófagos e uma resposta Th2 com a produção de altos níveis de IL-10 (interleucina 10) e prostaglandina E2 (DONNELLY et al., 2008).

Antes que a PRDX1 fosse caracterizada como uma peroxidase, esta foi inicialmente descrita como uma proteína liberada a partir de células lisadas capaz de aumentar a atividade citotóxica de células *natural killers* (NK) (SHAU et al., 1993). Esses achados demonstraram que a PRDX1 extracelular é capaz de atuar como um DAMP e desencadear a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 (RIDDELL et al., 2010). Outras PRDXs também já foram detectadas em diversos fluídos corporais, dentre eles o plasma, indicando que estas enzimas também desempenham papéis no meio extracelular, como a modulação do processo inflamatório (ISHII; WARABI e YANAGAWA, 2012). Também foi descrita a liberação exossomal por diferentes tipos de células após serem estimuladas com LPS, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e IL-1, de formas diméricas oxidadas de PRDX1 e PRDX2, bem como de PRDX2 glutationilada desencadeando a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos (CHANG et al., 2006; CATTERALL et al., 2006; MULLEN et al., 2015; SALZANO et al., 2014). O papel das PRDXs 1, 2, 5 e 6 como DAMPs foi enfatizado na inflamação pós-isquêmica no cérebro. Shichita e colegas mostraram que, após lesões isquêmicas, as peroxirredoxinas que são liberadas de células cerebrais necróticas podem induzir a expressão de citocinas inflamatórias em macrófagos levando à morte celular neural (SHICHITA et al., 2012).

A inflamação é um componente essencial da resposta imune inata e está implicada na patogênese de muitas doenças, das quais a maioria também está associada com o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como é o caso da anemia falciforme, portanto, explorar o papel das PRDXs na modulação do processo inflamatório pode auxiliar a entender o papel dessas enzimas de uma forma mais ampla nesta anemia hemolítica.

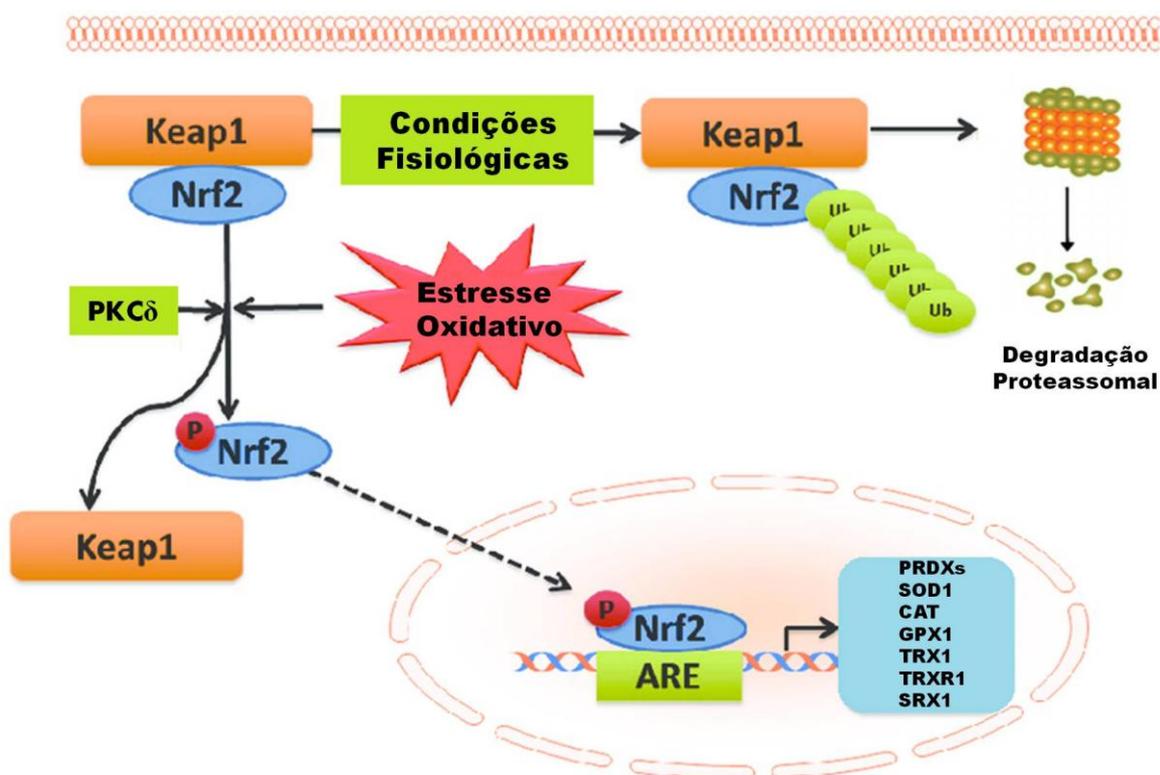
### **1.10. Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 e a regulação antioxidante**

Em condições normais, as enzimas antioxidantes não são expressas em sua capacidade máxima, contudo, estas podem ser induzidas por ativação transcricional, proporcionando proteção catalítica contra o estresse oxidativo (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007). A regulação de sistemas antioxidantes e da resposta celular ao estresse oxidativo envolve várias moléculas sinalizadoras, dentre estas o fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) merece destaque, visto que é um importante fator de transcrição que regula a expressão de diversas de enzimas antioxidantes que serão alvo deste estudo, dentre elas: PRDX1, 2 e 6, TRX1, TRXR1, SRX1, CAT, SOD1 e GPX1 (KOBAYASHI e YAMAMOTO, 2005; JONSSON e LOWTHER, 2007; OSBURN e KENSLE, 2008; SINGH et al., 2010; THAMSEN et al., 2011; SATOH et al., 2011; Ma, 2013; PARK et al., 2014).

Sob condições fisiológicas, NRF2 encontra-se no citoplasma formando um complexo inativo com a proteína KEAP1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), a qual inibe sua atividade transcricional através da ligação à um domínio regulatório onde se ligam outras proteínas, como um complexo ubiquitina ligase, que leva a ubiquitinação e consequente degradação de NRF2 pelo proteassoma (ITOH et al., 1999). Quando a célula é exposta a níveis elevados de agentes oxidantes, NRF2 é fosforilado por proteínas quinases como PKC $\delta$  (*Protein kinase C delta*), por exemplo, se dissocia de KEAP1 e migra para o núcleo onde se liga ao *antioxidant response element* (ARE), presente nas regiões promotoras de diversos genes, ativando a transcrição dos antioxidantes (figura 14) (HUANG; NGUYEN; PICKETT, 2002; NUMAZAWA et al., 2003).

Lee e colaboradores evidenciaram a importância de NRF2 na proteção contra o estresse oxidativo em células eritróides ao incubar eritrócitos deficientes para este fator de transcrição com altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados obtidos mostraram que

estas células eram altamente sensíveis a hemólise e apresentavam aumento na formação de meta-hemoglobina, sugerindo que eritrócitos deficientes de NRF2 são mais sensíveis ao estresse oxidativo e a oxidação da hemoglobina em comparação a eritrócitos normais (LEE et al., 2004). Além de sua atuação como regulador de diversos antioxidantes, NRF2 também atua na regulação da transcrição do gene da globina beta e é um elemento regulatório importante no controle da síntese de heme e de globina, promovendo o equilíbrio na produção desses 2 componentes (HASSON et al., 2007).



**Figura 14. Representação esquemática da via de sinalização de NRF2.** Em condições fisiológicas NRF2 permanece no citoplasma ligado ao seu repressor KEAP1, o qual possui um domínio para a ligação de proteínas relacionadas à ubiquitina ligase que leva a ubiquitinação e degradação de NRF2 pelo proteossoma. A exposição celular a altos níveis de oxidantes promove a fosforilação de NRF2 por proteínas quinases como PKC $\delta$ , este então se dissocia de KEAP1, migra para o núcleo, liga-se ao ARE e ativa a transcrição de diversos genes antioxidantes. (figura adaptada de CHEN, ZHANG, CAI, 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA

A modulação das EROs parece ter uma relação muito estreita com a fisiopatologia de diversas doenças hematológicas, principalmente nas anemias hemolíticas como a beta talassemia e a anemia falciforme. Nestas enfermidades, 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 atuação do sistema de defesa antioxidante composto pelas PRDXs, SOD, CAT e GPX, desempenha um papel fundamental na manutenção dos eritrócitos. As peroxirredoxinas se destacam nesse tipo celular por sua elevada abundância e reatividade (LOW et al., 2007).

Estudos anteriores já demonstraram a importância das PRDXs para o desenvolvimento e manutenção dos eritrócitos em anemias hemolíticas (LEE et al., 2003; NEUMANN et al., 2003; YANG et al., 2007; HAN et al., 2012; MATTE et al., 2010; DA CUNHA et al., 2010; DE FRANCESCHI et al., 2011). Contudo, ainda são escassos os estudos sobre o papel destas enzimas na beta talassemia intermediária e na anemia falciforme. Um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa forneceu indícios de que estas enzimas apresentam variação dos níveis de expressão gênica e proteica nas doenças acima citadas quando comparadas a indivíduos saudáveis. Entretanto, estudos adicionais que incluem um número maior de indivíduos são necessários para melhor estabelecer essa relação, bem como entender os seus mecanismos moleculares subjacentes.

Sendo assim, este trabalho deu continuidade ao estudo realizado anteriormente, com enfoque nas isoformas de PRDXs 1, 2 e 6 e nos redutores fisiológicos 2-Cys PRDXs. Adicionalmente, também foram analisados os demais antioxidantes, SOD1, CAT e GPX1, bem como o complexo NRF2/KEAP1/PKC $\delta$  relacionados à regulação da expressão gênica das enzimas antioxidantes avaliadas neste trabalho. Este estudo apresenta pela primeira vez um panorama abrangente sobre o estado redox das células eritróides de pacientes com beta talassemia intermediária e anemia falciforme.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo central traçar o perfil de expressão de genes envolvidos no estado redox de reticulócitos e eritrócitos de pacientes com beta talassemia intermediária e anemia falciforme em relação a indivíduos saudáveis.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Analisar a expressão gênica e o conteúdo proteico das PRDXs 1, 2 e 6, nos reticulócitos e eritrócitos de pacientes com beta talassemia intermediária e anemia falciforme, comparando-os a indivíduos saudáveis;
- Avaliar a expressão gênica e o conteúdo proteico dos redutores fisiológicos 2-Cys PRDXs, TRX1, TRXR1 e SRX1, nos reticulócitos e eritrócitos de pacientes com beta talassemia intermediária e anemia falciforme, em relação a indivíduos saudáveis;
- Mensurar os níveis das PRDXs 1 e 2 no plasma de pacientes com anemia falciforme buscando uma possível associação entre a secreção dessas enzimas e o processo inflamatório crônico observado nesses pacientes;
- Analisar a expressão gênica e o conteúdo proteico da superóxido dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT) e glutatona peroxidase 1 (GPX1), nos reticulócitos e eritrócitos de pacientes com beta talassemia intermediária e anemia falciforme, comparando-os a indivíduos saudáveis;
- Avaliar a expressão gênica do complexo de regulação antioxidante NRF2/KEAP1/PKC $\delta$ , nos reticulócitos de pacientes beta talassêmicos intermediários e com anemia falciforme;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética Institucionais (CAAE: 31939814.1.1001.5504) e todos os pacientes e controles só foram incluídos no estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 1). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a resolução nº 466/2012 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

### 4.2. Pacientes e controles

Foram convidados pacientes com diagnóstico molecular de beta talassemia ou anemia falciforme previamente realizado pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco (Fundação HEMOPE). Estes pacientes se encontravam em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatório e sem crises de dolorosas recentes. Amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram usadas como controles, este grupo foi composto por doadores voluntários. Uma vez que as PRDXs participam do ciclo circadiano todas as amostras de sangue foram coletadas entre 7 e 9 horas da manhã. A seguir mais dados são fornecidos sobre os grupos analisados.

#### 4.2.1. Pacientes beta talassêmicos e controles

Foram analisados no total 15 pacientes com beta talassemia intermediária, homocigotos para a mutação IVS-I-6 (T→C) ( $\beta^+$ ), com idades entre 8 e 63 anos ( $46.4 \pm 13,63$ ), sendo 8 do sexo feminino e 7 do sexo masculino. Os controles analisados somam 16 indivíduos sadios no total, com idades entre 22 e 42 ( $28 \pm 1,67$ ), sendo 8 do sexo feminino e 8 do sexo masculino.

Adicionalmente, também foram utilizadas amostras de pacientes beta talassêmicos maiores para efeitos comparativos, as quais correspondem a 8 no total, com idades entre 3 e 33 ( $19,75 \pm 15,08$ ), sendo 5 do sexo masculino e 3 do sexo feminino. Estes pacientes apresentavam os seguintes genótipos: IVS-I-6 (T → C) ( $\beta^+$ ) / IVS-I-5 (G → C) ( $\beta^+$ ) (3 indivíduos), IVS-I-6 (T → C) ( $\beta^+$ ) / IVS-I-1 (G → A) ( $\beta^0$ ) (1 indivíduo), IVS-I-1 (G → A) ( $\beta^0$ ) / IVS-II-849 (A → G) ( $\beta^0$ ) (1 indivíduo), CD39 (C→T) ( $\beta^0$ )/ CD39 (C→T) ( $\beta^0$ ) (2 indivíduos) e 1 indivíduo não genotipado.

Os dados hematológicos dos pacientes são apresentados na tabela 2.

**Tabela 2: Dados hematológicos dos pacientes beta talassêmicos**

Parâmetros	Beta talassemia intermediária	Beta talassemia maior
	n=15	n=8
Cel. Verm. ( $10^6\text{mm}^3$ )	$3.77 \pm 0.65$	$3.07 \pm 0.46$
Hb (g/dL)	$7.6 \pm 0.71$	$6.5 \pm 1.82$
VCM (fL)	$66.6 \pm 8.82$	$74.1 \pm 1.32$
Ret (%)	$7.1 \pm 3.69$	$4.3 \pm 1.8$
Hct (%)	$25.2 \pm 1.79$	$22.5 \pm 3.72$
HbF (%)	$10.5 \pm 5.91$	$38.22 \pm 40.05$
HbA (%)	$82.7 \pm 5.38$	$57.7 \pm 39.86$
HbA <sub>2</sub> (%)	$6.8 \pm 1.16$	$2.9 \pm 0.21$
Cel. Branc. ( $10^3\text{mm}^3$ )	$10.738 \pm 5.984.66$	$14.300 \pm 3.591.65$

Cel. Verm., células vermelhas; Hb, hemoglobina; VCM, volume corpuscular médio; Ret, reticulócitos; Hct, hematocrito; HbF, hemoglobina fetal; HbA, hemoglobina A, HbA<sub>2</sub>, hemoglobina A<sub>2</sub>; Cel. Branc., células brancas. Os dados são apresentados com média e desvio padrão.

Informações adicionais foram solicitadas à pacientes e controles (anexo 1), as que apresentaram maior relevância são descritas abaixo:

- Patologias associadas:

- Controles: nenhum relato;
- beta talassêmicos intermediários: 2 cardiopatias; 1 acidente vascular cerebral (AVC); 5 úlceras; 1 insuficiência cardíaca congestiva (ICC); 2 hipertensão arterial e 1 hiperesplenismo;
- beta talassêmicos maiores: nenhum relato.

- Medicação:

- Controle: nenhum relato;
- beta talassêmicos intermediários: 8 ácido fólico; 7 quelantes de ferro; 2 anti-hipertensivos; 1 diuréticos; 1 Digoxina (para tratamento de ICC);
- beta talassêmicos maiores: 4 ácido fólico e quelantes de ferro.

#### 4.2.2. Pacientes falciformes e controles

Foram analisados no total 30 pacientes com AF com idades entre 01 e 50 anos ( $20,38 \pm 11,70$ ), sendo 16 do sexo feminino e 14 do sexo masculino. Os controles analisados correspondem a 27 indivíduos no total, com idades entre 19 e 40 ( $24,54 \pm 5,52$ ), sendo 12 do sexo feminino e 15 do sexo masculino. A tabela 3 lista os haplótipos dos indivíduos com AF que participaram do presente estudo. Os dados hematológicos dos pacientes são apresentados na tabela 4.

**Tabela 3. Haplótipos dos pacientes com anemia falciforme**

Haplótipos	Nº de indivíduos
CAR/CAR	14
CAR/BEN	10
CAR/ATP	3
CAR/CAM	1
BEN/BEN	2

CAR= Bantu ou República centro africana; Ben= Benin; Cam= Camarões; Sen= Senegal; ATP= Atípico.

**Tabela 4: Dados hematológicos dos pacientes com anemia falciforme**

Parâmetros	Anemia Falciforme n=30
Cel. Verm. ( $10^6\text{mm}^3$ )	$2,62 \pm 0,51$
Hb (g/dL)	$7,9 \pm 1,16$
VCM (fL)	$91,2 \pm 9,17$
Ret (%)	$9,2 \pm 3,64$
Hct (%)	$23,6 \pm 3,76$
HbF (%)	$8,0 \pm 4,54$
HbS (%)	$89,3 \pm 4,53$
HbA <sub>2</sub> (%)	$2,6 \pm 0,63$
Cel. Branc. ( $10^3\text{mm}^3$ )	$13.392 \pm 5.376,68$

Cel. Verm., células vermelhas; Hb, hemoglobina; VCM, volume corpuscular médio; Ret, reticulócitos; Hct, hematocrito; HbF, hemoglobina fetal; HbA, hemoglobina A, HbA<sub>2</sub>, hemoglobina A<sub>2</sub>; Cel. Branc., células brancas. Os dados são apresentados com média e desvio padrão.

Informações adicionais foram solicitadas à pacientes e controles (anexo 2), as que apresentaram maior relevância são descritas abaixo:

- Patologias associadas:

- Controles: nenhum relato;
- Falciformes: 4 AVCs; 2 ICCs; 8 úlceras; 5 priapismo; 1 hipotireoidismo; 1 sopro cardíaco; 1 crises convulsivas.

- Medicação:

- Controle: nenhum relato;
- Falciformes: 14 hidroxiuréia; 20 ácido fólico; 1 antidepressivo; 2 analgésicos; 3 quelante de ferro; 1 anticonvulsivo; 1 anti-hipertensivos; 1 diuréticos; 1 medicação para tratamento de ICC.

#### **4.3. Separação de Células Vermelhas**

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo com citrato de sódio e centrifugadas para remoção do plasma e *buffy coat* (fração rica em plaquetas e leucócitos). As células foram lavadas 3 vezes em PBS (solução salina fosfatada tamponada) e ressuspensas em 1 mL de PBS para contagem no contador automático Cell-Dyn 1700 (Abbott Diagnostics, Lake Bluff, Illinois, USA). A concentração final foi ajustada para  $4 \times 10^8$  cel/mL. Para determinação da produção de EROS, as células vermelhas foram ressuspensas em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL.

#### **4.4. Isolamento de Neutrófilos e Células Mononucleares do Sangue Periférico**

As amostras de sangue total de indivíduos controles e pacientes foram coletadas em tubos de heparina lítica (9mL) e separadas com Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) de densidades de 1.119 g/L e 1.077 g/L. Após separação das células mononucleares e granulócitos, as hemácias contaminantes foram lisadas com tampão de lise ( $0.144\text{M NH}_4\text{Cl}$ ;  $0.01\text{M NH}_4\text{HCO}_3$ ) e lavadas novamente em PBS. Para determinação da produção de EROS as células mononucleares e granulócitos foram ressuspensas em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL.

#### 4.5. Determinação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

As amostras de células vermelhas, granulócitos e células mononucleares obtidas a partir do sangue fresco de pacientes e controles foram incubadas com 0,5µL de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). 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., 2005; AMER et al., 2006). Após incubação das células vermelhas (30 minutos); granulócitos e células mononucleares (15 minutos) em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, as células foram centrifugadas (5 minutos a 1600 rpm) lavadas e ressuspendidas em PBS (1X). A produção das EROS foi analisada por citometria de fluxo (FACS-calibur, Becton-Dickinson, Immunofluorometry systems, Mountain View, California, USA) com aquisição de 10.000 eventos, utilizando o programa CellQuest™ para análise da intensidade média de fluorescência (MFI).

#### 4.6. 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 NH<sub>4</sub>Cl; 0.01M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>). 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 C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>; 0.15M KCl, filtrada ou preparada com H<sub>2</sub>O 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 ressuspendido e homogeneizado em 1mL de Trizol® (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), que

rompe as células, dissolvendo os componentes celulares sem comprometer a integridade do RNA.

#### **4.7. Extração de RNA**

As amostras contendo reticulócitos e Trizol® foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, foram adicionados 200µL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) 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, a fase aquosa foi retirada e acondicionada em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500µL de isopropanol gelado. Após homogeneização, foi realizada 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 ressuspenso 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 Life Sciences, Chicago, Illinois, USA) e avaliadas quanto à integridade em gel desnaturante de agarose. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossômicas: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

#### **4.8. 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* (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 1,0 µL *DNaseI reaction buffer* com MgCl<sub>2</sub> 10X (Tris-HCl pH 8.4 200mM, MgCl<sub>2</sub> 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-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). 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 H<sub>2</sub>O. 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 qPCR utilizando iniciadores para o gene endógeno beta actina (BAC). A amplificação adequada deste gene indica uma boa síntese de cDNA.

#### 4.9. Reação de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) onde foi utilizado o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), que emite sinal de fluorescência ao intercalar com DNA dupla-fita. Os *primers* foram desenhados no programa online OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA), analisados quanto a formação de estruturas como *hairpins* e *dimers* e submetidos ao programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para confirmação de especificidade. Como controle endógeno utilizou-se *primers* para amplificação do gene da beta actina (BAC) e da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase1 (HPRT1). 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 5.

A quantificação dos resultados se baseia na derivação da fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). 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  $\Delta Ct$  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  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

**Tabela 5. Sequência de *Primers***

Gene	Numero de Acesso	Forward primer	Reverse primer
Beta Actina (BAC)	NM_001101.3	5'-CAAGCAGGAGTATGACGAGTC-3'	5'-GCCATGCCAATCTCATCTTG-3'
hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1)	NM_000194.2	5'-AGATGGTCAAGGTCGCAAG-3'	5'-GTATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC-3'
Peroxirredoxina 1 (PRDX1)	NM_002574.3	5'-TGTAATGACCTCCCTGTTGG-3'	5'-TATCACTGCCAGGTTTCCAG-3'
Peroxirredoxina 2 (PRDX2)	NM_005809.5	5'-CTGTTAATGATTTGCCTGTGGG-3'	5'-TGGGCTTAATCGTGCTACTG-3'
Peroxirredoxina 6 (PRDX6)	NM_004905.2	5'-CACGACTTTCTGGGAGACT-3'	5'-GGGCAATCAACTTAACATTCCTC-3'
Catalase (CAT)	NM_001752.3	5'-TGAATGAGGAACAGAGGAAACG-3'	5'-GTACTTGTCCAGAAGAGCCTG-3'
Superoxido Dismutase 1 (SOD1)	NM_000454.4	5'-GGGCAAAGGTGAAATGAAG-3'	5'-CAGCTAGCAGGATAACAGATGAG-3'
Glutathione Peroxidase (GPX1)	NM_000581.2	5'-TTCCAGACCATTGACATCGAG-3'	5'-CACCCCTCATAGATGAAAACCCC-3'
Sulfirredoxina 1 (SRX1)	NM_080725.2	5'-AGCATCCACACCAGACTTG-3'	5'-ACCCCTGCTATCCCTTCTG-3'
Tiorredoxina 1 (TRX1)	NM_003329.3	5'-TGGTGAAGCAGATCGAGAGCAAAGA-3'	5'-ACCACGTGGCTGAGAAGTCAACTA-3'
Tiorredoxina Reductase 1 (TRXR1)	NM_003330.3	5'-CAACATTGTCTGTGACCAAGC-3'	5'-AACCCCTCTAGAAAACCTCGCC-3'
Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (NRF2)	NM_006164.4	5'-GCTACGTGATGAAGATGGAAAAC-3'	5'-AGCTCAGAAAAGGTCAAATCCTC-3'
Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1)	NM_012289.3	5'-AACAGAGACGTGGACTTTTCG-3'	5'-GTGTCTGTATCTGGGTCGTAAC-3'
Protein kinase C delta (PKCδ)	NM_006254.3	5'-TGGAAAAGCGAGGTTGG-3'	5'-ATGGAGTCGATGAGGTTCTTG-3'

## 4.10. Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real

### 4.10.1. Concentração de Primer

A concentração ótima do *primer* utilizado na qPCR, 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 6.

**Tabela 6. Matriz para Padronização da Concentração Ótima de *Primers Forward* e *Reverse***

		<i>Primer Reverse</i> (nM)		
		100	150	300
<i>Primer Forward</i> (nM)	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  $\Delta Rn$  (variação de fluorescência) e não apresentou formação de dímeros, mesmo nos poços com NTCs (*no-template controls*). Na tabela 7 estão listadas as concentrações ótimas dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo.

#### 4.10.2. Eficiência de Reação

Para que a reação de qPCR 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<sup>+</sup>), 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 R<sup>2</sup> 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%, R<sup>2</sup> ≥ 0,99, *slope* próximo a -3,32 e Y- intercept maior que 32 (BUSTIN et al.,2009). 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 (BUSTIN et al.,2009). Os principais parâmetros referentes a cada *primer* utilizado neste trabalho estão listados na tabela 7.

**Tabela 7. Parâmetros de importância para os primers caracterizados**

<i>Primer</i>	<i>Concentração (F/R) nM</i>	<i>Threshold</i>	<i>Eficiência (%)</i>
<b>BAC</b>	300/150	0,098701	101,311
<b>HPRT1</b>	150/300	0,082606	97,648
<b>SOD1</b>	150/150	0,058913	96,576
<b>GPX1</b>	300/150	0,070705	96,5
<b>CAT</b>	150/300	0,122229	101,923
<b>PRDX1</b>	300/300	0,060659	95,439
<b>PRDX2</b>	300/300	0,096587	95,195
<b>PRDX6</b>	100/100	0,107838	98,96
<b>TRX1</b>	100/150	0,075392	95,331
<b>TRXR1</b>	150/150	0,092336	96,207
<b>SRX1</b>	100/100	0,094858	95,645
<b>NRF2</b>	150/150	0,058913	96,087
<b>KEAP1</b>	300/300	0,101843	98,695
<b>PKCδ</b>	100/300	0,049087	103,585

#### 4.11. Western blotting

Para o plasma e a lise das células vermelhas utilizou-se o seguinte tampão: EDTA (10mM), Trisma base (100mM), Pirofosfato de sódio (10mM), Fluoreto de sódio (100mM), Ortovanadato de sódio (10mM), PMSF (2mM), Aprotinina (0,1mg/ml) Triton (10%) e cComplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science). Amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 5.000 rpm para separação do plasma e remoção do *buffy coat*. O precipitado de hemácias e o plasma foram transferidos para diferentes tubos onde foi adicionado o mesmo volume de tampão às amostras. Estas amostras foram incubadas por 40 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 12.000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Após estabelecer a mesma concentração de proteínas totais para todas as amostras (50µg), foram adicionados a elas tampão de Laemmli (LAEMMLI, 1970). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio- Rad, Hercules, Califórnia, EUA) por transferência submersa. A membrana foi bloqueada por 1 hora com 5% p/v de leite

desnatado em TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, pH=8, com 0,1% v/v de Tween 20). Todos os anticorpos foram utilizados conforme orientação do fabricante. Anticorpos primários: Anti-PRDX2 mAb (diluição 1:5.000, Abnova #H00007001-M01); Anti-PRDX6 mAb (diluição 1:5.000, Abnova #H00009588-M01); Anti-TRX1 mAb (diluição 1:2.500, Abnova #H00007295-M01); Anti-PRDX1 mAb (diluição 1:4.000, Cell Signaling #8499); Anti-catalase mAb (diluição 1:5.000, Cell Signaling #12980); Anti-GPX1 mAb (diluição 1:4.000, Abcam #ab22604) e Anti-SOD1 mAb (diluição 1:5.000, Abcam #ab16831); Anti-SRX1 policlonal rabbit (diluição 1:2.500, Proteintech Group Inc #14273-1-AP); Anti-TRXR1 mAb (diluição 1:2.000, AbFrontier Co #LF-PA0023); Anti-GAPDH policlonal rabbit (diluição 1:10.000, EMD Millipore #ABS16); anti-Prx-SO3 policlonal rabbit (diluição 1:2500, AbFrontier Co #LF-PA0004). Anticorpos secundários: Goat anti-rabbit IgG conjugated HRP e Goat anti-mouse IgG conjugated HRP (diluição 1:10.000, Biorbyt Ltd - Cambridge, Cambridgeshire, UK).

Após incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lava lavada (TBS-T por 4X de 5 min. cada) e incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (Amersham<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent - GE Healthcare ) por quimioluminiscência de acordo com as instruções do fabricante. As bandas foram visualizadas e fotografadas usando um aparelho fotodocumentador ChemiDoc (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

#### **4.12. Análise estatística**

Os dados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$ SEM; standard error of mean) e foram comparados com teste *t Mann Withney* utilizando o GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

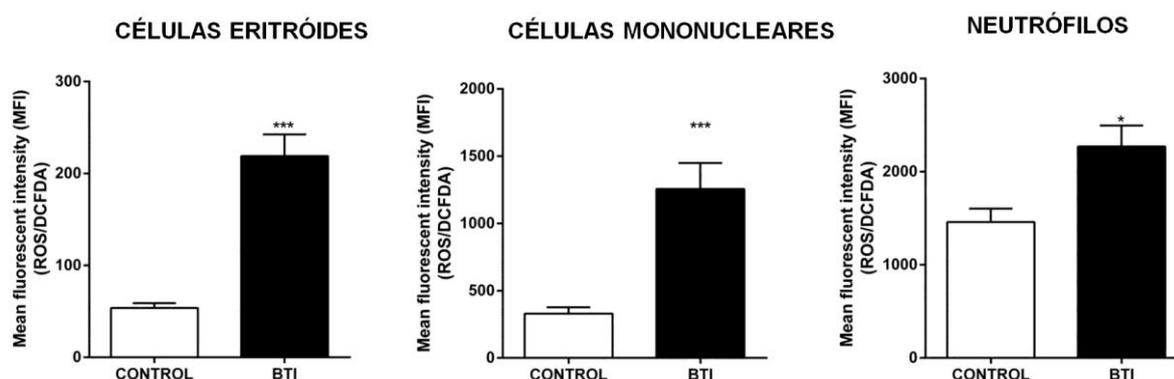
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar o entendimento, os resultados e a discussão foram separados em dois capítulos, nos quais descrevemos os resultados encontrados para os pacientes beta talassêmicos e sua respectiva discussão no capítulo 1 e para pacientes com anemia falciforme no capítulo 2.

### 5.1. CAPÍTULO 1 - Análise de genes envolvidos no estado redox de reticulócitos e eritrócitos de pacientes beta talassêmicos

#### 5.1.1. Produção de EROS é aumentada em diferentes tipos de células sanguíneas de pacientes beta talassêmicos

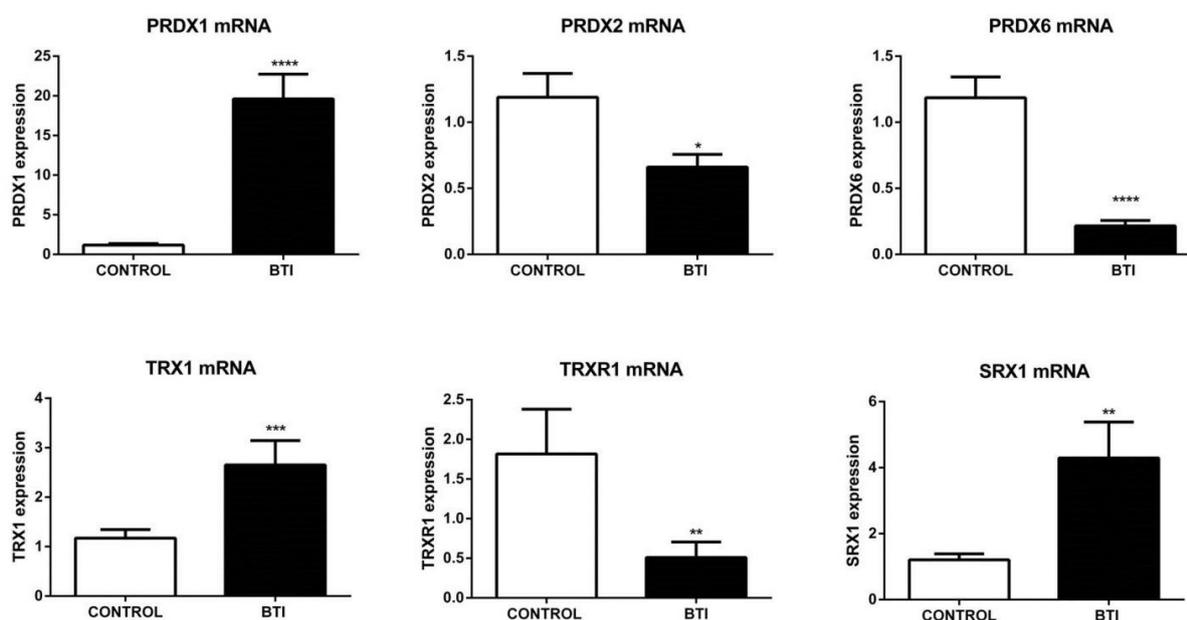
Os níveis de EROS foram mensurados nos eritrócitos de pacientes com beta talassemia intermediária (BTI) e indivíduos saudáveis (Control). Adicionalmente, avaliamos também os níveis destes compostos em neutrófilos e células mononucleares do sangue periférico destes mesmos indivíduos. Os resultados obtidos mostraram significativo aumento na produção de EROS em todos os tipos celulares analisados (figura15).



**Figura 15. Análise produção de EROS em células do sangue.** A produção de EROS foi significativamente aumentada nos neutrófilos, células vermelhas e mononucleares de pacientes com beta talassemia intermediária (n=13) em relação ao grupo e indivíduos saudáveis (n=15). Os resultados são expressos de acordo com a intensidade média de fluorescência (MFI) emitida pelo conjunto de células analisadas e são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$ SEM). Significado estatístico: (\* $p < 0,05$ ), (\*\*\*) $p < 0,0001$ ).

### 5.1.2. Transcrição das PRDXs 1, 2 e 6 e dos redutores de PRDXs 2- Cys é alterada em reticulócitos de pacientes beta talassêmicos intermediários

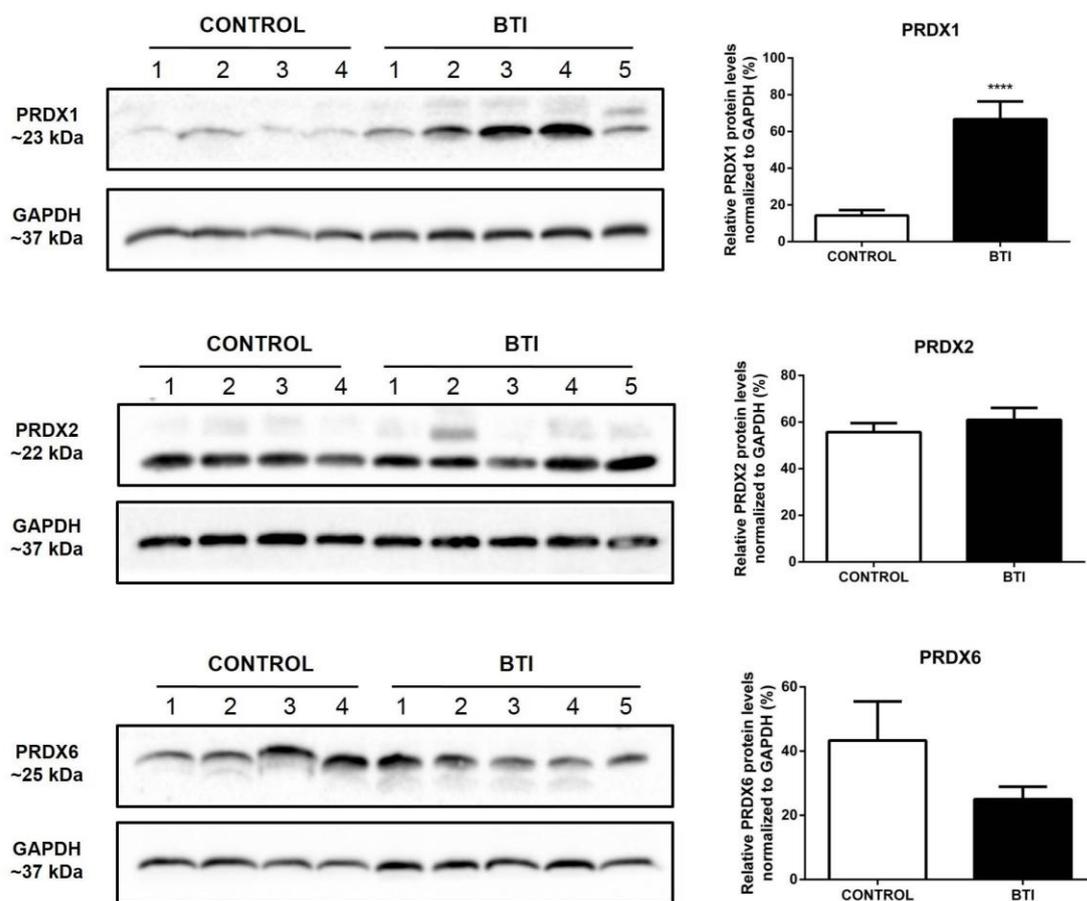
Comprovado o aumento expressivo da geração de EROS, analisamos os níveis transcricionais das PRDXs 1, 2 e 6 e dos redutores TRX1, TRXR1 e SRX1, em reticulócitos de indivíduos saudáveis (control) e com beta talassemia intermediária (BTI). Os resultados obtidos evidenciaram um significativo aumento nos níveis do RNAm da *PRDX1*, *TRX1* e *SRX1*, bem como a redução do RNAm da *PRDX2*, *PRDX6* e *TRXR1* em pacientes BTI quando comparados a indivíduos saudáveis (figura 16).



**Figura 16.** Análise da expressão gênica das PRDXs 1, 2 e 6 e dos redutores PRDXs 2- Cys em reticulócitos de beta talassêmicos intermediários e indivíduos saudáveis. A qPCR foi realizada utilizando os *primers* descritos na tabela 5. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referencia endógena *beta actina* (*BAC*), exceto para *TRXR1*, onde utilizou-se *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) como referencia endógena. Control (n=16) e BTI (n=15). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$ SEM). Significado estatístico: (\* $p < 0,05$ ), (\*\* $p < 0,001$ ), (\*\*\*) $p < 0,0001$ ), (\*\*\*\* $p < 0,00001$ ).

### 5.1.3. Níveis proteicos de PRDX1 são aumentados nos eritrócitos de beta talassêmicos intermediários

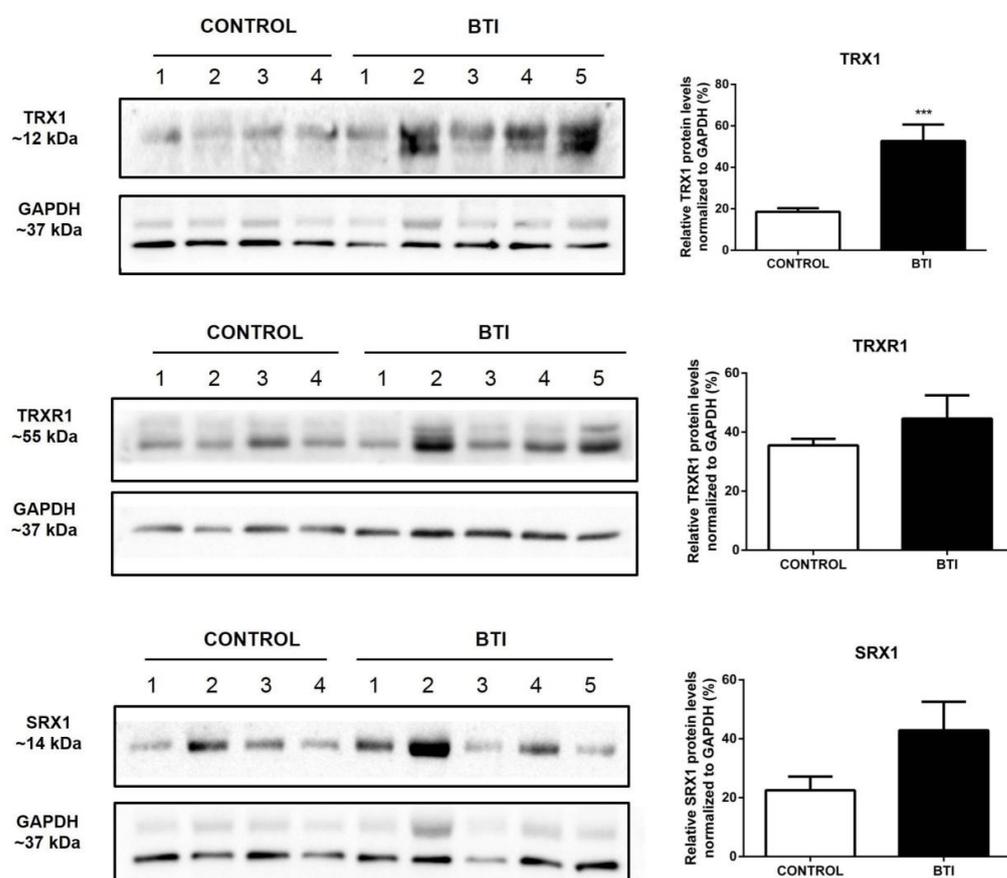
O conteúdo proteico das três isoformas de PRDXs foram mensurados no lisado celular de eritrócitos maduros de 10 pacientes e 8 indivíduos sadios no total. Em concordância com os níveis de RNAm, nossos dados mostraram um aumento estatisticamente significativo da produção proteica de PRDX1 (figura 17). Em contrapartida, os níveis proteicos da PRDX2 e PRDX6 não apresentaram diferenças estatísticas entre pacientes e controles (figura 17), apesar da redução observada nos níveis de RNAm destas enzimas em reticulócitos de talassêmicos intermediários (figura 16).



**Figura 17. Análise dos níveis proteicos das PRDXs 1, 2 e 6 no lisado celular de eritrócitos de pacientes beta talassêmicos intermediários e indivíduos sadios.** As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50µg de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referencia endógena o GAPDH. Control (1-4) e BTI (1-5). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM) e são representativos de duas membranas independentes. Significado estatístico: (\*\*\*\* $p < 0,00001$ ).

#### 5.1.4. Conteúdo proteico de TRX1 é aumentado nos eritrócitos de beta talassêmicos intermediários

Os níveis proteicos dos redutores 2-Cys PRDXs foram mensurados no lisado celular de eritrócitos maduros de BTI (n=10) e indivíduos saudáveis (n=8). Nossos resultados mostraram um aumento significativo na produção proteica da TRX1 (figura 4), corroborando os dados de expressão gênica (figura 16). A TRXR1 não apresentou diferenças relevantes entre pacientes e controles (figura 18), apesar da redução observada nos níveis de RNAm destas enzimas em BTI (figura 16). A SRX1 não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos, embora tenha mostrado níveis mais elevados em BTI (~91%) (figura 18).



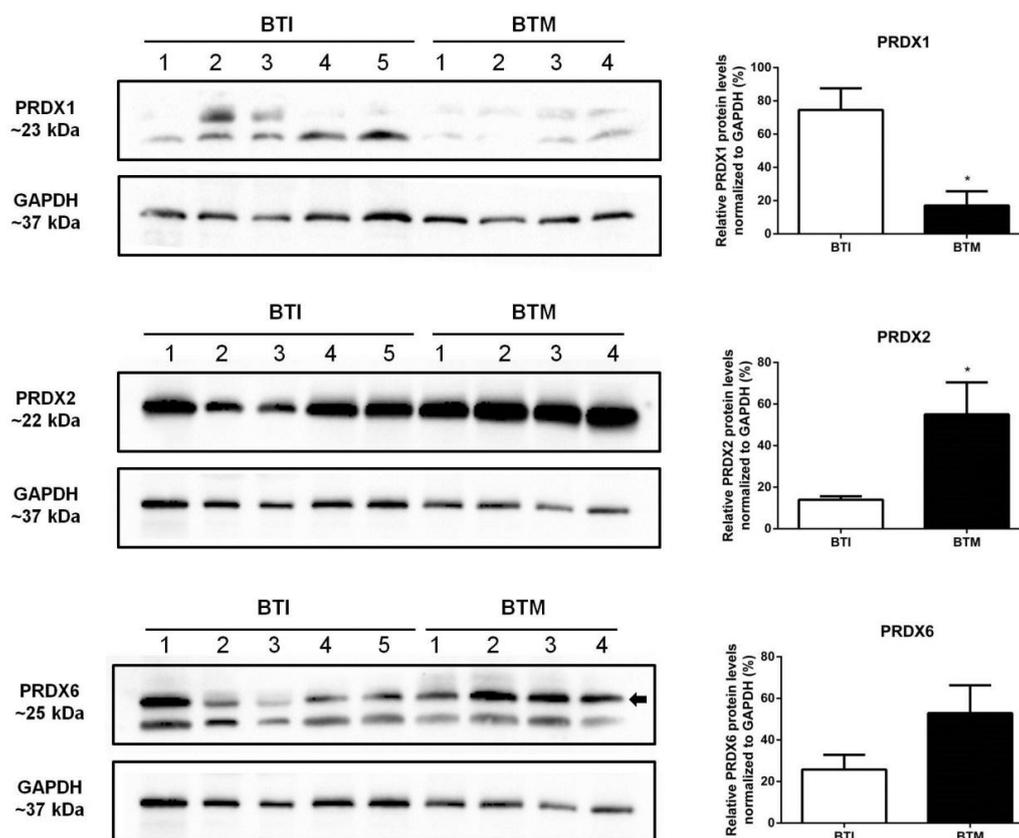
**Figura 18. Análise dos níveis proteicos dos redutores PRDXs 2- Cys no lisado celular de eritrócitos de pacientes beta talassêmicos intermediários e indivíduos saudáveis.** As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50µg de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referencia endógena o GAPDH. Control (1-4) e BTI (1-5). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM) e são representativos de duas membranas independentes. Significado estatístico: \*\*\*( $p < 0,0001$ ).

### 5.1.5. Conteúdo proteico das PRDXs 1 e 2 varia entre fenótipos da beta talassemia

Como descrito anteriormente, De Franceschi e colaboradores demonstraram um aumento nos níveis de PRDX2 ao analisar culturas eritróides de beta talassêmicos com a mutação CD39 ( $\beta^0$ ) (DE FRANCESCHI et al., 2011). Este mesmo grupo também relatou que o aumento dessa enzima estava relacionado com a gravidade da doença, ao analisar dois modelos de camundongos beta talassêmicos com gravidades distintas (MATTE et al., 2010). Ainda neste trabalho, diferenças nos níveis de PRDX1 e PRDX6 não foram observadas. Em contrapartida, nossas análises em beta talassêmicos intermediários homozigotos para IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) ( $\beta^+$ ), uma mutação que de modo geral, apresenta um fenótipo mais brando, mostraram um aumento nos níveis proteicos de PRDX1, não sendo observadas diferenças de conteúdo proteico de PRDX2 e PRDX6, quando comparada indivíduos sadios (figura 17). Visando uma melhor discussão de nossos dados, comparamos os níveis proteicos destas PRDXs entre beta talassêmicos intermediários (BTI) e beta talassêmicos maiores (BTM). Foram analisados 10 pacientes BTI, todos homozigotos para IVS-I-6 (T $\rightarrow$ C) e 8 pacientes BTM, com as seguintes mutações: IVS-I-6 (T  $\rightarrow$  C) / IVS-I-5 (G  $\rightarrow$  C) (3 indivíduos), IVS-I-6 (T  $\rightarrow$  C) / IVS-I-1 (G  $\rightarrow$  A) (1 indivíduo), IVS-I-1 (G  $\rightarrow$  A) / IVS-II- A  $\rightarrow$  G) (1 indivíduo), CD39 (C $\rightarrow$ T) (2 indivíduos) e 1 indivíduo não genotipado.

Visto que, PRDX1 e PRDX2 apresentam aproximadamente 91% de identidade sequencial, utilizamos uma proteína humana recombinante para testar uma possível reação de ligação cruzada entre os anticorpos dessas proteínas, a qual não foi observada confirmando assim a especificidade dos mesmos (dados não mostrados).

Os resultados obtidos mostram níveis significativamente aumentados de PRDX1 em BTI quando comparados a indivíduos BTM, enquanto a PRDX2 mostrou-se mais elevada em BTM. A PRDX6 não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (figura 19).



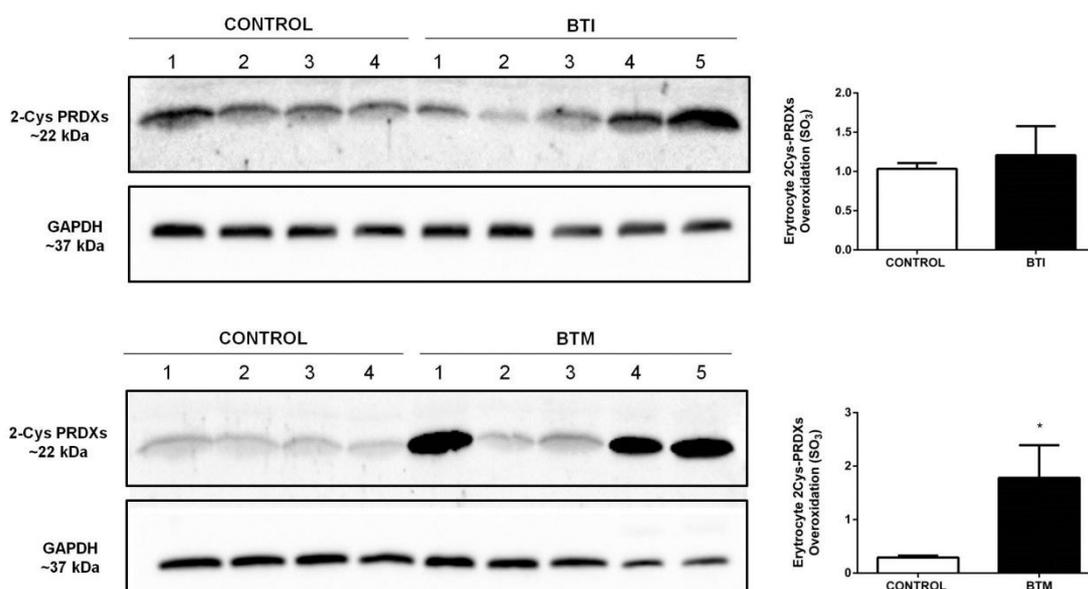
**Figura 19. Análise comparativa dos níveis proteicos das PRDXs 1, 2 e 6 entre beta talassêmicos intermediários e maiores.** As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50µg de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referencia endógena o GAPDH. BTI (1-5) e BTM (1-4). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM) e são representativos de duas membranas independentes. Significado estatístico (\* $p < 0,05$ ).

### 5.1.6. Eritrócitos de pacientes com BTM apresentam níveis mais elevados de superoxidação 2-Cys PRDXs, especialmente PRDX2

Os níveis proteicos de PRDX2 não foram afetados em pacientes com BTI e indivíduos saudáveis. No entanto, altos níveis dessa proteína foram observados em pacientes com BTM. Sabe-se que a cisteína no sítio ativo das 2-Cys PRDXs pode ser superoxidada em  $SO_2/SO_3$ , o que resulta na sua inativação catalítica. A forma superoxidada destas enzimas pode ser detectada por análises de Western blot que reconhecem uma sequência específica correspondente a  $SO_2/SO_3$  no sítio catalítico das 2-Cys PRDXs. Uma vez que esta sequência é a mesma para PRDX1 e PRDX2 e o peso molecular destas duas enzimas é muito semelhante, não é possível diferenciar as formas

SO<sub>2</sub>/SO<sub>3</sub> das PRDXs 1 e 2 por Western blot. No entanto, a PRDX2 é mais sensível à superoxidação e aproximadamente 80 vezes mais expressa em eritrócitos do que a PRDX1 (LIM et al., 2008; CHO et al., 2010), portanto, as formas superoxidadas detectadas por western blot correspondem em grande parte à PRDX2 (figura 20).

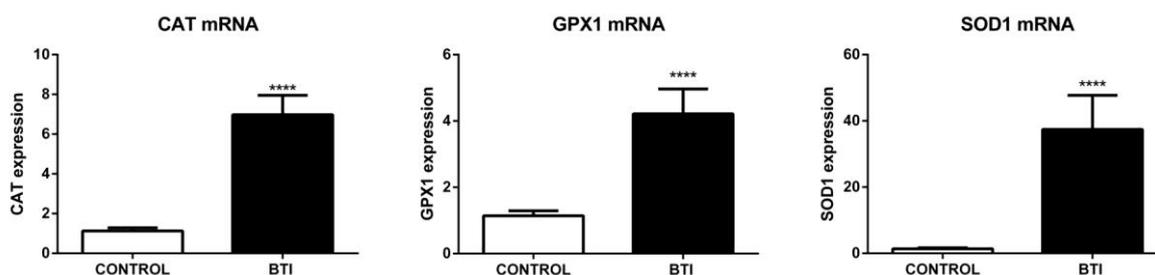
Para estas análises, as células eritróides foram lisadas na presença de N-etilmaleimida (NEM) para evitar oxidações artificiais e usamos um anticorpo anti-Prdx-SO<sub>3</sub>. Nossos resultados mostraram que a superoxidação de 2-Cys PRDXs foi significativa maior em pacientes com BTM (figura 20).



**Figura 20. Análise dos níveis de superoxidação das 2-Cys PRDXs em pacientes com beta talassemia intermediária e maior.** Western blot representativo para o estado de superoxidação das 2-Cys PRDXs. As células eritróides foram lisadas na presença de 200 μM de Nethylmaleimide (NEM) para evitar oxidação adicional da amostra. Os níveis de superoxidação foram mensurados utilizando-se 50μg de extrato proteico total, as amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v). A intensidade das bandas foi mensurada usando GAPDH como controle endógeno. Control (n=4; 1-4); BTI (n=5; 1-5); BTM (n=5; 1-5). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria utilizando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados como média com erro padrão (± SEM). Significado estatístico: (\*p<0,05).

### 5.1.7. Expressão gênica de *CAT*, *GPX1* e *SOD1* é aumentada em beta talassêmicos intermediários

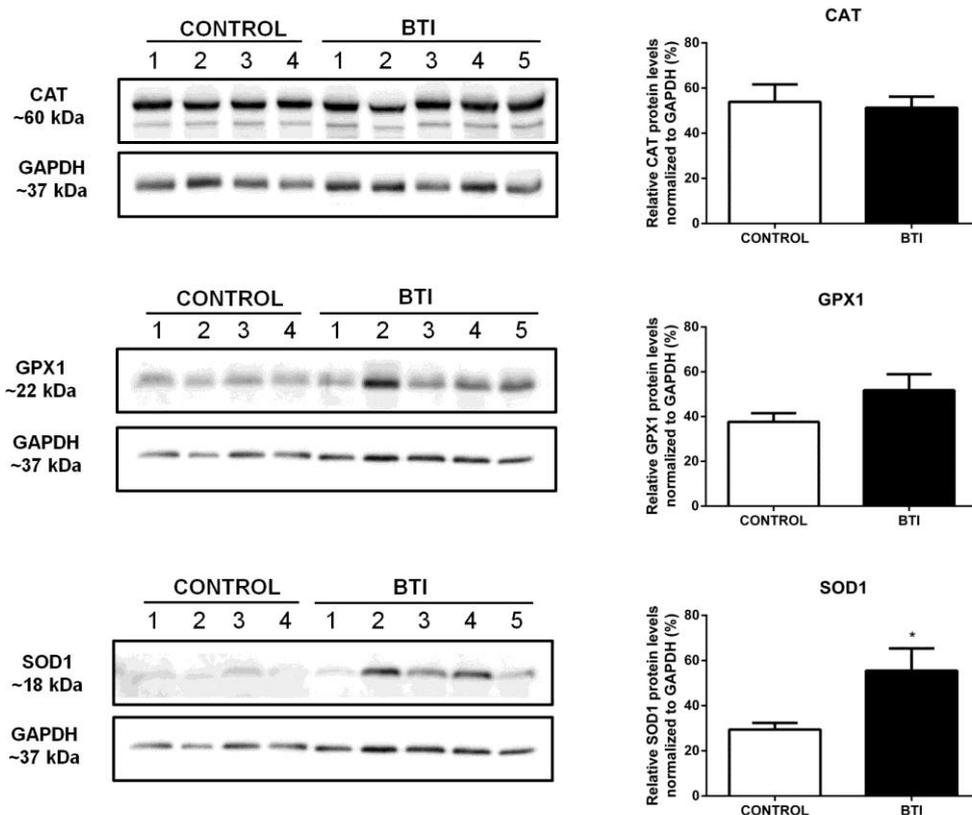
Para as análises de expressão gênica foram utilizados reticulócitos de 15 pacientes com beta talassemia intermediária (BTI) e de 16 doadores sadios (control). Os resultados obtidos mostraram aumento nos níveis de RNAm de *CAT*, *GPX1* e *SOD1* em pacientes BTI quando comparados ao grupo de indivíduos sadios (figura 21).



**Figura 21. Análise de expressão gênica da *SOD1*, *CAT* e *GPX1* em indivíduos sadios e pacientes beta talassêmicos intermediários.** A qPCR foi realizada utilizando os *primers* descritos na tabela 5. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referencia endógena *beta actina (BAC)*. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM). Significado estatístico: (\*\*\*\* $p < 0,00001$ ).

### 5.1.8. Conteúdo proteico de *SOD1* é maior em pacientes com beta talassemia intermediária

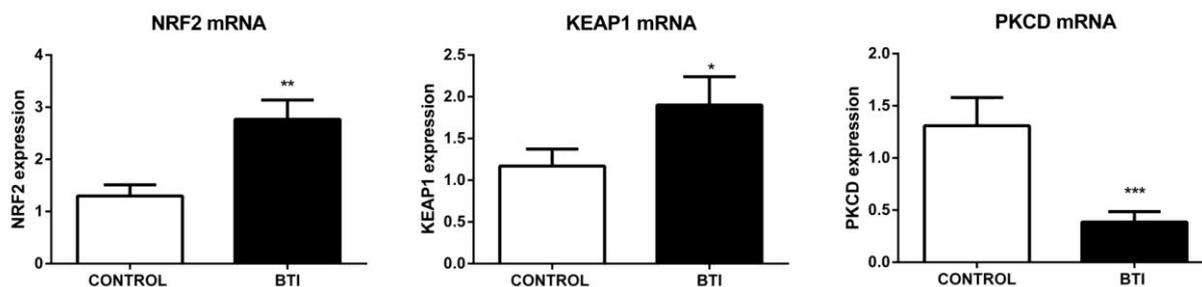
O conteúdo proteico de *CAT*, *GPX1* e *SOD1* foi mensurado no lisado celular de eritrócitos maduros de 10 pacientes com beta talassemia intermediária e 8 indivíduos sadios no total (figura 22). Apesar dos níveis significativamente elevados de RNAm (figura 21), *CAT* e *GPX1* não apresentaram diferenças estatisticamente relevantes de conteúdo proteico entre os grupos analisados (figura 22). No caso da *SOD1*, os dados proteicos refletem os altos níveis de RNAm observados, visto que, observamos um significativo aumento em sua produção proteica nos pacientes analisados (figura 22).



**Figura 22. Análise do conteúdo proteico de CAT, GPX1 e SOD1.** As amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50µg de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referencia endógena o GAPDH. Control (1-4) e BTI (1-5). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM) e são representativos de duas membranas independentes. Significado estatístico: (\* $p < 0,05$ ).

### 5.1.9. Complexo de regulação antioxidante NRF2, KEAP1 e PKC $\delta$ é diferencialmente expresso em beta talassêmicos intermediários

A expressão gênica do complexo *NRF2*, *KEAP1* e *PKC $\delta$*  foi analisada em reticulócitos de pacientes BTI e comparada com indivíduos sadios (control). Os dados obtidos mostraram um aumento na expressão gênica de *NRF2* (aproximadamente 3 vezes) e *KEAP1* (aproximadamente 2 vezes) nos reticulócitos do grupo BTI quando comparado ao grupo controle (figura 23). Já *PKC $\delta$*  apresentou uma significativa redução nos pacientes BTI (figura 23).



**Figura 23.** Análise da expressão gênica de NRF2, KEAP1 e PKC $\delta$  em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com beta talassemia intermediária. A qPCR foi realizada utilizando os *primers* descritos na tabela 5. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referência endógena *beta actina* (*BAC*). Control (n=16) e BTI (n=15). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM). Significado estatístico: (\* $p$ <0,05), (\*\* $p$ < 0,001), (\*\*\*) $p$ < 0,0001).

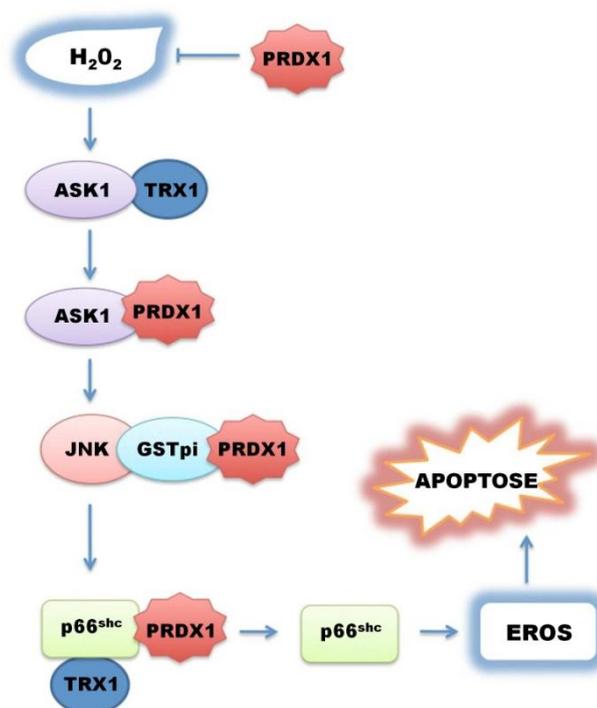
#### 5.1.10. Discussão

Diversos trabalhos já relacionam a geração de EROS com a fisiopatologia da beta talassemia. Corroborando esses relatos, nossos dados evidenciaram um significativo aumento desses compostos não somente nos eritrócitos, mas também nas células mononucleares e neutrófilos dos pacientes analisados. Com relação às células mononucleares, o estresse oxidativo prejudica as funções fagocíticas e desencadeia um quadro de senescência prematura nos linfócitos T, que por sua vez prejudica a função do sistema inune (GHATREH-SAMANI et al., 2016). No que se refere aos neutrófilos, estes exercem sua atividade antibacteriana por meio da produção de EROS gerados através do burst respiratório. Entretanto, um estudo realizado por Amer e Fibach, demonstrou que neutrófilos talassêmicos submetidos ao estresse crônico apresentam uma redução na capacidade de provocar o burst respiratório, ocasionando o comprometimento de sua função antibacteriana (AMER e FIBACH, 2005). O comprometimento da função das células mononucleares e dos neutrófilos ocasionado pelo estresse oxidativo pode estar intimamente relacionado com a maior susceptibilidade a infecções recorrentes que frequentemente é observada em beta talassêmicos. Nos eritrócitos, como já descrito com maiores detalhes anteriormente, o estresse oxidativo tem sido implicado na eritropoese ineficaz, resultando na produção extremamente baixa de glóbulos vermelhos maduros, os quais por sua vez, terão uma curta sobrevida na circulação em virtude dos inúmeros danos oxidativos acumulados. Adicionalmente, a hemólise dos eritrócitos na circulação promove danos adicionais a

outras células, visto que os eritrócitos são células circulantes que tem acesso a todos os tecidos do corpo (VOSKOU et al., 2015).

Portanto, a atuação do sistema de defesa antioxidante enzimático é de vital importância na manutenção dos eritrócitos, o que coloca as peroxirredoxinas em destaque por sua abundância e reatividade com os níveis de EROs aumentados (MEISSNER, U. et al., 2007; YANG et al., 2007; STACEY et al., 2009). Neste trabalho, mostramos que os níveis de PRDX1 são maiores em pacientes BTI quando comparados a indivíduos saudáveis e BTM. A importância desta PRDX para a sobrevivência dos eritrócitos foi demonstrada por Neumann e colegas que ao diminuir a expressão dessa enzima em camundongos observaram que estes apresentavam reduzida expectativa de vida, bem como grave anemia hemolítica (NEUMANN et al., 2003). Assim, especulamos que o aumento de PRDX1 pode contribuir com a PRDX2 na eliminação de  $H_2O_2$  com consequente diminuição de efeitos deletérios causados por este composto nos eritrócitos de pacientes com BTI.

Ainda no que se refere à PRDX1, estudos anteriores demonstraram em diferentes tipos celulares que paralelamente à sua atividade de peroxidase, esta enzima, assim como seu redutor fisiológico TRX1, possuem funções anti-apoptóticas no citoplasma através da interação direta ou indireta com importantes reguladores apoptóticos induzidos pelo estresse oxidativo, como ASK1, JNK e p66<sup>shc</sup> (SAITOH et al., 1998; KIM, KIM, LEE, 2008; GERTZ et al., 2009). Nossos resultados também evidenciaram níveis significativamente elevados de TRX1 em BTI, indicando que o aumento dessas duas proteínas pode representar um mecanismo adicional de proteção celular na defesa contra a morte celular induzida pelo estresse oxidativo, detalhes dessa interação são esquematizados e descritos na figura 24. A expressão diferencial encontrada para PRDX1 entre BTI e BTM, possivelmente age como um modulador fenotípico da gravidade da doença, porém são necessários estudos complementares para estabelecer melhor essa relação.



**Figura 24. PRDX1 e TRX1 na supressão da via apoptótica ASK1, JNK e p66shc.** Em condições fisiológicas, a PRDX1 suprime a sinalização de ASK1- JNK, mantendo sob controle os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uma vez que ASK1 permanece associada ao seu inibidor fisiológico, a TRX1. Entretanto, em condições de estresse oxidativo a TRX1 é substituída pela PRDX1 em sua forma oxidada para continuar a suprimir a ativação de ASK1. Trabalhos anteriores demonstraram que a superexpressão de PRDX1 inibe significativamente a fosforilação/ativação de ASK1 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, esta enzima também suprime a ativação de JNK, cuja ativação induzida por vários tipos de estresses, através de uma interação indireta mediada pela glutathione-S-transferase pi (GSTpi). Adicionalmente, a PRDX1 e a TRX1 foram identificadas como um dos moduladores negativos da ativação de p66<sup>Shc</sup>, o qual tem papel central na apoptose induzida por estresse oxidativo através da indução do colapso respiratório e ruptura mitocondrial. Os elevados níveis de PRDX1 e TRX1 observados em nosso trabalho indicam um possível mecanismo celular para manter essa via inativada, aumentando assim a sobrevivência da célula e consequentemente reduzir os impactos da eritropoiese ineficaz mediada por EROS (figura adaptada de ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012).

Em relação a PRDX2, seu papel na manutenção dos eritrócitos foi descrito em um estudo no qual se observou a presença de altos níveis de EROS, aumento da formação de corpos de Heinz e anemia hemolítica grave em camundongos *Prdx2*<sup>-/-</sup>. Assim, é provável que o equilíbrio redox regulado pela PRDX2 nos eritrócitos esteja intimamente associado a doenças hematológicas, como a redução da vida útil dessas células e a instabilidade da hemoglobina (LEE et al., 2003). Nossos resultados apontaram níveis reduzidos do RNAm desta enzima em reticulócitos de pacientes BTI, porém não foram observadas diferenças a nível proteico, estes achados podem indicar

que nesses pacientes o pico de produção de PRDX2 ocorreu em fases anteriores do desenvolvimento eritróide ou a existência de processos pós-transcricionais ainda não elucidados.

Já em BTM, os níveis de PRDX2 se mostraram bastante aumentados quando comparados a pacientes BTI e também em indivíduos saudáveis. Contudo, apesar desse aumento, a superoxidação das cisteínas a ácido sulfônico ( $\text{SO}_3$ ) no sítio catalítico dessas enzimas também é maior nesses pacientes. Estudos anteriores demonstraram que a oxidação e a superoxidação das PRDXs podem ser importantes para cascatas de sinalização e também para disponibilizar a TRX1 na forma reduzida para possibilitar a ativação de vias de reparo com o objetivo de promover a sobrevivência celular (DAY et al., 2012; VEAL et al., 2017; STOCKER et al., 2018). Uma vez que a produção de EROS em pacientes com BTM é bastante acentuada, a superoxidação da PRDX2 pode estar envolvida na tentativa de manter a atividade de TRX1 para auxiliar na sobrevivência celular sob condições de estresse oxidativo, como já descrito em células de levedura (DAY et al., 2012). No entanto, uma vez que a geração de EROS está continuamente aumentada nessas células, esse mecanismo pode não funcionar adequadamente. Em contraste, em células BTI, o aumento de PRDX1 e SRX1 poderia contribuir com a desintoxicação de EROS e com a prevenção de elevados níveis de superoxidação da PRDX2, respectivamente, prolongando o tempo de vida útil dos eritrócitos.

Embora a PRDX6 e a TRXR1 tenham apresentado níveis de RNAm reduzidos em pacientes BTI, não foram observadas diferenças de seu conteúdo proteico nesses pacientes, indicando que a produção dessas proteínas pode ter ocorrido nos estágios iniciais do desenvolvimento eritróide na medula óssea. Análises comparativas utilizando o método de cultura de células  $\text{CD34}^+$  de indivíduos saudáveis e pacientes BTI podem fornecer um perfil mais preciso sobre os estágios nos quais ocorre o pico de produção dessas enzimas em pacientes talassêmicos.

No que concerne aos demais antioxidantes presentes nos eritrócitos, a SOD1 é uma das mais importantes enzimas devido a sua capacidade de decompor ânion superóxido. Estudos anteriores demonstraram que camundongos deficientes de SOD1 apresentavam, dentre outras alterações, grave anemia hemolítica, evidenciando a importância dessa enzima na manutenção e sobrevivência das células eritrocitárias (IUCHI et al., 2007; STARZYŃSKI et al., 2009; IUCHI, 2012). Em nosso trabalho observamos o aumento da expressão gênica e do conteúdo proteico dessa enzima em pacientes BTI quando comparados a controles saudáveis, indicando a ação de um mecanismo celular

protetor contra os altos níveis de ânion superóxido gerados nestas células devido a maior instabilidade da hemoglobina.

Com relação a GPX1, apesar dos elevados níveis de RNAm encontrados nos reticulócitos de BTI, observamos apenas 38% de aumento proteico efetivo nos eritrócitos maduros destes pacientes. Uma característica dessa enzima é sua susceptibilidade à inativação oxidativa irreversível durante o processo catalítico, que culmina em sua remoção por proteases responsáveis por degradar proteínas oxidadas nos eritrócitos (IUCHI, 2012). Tendo em vista os altos níveis de EROS que observamos em nossos pacientes, hipotetizamos que parte da GPX1 produzida pode estar sendo degradada devido a esse processo e por isso os altos níveis de RNAm que observamos para esta enzima não refletiriam os níveis proteicos.

Outra importante enzima responsável pela defesa dos eritrócitos é a catalase, que se destaca pela atuação eficiente em altas concentrações de  $H_2O_2$ . Nossas análises indicaram um aumento na expressão gênica desta enzima em beta talassêmicos intermediários, porém, por razões ainda não elucidadas, o conteúdo proteico observado nesses pacientes não reflete os altos níveis de RNAm observados.

Estudos anteriores mostraram que as PRDXs e outras enzimas antioxidantes podem ser reguladas pelo sistema NRF2/KEAP1/PKC $\delta$  em diferentes tipos de células (KOBAYASHI e YAMAMOTO, 2005; JONSSON e LOWTHER, 2007; OSBURN e KENSLER, 2008; SINGH et al., 2010; THAMSEN et al., 2011; SATOH et al., 2011; Ma, 2013; PARK et al., 2014). Nossos dados apontaram um aumento na expressão do complexo NRF2/KEAP1 em pacientes BTI. Embora os dois genes tenham mostrado níveis de expressão maiores quando comparados a indivíduos saudáveis, este aumento foi mais acentuado em *NRF2* (~3fold change) do que em *KEAP1* (~2fold change). Tais achados podem indicar a participação de *NRF2* na regulação positiva da expressão gênica dos antioxidantes que apresentaram níveis aumentados de RNAm neste trabalho. Apesar de *PKC $\delta$*  ter mostrado reduzida expressão em reticulócitos de pacientes BTI, em outro trabalho de nosso grupo observamos um aumento de sua expressão no 7º dia da cultura de células CD34<sup>+</sup> de BTI (dados não mostrados), portanto, não descartamos a sua participação como importante componente do sistema NRF2/KEAP1, contudo, a investigação de outras quinases capazes de fosforilar NRF2 pode fornecer informações adicionais sobre o funcionamento desse sistema em eritrócitos beta talassêmicos.

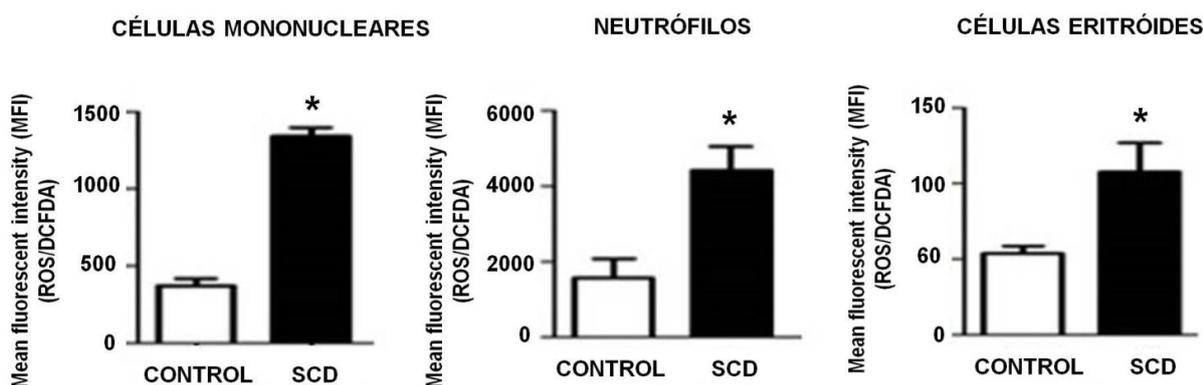
Em geral, nossos resultados descrevem pela primeira vez um amplo panorama sobre o estado redox das células eritróides de pacientes BTI, bem como coloca as

PRDXs como alvos interessantes para uma melhor compreensão da doença e suas variações fenotípicas.

## 5.2. CAPÍTULO 2 - Análise de genes envolvidos no estado redox de reticulócitos e eritrócitos de pacientes com anemia falciforme

### 5.2.1. Níveis de EROS são aumentados em eritrócitos, células mononucleares e neutrófilos de indivíduos com anemia falciforme

A produção de EROS foi analisada nos eritrócitos, os quais são o alvo deste estudo por serem as principais células acometidas pela anemia falciforme (SCD- Sickle Cell Disease), e também nos neutrófilos e células mononucleares, as quais também estão envolvidas nos processos de vaso-oclusão e inflamação crônica. As análises foram realizadas no sangue periférico de pacientes (SCD) e indivíduos saudáveis (control). Os dados obtidos mostraram significativo aumento na produção de EROS nos três tipos celulares analisados (figura 25).

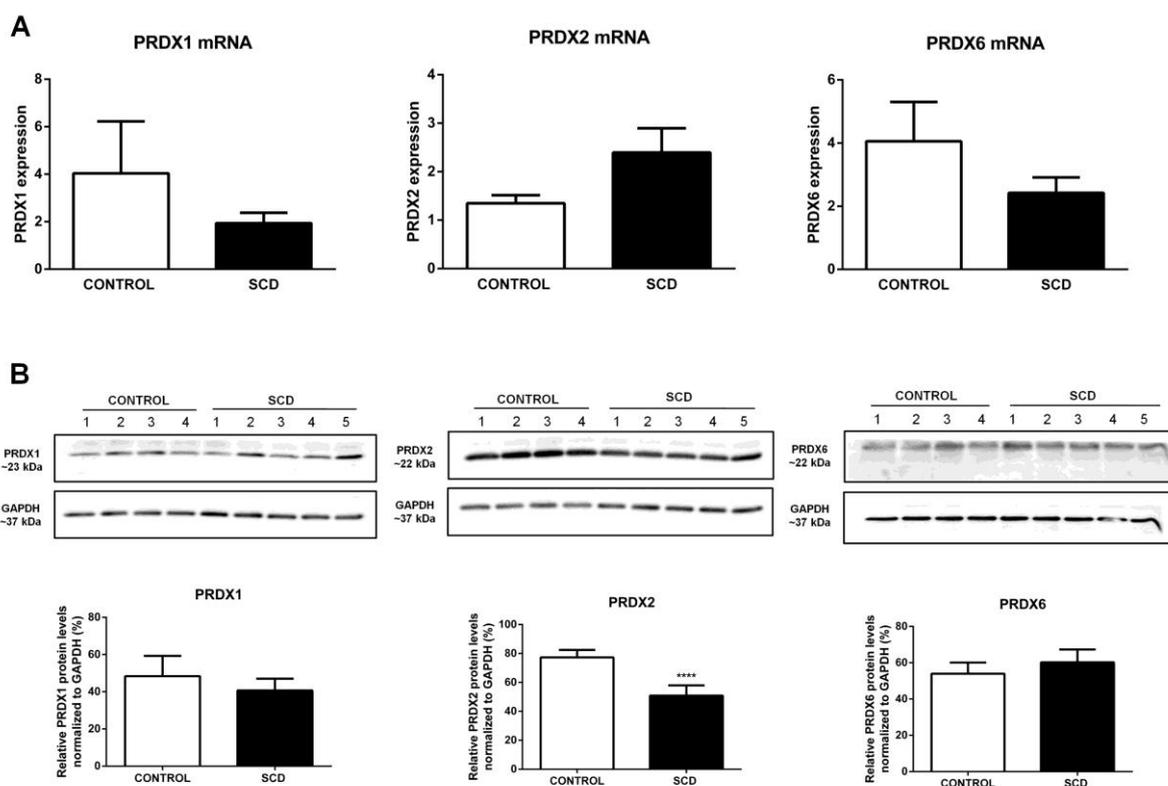


**Figura 25. Determinação dos níveis de EROS em células do sangue periférico de pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis.** A produção de EROS foi significativamente aumentada nos neutrófilos, células eritróides e mononucleares de pacientes com anemia falciforme (SCD) (n=12) em relação ao grupo e indivíduos saudáveis (n=15). Os resultados são expressos de acordo com a intensidade média de fluorescência (MFI) emitida pelo conjunto de células analisadas e são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM). Significado estatístico: (\* $p < 0,05$ ).

### 5.2.2. Conteúdo proteico de PRDX2 é reduzido nos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme

As análises de expressão gênica das *PRDXs 1, 2 e 6* foram realizadas nos reticulócitos de 30 indivíduos com anemia falciforme (SCD) e de 27 doadores saudáveis (control). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os

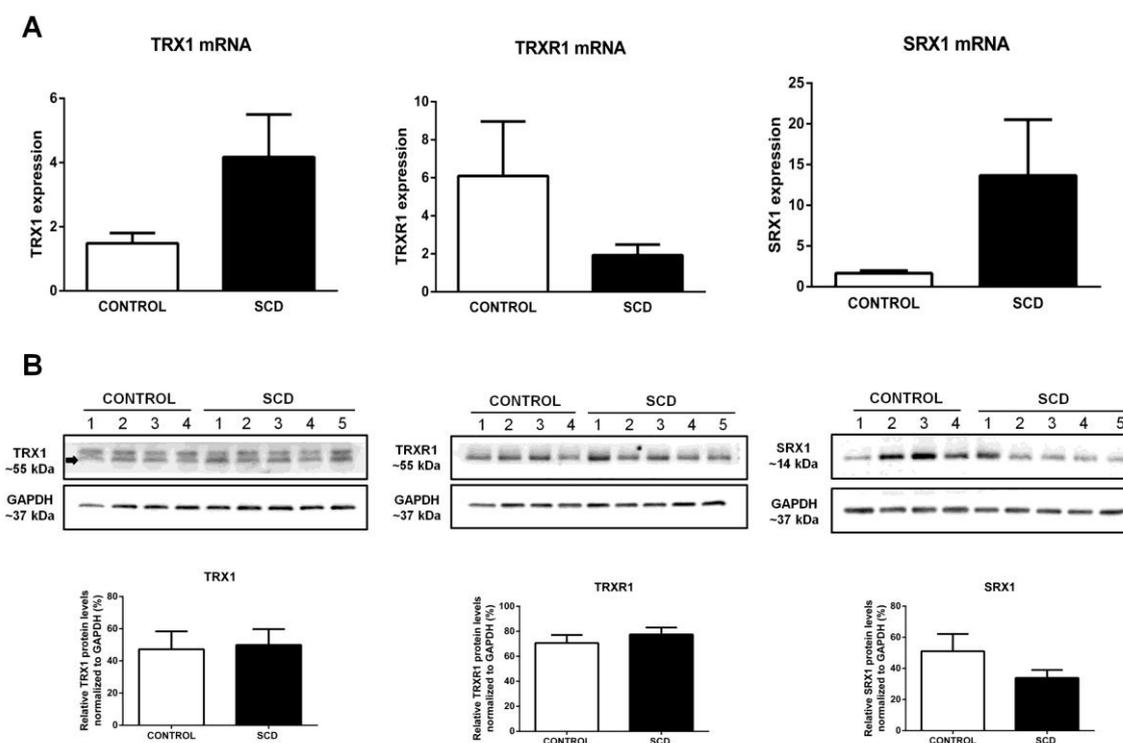
grupos analisados (figura 26A). Adicionalmente, realizamos estas análises separando os pacientes em grupos tratados e não tratados com hidroxiuréia, bem como pelas patologias associadas que estes pacientes apresentavam, como os resultados não se alteraram para nenhuma das PRDXs analisadas (dados não mostrados), optamos por manter os pacientes em um único grupo. Apesar de não terem sido observadas diferenças estatísticas a nível transcricional, mensuramos o conteúdo proteico destas três enzimas no lisado celular de eritrócitos maduros de 10 pacientes (SCD) e 8 indivíduos sadios (control) no total (figura 26B). Nossos dados apontaram uma significativa redução nos níveis proteicos de PRDX2 nos pacientes com anemia falciforme quando comparados ao grupo controle (figura 26B).



**Figura 26. Análise de expressão gênica e conteúdo proteico das PRDXs 1, 2 e 6 em indivíduos sadios e com anemia falciforme.** (A) A qPCR foi realizada utilizando os *primers* descritos na tabela 5. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referência endógena *BAC*. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM). (B) Para as análises de western blot as amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50 $\mu$ g de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referência endógena o GAPDH. Control (1-4) e SCD (1-5). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM) e são representativos de duas membranas independentes. Significado estatístico: (\*\*\*\* $p$  < 0,00001).

### 5.2.3. Redutores 2-Cys PRDXs não apresentam diferenças de expressão gênica e conteúdo proteico entre pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis

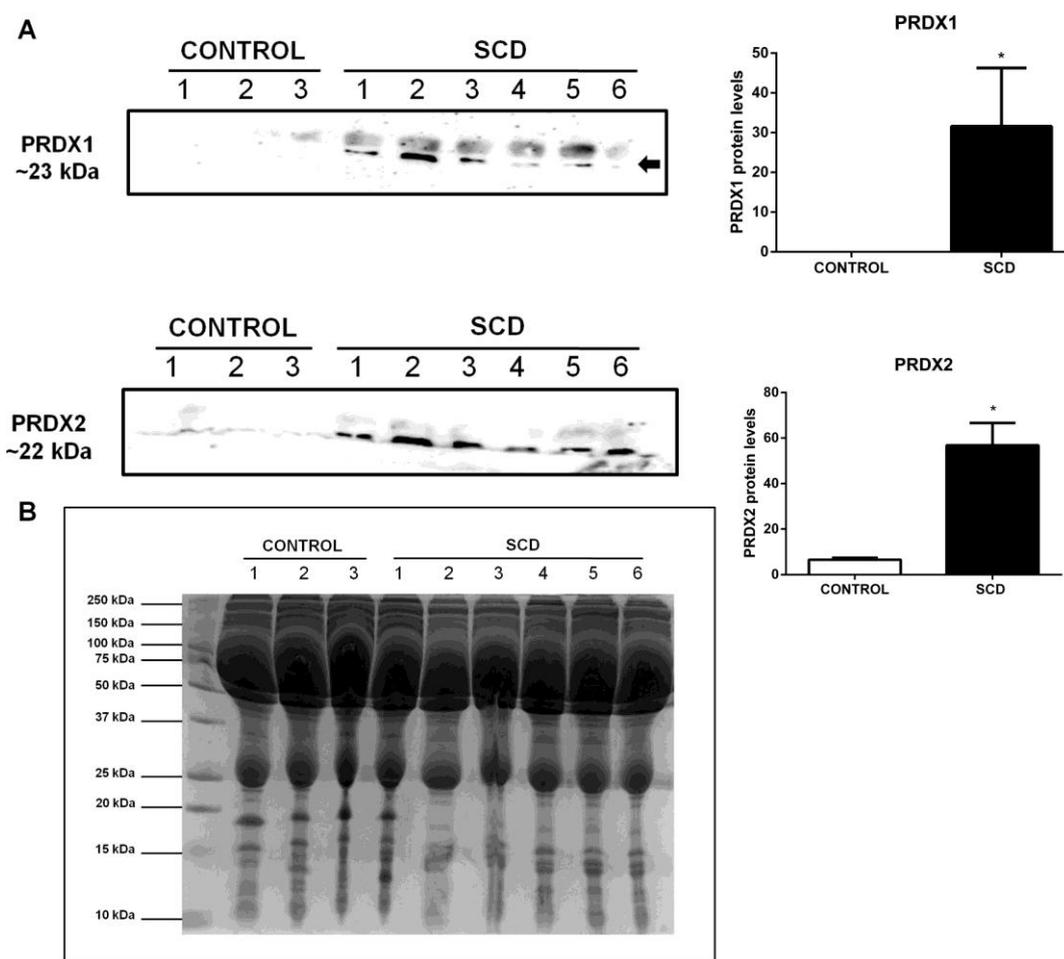
A expressão gênica de TRX1/TRXR1/SRX1, foi avaliada nos reticulócitos de 20 indivíduos saudáveis (control) e 26 pacientes falciformes (SCD). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (figura 27A). Os indivíduos falciformes foram analisados separadamente em grupos tratados e não tratados com hidroxiuréia, os resultados se mantiveram inalterados (dados não mostrados), portanto foram mantidos como um único grupo. Os níveis proteicos destas enzimas foram analisados no lisado de eritrócitos de 10 pacientes e 8 indivíduos saudáveis no total. Não foram observadas diferenças estatísticas na análise comparativa entre os grupos (figura 27B).



**Figura 27. Análise de expressão gênica e conteúdo proteico dos redutores 2-Cys PRDXs em indivíduos saudáveis e com anemia falciforme.** (A) A qPCR foi realizada utilizando os *primers* descritos na tabela 5. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referência endógena *BAC*, exceto para *TRXR1*, onde utilizou-se *HPRT1* como referência endógena. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM). (B) Para as análises de western blot as amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50 $\mu$ g de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referência endógena o GAPDH. Control (1-4) e SCD (1-5). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$ SEM) e são representativos de duas membranas independentes.

#### 5.2.4. PRDX1 e PRDX2 são aumentadas no plasma de pacientes SCD

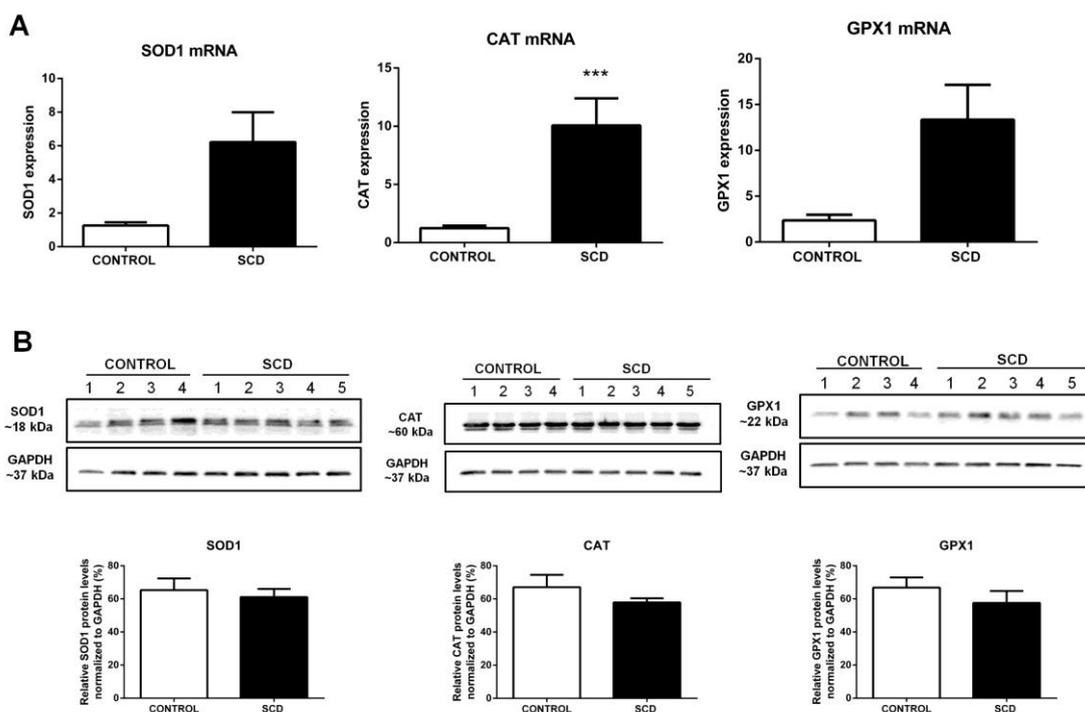
Como já descrito, diversos estudos relacionaram a presença das PRDXs 1 e 2 no meio extracelular com a modulação do processo inflamatório, visto que a anemia falciforme se caracteriza por um quadro de inflamação crônica, avaliamos os níveis destas duas enzimas no plasma de pacientes (SCD) e comparamos com indivíduos saudáveis (control). Foram analisados 6 pacientes e 3 controles. Nossos resultados mostraram a presença de PRDX1 apenas no plasma dos pacientes e níveis muito elevados de PRDX2 também nos pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis (figura 28A).



**Figura 28. Análise dos níveis de PRDX1 e PRDX2 no plasma de indivíduos saudáveis e com anemia falciforme.** (A) Para as análises de western blot foram selecionadas amostras de plasma livre de hemólise, estas amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50µg de proteína total de cada amostra. (B) Como normalizador do experimento de western blot foi utilizado um gel corado com coomassie blue. Control (1-3) e SCD (1-6). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$ SEM). Significado estatístico: (\* $p < 0,05$ ).

### 5.2.5. Níveis de RNAm de catalase são aumentados nos reticulócitos de pacientes com anemia falciforme

Adicionalmente, avaliamos os níveis de RNAm e de proteínas dos demais antioxidantes enzimáticos presentes nos eritrócitos: SOD1, GPX1 e CAT. As análises de expressão gênica foram realizadas nos reticulócitos de 27 pacientes com anemia falciforme (SCD) e de 20 indivíduos saudáveis (control) (figura 29A). Nossos dados apontaram um aumento significativo nos níveis de RNAm para CAT nos pacientes falciformes analisados (figura 29A). SOD1 e GPX1 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (figura 29A). Assim como nas análises anteriores, os pacientes com anemia falciforme foram analisados separadamente em grupos tratados e não tratados com hidroxiuréia e de acordo com patologias associadas que estes pacientes apresentavam, novamente os resultados se mantiveram inalterados (dados não mostrados), sendo assim, os pacientes falciformes foram agrupados em um grupo único para análise (figura 29A). Também mensuramos o conteúdo proteico destas 3 enzimas no lisado de eritrócitos de 10 pacientes e 8 indivíduos saudáveis no total (figura 29B). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para nenhuma das proteínas analisadas (figura 29B).

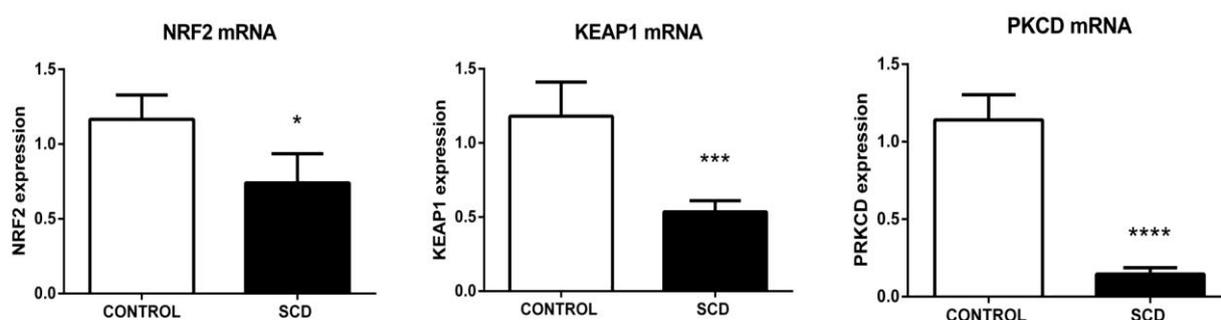


**Figura 29.** Análise da expressão gênica e do conteúdo proteico da SOD1, CAT e GPX1 em indivíduos saudáveis e pacientes com anemia falciforme. (A) A qPCR foi realizada utilizando os *primers*

descritos na tabela 5. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referencia endógena *BAC*. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$ SEM). (B) Para as análises de western blot as amostras foram separadas em SDS-PAGE redutor de 12% (p/v) usando 50 $\mu$ g de proteína total de cada amostra. A intensidade das bandas foi mensurada utilizando como referencia endógena o GAPDH. Control (1-4) e SCD (1-5). As análises quantitativas foram realizadas por densitometria usando o ImageJ Software. Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$ SEM) e são representativos de duas membranas independentes. Significado estatístico: ( $***p < 0,0001$ ).

### 5.2.6. Níveis de RNAm de *NRF2*, *KEAP1* e *PKC $\delta$* são reduzidos em reticulócitos de pacientes com anemia falciforme

Embora a célula eritróide madura não possua núcleo e, portanto não tem capacidade de síntese proteica, relatos na literatura indicam que os níveis de estresse oxidativos nesta patologia encontram-se elevados desde o desenvolvimento eritróide na medula óssea. Sendo assim, analisamos a expressão gênica do complexo *NRF2/KEAP1/PKC $\delta$*  nos reticulócitos de indivíduos saudáveis e pacientes falciformes. Foram analisados 15 pacientes e 15 indivíduos controle (figura 16). Os dados obtidos apontaram significativa redução nos níveis de RNAm para todo o complexo *NRF2/KEAP1/PKC $\delta$*  em pacientes com anemia falciforme quando comparados a indivíduos saudáveis (figura 30).



**Figura 30. Análise da expressão gênica do complexo *NRF2/KEAP1/PKC $\delta$* , regulador da transcrição de enzimas antioxidantes.** A qPCR foi realizada utilizando os *primers* descritos na tabela 5. A expressão relativa dos RNAm foi mensurada utilizando o gene de referencia endógena *beta actina* (*BAC*). Os resultados são apresentados na forma de média com erro padrão ( $\pm$  SEM). Significado estatístico: ( $*p < 0,05$ ), ( $***p < 0,0001$ ), ( $****p < 0,00001$ ).

### 5.2.7. Discussão

Como já descrito anteriormente, as EROs podem causar profundas lesões nos eritrócitos, diminuindo seu período de vida útil, especialmente em pacientes com anemia falciforme. Conforme o esperado, nossos resultados mostraram um expressivo aumento nos níveis desses compostos nos glóbulos vermelhos de indivíduos acometidos por essa patologia. Estas células estão constantemente sob estresse oxidativo e, por isso, liberam grandes quantidades de produtos relacionados à 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 ciclos de peroxidação lipídica, levando a liberação de aldeídos altamente citotóxicos como o malondialdeído (MAD) e alquenos como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-ANE) (DAILLY et al., 1998; CESQUINI et al., 2003). Além disso, estima-se 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).

O estresse oxidativo também afeta outros tipos de células sanguíneas na anemia falciforme, tais como os neutrófilos (AMER et al., 2005). Nossos dados evidenciaram níveis significativamente aumentados de EROS neste tipo celular nos pacientes analisados. Uma das principais fontes desses produtos nessas células é o complexo enzimático NADPH oxidase, responsável pela geração de ânion superóxido, que é posteriormente convertido em outros agentes oxidantes, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (BOUEIZ e HASSOUN, 2009). Interessantemente, esse complexo pode ser regulado por citocinas inflamatórias como TGF- $\beta$ 1 e endotelina-1, que são encontradas em altos níveis em pacientes com anemia falciforme e também são ativadas por EROS. Dessa forma, este sistema regulatório gera um ciclo vicioso entre a produção de espécies reativas e o processo inflamatório crônico (VOSKOU et al., 2015).

Além dos eritrócitos e dos neutrófilos, as células mononucleares também contribuem para a fisiopatologia da doença. Assim como os neutrófilos, os monócitos e linfócitos falciformes expressam maior número de moléculas de adesão endotelial, contribuindo para o agravamento da vaso-oclusão e também do processo inflamatório (ZENNADI et al., 2008). Em adição a esse quadro, nossos resultados apontaram a

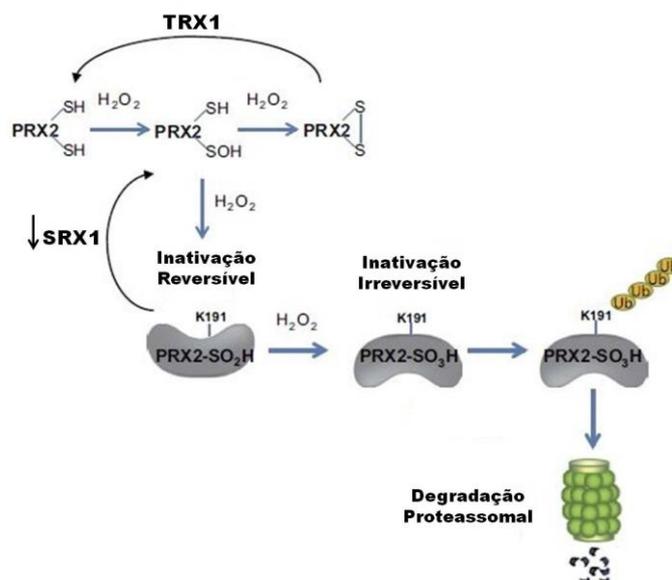
presença de altos níveis de EROS nas células mononucleares de pacientes falciformes quando comparadas a indivíduos saudáveis. Os linfócitos são bastante sensíveis ao estado redox celular (DROGE, 2002) e níveis elevados de EROS podem contribuir para o aumento da proliferação celular, danos cumulativos ao DNA e apoptose, culminando em um quadro de senescência replicativa precoce nessas células (JANG e SHARKIS, 2007; BEERMAN et al., 2014). O estresse oxidativo e a inflamação crônica tem sido associados à perda acelerada dos telômeros e consequentemente a perda prematura da capacidade de auto-renovação celular (CORREIA-MELO et al., 2014; KORDINAS et al., 2016) , sendo a anemia falciforme uma patologia na qual estes dois fatores estão presentes, podemos supor que esta também seja afetada pela senescência replicativa.

Como forma de avaliar uma possível resposta do sistema antioxidante ao aumento dessas EROS, analisamos os níveis de produção de algumas enzimas envolvidas na eliminação desses compostos, com ênfase para as PRDXs. De modo geral, estas análises foram focadas nos eritrócitos, uma vez que estas são as principais células acometidas pela doença.

Embora não tenham sido observadas diferenças a nível transcricional para nenhuma das três isoformas de peroxirredoxinas analisadas, a PRDX2 apresentou uma significativa redução proteica em pacientes falciformes. Esta enzima é considerada um importante citoprotetor eritrocitário e sua deficiência em camundongos já foi associada a um quadro de anemia hemolítica grave, com aumento na produção de EROS e de corpos de heinz (LEE et al., 2003). Adicionalmente, Han e colaboradores demonstraram que a PRDX2 em sua forma decamérica é capaz de interagir com a hemoglobina protegendo-a da desnaturação e da agregação induzidas pelo dano oxidativo e que esta interação encontra-se bastante prejudicada nas hemácias de pacientes com anemia falciforme, resultando no aumento significativo da agregação da hemoglobina por ataque de EROs (HAN et al., 2012). Estas informações somadas aos nossos dados sugerem que a redução de PRDX2 na anemia falciforme resulta em uma maior vulnerabilidade celular e tem um impacto direto na redução da sobrevivência dos eritrócitos na circulação e no agravamento das manifestações da doença.

Com relação à discrepância entre os níveis de RNAm e o conteúdo proteico de PRDX2 observado em pacientes falciformes propomos algumas hipóteses, primeiramente podemos supor que hajam mecanismos de regulação pós transcricionais limitando a tradução do RNAm dessa enzima, culminando na redução da produção proteica observada. Além dessa possibilidade, um estudo realizado com o uso de uma

linhagem de células de câncer de mama invasivo (MDA-MB-231), a qual foi exposta a altas concentrações de  $H_2O_2$ , demonstrou que após ser superoxidada por este composto, a PRDX2 sofre modificações conformacionais que expõem um sítio de ubiquitinação em sua região C-terminal, uma lisina na posição 191. Após sua ubiquitinação, a PRDX2 é rapidamente degradada pelo proteossoma (figura 31) (SONG et al., 2016). Em adição a isso, Cho e colaboradores relataram haver um aumento nos níveis de PRDX2 superoxidada em eritrócitos falciformes quando comparados aos de indivíduos saudáveis (CHO et al., 2010). Assim, com base nas informações descritas associadas à alta produção de EROS que demonstramos nos pacientes analisados, é razoável supor que elevadas quantidades de PRDX2 superoxidada estejam sendo geradas e degradadas pelo processo anteriormente descrito (figura 31), gerando assim o déficit proteico que observamos embora a transcrição esteja preservada nesses indivíduos.

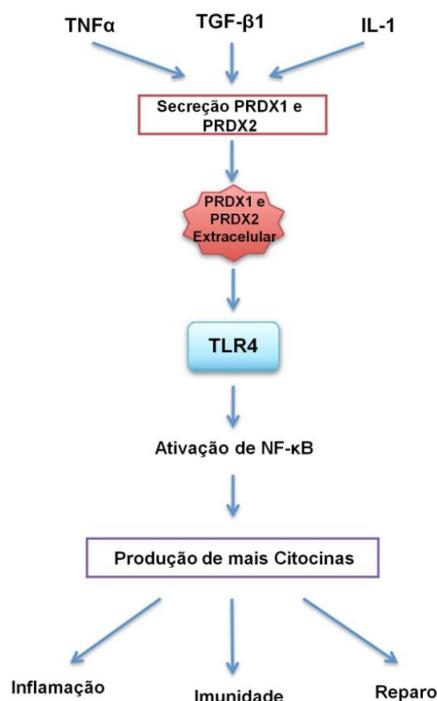


**Figura 31. Mecanismo proposto para a superoxidação e degradação da PRDX2 pelo proteossoma.**

A exposição da PRDX2 a altas concentrações de agentes oxidantes pode resultar na superoxidação de sua cisteína a ácido sulfônico (CP-SO<sub>3</sub>H), culminando em sua inativação catalítica e posterior degradação proteossomal (Figura adaptada de SONG et al., 2016).

Entretanto, as funções das PRDXs não se limitam apenas a sua atividade antioxidante. A presença dessas enzimas já foi descrita em diferentes fluidos corporais como o plasma, por exemplo, indicando que as PRDXs também desempenham funções biológicas no meio extracelular (ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012). Como descrito anteriormente em maiores detalhes, estudos recentes demonstraram que após o estímulo de citocinas como  $TNF\alpha$ ,  $TGF-\beta 1$  e  $IL-1$ , as PRDXs 1 e 2 podem ser

secretadas, por vias não clássicas, para o meio extracelular (figura 32) (KNOOPS et al., 2016). Uma vez no meio extracelular essas enzimas desempenham papéis na modulação do processo inflamatório, estimulando a liberação de mais citocinas pelos macrófagos (KNOOPS et al., 2016). Esse processo é mediado pela ligação dessas enzimas ao receptor de superfície celular TLR4 (toll-like receptor 4), o que desencadeia a ativação de NF-Kappa-B e outras vias de sinalização que induzem a produção de diversas citocinas envolvidas no reparo, imunidade e na inflamação (figura 32) (RIDDELL et al., 2010; ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012). A resposta inflamatória é um importante componente da resposta imune e também está associada à fisiopatologia de diversas doenças como a anemia falciforme. Em nossos dados observamos a presença de PRDX1 apenas no plasma dos pacientes e níveis muito elevados de PRDX2 também nos pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis. Nesse sentido, as PRDXs 1 e 2 poderiam estar atuando de duas formas na anemia falciforme, como citoprotetoras no meio intracelular combatendo as EROS e como moduladoras do processo inflamatório no meio extracelular.



**Figura 32. Representação esquemática da secreção das PRDXs 1 e 2 sua atuação no meio extracelular.** Detalhes são apresentados no texto (figura adaptada de ISHII; WARABI; YANAGAWA, 2012).

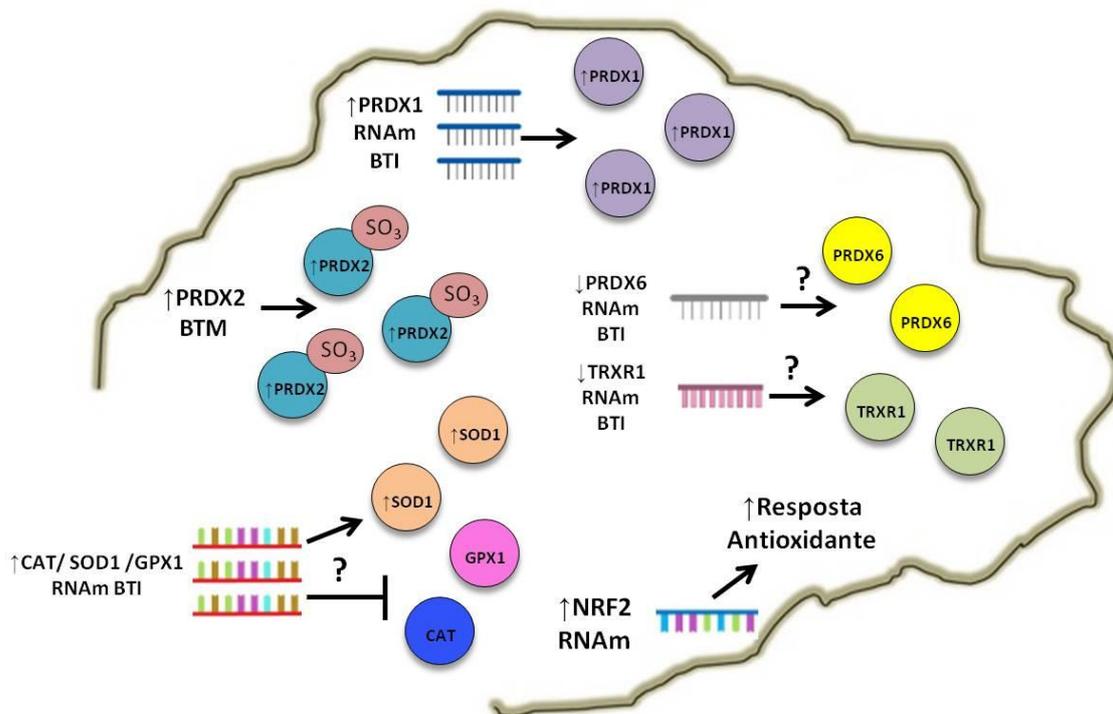
Adicionalmente, também analisamos os níveis de produção gênica e proteica das demais enzimas antioxidantes presentes nos eritrócitos: SOD1, GPX1 e CAT. Nossos resultados apontaram um significativo aumento nos níveis de RNAm da CAT em pacientes falciformes. A expressão da catalase é regulada a nível transcricional por fatores como NRF2, Sp1 (Specificity protein 1), NF-Y (Nuclear Factor Y) e FoxO3a (forkhead box O3A protein) (GLORIEUX et al., 2015). Uma vez que nossos dados mostraram níveis reduzidos de NRF2 podemos considerar a atuação dos demais fatores de transcrição como responsáveis pelo aumento na transcrição desse antioxidante. Nesse sentido, FoxO3a se mostra uma opção interessante devido a sua capacidade de responder ao estresse oxidativo por meio da ativação de genes que codificam proteínas antioxidantes e de reparo ao DNA (KOPS et al., 2002; TRAN et al., 2002), além de desempenhar um importante papel na maturação normal das células eritóides (MARINKOVIC et al., 2007).

Contudo, os elevados níveis de RNAm da catalase não se refletem em produção proteica. Esses dados sugerem o envolvimento de fatores que limitam a tradução do RNAm. Modificações pós-transcricionais como a ligação de microRNAs a região 3'UTR do RNAm da catalase e alterações em polirribossomos já foram descritas em outros tipos celulares como limitantes da síntese proteica da catalase (GLORIEUX et al., 2015) e poderiam ser alvo de investigações futuras nos eritrócitos falciformes.

Neste estudo também avaliamos os níveis de RNAm do complexo NRF2/KEAP1/PKC $\delta$ , conhecido por regular a expressão gênica das enzimas antioxidantes aqui descritas e nossos resultados mostraram redução na expressão de todos os genes do complexo nos pacientes falciformes. Esses achados corroboram os dados obtidos por Sangokoya e colaboradores que demonstraram que a presença dos elevados níveis de miR-144 em pacientes falciformes está diretamente associada a redução de NRF2 nos reticulócitos desses pacientes e com a diminuição da capacidade antioxidante nos eritrócitos, contribuindo para a redução da tolerância ao estresse oxidativo, hemólise e agravamento da anemia nestes indivíduos (SANGOKOYA; TELEN; CHI, 2010). No que se refere a KEAP1 e PKC $\delta$  temos como hipótese que a redução de ambas pode estar ocorrendo como reflexo à redução de NRF2, porém para que essa relação seja estabelecida são necessários estudos complementares. Em conjunto, nossos dados apresentam uma visão abrangente sobre o estado redox dos eritrócitos de pacientes falciformes e fornecem novos alvos de estudo.

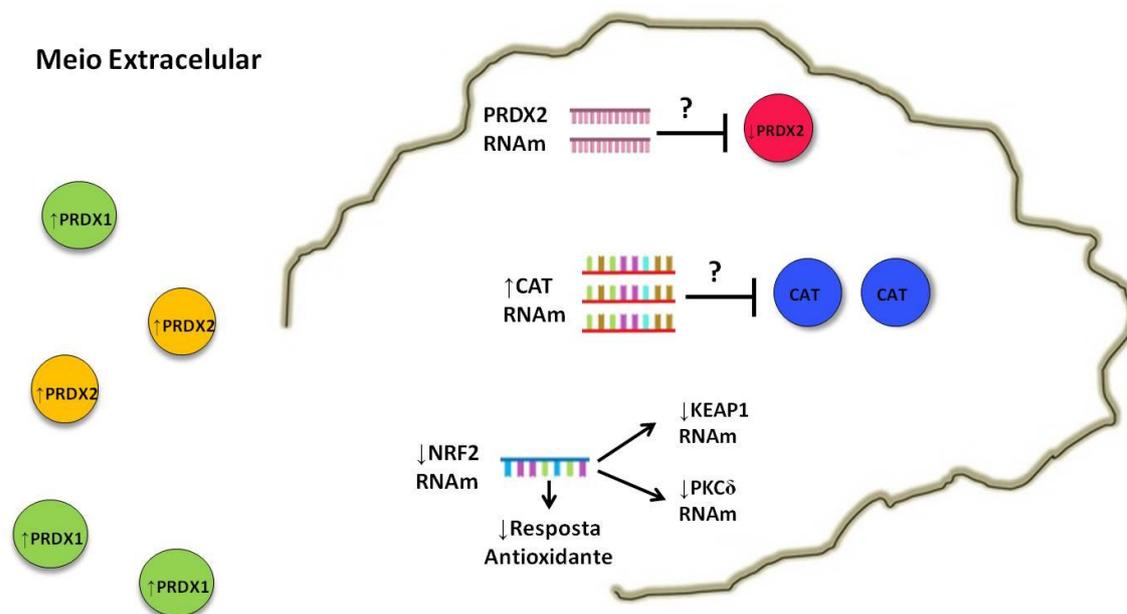
## 6. CONCLUSÃO

### Com relação a beta talassemia



**Figura 33. Representação esquemática das conclusões obtidas com relação a beta talassemia.** Em nosso estudo concluímos que a PRDX1 apresenta elevados níveis de produção em BTI quando comparados a indivíduos saudáveis e BTM, sendo que a expressão diferencial desta enzima entre BTI e BTM pode agir como um modulador fenotípico da doença. A PRDX2 mostrou elevado conteúdo proteico em indivíduos BTM quando comparados a BTI, entretanto, os níveis de superoxidação dessa enzima que resultam em sua inativação catalítica também são maiores nos pacientes BTM. Já em BTI o aumento de PRDX1 pode funcionar como um mecanismo auxiliar evitando a superoxidação da PRDX2. Ao se comparar indivíduos saudáveis e BTI observamos uma redução de PRDX6 e TRXR1 apenas em nível transcricional, sugerindo que nestes pacientes o pico de produção dessas enzimas ocorreu em fases anteriores do desenvolvimento eritróide. Estudos complementares podem auxiliar na elucidação dessa questão. Os demais antioxidantes SOD1, CAT e GPX1 apresentaram níveis elevados na produção de RNAm nos pacientes BTI analisados, contudo, estes se refletiram em conteúdo proteico elevado apenas para SOD1, sugerindo o envolvimento de mecanismos regulatórios adicionais para as outras duas enzimas. A produção aumentada de RNAm para NRF2 em pacientes BTI sugere o envolvimento desse fator de transcrição na regulação positiva da expressão gênica de alguns dos antioxidantes analisados nesse trabalho.

## Com relação a anemia falciforme



**Figura 34. Representação esquemática das conclusões obtidas com relação a anemia falciforme.** Em nosso estudo observamos uma significativa redução no conteúdo proteico da PRDX2 nos eritrócitos de pacientes com anemia falciformes quando comparados a indivíduos saudáveis, indicando uma maior vulnerabilidade dessas células ao ataque das EROS, hemólise e redução de sua sobrevivência na circulação. Apesar dessa redução proteica não foram observadas diferenças nos níveis de RNAm desta enzima entre os grupos analisados, indicando a existência de mecanismos pós-transcricionais ou pós-traducionais envolvidos na regulação da expressão dessa peroxirredoxina. No meio extracelular nossos dados mostraram quantidades maiores de PRDX1 e 2 no plasma dos pacientes falciformes em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo que nesses pacientes estas enzimas podem estar desempenhando um duplo papel, atuando como citoprotetoras no meio intracelular e moduladoras do processo inflamatório no meio extracelular. Com relação a CAT, embora tenha mostrado um significativo aumento de expressão gênica em pacientes com anemia falciforme, não foram observadas diferenças em nível proteico, o que sugere o envolvimento de processos ou condições que limitem a tradução desse RNAm. Em adição, nossos resultados também identificaram níveis reduzidos de RNAm do complexo regulador antioxidante NRF2/KEAP1/PKCδ nos pacientes falciformes. Apesar de não terem sido observadas reduções significativas na expressão gênica das enzimas antioxidantes analisadas nesse trabalho, sugerimos que a redução de NRF2 pode estar limitando uma resposta mais efetiva do sistema antioxidante nessas células, deixando-as mais vulneráveis ao estresse oxidativo.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, K. et al. Signaling events leading to peroxiredoxin 5 up-regulation in immunostimulated macrophages. **Free Radic. Biol. Med.** v.47, p.794–802, 2009.

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.

ALFONSO-PRIETO, M. et al. The molecular mechanism of the catalase reaction. **J. Am. Chem. Soc.** v.131, n.33, p. 11751-11761, 2009.

AMER, J. et al. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. **Eur J Haematol.** v.70, n.2, p.84-90, 2003.

AMER, J.; FIBACH, E. Chronic oxidative stress reduces the respiratory burst response of neutrophils from beta thalassemia patients. **Br. J. Haematol.** v.129, p.435-441, 2005.

AMER, J. et al. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants **Br. J. Haematol.**, v.132, p. 108-113, 2006.

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.

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.

AUGUSTO, O. Radicais livres: bons, maus e naturais. **São Paulo: Oficina de textos;** 2006

BALLAS, S. K.; SMITH, E. D. Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. **Blood.** v.79, n.8, p.2154-63, 1992.

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  $\beta$ -thalassemia: it's a sample as  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . **J. Clin. Invest.** v.115, n.6, p. 1470-1473, 2005.

BAST, A. et al. Influence of iNOS and COX on peroxiredoxin gene expression in primary macrophages. **Free Radic. Biol. Med.** v.49, p.1881–1891, 2010.

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

BEERMAN, I. et al. Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell stem cell*. v.15, n.1, p.37-50, 2014.

BEETSCH, J.W. et al. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells, *Brain Res.* v.786, p. 89–95, 1998.

BERTINI, I.; MANGANI, S.; VIEZZOLI, M. S. Advances in inorganic Chemistry. **San Diego: Academic press**; 1998.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v.5, p.9–19, 2012.

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.

BOUEIZ, A.; HASSOUN, P. M. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvasc Res.* v.77, p. 26–34, 2009.

BROWN, D. I.; GRIENGLING, K. K. Nox proteins in signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p. 1239, 2009.

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

BUSTIN, S. A. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. v.55, n. 4, p.611-622.

CAO, A. Phenotype-Genotype Relationships in Mendelian Disorders: the Example of  $\beta$ -Thalassemias. *Italian Journal of Pediatrics*. v. 28, n. 6, pp 440-452, 2002.

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

CAPPELLINI, M. D.; COMINO, A. In: Clinica e Terapia della Talassemia. **Società Editrice Europea di Nicodemo Maggiulli & C.**, Firenze, Italia. 2000; Cap 3, pp 61-94.

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, p.1101–1109, 2006.

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.

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

CHATTERJEE, S. et al. Peroxiredoxin 6 phosphorylation and subsequent phospholipase A2 activity are required for agonist-mediated activation of NADPH oxidase in mouse pulmonary microvascular endothelium and alveolar macrophages. **J. Biol. Chem.** v.286, p.11696–11706, 2011.

CHAVES, M. A.; LEONART, M.S.; NASCIMENTO, A.J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S, **Hematology.** v.13, p. 187–192, 2008.

CHELIKANIA, P.; FITA, I.; LOEWENA, P.C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cell. Mol. Life Sci.**, 61:192–208, 2004.

CHEN J, ZHANG Z, CAI L. Diabetic Cardiomyopathy and Its Prevention by Nrf2: Current Status. **Diabetes Metab J.** v.38, n.5, p.337-345, 2014.

CHO, C. S. et al. Hydroxyurea-Induced Expression of Glutathione Peroxidase 1 in Red Blood Cells of Individuals with Sickle Cell Anemia. **Antioxidants & Redox Signaling.** v.13, n.1, p.1-11, 2010.

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

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

COMHAIR, S. A. A; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.283, p. 246–255, 2002.

CORREIA-MELO et al. Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? **Longev Healthspan.** v.3, n.1, 2014.

COSTA, F. F.; FERTRIN, K. Y.; CONRAN, N. Síndrome Hemolítica. Fisiopatologia e Clínica. Classificação. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia.** São Paulo: Editora Atheneu, v. 1, p.161-167, 2013.

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.

DAY, A. M. et al. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. **Molecular cell.** v.45, n.3, p.398-408, 2012.

DE FRANCESCHI, L.; CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **Haematologica.** v.89, n.3, p.348-56, 2004.

DE FRANCESCHI L. Oxidative stress modulates heme synthesis and induces peroxiredoxin-2 as a novel cytoprotective response in  $\beta$ -thalassemic erythropoiesis. **Haematologica.** v.96, n. 11, p. 1595-604, 2011.

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.

DIET, A. et al. Regulation of peroxiredoxins by nitric oxide in immunostimulated macrophages. **J. Biol. Chem.** v.282, p.36199–36205, 2007.

DING, Y. et al. Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice. **Antioxid. Redox Signal.** v.13, p.1477–1490, 2010.

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

DONNELLY, S. et al. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. **FASEB J.** v.22, p.4022–4032, 2008.

DOUNCE, A. L. A proposed mechanism for the catalytic action of catalase. **J. Theor. Biol.** v.105, n.4, p. 553-67, 1983.

DROGE W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Rev.** v.82, p.47–95, 2002.

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.

DUSSIOT, M. et al. An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia **Nat. Med.**, v. 20, p. 398-407, 2014.

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

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

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**. v.43, n.1, p. 61-8.1997.

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

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

FOURQUET, S. et al. The dual functions of thiol-based peroxidases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging and signaling. **Antioxid Redox Signal**. v.10, n.9, p. 1565-1576, 2008.

FRANCO, M. C. et al. Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis, Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis, Prof. Alvaro Estévez (Ed.), **InTech**, 2013.

FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm **Curr. Opin. Hematol**. v.9, p. 101-106, 2002.

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

FUJII, J.; IKEDA, Y. Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. **Redox Rep**. v.7, n.3, p. 123-30, 2002.

FURUKAWA, Y.; O'HALLORAN, T.V. Amyotrophic lateral sclerosis mutations have the greatest destabilizing effect on the apo, reduced form of SOD1, leading to unfolding and oxidative aggregation. **J Biol Chem (Baltimore)** v.280, n.17, p. 17266-74, 2005.

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.

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-Thalassemia. *Orphanet J Rare Dis*. 2010; 5-11p.

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

GEORGE, A. et al. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease, **Blood**. v.121, p. 2099-2107, 2013.

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

GHATREH-SAMANI et al. Oxidative stress and age-related changes in T cells: is thalassemia a model of accelerated immune system aging? **Cent Eur J Immunol.** 2016; v.41, n.1, p.116–124, 2016.

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced dityrosine and tyrosine oxidation products in hemoglobin and red blood cells. **J Biol Chem.** v.276, n.26, p. 24129-24136, 2001.

GLORIEUX, C et al. Regulation of catalase expression in healthy and Cancer cells, **Free Radical Biology and Medicine.** v.87, p.84-97, 2015.

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.

GOYAL, M. M; BASAK, A. Human catalase: looking for complete identity. **Protein & Cell.** v.1, n.10, p. 888-897, 2010.

GREER, J. P et al. **Wintrobe's Clinical Hematology.** 11th ed. Editora: Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia PA, USA, 2003.

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.

GUIMARÃES, T.M.R.; MIRANDA, W.L.; TAVARES, M.M.F. O cotidiano das famílias de crianças e adolescentes portadores de anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.,**Recife/PE,v.31, n.1, p.9-14, 2009.

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.; GUTTERIDGE, M. C. How to characterize a biological antioxidant. **Free Rad. Res. Commun.,** v.9, p.1-32, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. V. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3 rd ed. **Oxford: University Press;** 1999.

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

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, 2012.

HASSON, A. et al. The Lim-only protein LMO2 acts as a positive regulator of erythroid differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v.364, n.3, p.675-681, 2007.

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

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

HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E.; MOSS, P. A. H. **Essential Haematology**. 4.ed, London, Edinburgh, Boston: Blackwell Science, 2000.p.437.

HOFFBRAND A.V, PETTIT J.E, MOSS P. A. H., **Fundamentos em Hematologia** 5ª edição, Editora Artmed, 2008.

HOFFBRAND, A.V. **Fundamentos em hematologia**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOFFMAN, R. et al. **Hematology: Basic Principles and Practice**. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Churchil 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.

HUANG, H. C.; NGUYEN, T.; PICKETT, C. B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. **J Biol Chem**. v.277, p.42769–42774, 2002.

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.

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.

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.

IUCHI, Y. et al. Elevated oxidative stress in erythrocytes due to an SOD1 deficiency causes anemia and triggers autoantibody production. **Biochem. J.** v.402, p.219-227, 2007.

IUCHI, Y. Anemia Caused by Oxidative Stress, In: SILVERBERG, D. Anemia. **InTech**, 2012. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/anemia/anemia-caused-by-oxidative-stress>

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.

JANG, Y. Y, SHARKIS, S. J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. **Blood.** v.110, n.8, p.3056-63, 2007.

JAYAKUMAR, T.; RAMESH, E.; GERALDINE, P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl<sub>4</sub>-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, R. M. et al. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in erythrocytes. **Free Radic Biol Med.** v.39, n.11, p. 1407-1417, 2005.

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

JONSSON, T. J.; LOWTHER, W. T. The peroxiredoxin repair proteins. **Subcell Biochem.** v.44, p.115–141, 2007.

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.

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.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v.47, p.89-116, 2007.

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, p.1913–1918, 2008.

KIM, S.U. et al. Peroxiredoxin I is a ROS/p38 MAPK-dependent inducible antioxidant that regulates NF- $\kappa$ B-mediated iNOS induction and microglial activation. **J. Neuroimmunol.** v.259, p.26–36, 2013.

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.

KNOOPS, B. et al. Multiple Roles of Peroxiredoxins in Inflammation. **Molecules and Cells.** v.39, n.1, p. 60-64, 2016.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation, **Antioxid. Redox Signal.** v.7, p.385–394, 2005.

KOPS, G. J. et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. **Nature.** v.419, p.316–321, 2002.

KORDINAS, V. et al. The Telomere/Telomerase System in Chronic Inflammatory Diseases. Cause or Effect? **Genes (Basel).** v.7, n.9, p.60, 2016.

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

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature,** v. 227, p. 680-85, 1970.

LAMBETH, J. D.; NEISH, A. S. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease,** v.9, p.119, 2014.

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.

LEE, J. M. et al. Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.101, n.26, p.9751-9756, 2004.

LI, L. et al. Increased susceptibility of MER5 (peroxiredoxin III) knockout mice to LPS-induced oxidative stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.355, p.715–721, 2007.

LIM, J. C. et al. Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. **J Biol Chem.** v.283, p.28873–28880, 2008.

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.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. **Methods.** v.25, p.402-408, 2001.

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.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p; 265-276, 1951.

LUBIN, C.; CHIU, D. Properties of vitamin E-deficient erythrocytes following peroxidant injury. **Pediatric Research, Baltimore**, v. 16, p. 928-932, 1982.

Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v.53, p.401–426, 2013.

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

MARINKOVIC, D. et al. Foxo3 is required for the regulation of oxidative stress in erythropoiesis. **The Journal of Clinical Investigation.** v.117, n.8, p.2133-2144, 2007.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Cienc. Cult.**, São Paulo , v. 66, n. 3, p. 54-57, 2014 .

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.

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, p. 52-71, 2001.

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.

MORRIS, C.R. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.** p. 177-185, 2008.

MULLEN, L. et al. Cysteine oxidation targets peroxiredoxin 1 and 2 for exosomal release through a novel mechanism of redox-dependent secretion. **Mol. Med.** v.21, p.98-108, 2015.

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.

NAGY, E. et al. Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.30, p. 1347-1353, 2010.

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; CAO, J; MANEVICH, Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. **Cell Cycle.** v.8, n.24, p. 4072-4078, 2009.

NUMAZAWA, S. et al. Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.285, p.334-342, 2003.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. **J Biol Chem (Baltimore)** v.276, n.42, p. 38388-93, 2001.

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.

OLIVIERI, N. F. The beta-thalasseмииs. **New England Journal of Medical.** v. 341, p.99-109, 1999.

OSBURN, W. O; KENSLER, T. W. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. **Mutat. Res.** v.659, p.31–39, 2008.

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.

PARK, J. et al. 2-cys peroxiredoxins: emerging hubs determining redox dependency of Mammalian signaling networks. **Int J Cell Biol.** v.71, p.58-67, 2014.

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

POWARS, R.D.  $\beta$ 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.

PUNCHARD, N.A.; KELLY, F.J. Cap. 16. Glutathione peroxidase: activity and steady-state level of mRNA (Daret K. St. Clair e Ching K. Chow). **Free radicals: a Practical Approach. Oxford University Press,** p. 227- 240, 1996

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.

RICE-EVANS, C. Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. In: HARRIS, J. R. Blood cell biochemistry. **London: Plenum Press,** 1991. p. 429-453.

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.

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. 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.

ROCHA, L. B. S. et al. Distribuição das mutações da  $\beta$ -talassemia em Fortaleza, Ceará. **J Bras Patol Med Lab.** v. 46, n. 6, p. 437-441, 2010.

ROMANELLO, K. S. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em pacientes talassêmicos e com anemia falciforme. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

ROVER JÚNIOR, L; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova** v.24, n.1 São Paulo, 2001.

SALZANO, S. et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.111, n.33, p.12157-62, 2014.

SANGOKOYA, C.; TELEN, M. J; CHI, J. T. microRNA miR-144 modulates oxidative stress tolerance and associates with anemia severity in sickle cell disease. **Blood**. v.116, n.20, p.4338-48, 2010.

SATOH, T. et al. Dual neuroprotective pathways of a pro-electrophilic compound via HSF-1-activated heat-shock proteins and Nrf2-activated phase 2 antioxidant response enzymes. **J Neurochem**. v.119, p.569–578, 2011.

SAITOH, M. et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. **EMBO J**. v.17, p.2596–2606, 1998.

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

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

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

SHAH, A. Thalassemia syndromes. **Indian J Med Sci**, v. 58, n.445-9, 2004.

SHICHITA, T. et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. **Nat. Med.** v.18, p.911–917, 2012.

SIGURET, V.; ANDREUX, J.P. Biological diagnosis of haemoglobinopathies by phenotype analysis. **Ann Biol Clin**, v.55, p. 103-12, 1997.

SINCLAIR, A.M. Erythropoiesis stimulating agents: approaches to modulate activity. **Biologics : Targets & Therapy**, v. 7, p. 161-174, 2013.

SINGH, S. et al. Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. **Free Radic Res**. v.44, p.1267–1288, 2010.

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

SONG, I. K. et al. Degradation of Redox-Sensitive Proteins including Peroxiredoxins and DJ-1 is Promoted by Oxidation-induced Conformational Changes and Ubiquitination. **Scientific Reports**. v.6, p.34432, 2016.

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.

STARZYŃSKI, R. R. et al. Haemolytic anaemia and alterations in hepatic iron metabolism in aged mice lacking Cu,Zn-superoxide dismutase. **Biochem. J.** v.420, n.3, p.383-390, 2009.

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

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

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, p. 442-454, 2005.

STEINBERG, M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends Pharmacol Sci.** v. 27, n. 4, p.204-10, 2006.

STEINBERG, M. H et al. Pathobiology of the human erythrocyte and its hemoglobins. **Hematology: Basic Principles and Practice.** Fifth Edit. Elsevier Inc. p. 427–38, 2009.

STEINBERG, M. H, et al. The risks and benefits of longterm use of hydroxyurea in sickle cell anemia: a 17.5 year follow-up. **Am J Hematol.** v.85, n.6, p.403-8, 2010.

STOCKER, S. et al. A role for 2-Cys peroxiredoxins in facilitating cytosolic protein thiol oxidation. **Nature chemical biology.** v.14, n.2, p.148-55, 2018.

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.

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.

TAIRUM, C.A. et al. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. **J Mol Biol.** v.424,p.28–41, 2012.

TAMAGNINI, G.P. et al.  $\beta$  thalassaemia – Portuguese type: clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of  $\beta$  thalassaemia. **British Journal of Haematology.** v.54, p. 189-200, 1983.

TAYLOR, S. M; PAROBK, C. M; FAIRHURST, R. M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**. v.12, n.6, p.457–468, 2012.

THAMSEN, M. et al. Is overoxidation of peroxiredoxin physiologically significant? **Antioxid Redox Signal**. v.14, p.725–730, 2011.

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

THEIN, S.L. Genetic Modifiers of  $\beta$ -Thalassemia. **Haematologica**. v. 90, p.649-60, 2005.

TOME-ALVES, R. et al. Hemoglobinas AS/alfa talassemia: importância diagnóstica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v.22, n.3, p.388-394, 2000.

TRAN, H. et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*. 2002;v.296, p.530–534, 2002.

TREISMAN, R. et al. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned  $\beta$  thalassaemia genes. **Nature**. v. 302, p. 591-596, 1983.

URBINATI, F., MADIGAN, C., MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies – part II: thalassaemias. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 8, n. 10, p. 1-26, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**. v. 160, p. 1-40, 2006.

VEAL, E. A. et al. Hyperoxidation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? **Antioxidants & redox signaling**. v.28, n.7, p.574-90, 2017.

VIVANCOS, A. P. et al. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. **Proc Natl Acad Sci**. v.102, n.25, p. 8875-8880, 2005.

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

WANG, J.; XU, G.; BORCHELT, D. R. Mapping superoxide dismutase 1 domains of non-native interactions: roles of intra and intermolecular disulfide bonding in aggregation. **J Neurochem(London)** v.96, n.5, p. 1277-88, 2006.

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. 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. Pathophysiology of thalassaemia. **Bailliere's Clin. Haematol.**, v. 11, n. 1, p. 127-146, 1998.

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, 2001.

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.

WEATHERALL, D. J. Genetic variation and susceptibility to infection: The red cell and malaria. **British Journal of Haematology** v.141, n.3, p.276–286, 2008.

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

WILLIAMS, W.J. et al. Hematology, 6.ed.; New York: Mc Graw Hill Book Company, 2001.p.1480.

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

YANG, C. S. et al. Roles of peroxiredoxin II in the regulation of proinflammatory responses to LPS and protection against endotoxin-induced lethal shock. **J. Exp. Med**. v.204, p.583–594, 2007.

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

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

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.

ZENNADI, R. et al. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood**. v.112, n.8 p.3474–3483, 2008.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (resolução 466/2012)**

**Pesquisa: Análise de genes envolvidos no estado redox de reticulócitos e eritrócitos de pacientes beta talassêmicos e com anemia falciforme.**

**Pesquisadores:** Anderson Ferreira da Cunha, Karen Simone Romanello, Karina Kirschner Lopes, Iran Malavazi, Aderson da Silva Araújo, Marcos André Cavalcanti Bezerra, Igor de Farias Domingos, Diego Antônio Pereira Martins, Fernando Ferreira Costa, Marcos Antonio de Oliveira.

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

A finalidade deste projeto é trazer informações para o paciente sobre o estudo “**Análise de genes envolvidos no estado redox de reticulócitos e eritrócitos de pacientes beta talassêmicos e com anemia falciforme.**” Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a quaisquer perguntas que o paciente possa ter sobre este termo e sobre o estudo. Cada participante da pesquisa receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As espécies reativas de oxigênio são compostos químicos que em excesso podem causar sérios danos às células. Estes compostos parecem estar diretamente relacionadas com inúmeras manifestações clínicas de doenças hematológicas como a beta talassemia e anemia falciforme. Sendo assim, é de vital importância que as células possuam mecanismos de defesa eficientes, como o sistema antioxidante, o qual é formado por enzimas que atuam combatendo o aumento de espécies reativas de oxigênio. Recentemente, nosso grupo realizou um estudo buscando relacionar uma família destas enzimas, denominadas de peroxirredoxinas (PRDXs), com o quadro clínico de pacientes com anemia falciforme e beta talassemia. Nossos resultados foram bastante satisfatórios e mostraram variação nos níveis de produção destas enzimas entre pacientes e indivíduos saudáveis. Estes dados sugerem que as PRDXs podem estar associadas à clínica observada nestes pacientes, contudo estudos adicionais são necessários para melhor estabelecer essa relação, bem como os seus mecanismos. Neste projeto estamos propondo analisar genes e proteínas direta ou indiretamente envolvidos com as PRDXs e que conseqüentemente podem auxiliar na melhor compreensão da relação destas enzimas com a anemia falciforme e a beta talassemia.

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 que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@power.ufscar.br

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:

Sim

Não

\_\_\_\_\_  
Voluntário/ Responsável

\_\_\_\_\_  
Voluntário/ Responsável

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

(Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha)

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha,

**Endereço:** Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310, Bairro Monjolinho -  
Universidade Federal de São Carlos - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde -  
Departamento de Genética e Evolução- Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada.  
Tel.: + 55 16 3351-8318

**Consulta de questões éticas**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS PRO-REITORIA DE PESQUISA**

**Rod. Washington Luiz, km 235 - Caixa Postal 676 - 13.565-905 São Carlos – SP**

**Telefone: (16) 3351-8028**

**fcruz@ufscar.br**

Comitê de Ética da Fundação HEMOPE

Endereço: Rua Joaquim Nabuco, 171 – Graças – 52011-000 Recife, PE

Telefone: (81) 3182-4660

Comitê de Ética em Pesquisa Unicamp

Endereço: Rua Tessália Viera de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111

13084-971 - Campinas - SP

Telefone: (19) 3521-8936

cep@fcm.unicamp.br

**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? \_\_\_\_\_