

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

KARINA KIRSCHNER LOPES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PEROXIRREDOXINAS EM PACIENTES
COM DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E DOENÇA
FALCIFORME POR HEMOGLOBINA SC**

SÃO CARLOS

2014

KARINA KIRSCHNER LOPES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PEROXIRREDOXINAS EM PACIENTES
COM DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE E DOENÇA
FALCIFORME POR HEMOGLOBINA SC**

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

Orientador: Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

**SÃO CARLOS
2014**

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

L864ae

Lopes, Karina Kirschner.

Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e doença falciforme por hemoglobina SC / Karina Kirschner Lopes. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 77 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Biologia molecular. 2. Anemia hemolítica. 3. Peroxirredoxinas. 4. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD: 574.88 (20ª)

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

**“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS PEROXIRREDOXINAS EM
PACIENTES COM DEFICIÊNCIA DE GLICOSE-6-FOSFATO
DESIDROGENASE E DOENÇA FALCIFORME POR HEMOGLOBINA
SC”**

Dissertação de Mestrado de

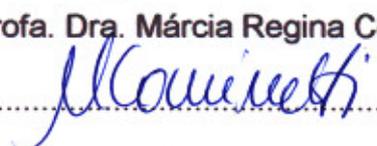
KARINA KIRSCHNER LOPES

Banca Examinadora

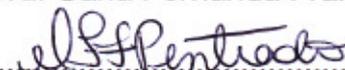
Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha


.....

Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti


.....

Profa. Dra. Carla Fernanda Franco Penteadó


.....

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que foi quem permitiu que eu estivesse aqui, que sempre esteve ao meu lado, me amparando nos momentos difíceis e permitiu que eu alcançasse os objetivos, concluindo este trabalho.

Agradeço aos meus pais, familiares e amigos que sempre me apoiaram, que confiaram em mim e mesmo de longe estão sempre perto, dando força, carinho e toda atenção necessária.

Agradeço ao meu noivo Jeferson, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, por todo carinho e dedicação.

Agradeço ao Prof Dr Anderson Ferreira da Cunha por acreditar em mim e por ter sido mais que um orientador e sim um amigo, conselheiro, sempre querendo nosso bem, preocupado com o futuro tanto das pesquisas como nosso futuro profissional.

Agradeço ao Prof Dr Iran Malavazi que contribuiu bastante para o desenvolvimento dessa pesquisa, sendo também um orientador.

Agradeço aos colegas de trabalho do LBGA, a todos que gastaram um pouco do seu tempo me auxiliando, e principalmente, a Karen e a Sheila que me receberam de braços abertos no laboratório, me ensinaram muito e foram grandes companheiras durante tempos bons e ruins que enfrentamos durante essa pesquisa.

Agradeço aos colegas de outros laboratórios que também contribuíram para essa pesquisa.

Agradeço a todos os colaboradores do HEMOPE pelo grande auxílio

Agradeço a todos os pacientes e voluntários que cederam material para essa pesquisa, sem os quais não poderia ter sido realizada.

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

Agradeço aos funcionários do DGE por todo serviço prestado.

Agradeço a FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro e manutenção do projeto.

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas pelo organismo sob diversas circunstâncias, como por exemplo, pela redução incompleta do oxigênio durante a respiração celular e ainda por fatores exógenos. Apresentam algumas funções no organismo, porém, quando em excesso são prejudiciais causando peroxidação de lipídios, danos ao DNA, organelas e até morte celular. Então, para que as EROs sejam mantidas em um nível adequado as células desenvolveram sistemas antioxidantes. Participam desse sistema as enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutathione peroxidase e as peroxirredoxinas (Prdx). Esta última se destaca pela abundância e grande reatividade com os substratos, nos seres humanos, seis Prdx foram descritas e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, desenvolvendo funções importantes na sinalização celular e protegendo as células dos danos oxidativos. Nos eritrócitos, esta proteína é tão abundante que só perde em concentração para as globinas, evidenciando um provável papel fundamental neste tipo celular já que os eritrócitos são verdadeiros alvos de danos causados pelas EROs. Porém, pouca atenção tem sido dada ao papel antioxidante das peroxirredoxinas nos eritrócitos e existem poucos trabalhos na literatura relacionando algumas destas proteínas com as diversas doenças eritrocitárias, principalmente em relação às anemias hemolíticas, as quais fazem parte a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) cuja deficiência de produção de NADPH parece interferir no ciclo catalítico das peroxirredoxinas, entretanto a relação destas proteínas na deficiência de G6PD e na hemoglobinopatia SC ainda não foi explorada. Dados de literatura mostram que os eritrócitos de pacientes com anemia falciforme estão sob constante estresse, no caso dos indivíduos com hemoglobinopatia SC parece haver maior taxa de autooxidação da hemoglobina devido a instabilidade da hemoglobina nesta doença, levando a um aumento de EROs. Este estudo avaliou o papel das PRDXs em reticulócitos de pacientes com as doenças descritas acima, comparando com reticulócitos de indivíduos saudáveis, utilizando PCR em tempo real e Western blot. Os resultados mostraram que não há diferença significativamente estatística entre a expressão gênica das PRDX em controle e nos pacientes nas duas doenças estudadas. Quanto a expressão protéica aparentemente também não houve uma diferença considerável. No entanto, ao avaliarmos o perfil redox da principal PRDX encontrada no eritrócito, PRDX 2, juntamente com a PRDX 1, verificamos que estas apresentavam-se em um estado de oxidação maior nos pacientes do que nos controles. Isso sugere que há uma deficiência na reciclagem dessas proteínas devido a baixa atividade da tiorredoxina redutase também devido ao aumento de EROs nesses pacientes. E como os pacientes não apresentam quadro grave de anemia hemolítica, pode estar havendo um aumento da expressão e / ou a atividade de outras proteínas anti-oxidantes, tais como a glutathione peroxidase e catalase.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are produced by the organism under various circumstances, such as the incomplete reduction of oxygen during cell respiration and also by exogenous factors. Have certain roles in the body, however, when in excess are harmful causing lipid peroxidation, DNA damage, cell organelles and even death. So, cells have developed antioxidant systems to maintained ROS at an appropriate level. Participating in this system the antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase and peroxiredoxins (PRDX). The latter stands out for its great abundance and reactivity with substrates, in humans six PRDX were described and are located in different cellular compartments, developing important roles in cell signaling and protecting cells from oxidative damage. In erythrocytes, this protein is so abundant that only lost in concentration for the globins, indicating a probable key role in this cell type as the erythrocytes are true targets of damage caused by ROS. However, little attention has been given to the antioxidant role of peroxiredoxins in erythrocytes and there are few studies in the literature relating to some of these proteins with erythrocyte various diseases, especially in relation to haemolytic anemia, which are part dehydrogenase deficiency Glucose-6-phosphate (G6PD) deficiency whose production of NADPH appears to interfere with the catalytic cycle of peroxiredoxins, however the relationship of these proteins in G6PD deficiency and SC hemoglobinopathy has not been explored. Literature data show that the erythrocytes in patients with sickle cell disease are under constant stress, in the case of individuals with SC hemoglobinopathy seems to be a greater rate of autoxidation of hemoglobin due to instability of the hemoglobin in this disease, leading to increased ROS. Then, this study evaluated the role of PRDXs in reticulocyte of patients with diseases described above, compared with reticulocytes of healthy individuals, using real-time PCR and Western blot. The results showed that no significantly statistical difference between the gene expression of PRDX in control and in patients in the two diseases studied. As for protein expression apparently there was also no significant difference. However, when assessing the redox profile at the major PRDX found in erythrocytes, PRDX 2, along with PRDX 1, we found that these patients were more oxidized state in patients than in controls. This suggests that there is a deficiency in the recycling of these proteins due to low activity of thioredoxin reductase, also due to increased ROS in these patients. And as patients do not present a severe hemolytic anemia there may be an increased expression and/or activity of other antioxidant proteins such as glutathione peroxidase and catalase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alterações morfológicas durante a eritropoiese em seres humanos.....	13
Figura 2. Representação da estrutura da molécula de hemoglobina adulta A1.....	15
Figura 3. Grupamento dos genes de α e β globina e a produção de diferentes hemoglobinas durante o desenvolvimento humano.....	16
Figura 4. Via glicolítica ou de Emden-Meyerhoff e via das pentoses.....	24
Figura 5. Ciclo da glutatona peroxidase.....	27
Figura 6. Ciclo da tiorredoxina e tiorredoxina redutase.....	28
Figura 7. Mecanismos de reação das peroxirredoxinas.....	36
Figura 8. Lâmina de leucócitos e esfregaço de reticulócitos.....	41
Figura 9. Gel desnaturante de agarose à 1,2%.....	42
Figura 10. Teste de cDNA com o primer da beta actina.....	43
Figura 11. Determinação da concentração ótima dos primers forward e reverse PRDX1.....	45
Figura 12. Curva de melting PRDX1.....	46
Figura 13. NTCs (no-template controls) PRDX1.....	46
Figura 14. Teste de Eficiência da PRDX1 300F/300R.....	48
Figura 15. Curva de melting da PRDX1.....	48
Figura 16. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos sadios e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.....	52
Figura 17. Análise de western blotting em controles e pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.....	53
Figura 18. Análise densitométrica das amostras de indivíduos controle e deficientes em G6PD.....	53
Figura 19. Análise de western blotting não-redutor do estado redox das peroxirredoxinas em controles e pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.....	54
Figura 20. Análise da expressão gênica da tiorredoxina e tiorredoxina redutase 1 em reticulócitos de indivíduos sadios e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase.....	56
Figura 21. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos sadios e com hemoglobinopatia SC.....	57
Figura 22. Análise de western blotting em controles e pacientes com doença falciforme por hemoglobina SC.....	58
Figura 23. Análise densitométrica das amostras de indivíduos controle e indivíduos com hemoglobinopatia SC.....	58
Figura 24. Análise de western blotting não-redutor do estado redox das peroxirredoxinas em controles e pacientes com hemoglobinopatia SC.....	59
Figura 25. Análise da expressão gênica da tiorredoxina e tiorredoxina redutase 1 em reticulócitos de indivíduos sadios e com hemoglobinopatia SC.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz para Padronização da Concentração Ótima de <i>Primers Forward e Reverse</i>	45
Tabela 2. Sequências e concentrações ótimas dos primers utilizados no qRT-PCR.....	47
Tabela 3. Parâmetros de importância para os <i>primers</i> caracterizados.....	49
Tabela 4. Anticorpos utilizados na técnica de western blotting.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

•OH - radical hidroxila

ATP - adenosina trifosfato

BFU- E – *burst- forming unit- erythroid*

CAT – catalase

cDNA – DNA complementar

CFU- E – *colony- forming units- erythroid*

CuZn-SOD – superóxido dismutase cobre e zinco

Cys – cisteína

CysP – cisteína peroxidásica

CysR – cisteína de resolução

DTPA – ácido dietileno triamina

DTT – ditioneitol

EC-SOD – superóxido dismutase extra celular

EDTA - ácido etilendiaminotetracético

EPO- eritropoetina

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

G6P - Glicose-6-Fosfato

G-6-PD A- - Variante Africana de deficiência de G6PD

G6PD - Glicose-6-fosfato Desidrogenase

GAPDH – gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

GPx - Glutathione Peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH- Glutathione

GSH - Glutathione Reduzida

GSSG - Glutathione Oxidada

GSTpi – Glutathione S transferase Pi

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

Hb – hemoglobina

HbSC - hemoglobina SC

K⁺ - potássio

LOOH - hidroperóxidos lipídicos

MCP - morte celular programada

MetHb - metahemoglobina

Mn-SOD - superóxido dismutase manganês

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídio

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Fosfato

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintetase

O₂^{•-} - ânion superóxido

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONOOH- peróxido de nitrito

PRDX - Peroxirredoxina

qRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real

RE – retículo endoplasmático

RNA – ácido ribonucleic

RNA_m – RNA mensageiro

RPM - rotações por minuto

SOD - superóxido dismutase

TRX - Tiorredoxina

TrxR - Tiorredoxina redutase

β_c-globina – globina beta com mutação para hemoglobina C

β_s-globina – globina beta com mutação para hemoglobina S

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

δ - Delta

ε - Épsilon

γ - Gama

ζ - Zeta

θ - Teta

α^1 - Alfa 1

α^2 - Alfa 2

γ A- Gama Adenina

γ G- Gama Glicina

O₂ - Oxigênio

-CH= - Radicais Metanílicos

Fe⁺⁺ - Ferro Divalente

μ g - Micrograma

μ L - Microlitro

μ M-Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. O eritrócito.....	12
1.2 A hemoglobina.....	14
1.3. A célula eritrocitária e EROS.....	16
1.3.1. Ânion superóxido.....	17
1.3.2. Peróxido de hidrogênio.....	18
1.3.3. Radical Hidroxila.....	19
1.3.4. Peroxidação Lipídica e Hidroperóxidos de Lipídeos.....	19
1.3.5. Óxido Nítrico e a Formação de Peroxinitrito.....	21
1.4. Anemia hemolítica e estresse oxidativo.....	22
1.4.1. Deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	23
1.4.2. Hemoglobinopatia SC.....	28
1.5. Defesas antioxidantes.....	30
1.5.1. Superóxido dismutase (SOD).....	30
1.5.2. Catalase.....	31
1.5.3. Glutathione Peroxidase.....	32
1.5.4. Peroxirredoxinas.....	33
1.6. Relevância biológica das peroxirredoxinas.....	36
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos Específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. Pacientes e controles.....	39
4.2. Aspectos éticos da pesquisa.....	40
4.3. Separação de Reticulócitos.....	40
4.4. Extração de RNA.....	41
4.5. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	42
4.6. Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	43
4.7. Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real.....	44
4.7.1. Concentração de Primer.....	44
4.7.2. Eficiência de Reação.....	47
4.8. Western blotting.....	49
4.8.1. Extração e quantificação de proteínas.....	49
4.8.2. Preparo da amostra para western redutor.....	50
4.8.3. Preparo da amostra para western não-redutor.....	50
4.8.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e Western Blot.....	50

4.9. Análise estatística	51
5. RESULTADOS.....	52
5.1. Análise da expressão gênica da família de peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com Deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	52
5.3. Análise proteica das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos saudáveis e com Deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	52
5.4. Análise do estado redox das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos saudáveis e pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase	54
5.5. Análise da expressão gênica da Tiorredoxina e Tiorredoxina redutase 1 em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com Deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase	55
5.6. Análise da expressão gênica da família de peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com hemoglobinopatia SC	56
5.7. Análise proteica das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos saudáveis e com hemoglobinopatia SC	57
5.8. Análise do estado redox das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos saudáveis e pacientes com hemoglobinopatia SC.....	59
5.9. Análise da expressão gênica da Tiorredoxina e Tiorredoxina redutase 1 em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com Doença Falciforme por Hemoglobina SC	60
6. DISCUSSÃO	61
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8. ANEXOS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. O eritrócito

O sangue periférico é constituído por três diferentes linhagens celulares: glóbulos vermelhos, eritrócitos ou hemácias; glóbulos brancos ou leucócitos; e plaquetas ou trombócitos. As hemácias constituem a maior população de células do sangue. Embora, sejam anucleadas, constituídas apenas por membrana plasmática e citoplasma, são bastante complexas (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001). Todo o processo pelo qual estas células são produzidas na medula óssea é denominado eritropoiese. Sob condições normais, esse processo resulta em uma taxa de produção de hemácias de modo a manter constante a massa eritrocitária do organismo, sugerindo que o processo é finamente regulado, sendo a eritropoetina o principal e mais bem conhecido fator de crescimento envolvido (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001; GREER et al., 2003).

O processo de maturação eritróide envolve uma grande variedade de células em diferentes estágios começando com a primeira geração de “stem cells” comprometidas com a diferenciação eritróide e terminando com células vermelhas maduras circulantes (LICHTMAN et al 1926; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001). Após o estímulo da eritropoetina, as células passam por várias modificações que levam à formação dos eritrócitos. A primeira etapa se inicia quando a unidade formadora de crescimento rápido- eritróide (BFU- E – *burst- forming unit- erythroid*) dá origem à unidade formadora de colônia-eritróide (CFU- E – *colony- forming units – erythroid*), que se diferencia na primeira célula morfológicamente identificável como sendo da linhagem eritróide, o proeritroblasto, o qual passará por sucessivas modificações que levam a célula a diferenciar- se em eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo e eritroblasto ortocromático (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005; HOFFMAN et al., 2008).

Em seguida, o eritroblasto ortocromático perde o núcleo num processo aparentemente ativo de extrusão transformando-se em reticulócito. O reticulócito é pois uma célula anucleada, aproximadamente 20% maior que os eritrócitos maduros, que ainda conserva no citoplasma alguns resquícios de organelas como mitocôndrias, ribossomos (com RNA mensageiro) e remanescentes do complexo de Golgi. O reticulócito retém, portanto, alguma capacidade de síntese protéica; de fato, 10-20% da síntese de hemoglobina completa-se nesse estágio. O reticulócito recém formado permanece de um a três dias na medula óssea, sendo

em seguida liberado para circulação. A maturação do reticulócito na circulação requer de um a dois dias, estes então perdem todas as organelas e têm o volume ligeiramente reduzido e a síntese de hemoglobina e a montagem da membrana são completadas. A partir deste ponto cessa a síntese protéica e perdem a capacidade de metabolismo aeróbico, restringindo-se a metabolização da glicose pela via de Emden-Meyerhoff e pela via das pentoses (LICHTMAN et al., 1926; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001). Uma vez amadurecido completamente, o reticulócito transforma-se então em uma hemácia madura cuja vida em circulação é de aproximadamente 120 dias (Figura 1) (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001).

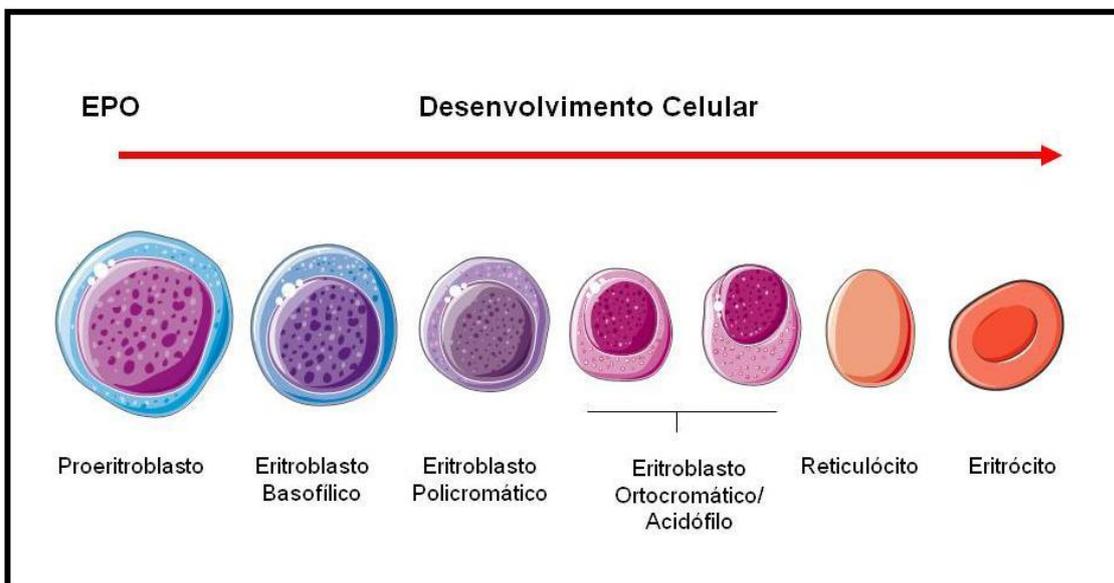


Figura 1. Alterações morfológicas durante a eritropoiese em seres humanos. Após o estímulo da EPO a célula eritróide sofre várias alterações morfológicas que levam à formação de eritrócitos maduros. Para mais detalhes ver o texto. Figura adaptada de DA CUNHA et al., 2012.

As hemácias maduras têm a forma homogênea de corpúsculos circulares, bicôncavos e de tamanho relativamente uniforme, com diâmetro médio de $8\mu\text{m}$ (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001). A organização estrutural da membrana celular dos eritrócitos permite que eles sofram grandes deformações mantendo sua integridade estrutural durante sua permanência no sistema circulatório (YAWATA, 2003).

Devido à perda do núcleo, mitocôndria e ribossomos, eritrócitos maduros são incapazes de realizar fosforilação oxidativa e síntese de proteínas. No entanto, eles ainda devem manter um metabolismo ativo para manter a flexibilidade e a integridade da membrana, bem como para preservar a hemoglobina na sua forma funcional para assegurar a entrega adequada de oxigênio (PRCHAL; GREGG, 2005).

Portanto, as células vermelhas possuem uma maquinaria metabólica ativa que fornece energia para bombear íons contra gradientes eletroquímicos e para manter a hemoglobina na forma reduzida. A principal fonte de energia metabólica vem da glicose. A glicose é metabolizada pela via glicolítica e através da via das pentoses (BLEUTER, 2001).

Após o período de 120 dias na circulação, em condições normais, os eritrócitos sofrem várias alterações morfológicas, causadas principalmente pela redução de sua atividade metabólica e pela oxidação da hemoglobina (GHAFFARI, 2008). Estas alterações são reconhecidas pelo sistema mononuclear fagocitário que é constituído por células fagocíticas (macrófagos e monócitos) presentes no fígado e no baço, principais responsáveis pela remoção dos eritrócitos da circulação. O aumento acelerado da destruição dos eritrócitos é a característica mais importante encontrada em várias doenças hemolíticas. (TELEN; KAUFMAN, 1999; HOFFMAN et al., 2008).

1.2 A hemoglobina

As funções primordiais dos glóbulos vermelhos são a de transportar oxigênio dos pulmões aos tecidos, mantendo a perfusão tissular adequada, e transportando gás carbônico dos tecidos aos pulmões. A hemoglobina, que constitui 95% das proteínas das hemácias, é a responsável por estas funções (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2005). O restante inclui enzimas necessárias para a produção de energia e para a manutenção da hemoglobina em seu estado funcional, reduzida (GREER et al. 2003).

A hemoglobina normal possui estrutura globular e quaternária formada por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas, sendo duas do tipo alfa (α) e duas do tipo beta (β), cada uma delas associada a um grupo prostético heme, formado por quatro núcleos pirrólicos, unidos entre si por radicais metanílicos ($-\text{CH}=\text{}$), contendo um átomo de ferro divalente (Fe^{++}) capaz de se ligar de modo reversível à molécula de oxigênio (O_2) (figura 2) (PERUTZ et al., 1960; STEINBERG; BRUGNARA, 2003).

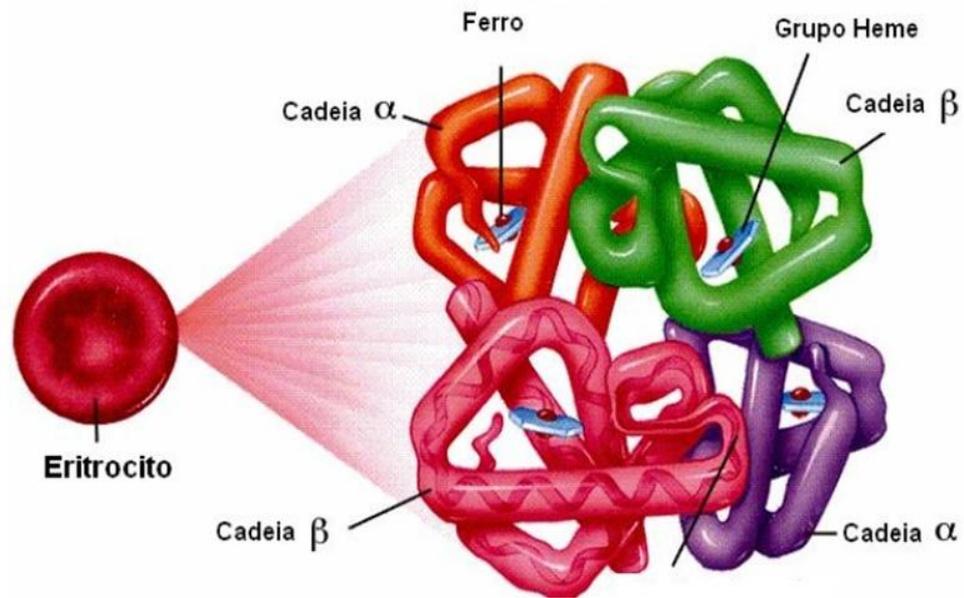


Figura 2. Representação da estrutura da molécula de hemoglobina adulta A1. A hemoglobina é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas do tipo alfa e duas do tipo beta, cada uma delas associada a um grupamento heme, contendo um átomo de ferro ao qual se liga o oxigênio de modo reversível. (Disponível em: http://www.kacr.or.kr/img/gene_expression/hemoglobin.jpg)

Os genes, que expressam as cadeias protéicas, localizam-se em dois grupamentos cromossômicos diferentes (α e β), localizados nos braços curtos dos cromossomos 16 e 11, respectivamente. No grupamento α incluem os genes para as cadeias zeta (ζ), alfa (α) e teta (θ), enquanto que o grupamento β é constituído dos genes para as cadeias épsilon (ϵ), gama (γ^A e γ^B), delta (δ) e beta (β). Durante o desenvolvimento ontogenético normal, ocorrem mudanças na expressão desses genes, que são os responsáveis pelos diferentes tipos de hemoglobinas humanas (DZIERZAK, 2001).

O primeiro tetrâmero de hemoglobina, predominante nas quatro semanas iniciais do período embrionário, é composto por duas cadeias zeta e duas cadeias épsilon ($\zeta_2\epsilon_2$) que formam a Hb Gower 1. Após esse período, as cadeias alfa e gama começam a ser sintetizadas, formando as hemoglobinas Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\gamma_2$), presentes até a décima segunda semana do período embrionário, estas são substituídas pela hemoglobina Fetal ($\alpha_2\gamma_2$), a mais importante Hb da vida intra-uterina, que predomina aproximadamente até a trigésima semana de gestação, quando ocorre o aumento da síntese das cadeias de globina β que progressivamente substitui as cadeias γ formando a hemoglobina do adulto, a hemoglobina

A1 ($\alpha_2\beta_2$) que aumenta gradativamente. Há também outra hemoglobina encontrada no adulto normal formada pela combinação das globinas α e δ denominada hemoglobina A2 ($\alpha_2\delta_2$), representando 2– 3% da hemoglobina total. A síntese de hemoglobina fetal pode não cessar totalmente e seu nível se mantém entre 0 – 1% (WEATHERALL; CLEGG, 1981; STEINBERG, 2005). (Figura 3).

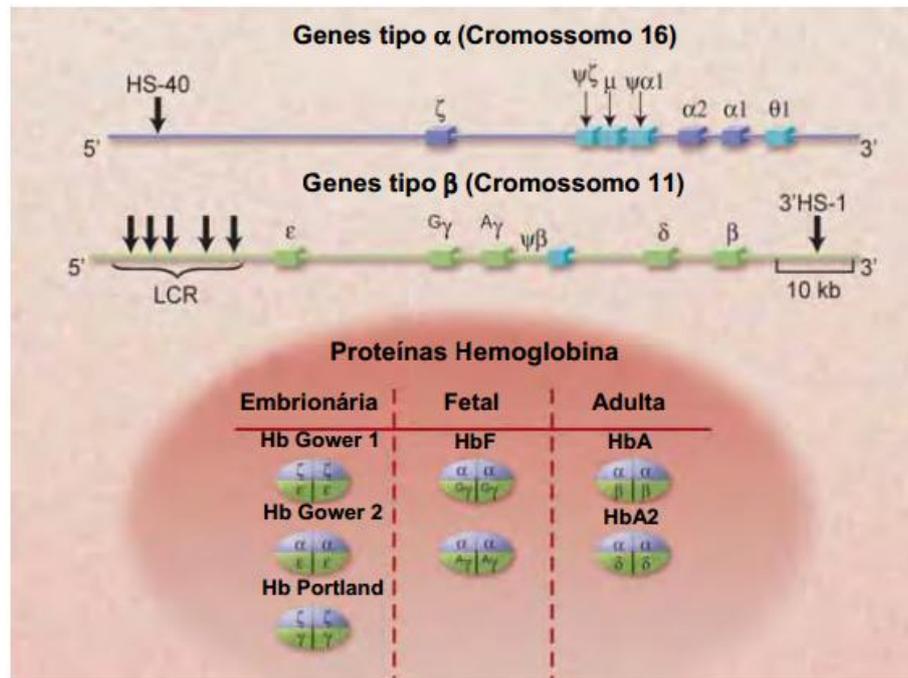


Figura 3. Grupamento dos genes de α e β globina e a produção de diferentes hemoglobinas durante o desenvolvimento humano. Os genes responsáveis pela síntese das cadeias globínicas estão organizados em dois grupamentos gênicos localizados em cromossomos diferentes. O grupamento α localiza-se no braço curto do cromossomo 16, é constituído pelos genes ζ , α_1 e α_2 . O grupamento β está situado no braço curto do cromossomo 11, e possui os genes ϵ , $A\gamma$ e $G\gamma$ e pelos genes delta δ e β . Durante o desenvolvimento ontogenético, ocorrem mudanças na expressão desses genes, formando os diferentes tipos de hemoglobinas humanas. (Adaptado de SCHECHTER, 2008).

1.3. A célula eritrocitária e EROS

O estado oxidativo das células é determinado pelo equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Pró-oxidantes são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROS são produtos gerados pela redução incompleta do oxigênio molecular pela exposição a agentes externos como cigarro, radiação, carcinógenos, drogas e ozônio, e internos, como durante a resposta inflamatória, atividade da NADPH oxidase, xantina oxidase (MASAKI,

2010) e em grande parte pela mitocôndria durante o metabolismo aeróbico normal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Apesar da ausência de mitocôndrias, EROs são continuamente produzidas nas células vermelhas devido à elevada tensão de oxigênio no sangue e a quantidade abundante de ferro do grupamento heme na hemoglobina. Vários fatores levam a geração de radicais oxidantes, tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) nos eritrócitos (ÇIMEN, 2008).

1.3.1. Ânion superóxido

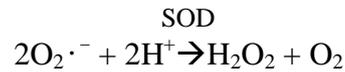
Nos eritrócitos, a fonte primária de EROs é a própria proteína carreadora de O_2 , ou seja a Hb que sofre auto-oxidação produzindo o $O_2^{\bullet -}$ (ÇIMEN, 2008). Durante a ligação reversível do oxigênio a hemoglobina, o ferro é mantido em seu estado ferroso (Fe^{2+}). No entanto, eventuais flutuações conformacionais espontâneas no grupamento heme da oxiHb (oxihemoglobina) permite que água ou um ânion entre, resultando na transferência de um elétron do ferro para o oxigênio para produzir metHb (metahemoglobina) e ânions superóxido (LOW; HAMPTON; WINTERBOURN, 2008).

No caso do transporte de oxigênio, o ferro necessita estar na sua forma reduzida (Fe^{2+}), caso isto não ocorra este pode se desprender da Hb. A redução do O_2 em $O_2^{\bullet -}$ é acompanhada da oxidação do átomo de ferro da hemoglobina, formando a metahemoglobina, a qual não é mais capaz de se ligar ou transportar O_2 . Nos eritrócitos humanos aproximadamente 3% do total das moléculas de Hb se transformam em MetHb diariamente. Esta MetHb pode ser reduzida pela via NADH citocromo ou pela via 5-metHb redutase (metahemoglobina redutase) e metHb redutase dependente de NADPH (KENNETT et al. 2005).

Considerando que a concentração de Hb no interior do eritrócito é de 5mM, mesmo uma pequena parcela que sofre auto-oxidação pode produzir altos níveis de EROs. Esse nível de EROS pode ser suficiente para danificar a própria célula vermelha, causando alterações nos lipídeos e na estrutura das proteínas (CLASTER et al., 1984), e, porque os glóbulos vermelhos são 40 % do volume de sangue, o escape de EROS a partir dessas células tem potencial para danificar outros componentes da circulação (JOHNSON et al., 2005).

1.3.2. Peróxido de hidrogênio

O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pode ser convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por dismutação espontânea ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Como indicado na reação abaixo:



Uma vez que as hemácias têm altos níveis de superóxido dismutase, o $O_2^{\cdot-}$ produzido será convertido em H_2O_2 (JOHNSON et al., 2005), que pode atravessar as membranas celulares quase tão facilmente quanto a água ao contrário do $O_2^{\cdot-}$ que necessita de canais aniônicos para sair (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Por ser um composto de alta permeabilidade em membranas, este também pode vir de fontes extracelulares para o eritrócito. Neste contexto, um fato de grande importância é que o eritrócito é considerado um “coletor” e decompositor universal de H_2O_2 dos organismos, pois além de desintoxicar oxidantes gerados endogenamente, os eritrócitos são capazes de atuar como um dissipador para o peróxido de hidrogênio extracelular, uma vez que possui acesso a praticamente todos os tecidos do corpo, além do número destas células ser extremamente abundante (BROWN et al., 1989; AOSHIBA et al., 1999; LOW; WINTERBOURN; HAMPTON, 2008).

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre em si, mas é geralmente incluído sob o título geral de espécie reativa de oxigênio (ERO). Ele é um fraco agente oxidante que pode danificar diretamente as proteínas e enzimas que contêm grupos tiol reativos. No entanto, como já foi dito, sua propriedade mais importante é a capacidade de atravessar membranas celulares livremente (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

Portanto, no eritrócito a hemoglobina está constantemente exposta a um fluxo intracelular de H_2O_2 , bem como a um fluxo extracelular. E a exposição de oxyHb ao H_2O_2 leva a modificações oxidativas que têm sido propostas como sinais para a proteólise seletiva nestas células (GIULIVI; DAVIES, 2001). Snyder et al, demonstraram que H_2O_2 induz a formação de um complexo covalente de espectrina e hemoglobina, bem como várias alterações celulares que incluem modificações na forma da célula, deformabilidade da membrana, na organização de fosfolipídios, e em características da superfície da célula (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008).

1.3.3. Radical Hidroxila

O radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é, provavelmente, o mediador final de maior dano tecidual induzido por radicais livres. Todas as espécies reativas de oxigênio descritas acima exercem a maior parte dos seus efeitos patológicos, dando origem à formação de radicais hidroxila. O radical hidroxila reage com constantes extremamente elevadas com quase todo o tipo de molécula encontrada em células, incluindo açúcares, aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos (LLOYD; HANNA; MASON, 1997).

Embora a formação de radicais hidroxila possa ocorrer de várias maneiras, o mecanismo *in vivo* mais importante é a decomposição de superóxido e de peróxido de hidrogênio catalisada por metal de transição. No caso, o ferro e o cobre desempenham um papel-chave na produção de radicais hidroxila *in vivo*. Isso ocorre devido à reação de Fenton (representada abaixo) onde o H_2O_2 reage com o ferro ($2+$) ou cobre gerando o radical $\cdot\text{OH}$ (STOHS; BAGCHI, 1995; FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008).

Reação de Fenton

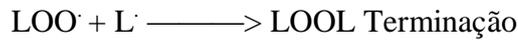
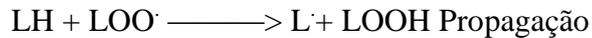
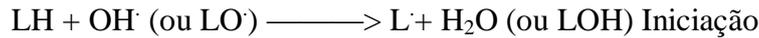


Como evidenciado na reação acima, o ferro tem um papel crucial na geração de $\cdot\text{OH}$. De fato, na presença de ferro a toxicidade de H_2O_2 pode ser potencializada em até 1000 vezes (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008).

1.3.4. Peroxidação Lipídica e Hidroperóxidos de Lipídeos

Os ácidos graxos poliinsaturados da membrana do eritrócito quando em contato com as EROs iniciam o processo de peroxidação lipídica (ou lipoperoxidação), mecanismo pelo qual os lipídios são atacados com energia suficiente para formar radicais orgânicos que reagem com o oxigênio e resultam no radical peroxil (PRATICO; DELANTY, 2000).

O radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Esta é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:



A primeira etapa desse processo, denominada iniciação, inicia-se com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo OH· ou pelo LO· (radical alcóxila), com conseqüente formação do L· (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L· reage rapidamente com o O₂, resultando em LOO· (radical peróxila), o qual é capaz de abstrair um átomo de H de outro lipídeo insaturado resultando em um novo radical lipídico e formando um peróxido de lipídeo (LOOH). O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L· e LOO·) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios (GUTTERIDGE 1995; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação pode ser catalisada por íons ferro, por conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais altamente reativos (alcóxila, LO* e peróxila, LOO*), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações, denominada ramificação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). As constantes para esta reação são de $1.5 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ na presença Fe²⁺ e são significativamente maiores que as alcançadas pela reação de Fenton para H₂O₂ as quais possuem taxas de $76 \times 10 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Acreditava-se que em razão dos LOOH não possuírem mobilidade elevada como o H₂O₂, seus efeitos deletérios poderiam ser restritos ao ambiente celular onde foi gerado, entretanto, diversos trabalhos tem apontado que uma vez que os LOOH possuem hidrofiliabilidade aumentada, estes podem se destacar das membranas onde foram originadas e translocar-se para outros compartimentos que possuem membranas. Já foi demonstrado também que peróxidos de fosfolipídeos e de colesterol podem ser transferidos tanto por meio de colisões entre membranas celulares de diferentes células como através do meio aquoso e desta forma podem afetar não somente outras células, mas também lipoproteínas do plasma em organismos multicelulares (GIROTTI, 2008).

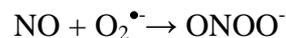
Devido à grande intimidade entre os lipídeos presentes na membrana plasmática e as proteínas de membrana, as quais podem chegar até 50% de sua composição, a peroxidação lipídica causa danos substanciais às proteínas constituintes (GUTTERIDGE, 1995). A peroxidação lipídica das membranas biológicas ocasiona perda de fluidez, queda do potencial de membrana, aumento da permeabilidade ao H⁺ e outros íons que resultam na ruptura e extravasamento do conteúdo celular (GIROTTI, 2008).

Além disso, as reações dos radicais livres resultam em mudanças na estrutura, transporte e antigenicidade nas membranas celulares. Nas hemácias, por exemplo, a peroxidação dos fosfolipídios, causa conseqüentemente um aumento da rigidez e deformidade das membranas, que por sua vez aumenta a suscetibilidade destes à hemólise (MAFRA et al., 1999). Adicionalmente, alguns produtos da fragmentação lipídica são citotóxicos (ESTERBAUER 1993; CATALA, 2009).

1.3.5. Óxido Nítrico e a Formação de Peroxinitrito

Os peroxinitritos e espécies reativas contendo nitrogênio também apresentam grande relevância para a célula eritrocitária, uma vez que o óxido nítrico (NO) é o terceiro gás mais abundante transportado juntamente com O₂ e CO₂ pelas células eritrocitárias. O NO é um importante componente em diversos processos/sistemas atuando na resposta imunológica e processos inflamatórios, crescimento e diferenciação celular, e também influenciando de forma bastante relevante no sistema circulatório, uma vez que está relacionado com a inibição de agregação plaquetária e nos processo de vaso-constricção e vaso dilatação (MONCADA; HIGGS, 1991; HAN et al. 2003; GLADWIN; CRAWFORD; PATEL, 2004; ROMERO; DENICOLA; RADI, 2006).

Entretanto, o NO pode reagir com o O₂^{•-} para formar um intermediário bastante reativo o peróxido de nitrito (ONOO⁻), conforme reação abaixo. Esta espécie é um poderoso oxidante capaz de causar danos em diversas biomoléculas e em pHs ácidos pode se decompor em dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) e •OH (GUTTERIDGE, 1995; SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007), os quais atuarão na peroxidação lipídica e nitrosilação de lipídeos, proteínas e DNA (GOLDSTEIN; CZAPSKI, 2000).



Na circulação os eritrócitos são os maiores responsáveis pelo seqüestro de NO, justamente por conter altos níveis de Hb, seja através de reações diretas com os grupamentos prostéticos da hemoglobina ou através de resíduos de cisteína das cadeias α da molécula (ULKER et al., 2009). A adição de um grupo NO a tióis protéicos (RSNO) forma um nitroso tiól em um processo denominado de S-nitrosilação e já foi demonstrado que a S- nitrosilação da hemoglobina é facilitada pela alteração conformacional da molécula induzida pelo O_2 . Assim ao reagir com a Hb ligada ao Oxigênio ($HbFe^{+2}O_2$) o NO é convertido a nitrato, ao passo que na reação sem o oxigênio ($HbFe^{+2}$) forma $HgbFe^{+2}NO$. O gradiente de O_2 das arteríolas promove a transição alostérica na Hb o qual libera NO e promove o aumento do fluxo sanguíneo (ZHANG et al., 2005; GRUBINA et al., 2007).

1.4. Anemia hemolítica e estresse oxidativo

O envelhecimento dos eritrócitos parece ser um processo multifatorial sendo que os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente esclarecidos (CAPRARI et al., 1999). Uma das explicações seria a teoria do envelhecimento através de EROs, na qual a degradação destas células viriam como resultado de danos oxidativos acumulados em biomoléculas com o passar do tempo de vida (TANG, 1997; MULLER et al., 2007). Este processo é resultado principalmente da formação de agregados de proteínas de banda 3, que é uma das proteínas mais abundantes na membrana do eritrócito, e que são estabilizados por moléculas de hemoglobina oxidada, conhecida como hemicromo. Isso causaria a perda da assimetria dos lipídeos de membrana através do reconhecimento desses agregados como antígenos por anticorpos IgG e do sistema complemento (ZAGO et al., 2001).

Em situação normal, a destruição dos eritrócitos acontece na mesma razão que a eritropoese de forma a manter o número de eritrócitos circulantes (ZAGO et al., 2005). Um aumento na destruição ou remoção dos eritrócitos da circulação antes da sua duração normal de 120 dias é característica do processo de hemólise. Esta pode ser uma condição assintomática, porém, quando a produção de eritrócitos não pode acompanhar o ritmo de sua destruição, caracteriza um quadro de anemia hemolítica (DHALIWAL; CORNETT; TIERNEY, 2004).

A causa exata da hemólise em muitas anemias hemolíticas é obscura ou não completamente estabelecida (ZAGO et al. 2005). A modulação das EROs parece ter uma relação muito estreita com a fisiopatologia de diversas doenças hematológicas, principalmente em anemias hemolíticas (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Quando há um desequilíbrio

entre a formação das espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes o resultado é o estresse oxidativo (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

O estresse oxidativo é responsável por agravar os sintomas de muitas doenças, incluindo este tipo de anemias. Embora não seja a etiologia primária destas doenças, o dano oxidativo desempenha para as células eritróides um papel crucial na hemólise levando a eritropoiese ineficaz na medula óssea e a curta sobrevivência das células vermelhas na circulação (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008).

Diversos estudos mostram que eritrócitos humanos expostos a um elevado nível de estresse oxidativo apresentam alterações celulares como denaturação oxidativa da Hb, lipídeos de membrana peroxidados e diversas proteínas de membrana agregadas, formando complexos de alto peso molecular, resultando na diminuição da sobrevivência dessas células. Sabe-se que a morte celular programada (MCP) de eritrócitos é bastante aumentada em doenças hematológicas como, por exemplo, na doença falciforme, beta talassemia e deficiência de G6PD (RUSANOVA et al., 2010).

Nestas patologias, o ambiente celular é extremamente pro-oxidante seja por conta da geração ineficiente de NADPH, seja pela formação de MetHb resultando em danos oxidativos e conseqüente hemólise das células que por sua vez favorecem a formação dessas espécies em outros tipos celulares (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2008). Como veremos a seguir:

1.4.1. Deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), enzima essencial para todas as células, catalisa a primeira reação da via das pentoses fosfato (ONDEI et al., 2009), como mostrado na figura 4. Nesta via, a G-6-PD (glicose-6-fosfato desidrogenase) oxida a glicose-6-fosfato (G6P) para 6-fosfogliconalactona com redução concomitante de fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADP⁺) para a forma reduzida NADPH. Nas células vermelhas do sangue, que não contêm as mitocôndrias, a via das pentoses fosfato é a única fonte de NADPH, um modulador crítico de potencial redox intracelular (MANGANELLI et al., 2013).

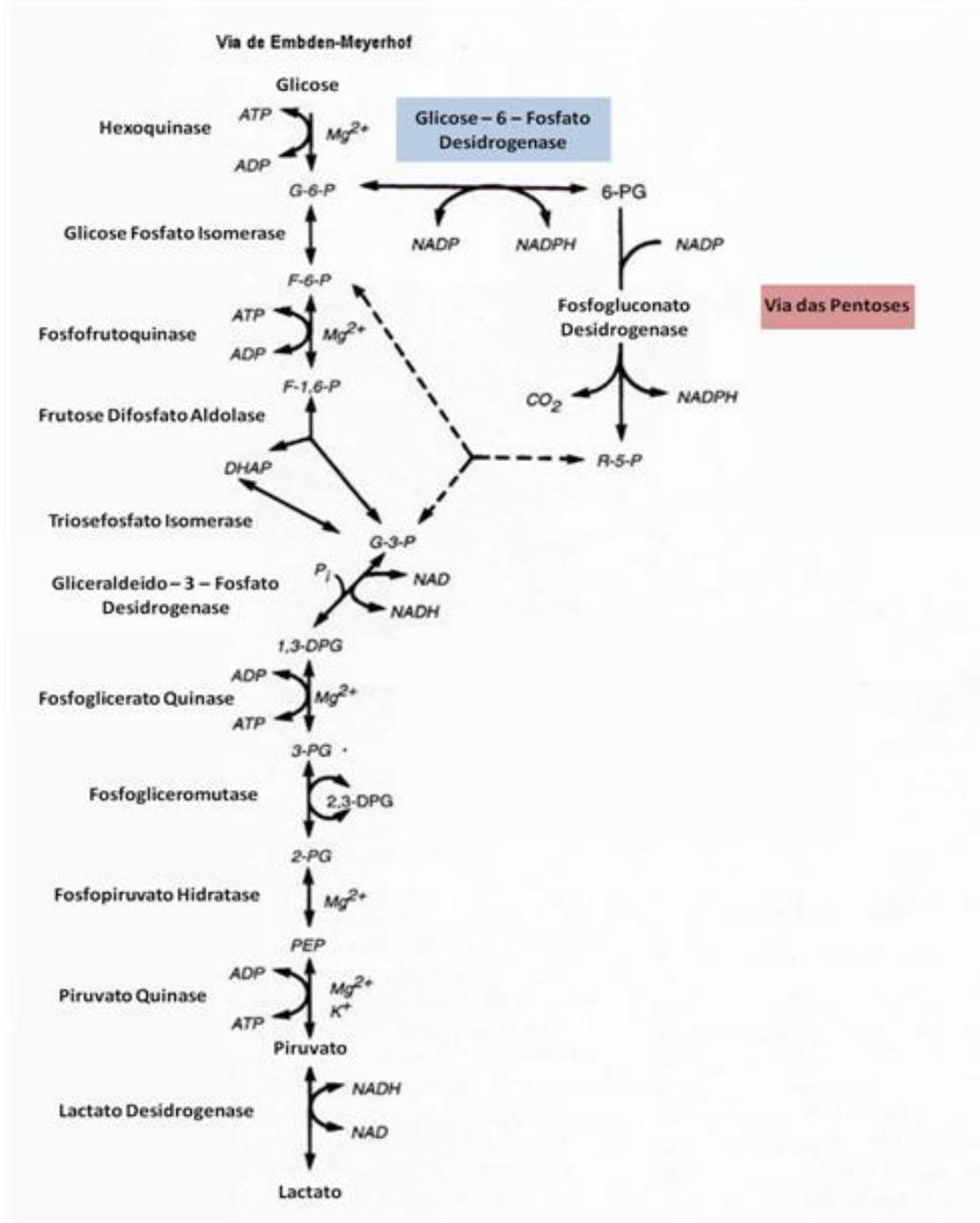


Figura 4. Via glicolítica ou de Emden-Meyerhoff e via das pentoses. A via glicolítica ou via de Emden-Meyerhoff é a principal via de consumo da glicose nos eritrócitos para produção de ATP, com desvio para via das pentoses, esta que é ativada em resposta ao estresse oxidativo para produção de NADPH pela ação da glicose-6-fosfato desidrogenase (destacada em azul), enzima que participa da primeira reação desta via. Adaptado de LUKENS, 1998.

Apesar de sua ampla distribuição no organismo, é no metabolismo das hemácias que a G-6-PD exerce a sua função mais importante (COMPRI; SAAD; RAMALHO, 2000). Sendo que a deficiência desta proteína é o distúrbio enzimático mais comum de glóbulos

vermelhos nos seres humanos. Estima-se que cerca de 400 milhões de pessoas são afetadas por essa deficiência (ELYASSI; ROWSHAN, 2009). A prevalência global desta doença se encontra geograficamente correlacionada às áreas endêmicas em malária, sendo maiores na África Sub-Sahariana, Oriente Médio, Sudeste da Ásia, Europa Mediterrânea e algumas áreas da América Latina (NKHOMA et al., 2009). A deficiência de G6PD parece proteger contra a infecção por *Plasmodium falciparum*. Glóbulos vermelhos com deficiência de G6PD parasitados são fagocitados mais facilmente pelos macrófagos que células vermelhas parasitadas que possuem atividade normal de G6PD (LUZATTO; NOTARO, 2001).

É causada por mutações no gene codificante para G6PD localizado no cromossomo X (locus Xq28), e a expressão fenotípica é mais freqüente em homens hemizigotos e mulheres homozigotas, tendo padrão de herança recessivo ligado ao sexo (KATSURAGAWA, 2004).

Estudos realizados na população brasileira revelaram uma prevalência de deficientes de G6PD em torno de 1% a 10%, com os maiores índices sendo encontrados entre os homens de ascendência africana (MAIA et al., 2010).

Mais de 160 mutações diferentes foram determinadas (BEUTLER; VULLIAMY, 2002), sendo a maioria, mutações pontuais e pequenas deleções que causam defeitos estruturais na enzima. Na maioria dos casos, essas mutações causam instabilidade da enzima ou atividade alterada, geralmente por diminuição da afinidade de G6PD para com os seus substratos, NADP⁺ ou glicose-6-fosfato (G6P) (LUZZATTO, 2006).

Em 1967, a OMS (Organização Mundial da Saúde) fez recomendações iniciais para a caracterização da deficiência de G6PD. Inicialmente, a deficiência G6PD foi caracterizada bioquimicamente, medindo a atividade da enzima residual e mobilidade eletroforética. Utilizando esses critérios, mais de 400 variantes bioquímicas de G6PD foram definidas (CAPELLINI; FIORELLI, 2008).

Variantes da deficiência de G6PD foram agrupados em cinco classes com base na atividade enzimática e manifestações clínicas (CAPELLINI; FIORELLI, 2008). Estes são descritos como: classe I (mutações graves de anemia hemolítica não esferocítica crônica); classe II (intermediário, 10% da função normal de G6PD); classe III (leve, 10-60% de G6PD função normal); classe IV (assintomática, 60-100% de G6PD função normal); e classe V: mutações que causam aumento da atividade G6PD (BEUTLER, 1994; FRANK 2005).

Das variantes de G-6-PD com atividade deficiente, as de maior importância pela sua frequência são a variante Africana ou A-, que ocorre comumente em descendentes daquele continente, bem como no sul da Itália, Espanha, Portugal e Península Arábica, a variante Mediterrânea, que é encontrada mais usualmente em italianos, também em gregos, judeus orientais, árabes e persas; a variante Cantão, frequente no sul da China; a variante Seattle, com alta frequência na Sardenha, Grécia e sul da Itália, embora tenha sido descrita pela primeira vez nos EUA; e a variante Union, encontrada em chineses e no sul da Itália (VULLIAMY; LUZZATO; MASON, 1992).

As variantes mais encontradas no Brasil foram a africana (G-6-PD A-) e a Mediterrânea, sendo que 95% a 99% dos deficientes de G-6-PD apresentam a variante africana (COMPRI; SAAD; RAMALHO, 2000; GARLIP; RAMALHO, 1988).

Defeitos da classe I, provavelmente, são causadas por mutações na região da enzima onde NADP⁺ ou G6P se liga. A base genética para as outras classes é desconhecida. Deficiências de Classe I são raras e podem ser graves o suficiente para causar dependência de transfusão. Eritrócitos desses pacientes têm uma vida útil consideravelmente menor que a dos eritrócitos saudáveis, mesmo quando eles não estão expostos ao estresse oxidativo (PETERS; VAN NORDEN, 2009).

Os pacientes com classe II, III, IV são geralmente assintomáticos. Deficiências da classe III são os defeitos mais comuns e a hemólise, que ocorre devido a presença de um agente que leva ao estresse oxidativo é auto-limitante nesta classe, apenas os eritrócitos mais velhos não têm G6PD ativo suficiente para compensar episódios de estresse oxidativo, a variante G-6-PD A- é classificada como do tipo III (BEUTLER; DUPARC 2007). Já a Mediterrânea é classificada como de classe II, estas são geralmente assintomáticas, mas ambos os eritrócitos jovens e velhos são suscetíveis ao estresse oxidativo. Hemólise nesta classe é muito mais grave e não é auto-limitante pois a hemólise cessa somente após a remoção do agente causador de estresse (PETERS; VAN NORDEN 2009).

Esses agentes causadores de aumento do estresse oxidativo podem ser várias drogas e produtos químicos, tais como a primaquina e dapsona, a ingestão de favas, e stress (por exemplo, infecção) podem induzir a anemia hemolítica nesses indivíduos (PETERS; VAN NORDEN, 2009). Pois a produção reduzida de NADPH não é suficiente para neutralizar o aumento do stress oxidativo (MANGANELLI et al., 2013) prejudicando sua capacidade de eliminar os peróxidos lipídicos e H₂O₂ (JAMURTAS et al., 2006) o que acarreta na oxidação

de numerosos compostos essenciais para sobrevivência da hemácia (como grupamentos tióis de proteínas de membrana), formação de corpos de Heinz, aumento do cálcio intra-eritrocitário e finalmente hemólise da célula (ABBOUD; AL-AWAIDA. 2010).

Isso ocorre pois, como foi dito anteriormente, o NADPH é um modelador crítico do potencial redox intracelular (Paglialunga et al. 2004). Catalase, uma enzima antioxidante que converte o peróxido de hidrogênio a água e oxigênio, é NADPH independente, mas um sítio alostérico essencial de ligação para NADPH mantém catalase na sua conformação mais ativa e a protege contra a toxicidade do peróxido de hidrogênio, inibindo sua inativação (KIRKMAN; GAETANI, 1984; ZHANG et al., 2010).

Também é utilizado pelos sistemas tioredoxina e glutathione para regenerar as formas reduzidas que então serão utilizadas em funções antioxidantes (ZHANG et al., 2010). A glutathione quando oxidada (GSSG), é convertida de volta para a glutathione reduzida (GSH) pela glutathione redutase (GR), utilizando NADPH (Sobhakumar et al. 2012), como mostrado abaixo (Figura 5). No caso das Prdx 1-cys a glutathione parece ser seu agente redutor (FISHER, 2011).

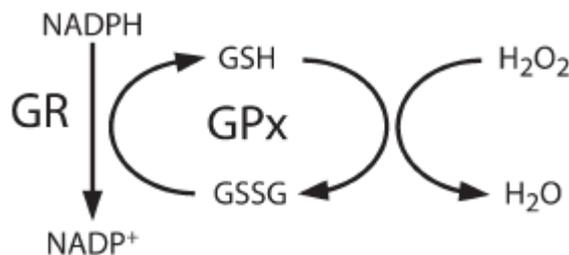


Figura 5. Ciclo da glutathione peroxidase. NADPH é utilizado pela glutathione redutase (GR) para reduzir glutathione oxidada (GSSG) a glutathione reduzida, esta então será utilizada como substrato pela glutathione peroxidase (GPx) para eliminar o peróxido de hidrogênio (Peter e van Norden, 2009)

A descrição mais geral do sistema tioredoxina (Trx) é o seu papel como proteína dissulfeto redutase. A enzima funciona tomando elétrons de NADPH e via TrxR (Tiorredoxina redutase) estes são transferidos para o sítio ativo da Trx, que é a dissulfeto redutase geral. Este sistema é utilizado para que as Prdx do tipo 2-cys possam decompor outra molécula de peróxido (HOLMGREN; LU, 2010) (Figura 6).

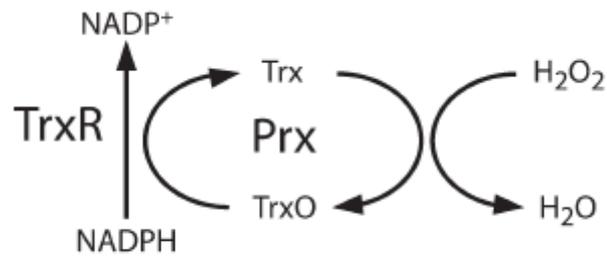


Figura 6. Ciclo da tiorredoxina e tiorredoxina redutase. NADPH é utilizado pela Tiorredoxina redutase (TrxR) para reduzir tiorredoxina oxidada (TrxO) a tiorredoxina (Trx), esta então irá reduzir a peroxirredoxina e esta consumirá o peróxido de hidrogênio (PETER; VAN NORDEN, 2009).

Como visto, o NADPH é essencial no ciclo catalítico das PRDX, entretanto a relação com estas proteínas na deficiência de G6PD ainda não foi explorada.

1.4.2. Hemoglobinopatia SC

Como dito anteriormente, o indivíduo adulto normal apresenta hemoglobina com quatro cadeias polipeptídicas, sendo duas alfa (α) e duas beta (β) (ZAGO et al. 2001).

Porém, podem ocorrer algumas alterações que modificam a estrutura da hemoglobina e outras nas quais uma ou mais cadeias globínicas são sintetizadas a uma taxa reduzida. O primeiro grupo é chamado de hemoglobinopatias estruturais e o segundo, de talassemias (WEATHERALL; CLEGG, 1999).

Em função da miscigenação da população brasileira, houve disseminação dos genes que dão origem às hemoglobinas variantes e determinam estas hemoglobinopatias e talassemias. (NAOUM, 1997; ZAGO; PINTO, 2007). Dentre as hemoglobinopatias estruturais, a doença falciforme, grupo de doenças que incluem indivíduos com anemia falciforme (hemoglobina - Hb SS) e distúrbios heterozigotos compostos (Hb SC, Hb SD, etc.) é a patologia hereditária monogênica mais freqüente e a mais impactante no mundo (PEREIRA et al. 2013).

A hemoglobina S é o resultado de uma mutação no gene da beta globina, onde ocorre a substituição de uma única base nitrogenada no códon 6 do gene de beta globina, adenina (A) substituída por uma timina (GAG→GTG), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina (STEINBERG, 2001).

A hemoglobina S ($\alpha 2/\beta S 2$) tem propriedades físico-químicas diferentes da hemoglobina normal devido à perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina (em razão da perda do ácido glutâmico). A hemoglobina mutante apresenta diferente estabilidade e solubilidade, quando a Hb S é desoxigenada ocorre uma interação hidrofóbica com outras moléculas de hemoglobina, desencadeando uma agregação em polímeros que resulta em alterações na estrutura da hemácia, levando a deformação, que em última instância desenvolve a forma de foice (do inglês *sickle*) que é a característica morfológica principal da doença, e o enrijecimento da membrana celular responsáveis pela vaso oclusão e a lesão tecidual que representam os principais eventos fisiológicos ligados a doença (BUNN; FORGET, 1986; ROSSE et al., 2000).

Já a doença da hemoglobina SC (HbSC) é uma condição heterozigótica, na qual um dos alelos possui a mutação descrita acima, responsável pela formação da HbS, e o outro possui uma mutação diferente, porém na mesma posição, e que causa a substituição do ácido glutâmico por uma lisina formando a hemoglobina C (NAOUM, 1997). Os pacientes heterozigotos para HbS e HbC (HbSC) constituem cerca de um terço dos casos de doença falciforme, tornando o genótipo HbSC a segunda forma mais comum de anemia falciforme (DALIBALTA et al. 2010).

Os pacientes com Hb SC são duplos heterozigotos herdando um gene βS -globina de um parental e um gene βC -globina do outro. Os eritrócitos destes indivíduos geralmente contêm cerca de 50% das células falciformes Hb S, 50% de Hb C e nenhuma Hb A (BUNN et al., 1982). Na doença HbSC, onde as concentrações iguais de HbS e HbC coexistem, HbC aumenta as propriedades patogênicas de HbS, resultando em uma desordem clinicamente significativa (NAGEL; FABRY; SETEINBERG, 2003).

A HbC induz a perda de K^+ (potássio) e de água, logo, o eritrócito tende a desidratação e cristalização, que é a base da patofisiologia da doença de HbC. Mecanismos similares contribuem para a patologia da doença de HbSC com a adição de que nesta, a presença da HbC intra-eritrocítico aumenta a concentração de hemoglobina intracelular pela perda de água e de K^+ , aumentando a tendência de HbS a polimerizar. O aumento da polimerização da Hb S amplificará o efeito da HbS 50% contida nestas células. E este efeito é em grande parte responsável pela patologia observada (NAGEL; FABRY; SETEINBERG, 2003).

Os pacientes com HbSC tem uma anemia hemolítica ao longo da vida de gravidade moderada e podem desenvolver episódios vaso-oclusivos e danos a órgãos similares aos observados na anemia falciforme (BUNN et al., 1982). Osteonecrose do osso é quase tão comum, retinopatia proliferativa falciforme é muito mais prevalente na HbSC doença do que na anemia falciforme. E o tempo de vida de pacientes com doença de HbSC é reduzido quando comparado com as populações de controle (NAGEL; FABRY; SETEINBERG, 2003).

Acredita-se que, no caso da anemia falciforme, os eritrócitos falcizados estejam sob constante estresse oxidativo e, assim liberem produtos de degradação da HbS (complexos Fe²⁺ e Fe³⁺), que atacam a membrana eritrocitária e catalisam a destruição de hidroperóxidos lipídicos (BECKER et al., 2004). Porém, nada foi descrito sobre o efeito desse estresse e a defesa antioxidante das peroxirredoxinas em pacientes com doença falciforme por hemoglobina SC.

1.5. Defesas antioxidantes

A exposição a radicais livres, a partir de uma variedade de fontes levou os organismos a desenvolver uma série de mecanismos de defesa. Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido por radical livre envolvem: (i) mecanismos de prevenção, (ii) os mecanismos de reparo, (iii) as defesas físicas, e (iv) as defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes podem ser classificadas nas categorias não-enzimáticas e enzimáticas. Defesas antioxidantes não-enzimáticas são representadas por ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH), carotenóides, flavonóides, e outros antioxidantes. E as enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT). Além de proteínas redox como as tioredoxinas e peroxirredoxinas. (VALKO et al. 2007; BIRBEN et al. 2012). As defesas enzimáticas estão abaixo descritas:

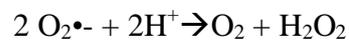
1.5.1. Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase (SODs) são metaloenzimas encontradas amplamente distribuídas em células procariotas e eucariotas (FRIDOVICH, 1995). A SOD existe em várias isoformas, diferindo na natureza do metal no seu sítio ativo, aminoácidos constituintes, bem como o seu número de subunidades, cofatores e outros recursos. Nos seres humanos, há

três formas de SOD: CuZn-SOD que é citosólica, Mn-SOD mitocondrial, e a SOD extracelular (EC-SOD) (MATÉS; PÉREZ-GÓMES; CASTRO, 1999).

Uma vez que é o ânion superóxido é a espécie reativa de oxigênio primária produzida a partir de uma variedade de fontes, a sua dismutação pela SOD é de importância primária para cada célula (BIRBEN et al., 2012). Assim, a SOD constitui o primeiro passo enzimático que desempenha um papel fundamental no controle celular do ânion superóxido, catalisando a dismutação deste a oxigênio e peróxido de hidrogênio (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). Como mostrado abaixo:

Sod



SOD destrói $\text{O}_2^{\bullet-}$ com taxas de reação extremamente altas, por oxidação e redução sucessiva do íon de metal de transição no sítio ativo em um mecanismo do tipo "ping-pong" (MATÉS; PÉREZ-GÓMES; CASTRO, 1999). A reação química do ânion superóxido com o grupo prostético de SOD começa com a forma oxidada da enzima (Fe^{3+} , Cu^{2+} e Mn^{3+} , respectivamente) ligando ao ânion superóxido, adquirindo um próton e liberando oxigênio molecular. A forma reduzida da enzima (Fe^{2+} , Cu^{+} e Mn^{2+}), em seguida, liga-se a um segundo ânion superóxido e um próton, para libertar H_2O_2 e retornar ao seu estado oxidado (JOHNSON; GIULIVI, 2005).

O controle da produção de H_2O_2 é o segundo passo enzimático que desempenha um papel vital contra a propagação de ROS (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010).

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

1.5.2. Catalase

A catalase foi a primeira enzima antioxidante a ser caracterizada e catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (YOUNG; WOODSIDE, 2001). É uma enzima presente nas células de plantas, animais e bactérias aeróbicas (VALKO et al., 2006). A catalase apresenta-se como um tetrâmero composto de quatro monômeros idênticos, cada um

dos quais contém um grupo heme no local ativo. Também se liga NADPH como um equivalente redutor para evitar a inativação oxidativa da enzima por H_2O_2 (BIRBEN et al. 2012).

Esta enzima é extremamente eficiente e pode decompor milhões de moléculas de H_2O_2 por segundo ($\sim 10^7 M/Sec$). A maior atividade está presente no fígado e eritrócitos, mas pode ser encontrada em todos os tecidos (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Nos eritrócitos, a catalase protege a hemoglobina através da remoção de mais da metade do peróxido de hidrogênio gerado em eritrócitos humanos normais, que estão expostos a concentrações de oxigênio substanciais (GAETANI et al., 1989).

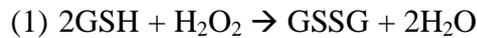
A catalase é mais eficaz na presença de concentrações elevadas de H_2O_2 . No entanto, na presença de baixas concentrações quer de H_2O_2 ou outros peróxidos, o sistema glutathiona desempenha um papel crítico (COMHAIR; ERZURUM, 2002), atua conservando os grupos sulfidrilas (SH), necessários à manutenção da integridade da membrana eritrocitária, evitando desta forma a oxidação da hemoglobina, conseqüentemente a formação de corpos de Heinz. A formação de corpos de Heinz no interior do eritrócito promove sequestração esplênica, com encurtamento do tempo de vida do eritrócito podendo levar a uma anemia hemolítica (BEUTLER, 1981).

1.5.3. Glutathiona Peroxidase

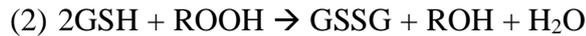
O sistema de glutathiona é um mecanismo fundamental para a redução de H_2O_2 . Ele complementa catalase como um sistema de redução para H_2O_2 , mas excede catalase na sua capacidade de eliminar outras variedades de peróxidos tóxicos (COMHAIR; ERZURUM, 2002). A glutathiona peroxidase é uma família de enzimas tetraméricas que contém um resíduo de selenocisteína nos seus sítios ativos. Esta utiliza tióis de baixo peso molecular, por exemplo a GSH (glutathiona), como doador de elétron, para redução do peróxido de hidrogênio (1) e outros peróxidos (2) a água ou seus álcoois correspondentes (COMHAIR; ERZURUM, 2002; VALKO et al. 2006; BIRBEN et al. 2012).

Conforme representação abaixo:

Gpx



Gpx



Como podemos ver a GSH é então oxidada a GSSG (glutathiona oxidada). Esta será novamente reduzida a GSH pela glutathiona redutase que usa NADPH gerado a partir da via das pentoses fosfato como um doador de elétrons para esta reação, como explicado anteriormente (COMHAIR; ERZURUM, 2002).

A distribuição subcelular predominante está no citosol e mitocôndrias, sugerindo que a glutathiona peroxidase é o principal limpador de peróxido de hidrogênio nestes compartimentos subcelulares. Como vimos, a atividade da enzima é dependente da constante disponibilidade de glutathiona reduzida. Normalmente, a relação glutathiona reduzida:glutathiona oxidada é normalmente mantida muito elevada como resultado da atividade da enzima glutathiona redutase. Logo, qualquer via de competição que utiliza NADPH (tal como a via da aldose-redutase), ou deficiência na produção deste, pode levar a uma deficiência de glutathiona reduzida e, portanto, prejudicar a ação da glutathiona peroxidase (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

1.5.4. Peroxirredoxinas

As peroxirredoxinas (Prdxs) constituem uma família de peroxidases que reduzem o peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos e peroxinitrito. Para realizar a redução de seus substratos as Prdx utilizam um resíduo de cisteína conservada e altamente reativa, próxima a sua região N- terminal, denominada cisteína peroxidásica (CysP) e a maioria apresenta um segundo resíduo de cisteína próximo a região C- terminal designado de cisteína de resolução (CysR) (NEUMANN; CAO; MANEVICH, 2009).

Baseado no mecanismo e do número de cisteínas envolvidas durante a catálise as Prdx podem ser classificadas em 2-Cys típica, 2-Cys atípica, ou 1-Cys Prdx (LOW et al., 2007). Em seres humanos já foram descritas seis isoformas de PRDXs as quais podem ser encontradas em diferentes compartimentos da célula: com PRDX 1, 2 e 6, sendo localizada principalmente no citoplasma; PRDX 3 sendo restrita a mitocôndria; PRDX 4, sendo encontrada predominantemente no retículo endoplasmático (RE) e PRDX 5 estar presente no citosol, mitocôndrias e peroxissomos (RHEE et al., 2012). PRDXs de 1 a 4 são 2-Cys típica, homodiméricas e contém ambos os resíduos de cisteína N-terminal e C-terminal conservados; PRDX 5 é do tipo 2-Cys atípica, funcionalmente monomérica e possui um resíduo de cisteína N-terminal conservado e outro C-terminal não conservado; a PRDX 6 é do tipo 1-Cys, 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 et al., 2012).

A família das peroxirredoxinas compartilha o mesmo mecanismo catalítico (BELL; HARDINGHAM, 2011), a qual a redução dos peróxidos se inicia pelo ataque da cisteína peroxidásica ($\text{Cys}_P\text{-SH}$), 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 ($\text{Cys}_P\text{-SOH}$). A etapa subsequente depende do tipo de peroxirredoxina (MONTEIRO et al. 2007).

Nas peroxirredoxinas do tipo 2-Cys a $\text{Cys}_P\text{-SOH}$ é atacada por uma segunda cisteína, denominada cisteína de resolução, de outra subunidade da enzima o que leva à formação de um dissulfeto intermolecular estável e liberação de H_2O , este dissulfeto pode ser reduzido por um redutor tiol dependente, tiorredoxina (Figura 7A). No caso das PRDXs 2-Cys atípicas, a CysR está localizada na mesma cadeia polipeptídica e a reação com a CysP resulta na formação de uma ligação dissulfeto intramolecular, que também é reduzido pela Trx como em 2-Cys Prx típica (NETTO; STADTMAN, 1996; WOOD et al., 2003; RHEE et al., 2012) (Figura 7B). Em comparação, a PRDX 2-Cys atípica existe como um monômero com ambos resíduos Cys na mesma molécula, no caso da PRDX 2-cys típica, esta existe como um homodímero. A PRX 1-Cy, Prdx 6, não contém uma cisteína de resolução e não podem ser reduzidas por Trx, porém, podem ser reduzidas por outros agentes, potencialmente glutatona (BELL; HARDINGHAM, 2011).

Para que as PRDXs possam decompor outra molécula de peróxido, precisam ser novamente reduzidas. As PRDXs são então reduzidas pela tioredoxina (Trx), a qual possui duas cisteínas vicinais localizada em um motivo Cys-X-X-Cys (em que X representa qualquer outro aminoácido). Após a redução das PRDX, as cisteínas de Trx são oxidadas à dissulfeto e são reduzidas pelas tioredoxinas redutases (TrxRs) utilizando equivalentes redutores provenientes do NADPH. Já a PRDX6, tem como seu redutor fisiológico a glutathiona (GSH), na presença da isoforma Pi da GST (Glutathione S transferase) (HOLMGREN; LU, 2010; OLIVEIRA et al., 2010) (Figura 4C)

Quando as PRDXs 2-Cys típicas são expostas a altas concentrações de peróxido, o ataque do ácido sulfênico (CP-SOH) por outras moléculas de peróxido não possibilita a formação do dissulfeto com a CysR. Logo a CysP fica superoxidada, assumindo a forma de cisteína ácido sulfínico (CP-SO₂H) ou ácido sulfônico (CP-SO₃H). 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).

Esta superoxidação resulta na perda da função de peroxidase dessas enzimas, visto que, a Trx não pode reduzir estes intermediários. Porém, outra enzima de baixo peso molecular dependente de ATP, Mg²⁺ e um tiól, denominada sulfirredoxina (Srx) consegue reativar a atividade peroxidásica das PRDXs. Entretanto, a Srx é capaz de reduzir somente a cisteína ácido sulfínico (CP-SO₂H), não sendo conhecido até o momento, nenhum redutor biológico para a forma CP-SO₃H (BITEAU; LABARRE; TOLEDANO, 2003) (Figura 7A).

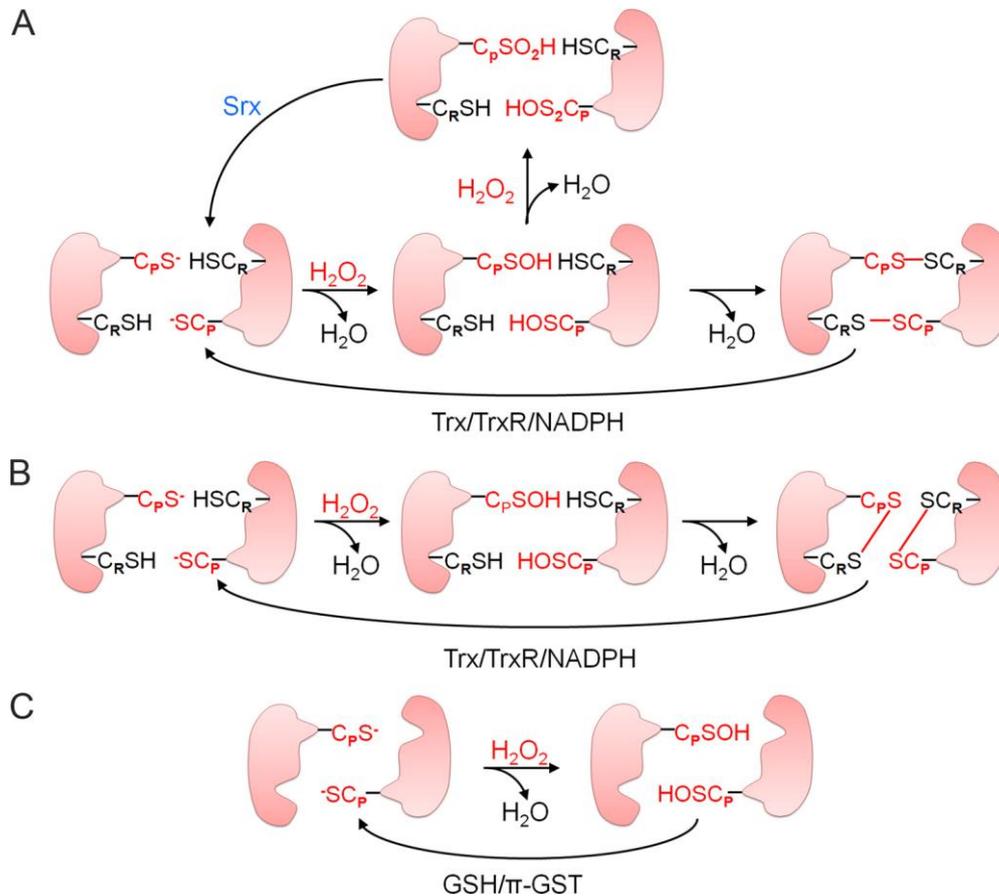


Figura 7. Mecanismos de reação das peroxirredoxinas. Inicialmente, a CysP-SH ataca um átomo de H_2O_2 formando ácido sulfênico na CysP (CysP-SOH). (A) PRDXs 2-Cys típicas, o ácido sulfênico formado na CysP reage com a CysR de outra subunidade da enzima formando uma ligação dissulfeto intermolecular que pode ser reduzida pela Trx. Adicionalmente, quando as PRDXs 2-Cys típicas são expostos às elevadas concentrações de peróxido a CysP fica superoxidada e assume a forma de cisteína ácido sulfínico (CP-SO₂H) ou ácido sulfônico (CP-SO₃H), os quais não são reduzidos pela Trx, necessitando de outro redutor, a sulfirredoxina. Entretanto, esta enzima é capaz de reduzir somente a forma CP-SO₂H, não sendo conhecido redutor biológico para CP-SO₃H até o momento (B) PRDXs 2-Cys atípicas, a CysR está localizada na mesma cadeia polipeptídica e a reação com a CysP resulta na formação de uma ligação dissulfeto intramolecular, a qual também pode ser reduzida pela Trx. (C) PRDXs 1-Cys, possuem apenas a CysP, o ácido formado durante a oxidação é reduzido por um tiol externo como a GSH. Figura extraída de RHEE et al., 2012.

1.6. Relevância biológica das peroxirredoxinas

Dentre as três classes de enzimas celulares capazes de decompor o hidroperóxidos, as PRDX e as Gpx se destacam, entretanto, as PRDX se destacam ainda mais pela abundância e grande reatividade com os substratos (KANG et al., 2005). Estas enzimas são verdadeiramente ubíquas tendo sido identificados em leveduras, células vegetais e animais,

incluindo tanto a protozoários e parasitas helmintos, e a maioria, se não todas, eubactérias e archaea (WOOD et al., 2003).

Estão entre as dez proteínas mais abundantes em *Escherichia coli*, compõem entre 0,1-0,8% das proteínas solúveis em outras células de mamíferos (RINALDUCCI et al., 2011) e estão entre as 10 proteínas mais expressas em determinados tipos celulares (WOOD et al., 2003; RHEE et al., 2005) como por exemplo no eritrócito, onde a peroxirredoxina 2 (PRDX2) é tão abundante que foi identificada nestas células, antes mesmo que a atividade antioxidante desta proteína fosse descrita (HARRIS, 1969). Os eritrócitos também possuem PRDX1 e PRDX6, embora em menor quantidade do que PRDX2. Sendo que, esta última representa a terceira proteína mais encontrada nestas células, após hemoglobina e anidrase carbônica (RINALDUCCI et al., 2011; LOW et al., 2008).

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

2. JUSTIFICATIVA

Comparado com outras células somáticas, os eritrócitos são expostos ao estresse oxidativo de uma grande variedade de fontes. Além disso, os eritrócitos são incapazes de sintetizar novas proteínas para substituir as danificadas durante a sua vida útil de 120 dias. Por isso, nos eritrócitos existe a produção abundante destas proteínas antioxidantes ao longo de sua maturação (LOW et al., 2007). Durante muito tempo, considerou-se que catalase e glutathione peroxidase (GPx) constituem a defesa do eritrócito contra peróxido de hidrogênio. PRDXs foram descobertos há relativamente pouco tempo, e poucos relatos científicos tem sido descritos referente ao seu papel antioxidante em eritrócitos (LOW et al. 2008).

Os poucos trabalhos existentes na literatura revelam que a importância das PRDXs deve ser acentuada nos eritrócitos. Como exemplos, Neumann e colaboradores (2003) realizaram experimentos diminuindo a expressão de PRDX1 em camundongos, e apesar de serem viáveis e férteis tinham uma reduzida expectativa de vida por apresentarem anemia hemolítica severa e cânceres malignos aos nove meses de vida aproximadamente. A partir desse trabalho foi sugerido que a anemia era causada pelo aumento de EROs nos eritrócitos e a participação de tal gene como supressor de tumor.

Também em 2003, Lee e colaboradores estudaram camundongos com deficiência em PRDX2, que é altamente expressa em todos os tipos celulares normais, e eles apresentaram doença hemolítica. Também foi detectado um aumento no nível de EROs em frações mais densas de glóbulos vermelhos. Nesse estudo identificou-se que a função antioxidante da PRDX2 é um fator crítico para a fisiologia dos glóbulos vermelhos (LEE et al. 2003). Tais resultados sugerem que PRDX2 desempenha um papel importante na proteção das células vermelhas ao estresse oxidativo em camundongos. Em relação a PRDX3, localizada nas mitocôndrias, foi demonstrado por Yang e colaboradores (2007), que a diferenciação de células eritroleucêmicas humanas pode ser regulada por essa proteína.

Curiosamente, apesar dos resultados relevantes descritos acima, não há nenhuma análise sistemática do envolvimento destas proteínas em doenças eritrocitárias, como na Deficiência de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase e na hemoglobinopatia SC, entretanto os argumentos citados anteriormente sugerem que o envolvimento destas proteínas podem ser bastante relevantes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo central deste trabalho é avaliar a relação entre a expressão das diferentes peroxirredoxinas e os níveis de EROs gerados em reticulócitos e eritrócitos de pacientes portadores de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e hemoglobinopatia SC, comparando com indivíduos saudáveis.

3.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), o perfil de expressão gênica dos seis membros das peroxirredoxinas em reticulócitos de pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e pacientes com hemoglobinopatia SC, comparando com indivíduos saudáveis;
3. Verificar a expressão protéica das peroxirredoxinas, através de western blotting em hemácias de pacientes comparando com controles;
4. Estabelecer a provável relação entre a produção destas proteínas e o quadro clínico observado nestes pacientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Pacientes e controles

Foram selecionados pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e pacientes com hemoglobinopatia SC diagnosticados pela Fundação Hemocentro de Pernambuco - HEMOPE. Para a extração de reticulócitos, o sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA e mantido refrigerado até o momento do processamento. Amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram usadas como controles, este grupo foi composto por doadores voluntários.

Alguns dados, como idade, sexo, tabagismo, alcoolismo, ou qualquer atividade que pode estar relacionada com o aumento de EROs foram solicitados aos pacientes e controles (Anexo 1).

4.2. Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – Hemope (registro CEP: 028/2011).

Todos os indivíduos somente foram incluídos no estudo após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), aprovado pelo comitê de ética da faculdade de ciências médicas da Fundação HEMOPE.

4.3. Separação de Reticulócitos

As amostras de sangue periférico (4mL) foram coletadas em tubo com EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) e transferidas para tubo Falcon de 15mL. Após centrifugação em 3.000 rpm, 10 minutos a 4°C, o plasma foi descartado e foi adicionado 5x o volume de solução de lise de hemácias (0.144M NH₄Cl; 0.01M NH₄HCO₃). As amostras foram incubadas 30 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo hemácias lisadas e reticulócitos foi transferido para novo tubo, homogeneizado com 1/10 de volume de uma solução de Sucrose/KCl (1.5M C₁₂H₂₂O₁₁; 0.15M KCl, filtrada ou preparada com H₂O tratada com DEPC) e centrifugado novamente 5.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo agora apenas reticulócitos foi transferido para novo tubo, tratado com 700µl de Ácido acético 10% e centrifugado 5.000 rpm 20 minutos a 4°C. O precipitado (*pellet*) foi então ressuspendido e homogeneizado em 1mL de Trizol® (Invitrogen), que rompe as células, dissolvendo os componentes celulares sem comprometer a integridade do RNA. Para testar a eficiência da extração e verificar possíveis contaminações com leucócitos foi feita uma lâmina com o esfregaço do *pellet* obtido ao fim da extração (figura 8A) e como forma de comparação foi preparada uma lâmina com leucócitos (figura 8B). Ambas as lâminas foram coradas com panótico que permite a diferenciação entre estes dois tipos celulares pela coloração diferencial. Posteriormente, uma lâmina também preparada com *pellet* resultante da extração de reticulócitos foi corada com azul de crezil brilhante, evidenciando a eficiência do protocolo de extração (figura 8C e 8D).

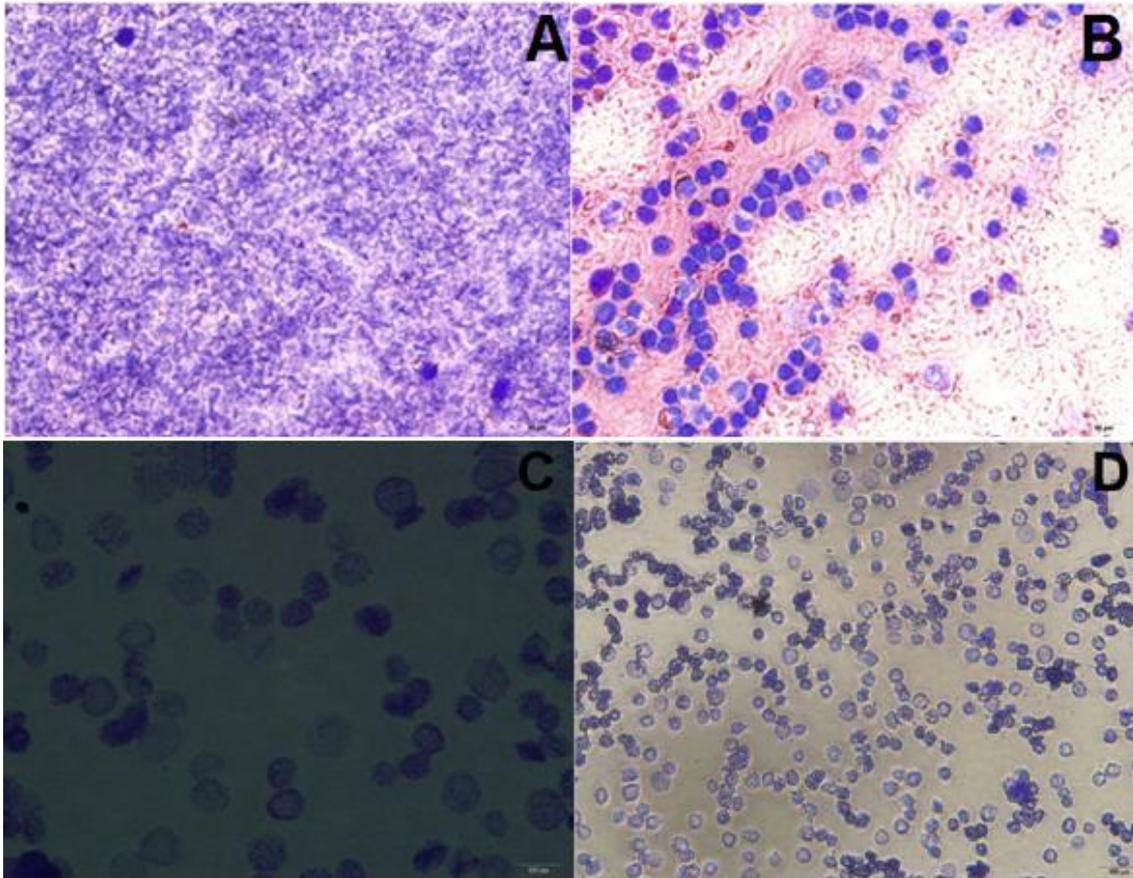


Figura 8. Lâmina de leucócitos e esfregaço de reticulócitos. A) Para verificar possíveis contaminações com leucócitos durante a extração de reticulócitos foi preparada uma lâmina com o esfregaço do *pellet* resultante após a extração. B) Para efeitos comparativos foi feita uma lâmina contendo leucócitos. As lâminas A e B foram coradas com panótico que permite a diferenciação entre leucócitos e eritrócitos pela coloração diferencial. As lâminas apresentadas nas imagens C e D também foram preparadas com o esfregaço do *pellet* obtido com a extração de reticulócitos executada de acordo com o protocolo descrito acima e coradas com azul de cresil brilhante, utilizado para corar reticulócitos. A figura C possibilita a visualização dos resquícios de RNA precipitado que formam grânulos. Estes grânulos desaparecem quando o reticulócito completa a diferenciação para eritrócito maduro (Romanello, K S. 2013). As lâminas A, B e C foram observadas em aumento de 40x e a lâmina D em aumento de 10x.

4.4. Extração de RNA

Para obtenção do RNA de reticulócitos utilizou-se o método de extração com o Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A amostra contendo reticulócitos e Trizol® foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, a fim de que houvesse completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos, foram adicionados 200µL de clorofórmio (CHCl₃) e agitado vigorosamente utilizando vortex, sendo realizada nova incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 15 minutos a

12.000g em temperatura de 4°C, o sobrenadante foi retirado e acondicionado em outro tubo, procedendo imediatamente para a etapa de precipitação com 500µL de isopropanol gelado. Após homogeneização, foi realizado nova incubação por 10 minutos em temperatura ambiente seguida de centrifugação por 10 minutos a 15.000G à 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionado 1mL de etanol gelado a 75%, sendo realizada nova centrifugação por 5 minutos a 15.000G à 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA colocado para secar por 10 minutos a temperatura ambiente, sendo então ressuspensionado em água livre de RNase e incubado a 55°C por 10 minutos e posteriormente colocado em gelo para solubilização total do RNA. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoVue-GE Healthcare) e avaliadas quanto à integridade em gel desnaturante de agarose. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S (figura 9). Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

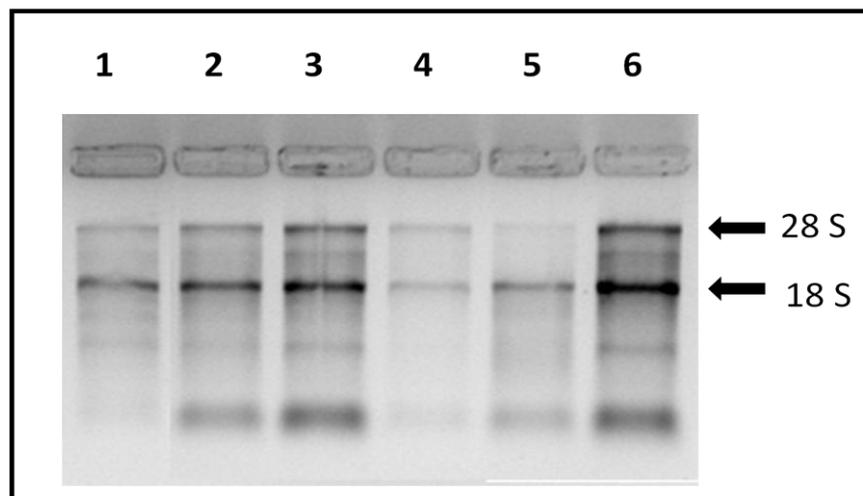


Figura 9- Gel desnaturante de agarose à 1,2%. Amostras de RNA de reticulócitos de pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e pacientes com doença falciforme por hemoglobina SC, onde pode-se ver as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A visualização das subunidades permite a confirmação de integridade do material. As mesmas análises foram realizadas para todos os RNAs extraídos.

4.5. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para retirar possíveis contaminações do RNA com moléculas de DNA, 1,0µg de cada RNA extraído foi tratado com 1,0 µL da enzima *DNaseI* (Fermentas, ThermoScientific), 1,0 µL *DNaseI reaction buffer com MgCl₂ 10X* (Tris-HCl pH 8.4 200mM, MgCl₂ 20mM, KCl

500mM), num volume final de 10 μ L. A reação foi incubada por 30 min à temperatura de 37oC e paralisada com a adição de 1,0 μ L de EDTA 50mM e incubação por 10 min a 65oC.

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

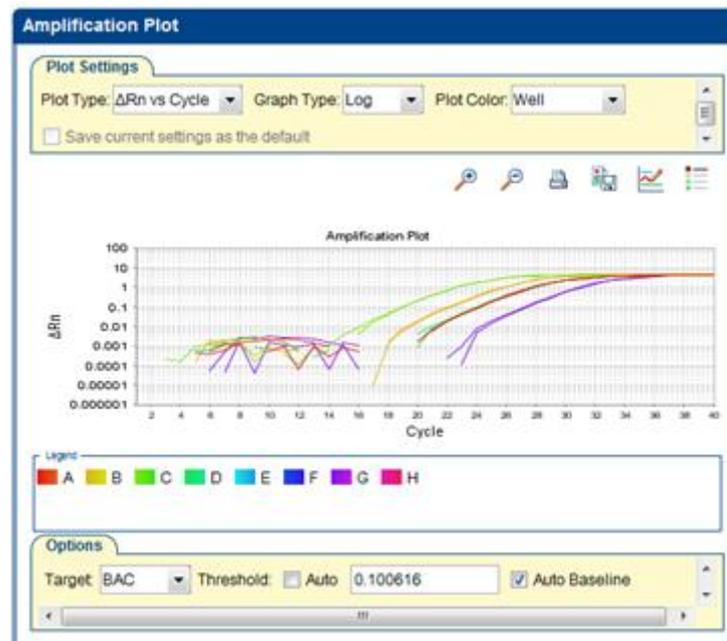


Figura 10. Teste de cDNA com o primer da beta actina. Após a síntese de cDNA as amostras foram testadas por PCR- RT utilizando o *primer* da beta actina. A amplificação desse gene confirmava a viabilidade da amostra para análises futuras.

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

A detecção de amplificação em tempo real foi feita no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) onde foi utilizado o reagente SYBR® Green PCR Master Mix (Applied

Biosystems), que emite sinal de fluorescência ao intercalar com DNA dupla- fita. Os primers foram desenhados através do programa "Primer Express" (Applied Biosystems) e analisados no programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para verificação das condições de formação de estruturas como grampos (*hairpins*) e dímeros (*dimers*). Como controle foi utilizado *primers* para amplificação do gene da β -actina. Em todos os casos foram feitos controles negativos, com água estéril substituindo a amostra. As amostras foram amplificadas em duplicatas. As reações foram preparadas em placas de 96 poços com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa usado foi: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Após a amplificação, a curva de melting foi determinada, através da variação de temperatura de 95°C por 15s, 60°C por 1 min e novamente 95°C por 15s. Os *primers* utilizados neste estudo estão listados na tabela.

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

4.7. Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real

4.7.1. Concentração de Primer

A concentração ótima do *primer* utilizado na qRT-PCR, deve ser mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra. Para isso, utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*) nas concentrações finais apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Matriz para Padronização da Concentração Ótima de *Primers Forward* e *Reverse*

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

A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de Ct (ciclo *threshold*), maior ΔRn (variação de fluorescência) e não apresentou formação de dímeros, mesmo nos poços com NTCs (*no-template controls*). Na tabela 2 estão listadas as sequências e concentrações ótimas dos *primers* utilizados na amplificação dos genes de estudo. As figuras 11, 12 e 13 mostram o exemplo do *primer PRDX1*, em que a concentração que apresentou as melhores condições foi 300 *Forward* / 300 *Reverse*. O mesmo procedimento foi realizado para todos os *primers* de PRDXs e para o gene endógeno β -actina.

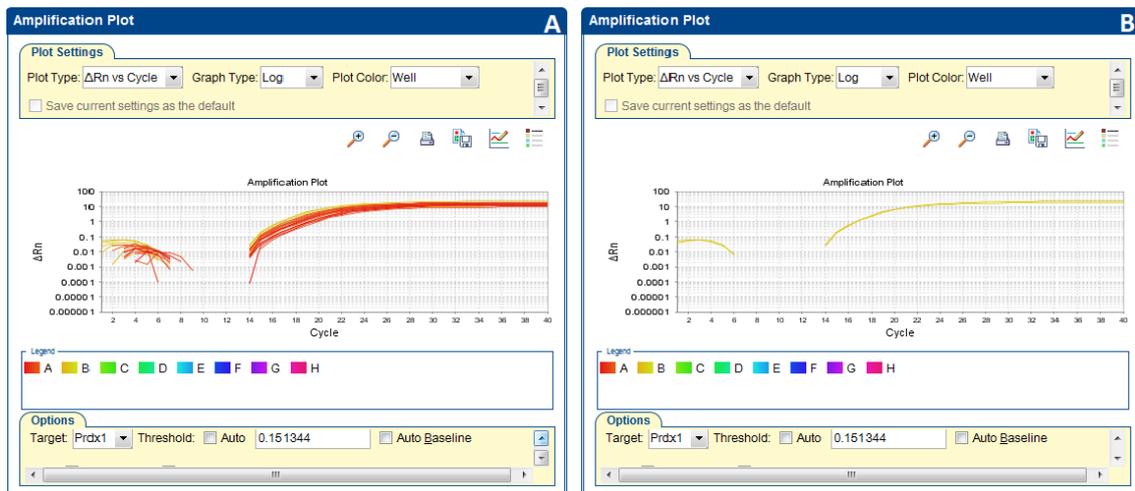


Figura 11. Determinação da concentração ótima dos primers forward e reverse PRDX1. A) curvas para as diferentes concentrações listadas na Tabela 1. B) duplicata da curva para a concentração escolhida (300F/300R), a qual apresentou menor Ct, maior ΔRn , sem formação de dímeros.

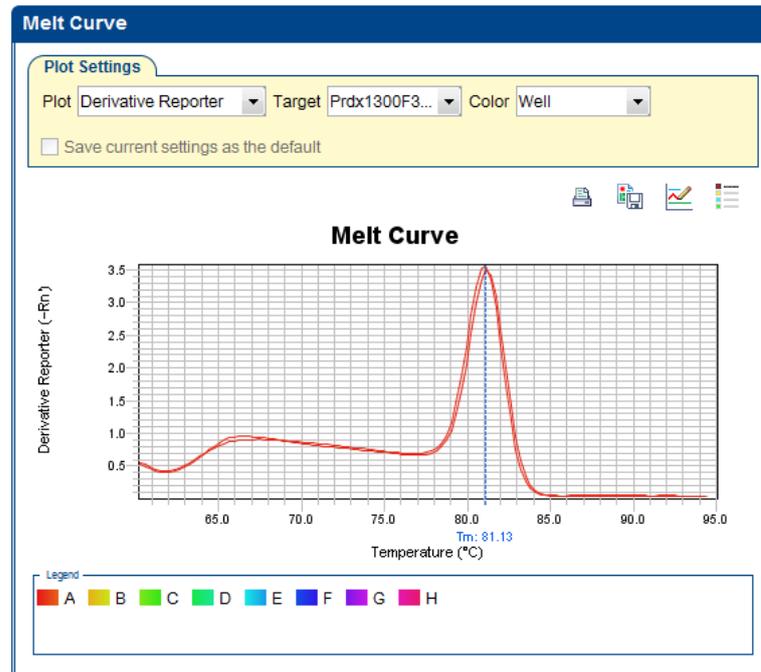


Figura 12. Curva de melting PRDX1. O pico único que aparece na figura próximo a 81°C mostra a especificidade da amplificação, em que picos a temperaturas distintas indicariam bandas inespecíficas ou ocorrência de dímeros.

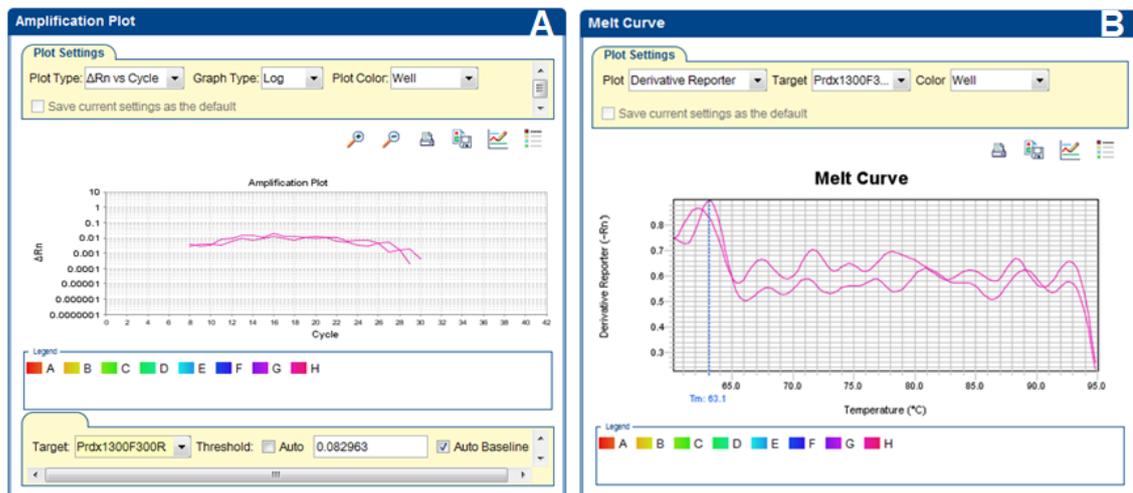


Figura 13. NTCs (no-template controls) PRDX1. A) A ausência de amplificação no controle negativo indica que não há contaminação do *primer*. B) A Curva de *melting* não apresenta picos de amplificação confirmando a ausência de contaminantes.

Tabela 2. Sequências e concentrações ótimas dos primers utilizados no real-time PCR (qRT-PCR)

Primer	Sequência	Concentração
PRDX1F PRDX1R	TGTAAATGACCTCCCTGTTGG TATCACTGCCAGGTTTCCAG	300nM 300nM
PRDX2F PRDX2R	CTGTTAATGATTTGCCTGTGGG TGGGCTTAATCGTGTCACTG	100nM 300nM
PRDX3F PRDX3R	TCCCACCTTAGCCATCTTGC GTAGTCTCGGGAAATCTGCTTAG	100nM 300nM
PRDX4F PRDX4R	CGTTTGGTTCAAGCATTCCAG CTTTTGGCGACAGACTTGAAG	300nM 150nM
PRDX5F PRDX5R	AGAAGGGTGTGCTGTTTGG TCATTAACACTCAGACAGGCC	100nM 100nM
PRDX6F PRDX6F	TGCCACCCAGTTGATTG TTCACCAAAGAGCTCCCATC	100nM 100nM
TRXF TRXR	TGGTGAAGCAGATCGAGAGCAAGA ACCACGTGGCTGAGAAGTCAACTA	100nM 150nM
TRXR1F TRXR1R	ATAGAAGGCAGGCAGCATCACACT TGACAGTTGTTCCATCACGCCCTA	300nM 100nM
β ACTINA - F β ACTINA - R	AGGCCAACCGCGAGAAG ACAGCCTGGATAGCAACGTACA	150nM 150nM

4.7.2. Eficiência de Reação

Para que a reação de qRT-PCR seja confiável e reprodutiva são necessárias condições ótimas de reação, onde as amplificações apresentem 100% de eficiência a cada ciclo de amplificação, ocorrendo duplicação da amostra. Após determinadas às concentrações ideais dos *primers* foram realizadas diluições seriadas de uma amostra conhecida para avaliar a eficiência do experimento, a qual é indicada pela inclinação (*slope*) da curva padrão. Utilizou-se diluições seriadas de amostras de cDNA de cultura de K562 (linhagem celular eritroleucêmica Ph+), que apresenta expressão de todos os genes analisados. Uma eficiência de 100% resulta em uma curva padrão com *slope* de -3,32. A eficiência de amplificação é dada pela fórmula $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Outros parâmetros como R² e Y- intercept (ponto em que a curva corta o eixo Y) também são obtidos neste experimento e foram cuidadosamente avaliados. Para ser considerado eficiente, um *primer* deve apresentar valor de eficiência entre 95 – 105%, R² \geq 0,99, *slope* próximo a -3,32 e Y-intercept maior que 32 (Figura 14). A curva de *melting* também foi analisada para verificar a formação de dímeros ou amplificações inespecíficas, representadas pelo aparecimento de mais de um pico (Figura 15). Depois de

obtidos e analisados os parâmetros citados é determinado um *threshold* que será utilizado nas análises posteriores.



Figura 14. Teste de Eficiência da PRDX1 300F/300R. A partir da análise feita é possível obter a eficiência do *primer*, no caso exemplificado de 101,702%, com um R^2 de 0,997, em um *threshold* de 0,082963.

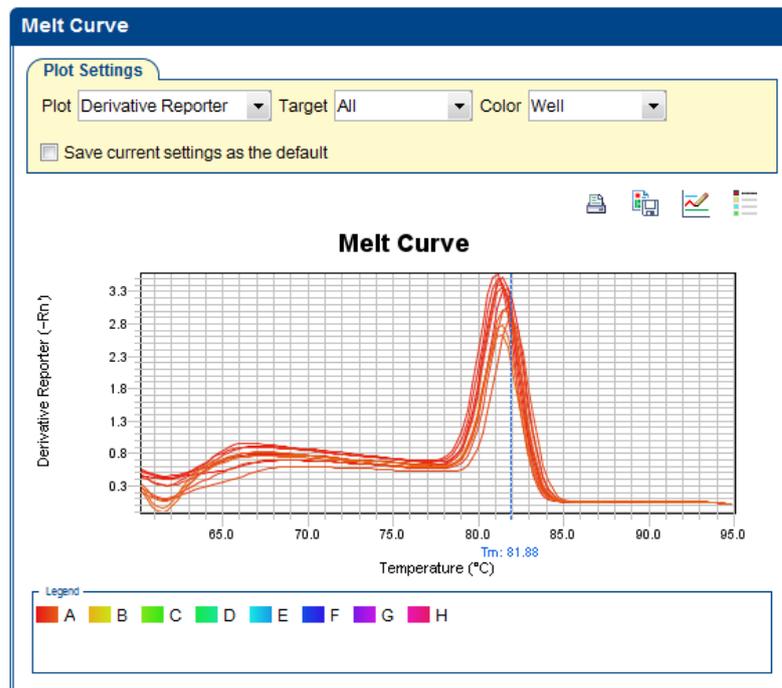


Figura 15. Curva de melting da PRDX1. O pico único que aparece na figura próxima a 82°C mostra a especificidade da amplificação, em que picos a temperaturas distintas indicariam bandas inespecíficas ou ocorrência de dímeros.

Para todos os *primers* citados anteriormente foi realizado o mesmo procedimento, e na tabela 3 está identificado os parâmetros de maior importância.

Tabela 3. Parâmetros de importância para os *primers* caracterizados.

Primer	Threshold	Eficiência	Slope
BAC	0,100616	97,441	-3,385
PRDX1	0,082963	101,702	-3,382
PRDX2	0,068407	98,044	-3,37
PRDX3	0,036544	95,097	-3,445
PRDX4	0,034823	95,112	-3,445
PRDX5	0,103905	98,27	-3,364
PRDX6	0,064225	100,324	-3,314
TRX	0,075392	94,331	-3,466
TRXR1	0,071463	96,362	-3,412

4.8. Western blotting

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

4.8.1. Extração e quantificação de proteínas

As proteínas totais foram extraídas da papa de hemácias de pacientes e controles. Amostras de sangue periférico (4mL) foram coletadas em tubo com EDTA e transferidas para tubo Falcon de 15mL. Após centrifugação em 3.000 rpm, 10 minutos a 4°C, o plasma e o buffy coat foram descartados e foi adicionado 5x o volume de solução de lise de hemácias (0.144M NH₄Cl; 0.01M NH₄HCO₃). As amostras foram incubadas 40 minutos em gelo, com agitação vigorosa a cada 5 minutos. Após centrifugação de 12.000g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo hemácias lisadas foi transferido para novo tubo e as proteínas foram quantificadas no espectrofotômetro iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio- Rad) de acordo com o método de Bradford. Após estabelecer a mesma concentração de proteínas para todas as amostras (100 µg/poço) as amostras foram preparadas com tampão de corrida conforme o tipo de western, redutor ou não-redutor.

4.8.2. Preparo da amostra para western redutor

Foi adicionado às amostras tampão desnaturante de Laemmli (100mM tris-HCl pH6.8, 4% p/v SDS, 20% v/v glicerol, 0,2% de azul de bromofenol e DTT) e estas foram desnaturadas em banho-maria a 100°C por 5 min. E então corridas em gel de poliacrilamida SDS.

4.8.3. Preparo da amostra para western não-redutor

Para esta análise foi feito previamente um tratamento das amostras para que não houvesse oxidação das PRDX durante o procedimento de extração e as amostras estivessem em suas condições naturais. Então, foi adicionado ao tampão de lise, o NEM 10mM (agente alquilante de tiol) que se liga as cisteínas não permitindo a ligação dos peróxidos; DTPA100µM (quelante de metal) para impedir a reação de fenton e oxidação da hemoglobina; e azida sódica110µM para promover a inativação da catalase, assim esta não consumiria o peróxido de hidrogênio existente na amostra. Em seguida as proteínas foram extraídas e quantificadas conforme explicação anterior e corridas com tampão de Laemmli sem DTT.

4.8.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e Western Blot

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras. Os géis de poliacrilamida utilizados na eletroforese possuíam 4 % (gel de entrada) ou 12% (gel de separação), com 1,0 mm de espessura. Foram adicionados 50µg de proteína por poço. A eletroforese foi realizada com o marcador de peso molecular (10 – 170kd) PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific), para possibilitar a identificação por peso molecular das proteínas de interesse. A corrida foi realizada a 150volts, em um tempo de aproximadamente 1 hora e 30 min. (The Mini Trans-Blot cell - Bio- Rad). O tampão de corrida utilizado (750ml) era composto por Trisma base (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1 g%). Após a corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% v/v metanol) por 30 minutos, a membrana e os filtros de transferência também foram incubados no tampão citado acima por 5 minutos.

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio- Rad) a 12 Volts durante 90 minutos pelo método semi- seco (Trans-Blot SD semi-dry cell – Bio- Rad), somente no caso do western não-redutor, as proteínas foram transferidas pelo método submerso (Bio- Rad) para melhor visualização de proteínas de tamanhos maiores. Em seguida, a membrana foi bloqueada overnight com 9% p/v de leite desnatado em TBS-T

(50mM Tris, 150mM NaCl, pH=8, contendo 0,1% v/v de Tween 20). Ao fim do bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T por 4X de 5 min cada e incubada com anticorpo primário (listados na tabela) por 4 horas em temperatura ambiente sob agitação, a seguir a membrana foi novamente lavada com TBS-T por 4X de 5 min. cada e incubada com anticorpo secundário conjugado com a enzima HRP (listados na tabela 4) por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação. Todos os anticorpos foram diluídos em solução tampão TBS-T.

Depois de lavada (TBS-T por 4X de 5 min. cada), a membrana foi incubada com um reagente de detecção da atividade da HRP (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent - GE Healthcare) por quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante. As bandas foram visualizadas e fotografadas usando o aparelho ChemiDoc da Bio-Rad por curtos intervalos de tempo para obtenção de uma imagem adequada. A análise densitométrica foi realizada utilizando o programa Image J.

Tabela 4. Anticorpos utilizados na técnica de western blotting

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

4.9. Análise estatística

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

5. RESULTADOS

5.1. Análise da expressão gênica da família de peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos sadios e com Deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase

Em todos os grupos estudados detectou-se a expressão apenas das isoformas das *PRDXS* 1, 2, 5 e 6. As isoformas de *PRDX3* e *PRDX4* não foram encontradas nos reticulócitos de nenhum dos grupos. A expressão gênica das peroxirredoxinas foi analisada nos reticulócitos dos seguintes grupos: indivíduos sadios (controle; n= 7), pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD; n= 8). Os resultados obtidos mostram que não há diferença estatística em nenhuma das peroxirredoxinas analisadas (Figura 16)

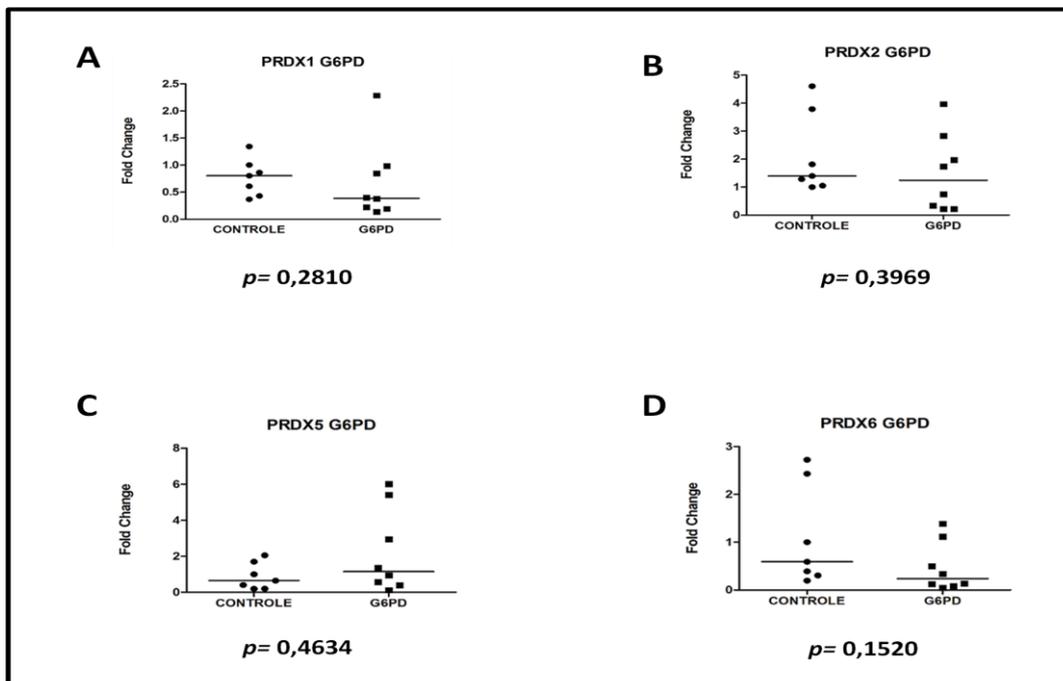


Figura 16. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos sadios e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Não foi encontrada diferença significativa entre indivíduos sadios e deficientes em G6PD na expressão das peroxirredoxinas analisadas por qRT-PCR (A) PRDX1 ($p=0,2810$), (B) PRDX2 ($p=0,3969$), (C) PRDX5 ($p=0,4634$), (D) PRDX6 ($p=0,1520$). O traço representa a mediana dos resultados.

5.3. Análise protéica das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos sadios e com Deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase

Foram analisadas as peroxirredoxinas 1, 2 e 6; a PRDX3, PRDX4 e PRDX5 não foram detectadas no lisado celular de pacientes e controles. Como controle endógeno foi utilizado o GAPDH (Figura 17).

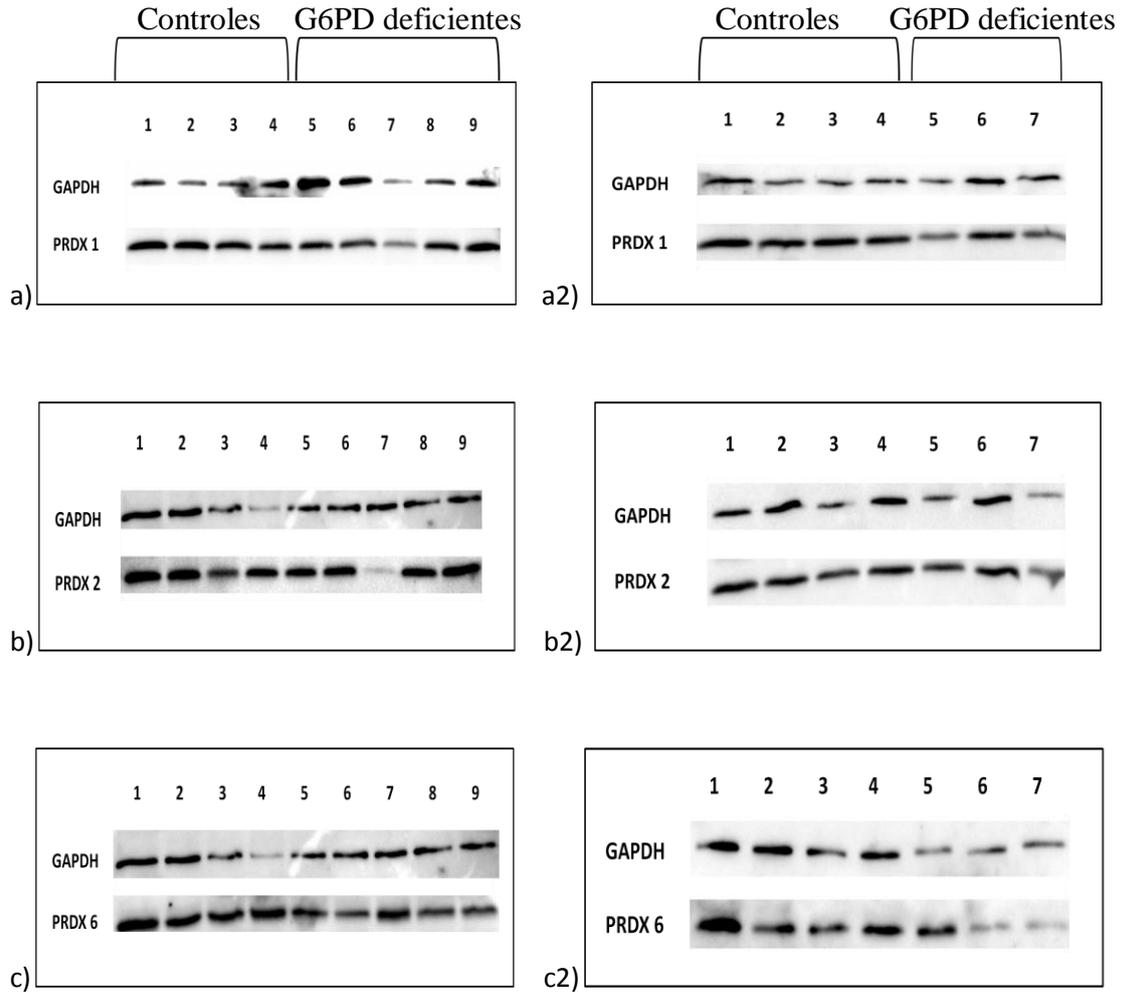


Figura 17. Análise de western blotting em controles e pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Análise de membranas com diferentes amostras, sendo que nas membranas a,b e c os indivíduos de 1 a 4 são indivíduos saudáveis. E os indivíduos de 5 a 7 são os pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. As membranas a2,b2 e c2, apresentam outros indivíduos saudáveis de 1 a 4. E os indivíduos em a2,b2 e c2 de 5 a 7 são outros pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. As membranas a e a2 mostram a expressão da PRDX1, as membranas b e b2 a expressão de PRDX 2 e as membranas c e c2 mostram a expressão da PRDX 6, cada uma tem como controle endógeno o GAPDH.

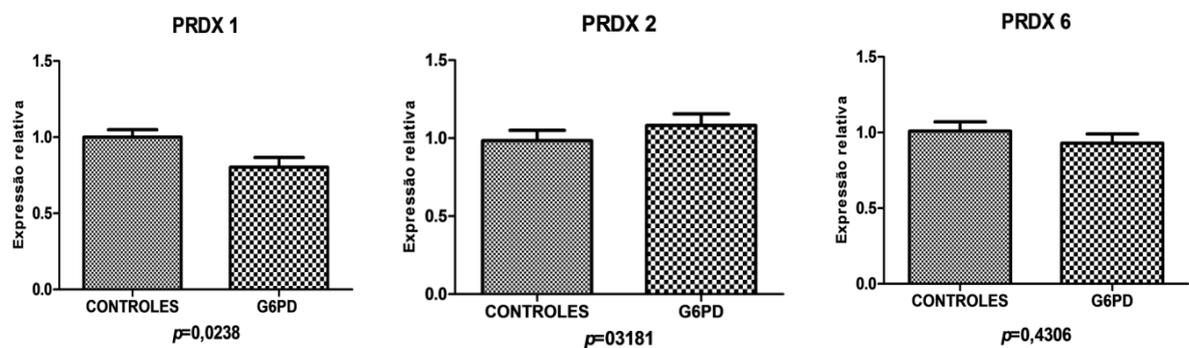
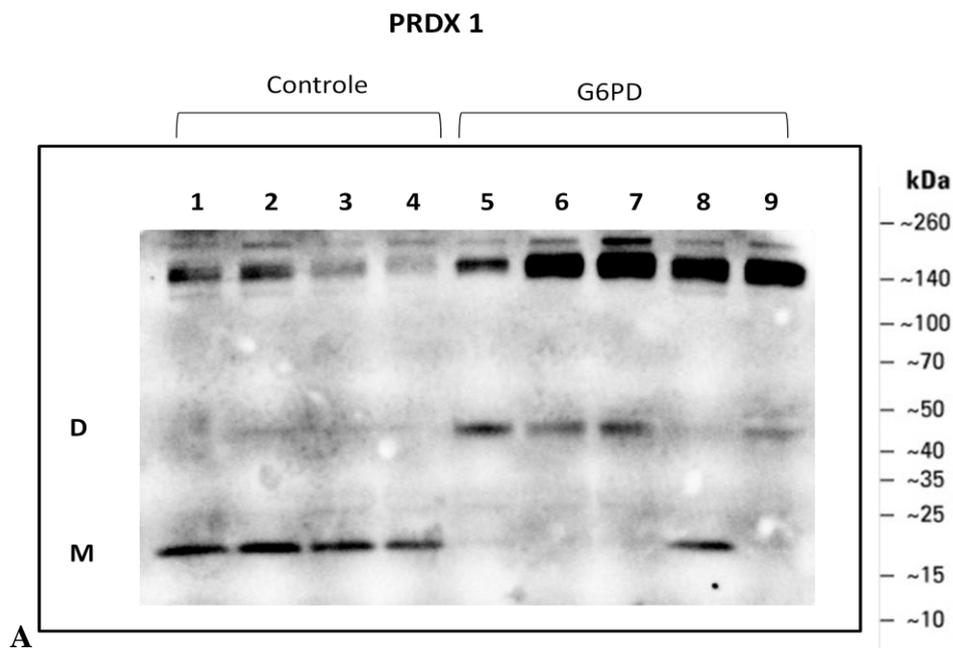


Figura 18. Análise densitométrica das amostras de indivíduos saudáveis e deficientes em G6PD. Gráficos mostrando o nível de expressão relativa de PRDX1, 2 e 6, resultante da densitometria realizada com o agrupamento de indivíduos controle e deficientes em G6PD e comparação da expressão destas proteínas entre os grupos após análise de western blot.

Foi observada uma diminuição da expressão de PRDX1 nos indivíduos G6PD deficientes em relação aos indivíduos controle. Porém, não houve diferença de expressão significativa para PRDX2 e PRDX6 (FIGURA 18).

5.4. Análise do estado redox das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos sadios e pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase

Devido à ausência de diferença de expressão significativa para PRDX 2, realizamos o western não-redutor das amostras de indivíduos sadios e com deficiência de G6PD, para verificar se essa proteína apesar de expressa em mesma quantidade não estaria inativa nos pacientes devido ao estresse oxidativo, ou seja, verificar o estado de oxidação das PRDX 2, e também analisamos PRDX 1 que por ser 2-cys típicas, assim como PRDX2, forma dímeros quando oxida, logo saberíamos se estas proteínas estariam reduzidas ou ativas (monôméricas), ou então oxidadas ou inativas (diméricas). O resultado mostrou maior quantidade de monômeros nos indivíduos sadios e maior quantidade de dímeros nos pacientes deficientes em G6PD tanto na análise feita de PRDX1 quanto a de PRDX2 (figura 19A e 19B)



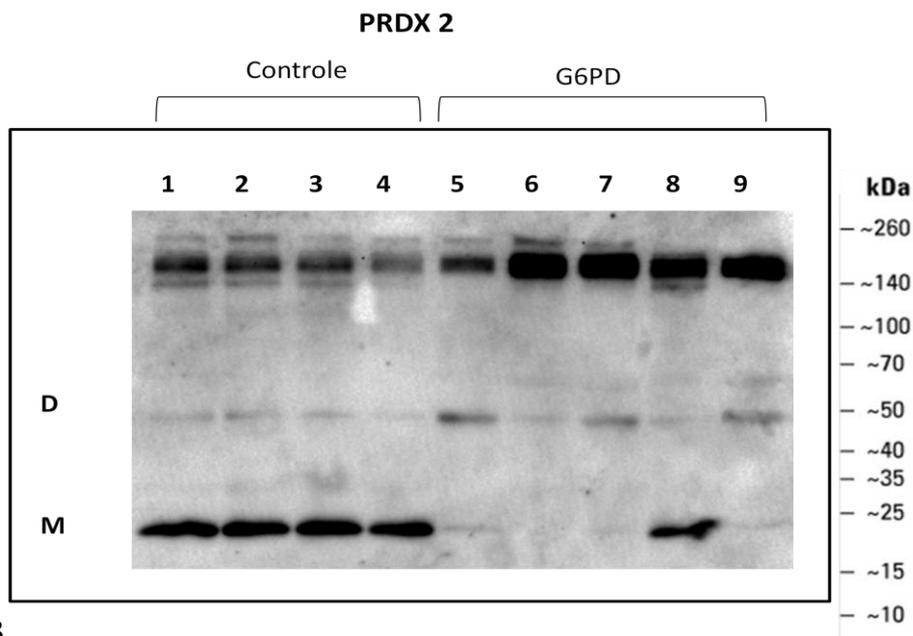


Figura 19. Análise por western blotting não-redutor do estado redox das peroxirredoxinas em controles e pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Os resultados mostram maior quantidade de monômeros(M) nos controles (1-4) e maior quantidade de dímeros(D) nos pacientes com deficiência de G6PD (5-9) tanto na análise feita para PRDX1 (A) quanto para análise feita com PRDX2 (B).

5.5. Análise da expressão gênica da Tiorredoxina e Tiorredoxina redutase 1 em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com Deficiência de Glicose-6-fosfato desidrogenase

Sabendo que a tiorredoxina é a redutora da maioria das peroxirredoxinas, exceto PRDX6, analisamos a expressão da tiorredoxina e sua redutora, a tiorredoxina redutase 1, para verificar se não haveria maior expressão dessas para compensar o estado oxidado das PRDX1 e 2 nos pacientes com deficiência de G6PD, como visto pelo western não-redutor.

A expressão gênica da tiorredoxina e tiorredoxina redutase 1 foi analisada nos reticulócitos dos seguintes grupos: indivíduos saudáveis (controle; n= 6), pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD; n= 7). Os resultados obtidos mostram que não há diferença estatística em nenhuma das análises (Figura 20).

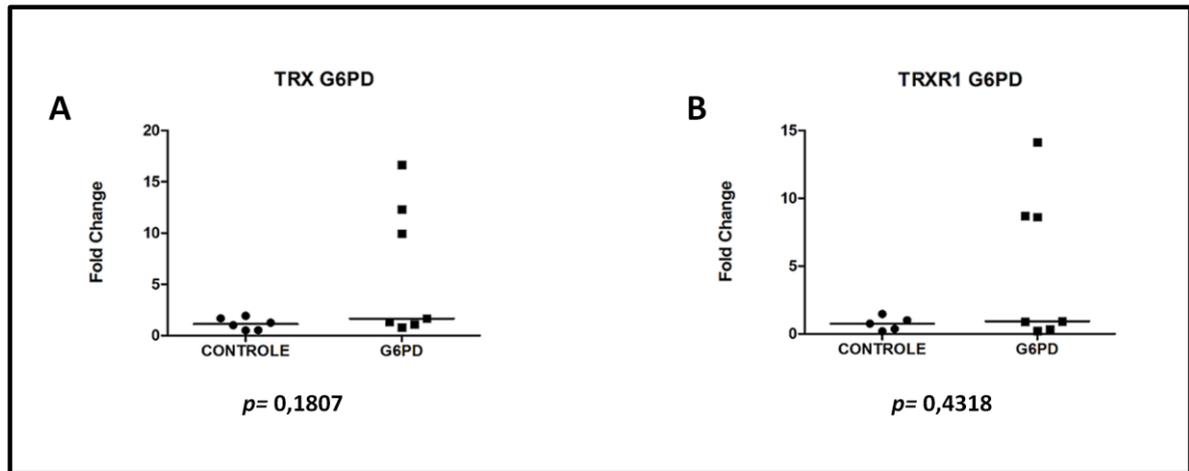


Figura 20. Análise da expressão gênica da tiorredoxina e tiorredoxina redutase 1 em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. Não foi encontrada diferença estatística em nenhuma das análises (A) TRX ($p=0,1807$), (B) TrxR1 ($p=0,4318$) realizadas por qRT-PCR. O traço representa a mediana dos resultados.

5.6. Análise da expressão gênica da família de peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com hemoglobinopatia SC

Assim como nos indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase as análises de expressão gênica das peroxirredoxinas foram feitas por PCR em tempo real. Contudo, em todos os grupos estudados detectou-se a expressão apenas das isoformas das *PRDXS* 1, 2, 5 e 6. As isoformas de *PRDX3* e *PRDX4* não foram encontradas. A expressão gênica das peroxirredoxinas foi analisada nos reticulócitos dos seguintes grupos: indivíduos saudáveis (controle; $n= 10$), pacientes com hemoglobinopatia SC (HbSC; $n= 18$). Os resultados obtidos mostram que não há diferença estatística em nenhuma das peroxirredoxinas analisadas (Figura 21).

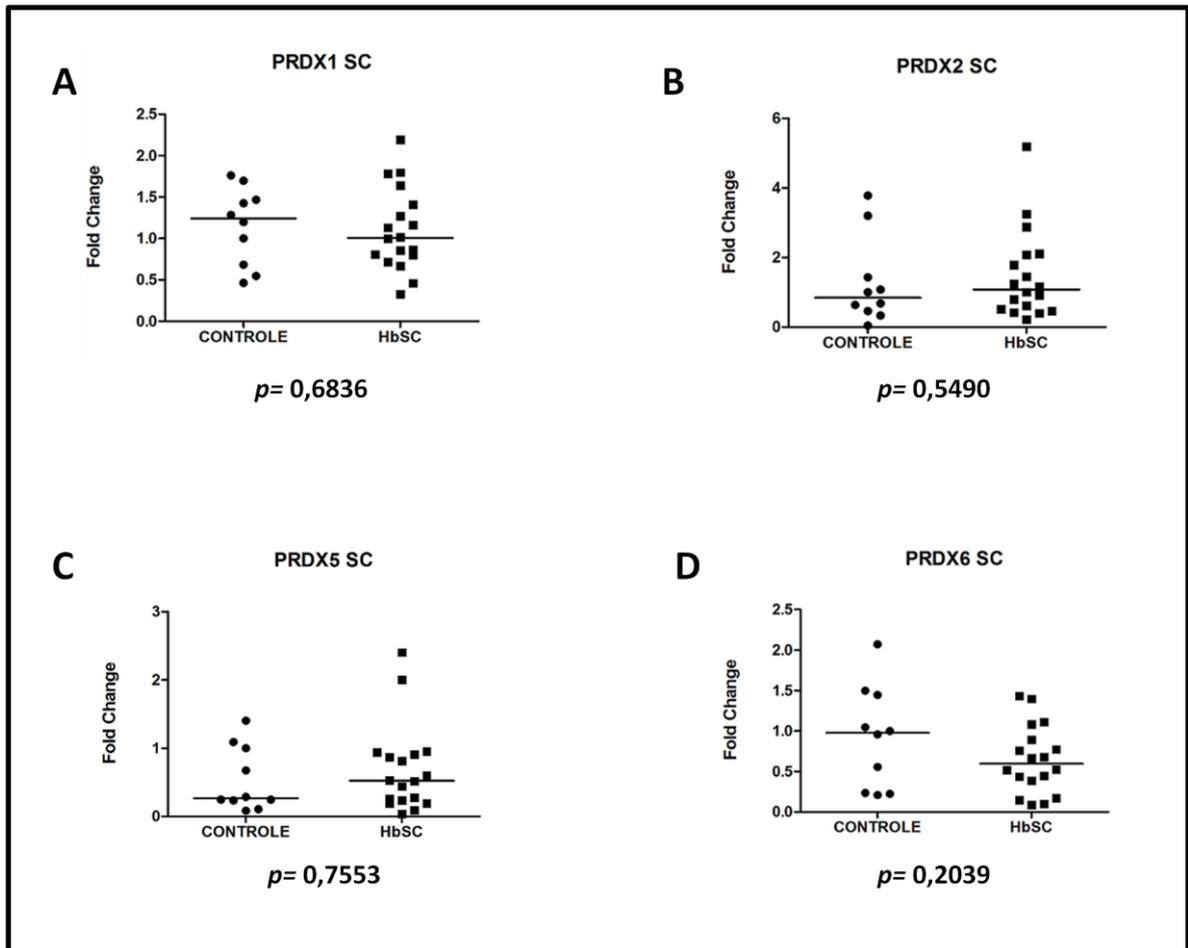


Figura 21. Análise da expressão gênica das peroxirredoxinas em reticulócitos de indivíduos saudios e com hemoglobinopatia SC. Não foi encontrada diferença estatística em nenhuma das peroxirredoxinas analisadas (A) PRDX1 ($p=0,6836$), (B) PRDX2 ($p=0,5490$), (C) PRDX5 ($p=0,7553$), (D) PRDX6 ($p=0,2039$) por qRT-PCR. O traço representa a mediana dos resultados.

5.7. Análise protéica das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos saudios e com hemoglobinopatia SC

Foram analisadas as peroxirredoxinas 1, 2 e 6; a PRDX3, PRDX4 e PRDX5 não foram detectadas no lisado celular de pacientes e controles. Como controle endógeno foi utilizado o GAPDH (Figura 22).

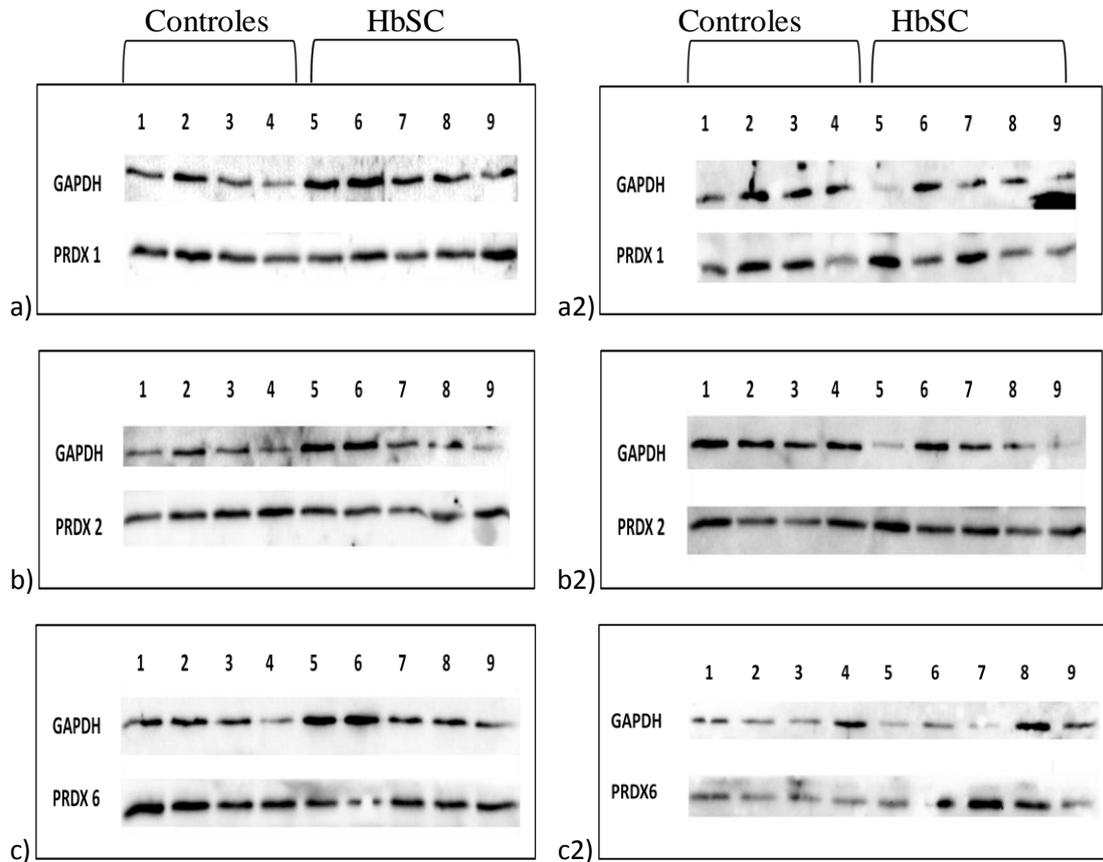


Figura 22. Análise de western blotting em controles e pacientes com hemoglobinopatia SC. Podemos verificar a análise de membranas com diferentes amostras, sendo que nas membranas a,b e c os indivíduos de 1 a 4 são indivíduos saudáveis e os indivíduos de 5 a 7 são os pacientes com hemoglobinopatia SC. As membranas a2,b2 e c2, apresentam outros indivíduos saudáveis de 1 a 4. Os indivíduos em a2,b2 e c2 de 5 a 7 são outros pacientes com hemoglobinopatia SC. As membranas a e a2 mostram a expressão da PRDX1, as membranas b e b2 a expressão de PRDX 2 e as membranas c e c2 mostram a expressão da PRDX 6, cada uma tem como controle endógeno o GAPDH.

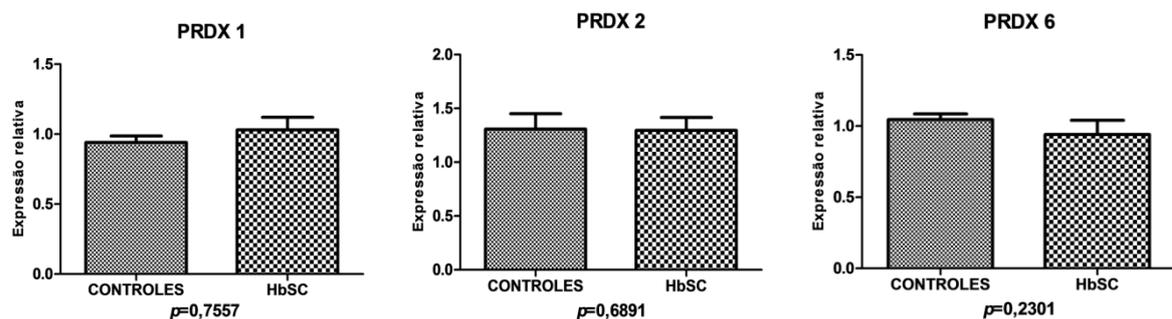
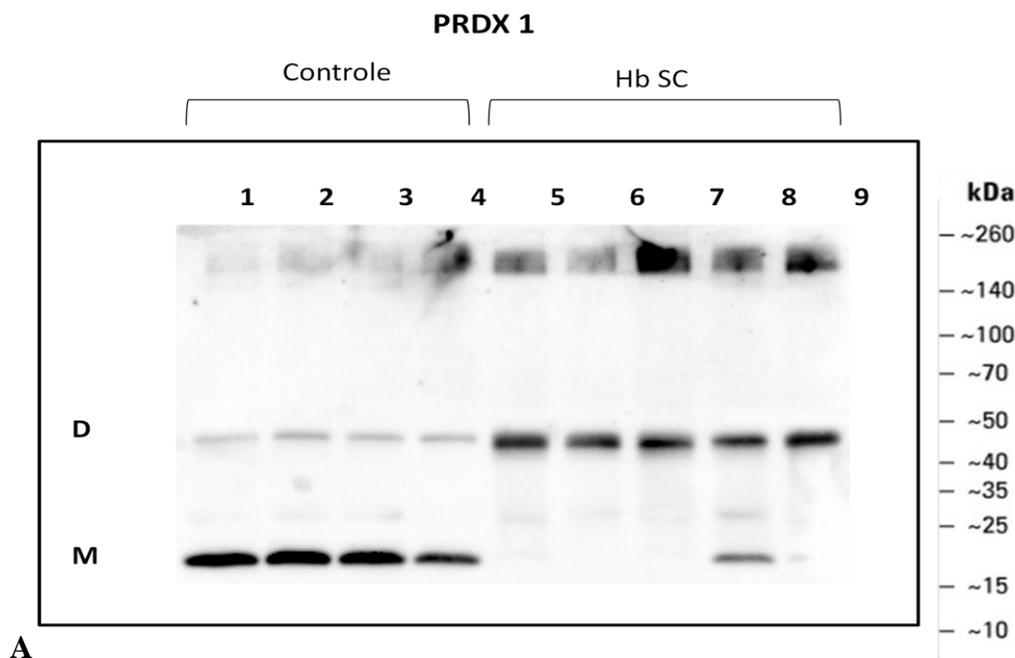


Figura 23. Análise densitométrica das amostras de indivíduos controle e com hemoglobinopatia SC. Gráficos mostrando o nível de expressão relativa de PRDX1, 2 e 6, resultante da densitometria realizada com o agrupamento de indivíduos controle e indivíduos com hemoglobinopatia SC e comparação da expressão destas proteínas entre os grupos após análise de western blot.

Não foi observada nenhuma diferença significativamente estatística entre indivíduos controle e indivíduos com hemoglobinopatia SC para as PRDX analisadas (Figura 23).

5.8. Análise do estado redox das peroxirredoxinas no lisado celular de indivíduos sadios e pacientes com hemoglobinopatia SC

Devido à ausência de diferença de expressão significativa, realizamos o western não-redutor das amostras de indivíduos sadios e com hemoglobinopatia HbSC, para verificar se essas proteínas apesar de serem expressas em mesma quantidade não estariam inativas nos pacientes devido ao estresse oxidativo, ou seja, verificar o estado de oxidação das PRDX1 e 2, que por serem 2-cys típicas formam dímeros quando oxidam, logo saberíamos se estas proteínas estariam reduzidas ou ativas (monôméricas), ou então oxidadas ou inativas (diméricas). O resultado mostrou maior quantidade de monômeros nos indivíduos sadios e maior quantidade de dímeros nos pacientes com doença falciforme por hemoglobina SC tanto na análise feita de PRDX1 quanto a de PRDX2 (figura 24A e 24B)



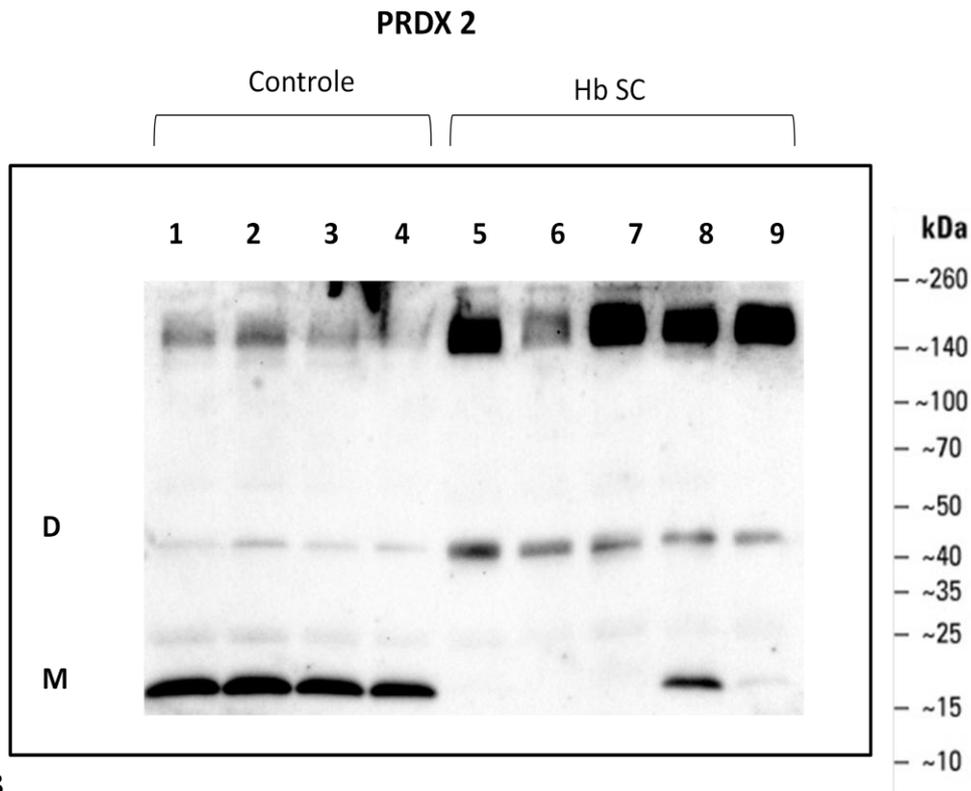


Figura 24. Análise de western blotting não-redutor do estado redox das peroxirredoxinas em controles e pacientes com doença falciforme por hemoglobina SC. Os resultados mostram maior quantidade de monômeros (M) nos controles (1-4) e maior quantidade de dímeros (D) nos pacientes com hemoglobinopatia SC (5-9) tanto na análise feita para PRDX1 (A) quanto para análise feita com PRDX2 (B).

5.9. Análise da expressão gênica da Tiorredoxina e Tiorredoxina redutase 1 em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com Doença Falciforme por Hemoglobina SC

Sabendo que a tiorredoxina é a redutora da maioria das peroxirredoxinas, exceto PRDX6, analisamos a expressão da tiorredoxina e sua redutora, a tiorredoxina redutase 1, para verificar se não haveria maior expressão dessas para compensar o estado oxidado das PRDX1 e 2 nos indivíduos com hemoglobinopatia SC, como visto pelo western não-redutor.

As análises de expressão gênica da tiorredoxina (TRX) e tiorredoxina redutase 1 (TRXR1) foram feitas por PCR em tempo real. A expressão gênica da TRX foi analisada nos reticulócitos dos seguintes grupos: indivíduos saudáveis (controle; n=6), pacientes com hemoglobinopatia (HbSC; n=9). Já para TRXR1 controle teve n=5 e os pacientes n=7. Os resultados obtidos mostram que não há diferença estatística em nenhuma das análises (Figura 25).

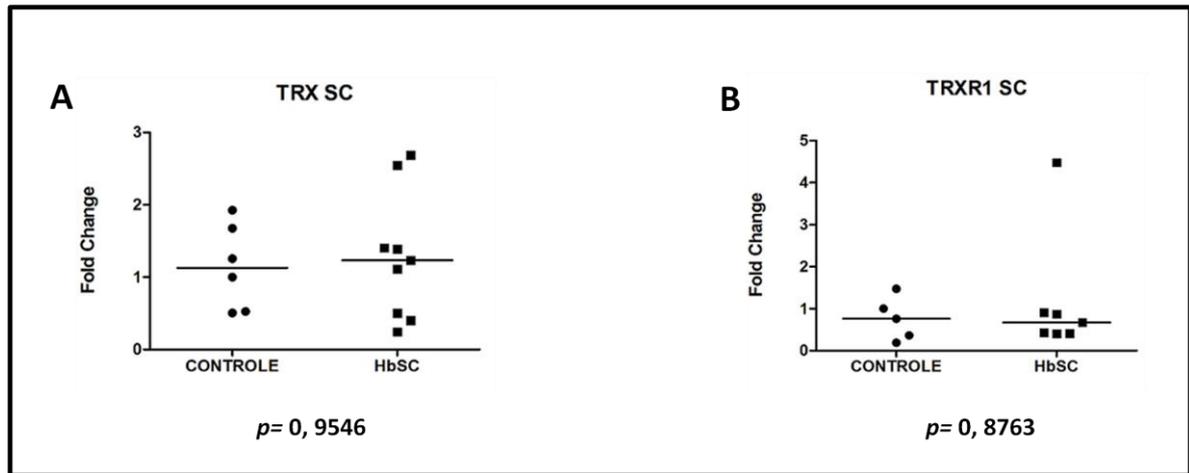


Figura 25. Análise da expressão gênica da tioredoxina e tioredoxina redutase 1 em reticulócitos de indivíduos saudáveis e com hemoglobinopatia SC. Não foi encontrada diferença estatística em nenhuma das análises (A) TRX ($p=0,9546$), (B) TrxR1 ($p=0,8763$) por qRT-PCR. O traço representa a mediana dos resultados.

6. DISCUSSÃO

Segundo Fibach e Rachmilewitz (2008), patologias dos eritrócitos como doença falciforme, talassemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase podem aumentar a taxa de autooxidação da hemoglobina. Sabe-se que nos eritrócitos a fonte primária de EROs é a Hb que sofre auto-oxidação produzindo o $O_2^{\bullet-}$ e se transforma em metahemoglobina (ÇIMEN, 2008).

Em indivíduos com deficiência de glicose-6-fosfato foram reconhecidos corpúsculos de Heinz (LOW et al. 2008), estruturas formadas devido a desnaturação da hemoglobina, neste caso devido ao aumento na taxa de oxidação da hemoglobina a metahemoglobina, formação de hemicromo e por fim precipitação desta (NAUM; SOUZA, 2004), onde a causa foi estabelecida como uma incapacidade de gerar NADPH suficiente em condições de estresse oxidativo (LOW et al. 2008).

No caso da hemoglobinopatia SC foi visto que tanto a HbS e HbC são menos estáveis do que a hemoglobina adulta normal (HbA). Daí a auto-oxidação é aumentada e subsequente produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) aumenta (NAGABABU et al. 2008).

Foi observado in vitro um aumento da expressão das Prdx 1-4 quando havia maior exposição das células a concentração de peróxido de hidrogênio (MITSUMOTO et al. 2001). Também foi demonstrado um aumento da expressão de Prdx 2 em células de camundongos

com beta talassemia, e isso pode ser devido a uma resposta ao aumento do estresse oxidativo nessas células (MATTE et al. 2010). Visto que pode haver maior estresse oxidativo nas doenças em estudo esperávamos observar uma diferença na expressão das peroxirredoxinas. Porém, notamos que somente a PRDX1 apresenta diferença de expressão protéica entre indivíduos sadios e indivíduos com deficiência de G6PD, apresentando uma diminuição nestes últimos. No entanto, para as outras proteínas estudadas (PRDX2 e 6), tanto para deficiência de G6PD como hemoglobinopatia SC não houve diferença estatística significativa tanto na análise de expressão gênica quanto na análise protéica das proteínas estudadas.

Muitos estudos têm demonstrado que a PRDX1 possui funções como regulador celular em cascatas de sinalização mediadas por peróxido de hidrogênio (KANG et al., 1998; NEUMANN; CAO; MANEVICH, 2009) e que pode proteger as células da morte celular induzida por EROs (BAE et al., 2007; KIM et al., 2008). Como observamos uma diminuição da PRDX1 nos indivíduos com deficiência de G6PD, isso pode indicar uma menor sobrevivência das hemácias destes indivíduos. Além de maior formação de corpos de Heinz, como visto por Han et al. 2012 em camundongos com ausência total de PRDX1.

As isoformas de PRDX3 e PRDX4 não foram encontradas em reticulócitos e/ou lisado celular, tanto de indivíduos sadios quanto de pacientes de ambas as doenças. Possivelmente, em virtude da ausência ou dos reduzidos níveis de RNAm para estes genes presentes nos reticulócitos destes grupos. Com relação à ausência destas isoformas no lisado celular, está pode estar ligada a localização mitocondrial da PRDX3 e ao fato da PRDX4 ser excretada para o meio extracelular. Também não foi encontrada expressão protéica de PRDX5, isso pode ser devido ao fato desta ser encontrada em maior quantidade nos peroxissomos, mitocôndrias e em baixas quantidades no citoplasma que não pôde ser identificada.

No caso das PRDX 1 e 2, além da análise de expressão, avaliamos o perfil redox. Estas enzimas apresentam 91% de homologia, são citosólicas, tem o mesmo mecanismo catalítico e semelhante cinética de reação (CHAE et al., 1999). Foi feito então western não-redutor para verificar o estado de oxidação (presença de dímero e monômero) destas proteínas e nas duas doenças estudadas foi encontrada maior quantidade de dímeros nos pacientes e nos indivíduos sadios maior quantidade de monômeros.

Sabe-se que 2cys- Prdx 1 e 2 consistem em monômeros que formam homodímeros. Estes existem principalmente sob a forma de ditiol reduzido sob condições fisiológicas. Os homodímeros estão alinhados de modo a que a cisteína peroxidática (C_P) de um monômero é

oposta a cisteína de resolução (C_R) do outro. A C_P é altamente susceptível a oxidação por peróxido de hidrogênio decorrente de auto-oxidação da hemoglobina ou quando adicionados exogenamente, após esta oxidação a C_P é atacada pela C_R resultando na formação de um dímero ligado por uma ponte dissulfeto (LOW et al., 2007; HALL; KARPLUS; POOLE, 2009). Este dímero é reciclado pelo sistema tiorredoxina (Trx) / tiorredoxina redutase (TrxR).

A reciclagem é lenta em eritrócitos, devido ao baixo nível de TrxR presente e o dímero pode acumular sob condições de estresse (LOW et al. 2007). E segundo Bayer e colaboradores (2013) um número de doenças relacionadas com processos associados com o aumento do estresse oxidativo, tanto internos como externos à eritrócitos, pode dar origem a um acúmulo de Prx2 oxidada, o que corrobora com nossos resultados.

Também fizemos análise da expressão gênica de Trx e TrxR e não encontramos diferença estatística. Porém, como já foi dito, a atividade de TrxR que é quem recicla Trx para então reduzir as peroxirredoxinas, é lenta, levando a essa dimerização das peroxirredoxinas. Logo, mesmo que as peroxirredoxinas apresentem mesma quantidade, seu estado de oxidação, ou seja, sua atividade pode estar comprometida devido ao aumento das EROs e baixa taxa de reciclagem da tiorredoxina redutase.

No caso dos indivíduos com G6PD em que há uma diminuição do NADPH, a reciclagem das Prdx 1 e 2 é ainda mais lenta, já que essas necessitam do NADPH para reduzir as TRX e estas as Prdx, levando a formação de dímeros.

No caso dos indivíduos com doença falciforme por hemoglobina SC, esse estado oxidativo pode ser reflexo do aumento de EROs devido a maior taxa de auto-oxidação da hemoglobina SC, como dito anteriormente.

Como vimos, com esse aumento de H_2O_2 , PRDX fica completamente oxidada e parece então que o eritrócito requer catalase e/ou a atividade da GPx para removê-lo (LOW et al. 2007).

Um estudo realizado com pacientes deficientes em G6PD verificou níveis normais de catalase, glutathiona peroxidase e SOD em todos os indivíduos analisados ambos com histórias positivas e negativas da crise hemolítica após ingestão de fava ou ingestão de drogas. Por outro lado, altos níveis de catalase e glutathiona peroxidase foram encontrados em um pequeno grupo com deficiência de G6PD (hemizigotos e heterozigotos) associada com traço beta-

talassemia, provavelmente em razão do estresse oxidativo cronicamente reforçado que está presente na beta talassemia (GERLI et al. 1982).

Sabe-se que os pacientes em estudo, apesar de apresentarem uma elevação no nível de EROs não apresentam um quadro grave de anemia hemolítica. Uma hipótese é que mesmo com maior taxa de oxidação das peroxirredoxinas e a presença de glutathione peroxidase e catalase nos pacientes com G6PD, não se sabe se há um aumento na atividade dessas últimas. Porém, para melhor compreender os resultados, mais estudos devem ser realizados para verificar a expressão e atividade destas enzimas nesses indivíduos.

Sabe-se que o alto nível de peróxido pode levar a uma hiperoxidação das peroxirredoxinas resultando na inativação da atividade de peroxidase e formando estruturas de alto peso molecular. Interessantemente, verificamos bandas de alto peso molecular no western não-redutor, estas aparecem em maior quantidade nos pacientes e podem caracterizar um estado de hiperoxidação (DAY et al. 2012). Além disso, podem ser associações das peroxirredoxinas com outras proteínas com as peroxirredoxinas, porém, algumas análises devem ser feitas para confirmar essa hipótese que parece ser interessante para melhor compreender os mecanismos que envolvem as peroxirredoxinas nesse tipo celular.

Este é o primeiro estudo em que é feita a análise da expressão e estado oxidativo das peroxirredoxinas em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e pacientes com hemoglobinopatia SC. Os objetivos do trabalho foram cumpridos, levando a resultados interessantes que mostram que não só a quantidade dessas proteínas é importante, mas também o seu estado oxidativo, a sua atividade. Além disso, os resultados abriram portas para outros experimentos que estão sendo executados pelo grupo.

7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, M.M; AL-AWAIDA, W. Synchrony of G6PD activity and RBC fragility under oxidative stress exerted at normal and G6PD deficiency. **Clin Biochem**, 43(4-5):455-60, 2010.

AL-GUBORY, KH; FOWLER, PA, GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 42:1634–1650, 2010.

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

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

BECKER K et al. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. **Int J Parasitol**, 34:163–189, 2004.

BELL KFS, HARDINGHAM GE. CNS peroxiredoxins and their regulation in health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**.14(8):1467–1477, 2011.

BEUTLER E, DUPARC S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. **Am J Trop Med Hyg** 77:779–789, 2007.

BEUTLER E, VULLIAMY TJ. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Blood Cells Mol Dis**,28:93–103, 2002.

BEUTLER, E. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase. In: STANBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S. **Bases metabólicas das doenças hereditárias**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, 1981.

BEUTLER, E. G6PD deficiency. **Blood**,84(11):3613-36, 1994.

BEUTLER, E. Energy metabolism and maintenance of erythrocytes. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, B. S.; KIPPIS, T. J.; SELIGSOHN, U. **Williams hematology**. 6^a ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap. 26, p. 319-332.

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

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

BUNN HF, NOGUCHI CT, HOFRICHTER J, ET AL: Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. **Proc Natl Acad Sci**, 79:7527, 1982.

BUNN, H.F.; FORGET, B.G. **Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects**. 1. ed. W.B. Saunders Company, 690 p., 1986.

CAPPELLINI, M.D; FIORELLI, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Lancet**, 371: 64–74, 2008.

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

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

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

ÇIMEN, M Y B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**. v390. 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, SAA; ERZURUM, SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 283: L246–L255, 2002

COMPRI, M.B; SAAD, S.T.O; RAMALHO, A.S. Investigação genético-epidemiológica e molecular da deficiência de G-6-PD em uma comunidade brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 16(2):335-342, 2000.

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**. 1. Ed. Intech, 2012. 352p.

DALIBALTA S, ELLORY J C, BROWNING J A, WILKINS R J, REES D C, GIBSON J S. Novel permeability characteristics of red blood cells from sickle cell patients heterozygous for HbS and HbC (HbSC genotype). **Blood Cells Mol. Dis.** 45, 46-52, 2010.

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**, 45.3, pp 398-408, 2012.

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

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

ELYASSI, A.R.;ROWSHAN, H.H. Perioperative management of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patient: a review of literature. **Anesth Prog**. 56:86-91, 2009.

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.** 43(1): 61-8.1997.

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

FISHER, A.B. "Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities," **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 15, no. 3, pp. 831–844, 2011.

FRANK JE. Diagnosis and management of G6PD deficiency. **Am Fam Physician**, 72:1277-1282, 2005.

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

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

GARLIPP, C.R.; RAMALHO, A.S. Aspectos clínicos e laboratoriais da deficiência de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G-6-PD) em recém nascidos brasileiros. **Rev Brasil Genet**, v. 11, p. 717-728, 1988.

GERLI GC, BERETTA L, BIANCHI M, AGOSTONI A, GUALANDRI V, ORSINI GB. Erythrocyte superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Scand J Haematol**, 29(2):135-40, 1982.

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

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.

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.

GREER JP, FOERSTER J, LUKENS JN, RODGERS GM, PARASKEVAS F, GLADER B. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11th ed. Editora: Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia PA, USA, 2003.

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

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, KARPLUS P A, and POOLE L B. Typical 2-Cys peroxiredoxins structures, mechanisms and functions. **FEBS J.** 276,2469–2477, 2009.

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

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

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

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

HOFFMAN, R. et al. **Hematology: Basic Principles and Practice.** 2nd ed. Churchill Livingstone – ELSEVIER, New York, 2008.

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.

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.

JAMURTAS AZ, FATOUROS IG, KOUKOSIAS N, ET AL. Effect of exercise on oxidative stress in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **In Vivo,** 20:875-880, 2006.

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.

JOHNSON, F; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects of Medicine,** 26:340–352, 2005.

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

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

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

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

KATSURAGAWA TH, GIL LHS, STÁBILE RG, PIRES MG, BONINI-DOMINGOS CR. Evaluation of the prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and hematologic profile of a population from Rondônia. **Rev Bras Hematol Hemoter,** 26:268–273, 2004.

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

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

KIRKMAN HN, GAETANI GF. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proc Natl Acad Sci USA** 81:4343–4347, 1984.

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.

LITCHMAN, MA; BEUTLER, E; KIPPS, TJ; SELIGSOHN, U; KAUSHANSKY, K; PRCHAL, JT. **Williams Hematology.** Editora: McGraw-Hill, 7^a ed., USA, 1926.

LLOYD, RV, HANNA, PM, MASON, RP. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine* 22.5 (1997): 885-888.

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

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

LUKENS, J. N. Deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase e deficiências relacionadas que envolvem a via da pentose fosfato e metabolismo da glutatona. In: LEE, R. G. et al. **Wintrobe Hematologia Clínica.** São Paulo: Manole, 1998, v. 1. p. 1101–1113.

LUZZATO, L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. **Haematologica,** 91: 1303-1306, 2006.

LUZZATTO L; NOTARO R. Protecting against bad air. **Science** 293:442-443, 2001.

MAFRA, D., ABDALA, D. S. P., COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Rev. Nutr., Campinas,** 12(3): 205-212. 1999.

MAIA et al. Prevalência da deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase em doadores de sangue de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Rev Bras Hematol Hemoter,** 32(5):422-423, 2010.

MANGANELLI G, MASULLO U, PASSARELLI S, FILOSA S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: Disadvantages and possible benefits. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets,** 13(1):73–82. 2013.

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

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

MATÉS, JM; PÉREZ-GÓMES, C; CASTRO, IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry,** Vol. 32, No. 8, 595–603, 1999.

MATTE, A. et al. Peroxiredoxin-2 expression is increased in β -thalassemic mouse red cells but is displaced from the membrane as a marker of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 49.3, pp 457-466, 2010.

MITSUMOTO, Atsushi, et al. Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 30.6, pp 625-635, 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.

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

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

NAGABABU E. et al. Iron-deficiency anaemia enhances red blood cell oxidative stress. **Free Radic. Res**. 42, 824–829, 2008.

NAGEL RL, FABRY ME, STEINBERG MH. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Rev**, 17(3):167-78, 2003.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Savier, p1997.171

NAOUM, P. C.; SOUZA, P. C. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da HbS nos genótipos SS, SF (S/ β 0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 4, p. 249-59, 2004.

NETTO, L. E.; STADTMAN, E. R. The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical chain of reactions. **Arch Biochem Biophys**. v.333, n.1, p. 233-242, 1996.

NEUMANN, C. A. et al. Essential role for the peroxiredoxin PRDX1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. **Nature**. v.424, n.6948, p. 561-565, 2003.

NEUMANN, C. A.; FANG, Q. Are peroxiredoxins tumor suppressors? **Curr Opin Pharmacol**.v.7, n.4, p. 375-380, 2007.

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

NKHOMA, E.T; POOLE, C;VANNAPPAGARI, V;HALL, S.A; BEUTLER, E.The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A systematic review and meta-analysis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 42: 267–278, 2009.

OGUSUCU, R. et al. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxyxynitrite: rate constants by competitive kinetics. **Free Radic Biol Med**. v.42, n.3, p. 326-334, 2007.

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.

ONDEI, L.S., SILVEIRA, L.M., LEITE, A.A., SOUZA, D.R.S., PINHEL, A.A.S., PERCÁRIO, S., RICCI, O., BONINI-DOMINGOS, C.R. Lipid peroxidation and antioxidant capacity of G6PD-deficient patients with A-(202G>A) mutation. **Genet. Mol. Res.** 8 (4), 1345–1351. 2009.

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

PEREIRA ET AL. Sickle Cell Disease: quality of life in patients with hemoglobin SS and SC disorders. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 35(5):325-31, 2013.

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

PETERS, A.L; VAN NOORDEN, J.F. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: Cytochemical Detection of Heterozygous G6PD Deficiency in Women. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, 57(11):1003-1011, 2009.

PRATICÒ D, DELANTY N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **Am J Med.** 109:577–585, 2000.

PRCHAL JT; GREGG XT. Red cell enzymopathies. In: HOFFMAN R, BENZ E. **Hematology: Basic Principles and Practice**. Editora: Churchill living stone, 4th ed. Philadelphia, 2005. p.653-659..

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.

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.

RINALDUCCI S, D'AMICI GM, BLASI B, ZOLLA L. Oxidative stress-dependent oligomeric status of erythrocyte peroxiredoxin II (PrdxII) during storage under standard blood banking conditions. **Biochimie.** 93:845–85, 2011.

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

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

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

SCHECHTER, A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, Washington, DC, v.112, n.10, p. 3927-3928, 2008.

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

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

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

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

STOHS, S. J., D. BAGCHI. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine** 18.2. 321-336, 1995.

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

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

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

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

VALKO, M. ET AL. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39:44-84, 2007.

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

VULLIAMY, T.; MASON, P.; LUZZATTO, L.The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Trends Genet**, v. 8, n.4, p. 138-143, 1992.

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

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

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

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

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

YAWATA, Y. Cell Membrane: The Red Blood Cell as a Model. WILEY-VCH VerlagGmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.

YOUNG, IS; WOODSIDE, JV. Antioxidants in health and disease. **J Clin Pathol**, 54:176–186, 2001.

ZAGO MA, PINTO ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 29(3):207-14, 2007.

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

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

ZHANG et al. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and β -cell apoptosis. **FASEB J**, 24(5): 1497–1505, 2010.

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

8. ANEXOS

ANEXO 1

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

DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Profissão: _____

Tipo de Anemia: _____

Medicação (se houver): _____

ANTECEDENTES PESSOAIS

Tabagismo Alcoolismo Outros: _____

Atividade Física. Qual? _____

Frequência (dias por semana): _____

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

Sim Não

Qual/ Quais? _____

Faz uso de medicação para tratamento desta patologia? Sim Não

Qual/ Quais? _____

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****(resolução 196/96; 340/04; 347/05)****Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO PAPEL BIOLÓGICO DE PEROXIRREDOXINAS NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR ERITRÓIDE E EM DOENÇAS GENÉTICAS ERITROCITÁRIAS.**Pesquisadores:** Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, Prof. Dr. Iran Malavazi, Aderson da Silva Araújo, Marcos André Cavalcanti Bezerra, Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer, Fernando Ferreira Costa, Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira, Karen Simone Romanello, Karina Kirschner Lopes, Sheila Tiemi Nagamatsu, Tainá Regina Damaceno Silveira.**Local:** UFSCar, HEMOPE e HEMOCENTRO / FCM – UNICAMP.

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

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

Para participar, caso você queira, deverá doar 2 frascos (4 colheres de sopa cada) de sangue. Essa coleta será feita por um profissional treinado e, no máximo, poderá ficar uma pequena mancha roxa e a região poderá ficar um pouco dolorida. Além disso, serão

levantados alguns dados de seu prontuário médico. O material desse estudo, caso você permita, será armazenado no HEMOPE, UNICAMP e UFSCar e somente será utilizado para outros estudos após nova consulta ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

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

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

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

Outros pontos importantes foram enfatizados:

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

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

Consentimento para participação no estudo:

Voluntário/ Responsável

Pesquisador responsável

Autorização para armazenamento de material biológico:

Sim

Não

Voluntário/ Responsável