

Nelson Cazuó Tukamoto Junior

**Influência do polimorfismo de *GST* e peroxidação lipídica no  
fenótipo de Hb S e mutantes no gene *HFE***

Dissertação para a obtenção do título de mestre, apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp.

Orientador: Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

**São José do Rio Preto**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Tukamoto Junior, Nelson Cazu.

Influência dos polimorfismos de GST e peroxidação lipídica no  
fenótipo de portadores de Hb S e mutantes no gene *HFE* / Nelson Cazu  
Tukamoto Junior. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2008.

107 f.: il. ; 30 cm.

Orientador: Claudia Regina Bonini-Domingos

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas

1. Hemoglobinopatia. 2. Hemoglobina variante. 3.  
Hemoglobinopatia - diagnóstico clássico e molecular. I. Bonini-  
Domingos, Claudia Regina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto  
de Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas. III. Título

CDU – 616.155

***Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro do CNPq e Capes.***

**Nelson Cazuó Tukamoto Junior**

**Influência do polimorfismo de *GST* e peroxidação lipídica no  
fenótipo de Hb S e mutantes no gene *HFE***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:.....

2º. Examinador:.....

3º. Examinador:.....

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

*“Não é a crítica que conta, nem o homem que aponta como o outro tropeça ou onde aquele que faz podia ter feito melhor. O mérito é daquele que está na arena”.*

*Theodore Rosevelt*

***Tocando em Frente***  
***Renato Teixeira***

*Ando devagar porque já tive pressa  
 E levo esse sorriso porque já chorei demais  
 Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe  
 Só levo a certeza de que muito pouco eu sei  
 Ou nada sei*

*Conhecer as manhãs e as manhãs,  
 O sabor das massas e das maçãs,  
 É preciso amor pra poder pulsar,  
 É preciso paz pra poder sorrir,  
 É preciso a chuva para florir*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
 Compreender a marcha e ir tocando em frente  
 Como um velho boiadeiro levando a boiada  
 Eu vou tocando dias pela longa estrada eu vou  
 Estrada eu sou*

*Conhecer as manhãs e as manhãs,  
 O sabor das massas e das maçãs,  
 É preciso amor pra poder pulsar,  
 É preciso paz pra poder sorrir,  
 É preciso a chuva para florir*

*Todo mundo ama um dia todo mundo chora,  
 Um dia a gente chega, no outro vai embora  
 Cada um de nós compõe a sua história  
 Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
 E ser feliz*

*Conhecer as manhãs e as manhãs  
 O sabor das massas e das maçãs  
 É preciso amor pra poder pulsar,  
 É preciso paz pra poder sorrir,  
 É preciso a chuva para florir*

*Ando devagar porque já tive pressa  
 E levo esse sorriso porque já chorei demais  
 Cada um de nós compõe a sua história,  
 Cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
 E ser feliz*

**Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que me apoiaram e me deram forças para que meu objetivo fosse completado.**

Aos meus pais Nelson Cazuó Tukamoto (*in memorian*) e Eunice Barbosa Tukamoto (*in memorian*) pela educação, respeito e dignidade, além da presença sempre constante em meus pensamentos.

Ao meu irmão, Kenji Barbosa Tukamoto, exemplo de responsabilidade, sigo teus passos, pois sei, são seguros.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini-Domingos, muito mais que uma orientadora, me acolheu como se fosse seu filho, exemplo de dedicação e profissionalismo, agradeço pela confiança e respeito.

Ao Hemocentro de São José do Rio Preto, na pessoa do Dr. Octávio Ricci Júnior, pela atenção e colaboração nas coletas de sangue dos doadores e pacientes.

Ao Hospital Apoio de Brasília, na pessoa da Dra. Ísis Magalhães e Dra. Terezinha Chaves, por seus esforços nas coletas de sangue dos pacientes.

Ao Hemocentro da Santa Casa de São Paulo, na pessoa do Dr. Rodolfo Cançado por sua receptividade, atenção e colaboração nas coletas de sangue.

A Prof. Dr. Sandro Percário e Profa. Dra. Dorotéia Rossi, pela introdução de novas metodologias no LHGDH e pela atenção, paciência e receptividade.

Às amigas, Paula e Luciana, pelo incentivo, ensino, colaboração e diversão, sem elas não conseguiria realizar este trabalho.

À amiga Marilanda, que mesmo fora do país, sempre nos diverte com suas peripécias.

Aos amigos do Laboratório, Carlos, Fábio, Thiago, Lígia, Isa, Maza, Eliana, Sally, Bel, Marina, Natalia P, Natalia G, Gisele, Lara e Renata, pelo companheirismo e amizade.

A família Bonini-Domingos, Luís Henrique, Ana Carolina e Ana Luísa, pelo carinho, respeito e confiança.

Aos amigos, que torceram e incentivaram, em todas as etapas da minha vida.

**Lista de Abreviaturas**

Hb	Hemoglobina
O <sub>2</sub>	Oxigênio
H <sub>2</sub> O	Água
OH	Radical hidroxila
GST	Glutathiona S-transferase
PCR-AE	Reação em cadeia da polimerase alelo-específica
RFLP	Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição
Kb	Quilobase
PTNT	Programa de triagem neonatal
HH	Hemocromatose hereditária
Fe	Ferro
DNA	Ácido desoxiribonucléico
mg	Miligramas
g	Gramas
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
CYP	Citocromo P450
GSSG	Glutathiona oxidada
GR	Glutathiona reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
GPX	Glutathiona Peroxidase
CNS	Conselho Nacional de Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
MDA	Malondialdeído
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalência ao trolox
UV	Ultravioleta
P.A.	Puro absoluto
rpm	Rotações por minuto
q.s.p.	Quantidade suficiente para

## Lista de Figuras

Figura 1: Representação da organização cromossômica	17
Figura 2: Alteração da membrana celular por polímeros de Hb S	19
Figura 3: Esfregaço de sangue periférico de um paciente	19
Figura 4: Ilustração da absorção de Fe	23
Figura 5: Representação esquemática da ação das GST	25
Figura 6: Foto de gel de agarose a 1.5%, com iluminação UV.	39
Figura 7: Foto de gel de agarose 1,5% para identificação da mutação H63D.	40
Figura 8: Representação da frequência genotípica dos polimorfismos no gene <i>HFE</i>	42
Figura 9: Foto de gel de poliacrilamida 6% para GSTP1	42
Figura 10: Gráfico da frequência genotípica dos polimorfismos de GSTM/T	44
Figura 11: Gráfico da frequência genotípica do polimorfismo de GSTP1	46
Figura 12: Representação gráfica dos valores médios de MDA	48
Figura 13: Representação gráfica dos valores médios de TEAC	48
Figura 14: Ilustração gráfica dos valores médios do MDA	50
Figura 15: Representação gráfica dos valores médios do TEAC	50
Figura 16: Representação gráfica dos valores médios do MDA, no grupo B	52
Figura 17: Representação gráfica dos valores médios de TEAC, no grupo A	54
Figura 18: Representação gráfica dos valores médios de TEAC, no grupo A	54
Figura 19: Representação gráfica dos valores médios de TEAC, no grupo C	55

**Lista de Tabelas**

Tabela 1: Frequências genotípica, absoluta e relativa, para os polimorfismos	41
Tabela 2: Frequência alélica das mutações C282Y e H63D	41
Tabela 3: Frequência genotípica dos polimorfismos de GST	44
Tabela 4: Frequência alélica das mutações M e T do gene <i>GSTM1</i>	45
Tabela 5: Frequência para o polimorfismo GSTP1	45
Tabela 6: Frequência alélica do polimorfismo de GSTP1	46
Tabela 7: Estatística descritiva obtida para os valores de MDA	47
Tabela 8: Descrição dos valores médios para as quantificações de MDA	49
Tabela 9: Comparação entre os diferentes fenótipos de Hb, separados	51
Tabela 10: Comparação entre os diferentes fenótipos de Hb	52
Tabela 11: Descrição dos valores médios para as quantificações de TEAC	53
Tabela 12: Descrição dos valores médios para as quantificações	53
Tabela 13: Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos	79
Tabela 14: Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos	80
Tabela 15: Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos	81
Tabela 16: Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos	84
Tabela 17: Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos	85
Tabela 18: Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos	86

## Resumo

A clínica da doença falciforme é variável e depende de fatores genéticos, sociais, culturais e ambientais. As lesões celulares causadas por radicais livres estão associadas com a diminuição da sobrevivência do eritrócito em vários tipos de anemias hemolíticas, sejam de ordem adquirida, hereditária ou metais pesados. Os defeitos de metabolismo do ferro, em especial oriundos do polimorfismo no gene *HFE*, levam ao acúmulo de ferro tecidual, com potencial oxidante. O controle desses efeitos deletérios é realizado por enzimas de detoxificação, como a glutatona e o polimorfismo em seu gene leva ao desequilíbrio do sistema antioxidante. Avaliamos a influência dos polimorfismos dos genes *HFE* e Glutathione S-Transferase (*GST*) na peroxidação lipídica em portadores de hemoglobina S (Hb S) e sua relação com o aumento da destruição eritrocitária e geração do estresse oxidativo. Para a detecção da Hb S utilizamos metodologias clássicas de diagnóstico para hemoglobinopatias e confirmação por biologia molecular (PCR-AE), para a detecção dos polimorfismos dos genes *HFE* e *GST* utilizamos as técnicas de PCR-RFLP e PCR-MULTIPLEX e para inferência do estresse oxidativo realizamos a dosagem do malondialdeído e capacidade antioxidante total (MDA e TEAC). Nesse trabalho analisamos 446 amostras que foram divididas em três grupos: traço falciforme, doentes falcêmicos e sem alterações de hemoglobina. Para a frequência dos polimorfismos do gene *HFE* observamos a alta frequência do alelo H63D nos grupos, que ficou entre 17% e 23%. Também analisamos os principais polimorfismos da *GST* destacando a alta frequência encontrada do genótipo nulo para *GSTM/T* nos indivíduos normais e com o traço falciforme e, a alta frequência do genótipo M/M e V/V encontrada em doentes falcêmicos. Podemos afirmar que os níveis de MDA foram elevados em indivíduos adultos do grupo de doentes falcêmicos, causado pela anemia hemolítica, agravada pelas transfusões, excesso de ferro e infecções recorrentes. Um resultado não esperado foram os níveis de TEAC elevado no grupo de doentes falcêmicos, uma possível explicação para esse aumento refere-se às recentes transfusões e ao uso de hidroxiuréia, estimulando a liberação de óxido nítrico no endotélio vascular e diminuição do estresse oxidativo no paciente. Não observamos influência dos polimorfismos no estresse oxidativo em doentes falcêmicos.

**Palavras-chave:** Hemoglobinopatias; doença falciforme; *GST*; *HFE*; capacidade antioxidante.

## Abstract

The symptoms of sickle cell disease are variable and depend on genetic, social, cultural and environmental factors. Free radicals damage the cell, decreasing the red cells surveillance in various types of Hemolytic anemia, as acquired, inherited or caused by heavy metals. Iron metabolism defects, especially the polymorphism on *HFE* gene, lead to the iron accumulation in tissue, with potential oxidizer. The control of these deleterious effects is done by detoxification enzymes, such as glutathione with its gene polymorphisms lead to imbalance in antioxidant system. The influence of *HFE* and Glutathione S-Transferase (*GST*) genes polymorphisms on lipid peroxidation were evaluated in individuals with hemoglobin S (Hb S); their relationship with the erythrocyte destruction increasing and generation of oxidative stress were also evaluate. Hb S was detected by hemoglobin diagnosis traditional methods and confirmed by molecular biology (PCR-AE); the *HFE* and *GST* genes polymorphisms were detected by PCR-RFLP and PCR-MULTIPLEX and the oxidative stress was measured by malondialdehyde dosage (MDA) and total antioxidant capacity (TEAC). In this work, 446 samples were analysed subdivided into three groups: Hb S carrier, sickle cell disease patients and people without changes in hemoglobin as a control group. A high frequency of the allele H63D were observed in these groups, between 17% and 23%. We also analyze the main polymorphisms of the *GST* highlighting the high frequency of the nule genotype *GSTM/T* in control group and Hb S carriers, and, the high frequency of the genotype *M/M* and *V/V* in sickle cell disease patients. The MDA levels were high in the group of adult sickle cell disease patients, caused by hemolytic anemia, aggravated by transfusions, iron excess and recurrent infections. An unexpected result was the high levels of TEAC in the group of sickle cell disease patients, probably due to the recent transfusions and the hydroxyurea use as therapy that stimulates the release of nitric oxide in vascular endothelium and decreases the oxidative stress on this patients. The influence of polymorphisms was not observed in the oxidative stress level between sickle cell disease.

Keywords: Hemoglobinopathies; sickle cell disease; *GST*; *HFE*; antioxidant capacity.

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	15
1.1 Hemoglobinas humanas	16
1.2 Doença Falciforme	18
1.3 Hemocromatose Hereditária	20
1.4 Glutathiona S-Transferase	23
1.5 Dano oxidativo à hemácia falcizada	26
1.6 Peroxidação lipídica	27
<b>2. Objetivos</b>	28
2.1 Objetivos gerais	29
2.2 Objetivos específicos	29
<b>3. Material e Método</b>	30
3.1 Casuística	31
3.2 Considerações éticas	32
3.3 Método	33
<b>4. Resultados</b>	38
<b>5. Discussão</b>	56
<b>6. Conclusão</b>	64
<b>7. Referências</b>	66
<b>Anexo I</b>	73
<b>Anexo II</b>	78
<b>Apêndice</b>	87

## **Introdução**

## 1-Introdução

### 1.1 Hemoglobinas Humanas

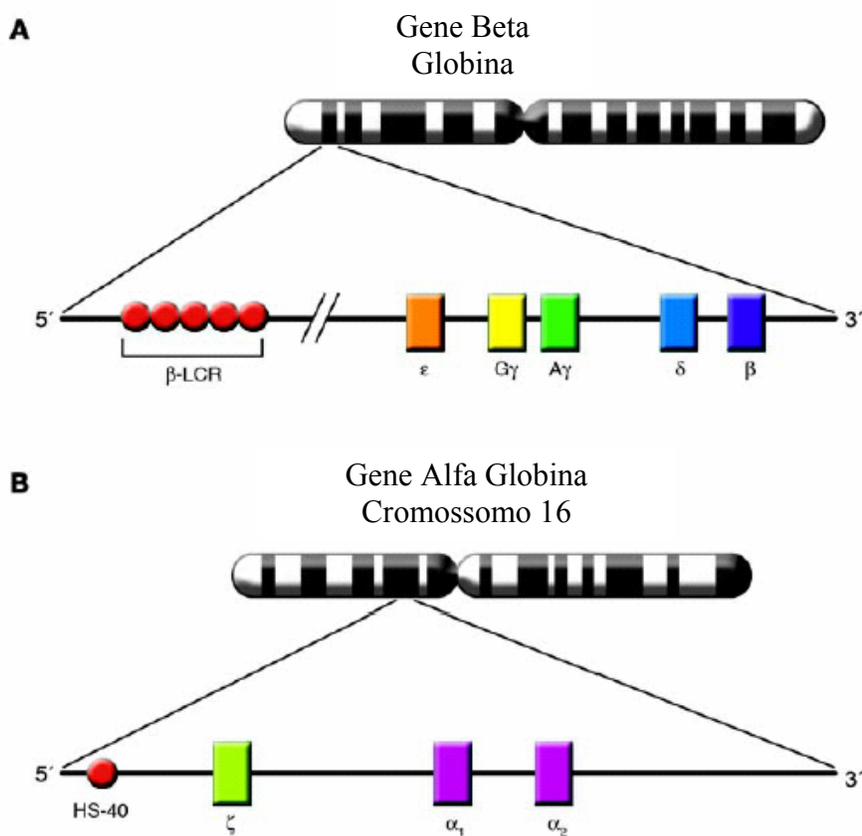
A hemoglobina (Hb) é um tetrâmero, com peso molecular de 64.458 Daltons, formada por quatro subunidades. Cada subunidade é composta de duas porções: a globina, fração protéica que varia geneticamente, e o heme, grupo prostético que contém o ferro, o qual se combina com o oxigênio e confere à molécula sua capacidade de transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e de parte do gás carbônico no sentido inverso. A fração protéica da molécula de Hb é formada num total de 574 aminoácidos. Duas das subunidades são constituídas por 141 aminoácidos, chamadas tipo alfa. As outras duas possuem 146 aminoácidos cada e são denominadas tipo beta (HONIG; ADAMS, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

O grupamento heme é essencial para a função de todas as células com atividade aeróbica. Formado por um complexo de ferro com protoporfirina IX, usado como grupo prostético em várias hemoproteínas como os citocromos, as guanilato ciclases e as hemoglobinas, e servindo para diversas funções incluindo o transporte de oxigênio e a transdução de sinais. O heme livre age como um pró-oxidante tóxico, e as células possuem sistemas específicos para manter sua concentração abaixo de  $10^{-9}$ M (FORESTI *et al.*, 2006).

As cadeias do tipo alfa são elaboradas por genes específicos localizados no braço curto do cromossomo 16, em uma região de aproximadamente 25 Kb. No complexo gênico alfa existem dois genes estruturais que expressam as globinas alfa, separadas por aproximadamente 3 Kb. São denominadas de alfa 1 e alfa 2, e permanecem em atividade durante toda a vida do indivíduo. Seu ritmo normal de síntese é bastante elevado, uma vez que participam da composição de quase todas as Hb (HONIG; ADAMS, 1986).

Os genes do complexo beta, da globina humana, estão localizados no braço curto do cromossomo 11, abrangendo uma região de aproximadamente 55 Kb sendo que o gene  $\epsilon$  é expresso na fase embrionária,  $\gamma^G$  e  $\gamma^A$  na fase fetal, o pseudogene beta é inativo e os genes  $\delta$  e  $\beta$  são atuantes a partir de uma fase do período fetal e em toda plenitude no período pós-nascimento. (HONIG; ADAMS III, 1986; WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A representação esquemática da localização dos genes globina nos cromossomos pode ser visualizada na Figura 1.



**Figura 1:** Representação da organização cromossômica dos grupamentos alfa e beta globina. (\*)

Cada gene estrutural da globina humana possui três éxons, seqüências que codificam a globina e duas seqüências não codificadoras denominadas íntrons, os quais não são transcritos nas células eritróides.

A maioria das hemoglobinas variantes estruturais é originada por simples substituições de aminoácidos, provavelmente, resultante de mudanças na seqüência dos nucleotídeos. Alterações estruturais, com conseqüências nas atividades físico-químicas da molécula, estão na dependência da extensão do processo mutacional e dos locais em que ocorrem (ZAGO, 1986; NAOUM, 1997).

---

(\*) Disponível em <<http://pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=17404610>> Acesso em 22 de junho de 2007.

Foram descritas até o momento 973 variantes de Hb (\*). No Brasil, dentre as hemoglobinas variantes os fenótipos mais conhecidos são Hb S e Hb C. (BONINI-DOMINGOS, 1993).

## 1.2 – Doença Falciforme

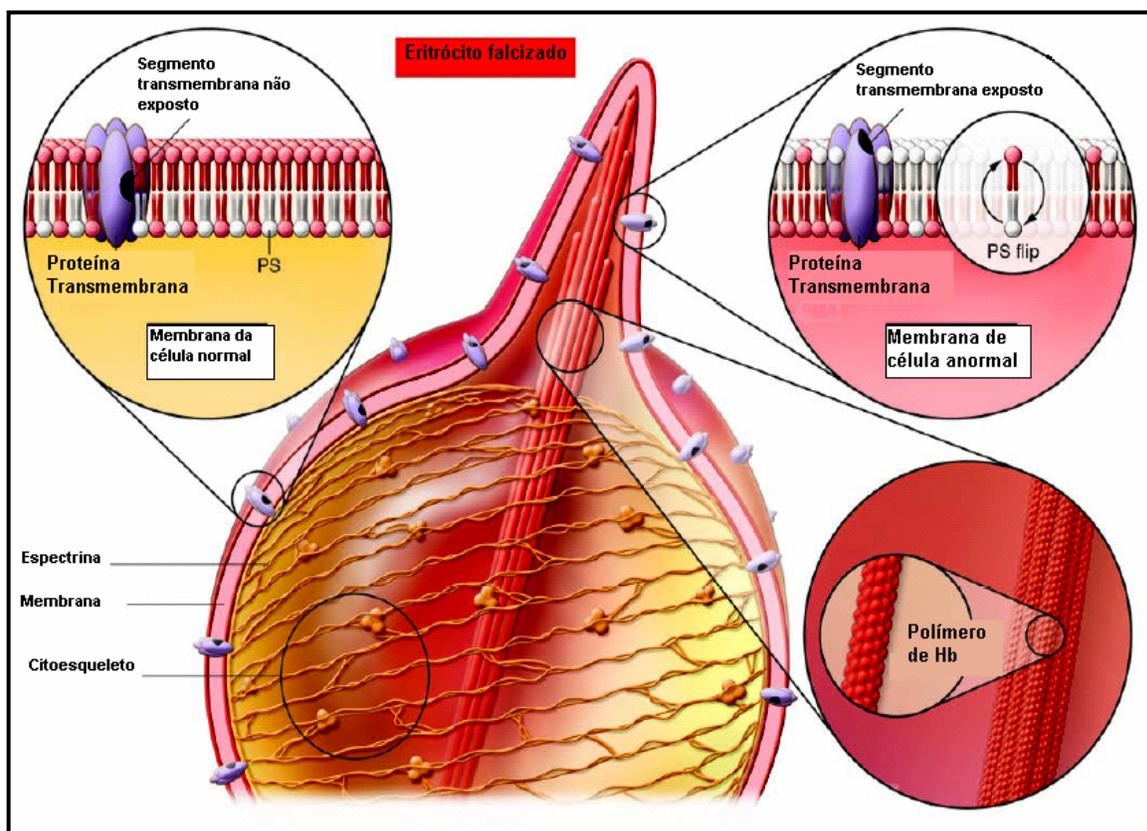
A Hb S é originada por mutação no gene beta da globina, produzindo alteração estrutural na molécula. Há a substituição do ácido glutâmico na posição seis da cadeia por uma valina (GAG > GTG). Essa troca resulta em mobilidade eletroforética mais lenta da Hb S quando comparada com a Hb A em eletroforese pH alcalino. Em situação de baixa tensão de oxigênio ou por alguma alteração de pH, a Hb S se polimeriza (Figura 2), o eritrócito adquire a forma de “foice” e torna-se rígido, sem elasticidade. As características do homozigoto só serão percebidas após os seis meses de idade (WEATHERALL; CLEGG, 2001).

A doença das células falciformes é a mais comum das alterações hematológicas hereditárias conhecidas no homem. Sua distribuição é ampla, abrangendo todos os continentes, notadamente África, América do Norte, América Latina e parte da Ásia. O termo Doença Falciforme determina um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio da Hb S que inclui a forma homozigota do gene  $\beta^S$  (Hb SS), as interações de Hb S com talassemias e a associação com outras variantes de hemoglobina. Os heterozigotos possuem concentrações variadas de Hb S, sendo considerados assintomáticos (NAOUM, 1997; FRENETTE; ATWEH, 2007).

A primeira descrição na literatura médica, feita por Herrick, J.B em 1910, de um caso clínico de anemia falciforme, deveu-se à observação de hemácias alongadas e em forma de foice no esfregaço sangüíneo (Figura 3) de um jovem negro, originário de Granada, Índias Ocidentais, estudante do *Chicago College of Dental Surgery*, admitido no *Prebysteriam Hospital* com anemia (NETO;PITOMBEIRA, 2003; FRENETTE; ATWEH, 2007).

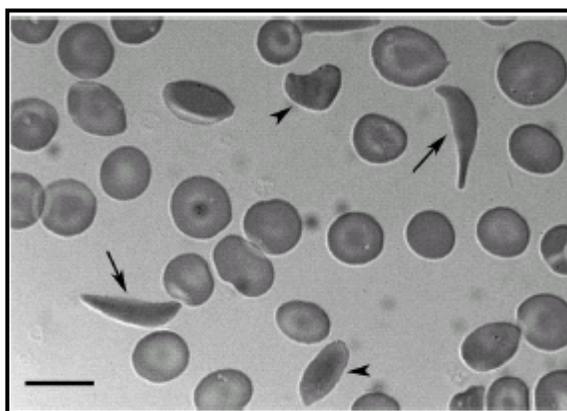
---

(\*) Disponível em <<http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>> Acesso em 26 de junho de 2007.



**Figura 2** – Alteração da membrana celular por polímeros de Hb S. Os polímeros rompem o citoesqueleto e formam uma saliência resultando em um desarranjo da bicamada de fosfolípidos causando a inversão da fosfatidilserina (PS) e exposição da proteína transmembrânica (modificado de FRENETTE; ATWEH, 2007).

(\*)



**Figura 3** – Esfregaço de sangue periférico de um paciente com doença falciforme, com presença de depranócitos (modificado de FRENETTE; ATWEH, 2007). (\*)

(\*) Disponíveis em <<http://pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=17404610>>  
Acesso em 22 de junho de 2007

No Brasil, a anemia falciforme tem significativa importância epidemiológica em virtude da prevalência, da morbidade e da mortalidade e, por isso, tem sido apontada como uma questão de saúde pública (BANDEIRA *et al.*, 2007). Segundo dados do Ministério da Saúde, pode-se estimar a existência de mais de dois milhões de pessoas portadoras do traço falciforme e mais de oito mil afetados com a forma homozigótica (Hb SS). Segundo o Programa de Triagem Neonatal (PTNT) (\*), nascem 3.500 crianças por ano com a doença falciforme e cerca de 200.000 com o traço falcêmico (BANDEIRA *et al.*, 2007).

As células falciformes são mais frágeis que os eritrócitos normais na corrente sanguínea e, por essa razão, vivem menos que o tempo médio de 120 dias. Os eritrócitos falcêmicos têm suas lesões intensificadas em uma relação direta com a concentração de Hb S intra-eritrocitária, sendo que em alguns casos, quando a concentração de Hb S é superior a 90%, a vida média dos eritrócitos é de aproximadamente 30 dias (NAOUM; NAOUM, 2004; FRENETTE; ATWEH, 2007).

A clínica da doença falciforme é muito variável, pois depende de fatores genéticos, sociais, culturais e ambientais. Três características geneticamente determinadas têm importância na gravidade da evolução clínica: as interações com a talassemia, os níveis de hemoglobina fetal (Hb F) e os haplótipos associados ao gene da Hb S (ZAGO, 2001).

As lesões celulares causadas por radicais livres derivados de espécies ativadas de oxigênio (O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e HO) estão associadas com a diminuição da sobrevivência do eritrócito em vários tipos de anemias hemolíticas, sejam de ordem adquirida, hereditária, induzida por drogas oxidantes ou metais pesados (NAOUM; NAOUM, 2004).

Qualquer situação patológica que aumente a geração de radicais superóxidos seja pela elevação de estresse oxidativo ou pelo desequilíbrio das defesas antioxidantes, acentuará a produção de espécies ativadas de oxigênio (NAOUM; NAOUM 2004).

### **1.3 - Hemocromatose Hereditária**

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença caracterizada pelo acúmulo de ferro (Fe) no organismo, frequente em descendentes de europeus. A primeira referência dessa patologia foi de 1865, na França, por Trousseau.

---

(\*) Disponíveis em <[http://200.214.130.38/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=24991&janela=2](http://200.214.130.38/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24991&janela=2)>

Após 25 anos, Von Recklinghausen, em 1889 na Alemanha, utilizou pioneiramente do termo “hemocromatose” descrevendo um distúrbio relacionado a problemas de estocagem e difusão de ferro. Apenas em 1935, foi caracterizada como uma doença hereditária gerada pelo excesso de ferro depositado nos tecidos (SHELDON, 1935; PIETRANGELO, 2006).

O ferro é o metal mais abundante na Terra, sendo freqüentemente encontrado na forma insolúvel ( $\text{Fe}^{+3}$ ). A capacidade de extrair elétrons torna o ferro fundamental para funções celulares, como síntese de DNA, transporte de oxigênio e respiração celular. Graves problemas são gerados quando esse metal está deficiente ou em excesso no organismo (PIETRANGELO, 2002).

O ferro é relativamente difícil de ser absorvido da dieta, e somente 10% do ferro ingerido é aproveitado pelo nosso organismo que corresponde a aproximadamente 1 mg. Em condições normais, o conteúdo de ferro no organismo humano é estável, podendo ser encontrado entre quatro e cinco gramas, com a prioridade de satisfazer a necessidade eritropoética de aproximadamente 20 mg por dia na incorporação pela Hb. A variação no estoque de ferro hepático é ampla e variável podendo ser de 300 mg durante o período menstrual, a até um grama em um homem adulto (PIETRANGELO, 2006). Assim, todo controle de absorção fêrrica é realizado pela superfície do lúmen duodenal, sendo necessária a atuação de um sistema metabólico eficiente, capaz de regular os níveis do metal, impedindo sua ação tóxica nos componentes celulares. O ferro é um metal hidrofílico polar e incapaz de atravessar membranas, por isso, sua entrada na célula é mediada por especializações do sistema de transporte, garantindo sua redução para um estado solúvel ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e favorecendo sua ligação a transportadores celulares (PIETRANGELO, 2002).

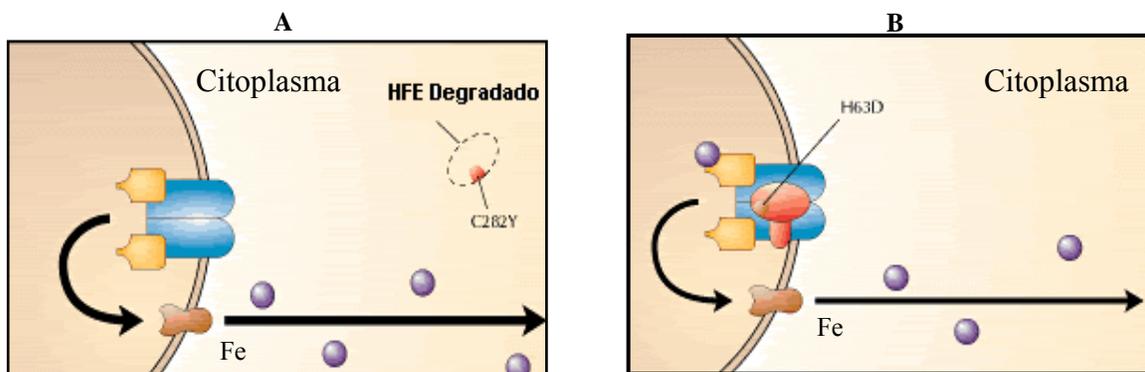
Pacientes com Hemocromatose apresentam estoques aumentados de ferro (25 a 30 g), em conseqüência da intensa absorção intestinal (LIMDI; CRAMPTON, 2004), mas, apesar desse mecanismo não estar ainda bem determinado, acredita-se que esse aumento seja provocado por um descontrole das células duodenais epiteliais em captar o metal mais avidamente (PIETRANGELO, 2004). A excreção do ferro é bem limitada, fazendo com que o organismo tenha dificuldade em excretar o excesso. (PIETRANGELO, 2006).

O ferro possui grande importância para o funcionamento celular, ativando uma série de reações químicas que resulta em radicais livres, os quais podem levar ao estresse oxidativo e dano celular, como pelo desequilíbrio da reação de Fenton e de Haber-Weiss. Lesões teciduais associadas a sangramentos também podem liberar Hb e ferro, favorecendo reações oxirredutoras (FRANCHINI; VENERI, 2005).

A HH provém de uma herança autossômica recessiva, e sua descoberta permitiu um grande avanço no entendimento dessa patologia. O gene *HFE* tem aproximadamente 10 Kb e sete éxons. Localiza-se no braço curto do cromossomo seis, próximo ao Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Codifica um Polipeptídeo de 343 resíduos de aminoácidos, a proteína HFE, que apresenta características histoquímicas semelhantes às proteínas de classe I do MHC. Duas mutações foram identificadas inicialmente no gene *HFE*, em pacientes caucasianos com HH: C282Y, na qual ocorre uma troca de guanina para adenina no nucleotídeo 845, que leva a substituição de uma cisteína por uma tirosina no aminoácido de posição 282; e H63D, a qual troca uma citosina para uma guanina no nucleotídeo 187 que resulta na substituição de uma histidina por um ácido aspártico na posição 63 do aminoácido (FEDER *et al.*, 1996).

A mutação C282Y gera uma proteína defeituosa que não permite a interação com a proteína plasmática acessória,  $\beta_2$  Microglobulina, responsável pelos mecanismos regulatórios do ferro no organismo. A mutação H63D produz uma proteína que diminui a afinidade por ligantes (Figura 4) (BITTENCOURT *et al.*, 2002).

A hemocromatose é uma doença multifatorial caracterizada pela progressão de uma anormalidade bioquímica para uma toxicidade nos órgãos. A alteração da proteína do gene *HFE* apresenta um papel essencial dentro desse processo, mas sua presença, somente, não é suficiente para explicar o amplo espectro das conseqüências metabólicas e patogênicas atribuídas para a doença. Dentro deste contexto, existem muitos fatores relacionados ao indivíduo (idade, gênero, genes modificados) ou adquiridos (dieta, álcool) exercendo um importante papel na penetrância desse defeito genético. O diagnóstico precoce da HH é essencial, pois o tratamento por flebotomia pode ser introduzido antes da instalação dos danos irreversíveis nos órgãos, podendo dar uma boa expectativa de vida ao paciente (PIETRANGELO, 2006).



**Figura 4** – Ilustração da absorção de Fe em consequência da herança dos polimorfismos C282Y (A) e H63D (B) Modificado de <http://home.vicnet.net.au/~johnlee/Hemo/genetic.htm>. (\*)

#### 1.4 - Glutathione S Transferase

A glutathione S transferase (GST) é uma família de proteínas que tem papel de detoxificação de eletrólitos exógenos e endógenos que podem alcalinizar o DNA e proteínas iniciando uma disfunção celular e toxicidade. GSTs também catalisam outras reações incluindo redução de hidroperóxido orgânico, com importante papel na proteção de tecidos frente ao estresse oxidativo e danos a ácidos nucleicos. Uma grande parte das GSTs demonstra uma família de genes que estão presentes em tecidos de mamíferos (SHARMA *et al.*, 2000).

As GST são divididas em quatro classes:  $\alpha$ (GSTA),  $\mu$ (GSTM),  $\pi$ (GSTP) e  $\theta$ (GSTT) (VICARI *et al.*, 2008). O gene *GSTM1* está localizado no cromossomo 1p13.3 e sua expressão da *GSTM1* tem sido descrita como de herança autossômica dominante. Este polimorfismo está envolvido na detoxificação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e outros mutágenos, 20% a 50% dos indivíduos não expressam a enzima, devido uma deleção completa (ROSSINI *et al.*, 2002).

(\*) Disponível em <<http://home.vicnet.net.au/~johnlee/Hemo/genetic.htm>>. Acesso em 26 de junho de 2007.

O gene *GSTT1* está localizado no cromossomo 22, assim como no caso da *GSTM1*, devido a deleções completas, 20% a 60% dos indivíduos não expressam a enzima por ele codificada. Este polimorfismo atua na variação da enzima na catalização de halometanos em eritrócitos humanos (ROSSINI *et al.*, 2002). O genótipo *GSTT1* nulo é outro polimorfismo comum, cuja falta da enzima é um fator de risco para carcinoma basocelular. Indivíduos com ambos os genótipos nulos *GSTM1* e *GSTT1* são particularmente predispostos a carcinogênese (LANDI, 2000).

A GSTP1 é expressa em grande quantidade em todos os tecidos (ZUNTAR *et al.*, 2004). Seu polimorfismo foi descrito pela 1ª vez no cromossomo 11q13, e constataram uma transição do nucleotídeo 313 (A→G) no éxon 5 e 341 no éxon 6 (G→T), envolvendo a substituição de dois aminoácidos no sítio de atividade da enzima (Ile → Val e Val → Ala). Essa variação alélica parece reduzir a atividade de GSTP1 em muitos tecidos, juntamente com a capacidade de inativar importantes carcinógenos, indicando o envolvimento dessa enzima na suscetibilidade para cânceres (HARRIES *et al.*, 1997; TANINGHER *et al.*).

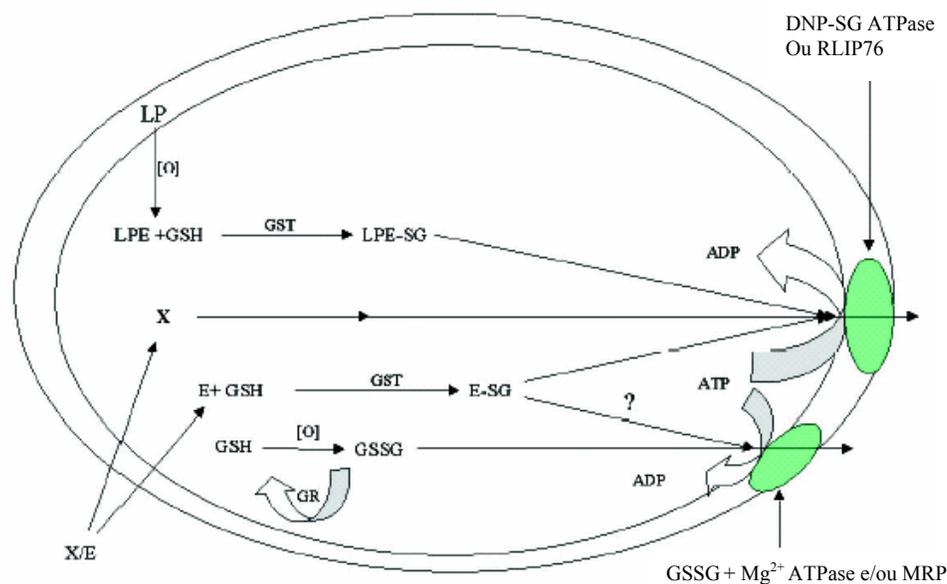
Vários compostos químicos necessitam de ativação metabólica para induzir seu efeito tóxico. Nessa reação talvez ocorram diferenças no metabolismo de enzimas, havendo uma suscetibilidade interindividual. A ativação metabólica é primeiramente mediada pela enzima citocromo P450 (CYP) envolvidas na fase I do processo de detoxificação. As CYPs aderem ao átomo de oxigênio, levando a formação de um epóxido ou cetona que, para produzirem seu efeito, podem reativar enzimas de fase II, como as GSTs para excreção na urina, ou como macromoléculas celulares incluindo DNA, RNA e proteínas (SHARMA *et al.*, 2000).

A glutathiona (GSH, L-y-glutamyl-L-cistenylicina), tripeptídeo contendo cisteína, é o tiol não protéico mais abundante na célula. O núcleo do resíduo cistenylicina da glutathiona possui função antioxidante, age mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS•, que produz, por dimerização o GSSH (glutathiona oxidada). A GSSH é, então, reduzida pela glutathiona redutase (GR), regenerando o GSH, num processo às custas de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). A disponibilidade limitada de NADPH pode levar ao aumento de GSSG e tornar as células

mais sensíveis ao dano oxidativo (KRETZCHMAR, 1996). O processo pelo qual a glutathiona detoxifica hidroperóxidos pode ser assim representado:



Portanto, a GSH atua de maneira importante na proteção celular frente ao quadro oxidativo e defesa contra xenobióticos. Entre as funções da GSH, relacionadas ao combate à peroxidação lipídica, podem ocorrer três reações. a GSH pode ser usada como substrato pela glutathiona peroxidase (GPX) na eliminação de peróxidos; a forma oxidada da vitamina C que, assim, pode atuar, mantendo a vitamina E na sua forma reduzida e funcional e pode, pela GST, detoxificar aldeídos reativos (como o malondialdeído) que são gerados durante a peroxidação lipídica. Se, de fato, grande parte da ação de GSH é obtida pela indução de suas enzimas, é necessária a manutenção do nível de GSH para suportar a ação funcional destas enzimas. Variações nos níveis de glutathiona afetam diretamente a síntese de proteínas e DNA (KRETZCHMAR, 1996). A Figura 5 ilustra a ação das GST sobre a peroxidação lipídica e xenobióticos.



**Figura 5:** Representação esquemática da ação das GST na peroxidação lipídica e xenobióticos. (\*)

Legendas: X – xenobióticos não eletrofilicos; E – xenobióticos eletrofilicos; O – oxidação; LP – lipídeos de membrana; LPE – produtos da peroxidação lipídica, -sg - xenobióticos eletrofilicos conjugados; GSH – Glutathiona; GSSG – Glutathiona oxidada; GR – Glutathiona reduzida; GST – Glutathiona S- transferase

(\*) Disponível em <[http://www.actabp.pl/pdf/3\\_2000/751.pdf](http://www.actabp.pl/pdf/3_2000/751.pdf)>. Acesso em 26 de junho de 2007

### **1.5 – Dano oxidativo à hemácia falcizada**

Um dos fatores que predispõe o processo hemolítico das células falciformes induzindo-o às múltiplas conseqüências patológicas da doença falciforme deve-se à degradação oxidativa da Hb S (STEINBERG, 1998; SOUZA, 1999).

Com a desoxigenação, a afinidade ao oxigênio pela Hb S reduz e, dessa forma, qualquer fator que estabilize o estado desoxi reduzirá a afinidade pelo oxigênio, perpetuando este estado e a polimerização, como por exemplo, a diminuição do pH (via efeito Bohr) e o aumento da concentração de 2,3 bifosfoglicerato (2,3 BPG) (BEUTLER, 1983; FRENETTE; ATWEH, 2007).

A desoxigenação da Hb S favorece a sua metahemoglobinização (meta-Hb S) e a conseqüente elevação desse pigmento dentro do eritrócito. Quando a concentração de meta-Hb S supera a ação da enzima meta-Hb redutase, é desencadeada a degradação da meta-Hb S, com formação de hemicromos ou subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina S, oxidada sob forma de corpos de Heinz (WINTERBOURN, 1990; NAOUM, 1996).

Durante a transformação do eritrócito discóide com Hb S em eritrócito falcizado, entre os eventos bioquímicos e polimerizantes da célula, ocorre à degradação oxidativa da Hb S, com liberação de espécies ativadas de oxigênio ( $O_2^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\bullet}$ ) alteram a distribuição das moléculas de imunoglobulinas G (IgG) na superfície da membrana eritrocitária. As alterações de membrana resultantes da polimerização, levam à falha parcial da bomba de sódio/potássio/APTase, com conseqüente perda de potássio e água pela hemácia, aumentando a concentração de Hb S e favorecendo a polimerização. Ocorre ainda, aumento da concentração de cálcio intracelular por alteração da bomba de cálcio/APTase e aumento da permeabilidade da membrana a esse íon (NAGEL *et al.*, 1991; MORRIS; RUCKNAGEL; JOINER, 1993; NAOUM, 1997).

As disposições desordenadas das proteínas transmembrânica e fosfatidilserina, em determinadas regiões da célula falciforme, facilitam as ligações das IgG com os receptores Fc das células endoteliais e, dessa forma, induzem a ação fagocitária dos macrófagos no sistema retículo endotelial, causando hemólise e anemia (SOUZA, 1999).

## 1-6 - Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica ocorre em ácidos graxos polinsaturados e é iniciada por um radical OH que captura um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia polialquil do ácido graxo. O fato do oxigênio ser sete a oito vezes mais solúvel em meio não polar do que no polar, permite que as membranas biológicas tenham uma elevada concentração de oxigênio na região hidrofóbica medial, com potencial para realizar o maior dano aos ácidos graxos polinsaturados da membrana, isto é, a esta é mais suscetível à desestruturação provocada pela peroxidação lipídica. Assim, um ácido graxo, com um elétron desemparelhado, reage com oxigênio gerando um radical peroxil. Este produto é altamente reativo e pode ser combinado com outros radicais semelhantes, alterando as proteínas de membrana (GATÉ *et al.*, 1999). Um dos produtos da peroxidação lipídica da membrana é o malondialdeído, um dialdeído altamente reativo, que eventualmente reage com o amino, grupo de proteínas, fosfolípidios ou ácidos nucleicos, induzindo modificações estruturais das moléculas biológicas (MC BRIDE; KRAEMER, 1999).

As principais conseqüências da lipoperoxidação da membrana são: alteração da permeabilidade, alteração do transporte de substâncias orgânicas e inorgânicas, alteração da bomba de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> e ATPase; danos ao DNA e morte celular (NAOUM; NAOUM, 2004).

Tendo como base o possível efeito citotóxico da mutação no gene da globina  $\beta^S$  (Hb S) relatados na literatura e dos efeitos tóxicos do acúmulo de ferro, avaliamos a influência dos polimorfismos dos genes *HFE* e *GSTs* na peroxidação lipídica dos portadores dessa alteração de hemoglobina e sua relação com o aumento da destruição eritrocitária e geração de estresse oxidativo.

## **Objetivos**

## **2 – Objetivos**

### **2.1 - Objetivo geral**

Avaliar a influência dos defeitos genéticos concomitantes em indivíduos portadores de Hb S em homozigose e heterozigose na capacidade antioxidante total e peroxidação lipídica e comparar estes com o grupo controle.

### **2.2 - Objetivos específicos**

Nos indivíduos ou pacientes portadores de Hb S e controles:

- avaliar a frequência de mutantes no gene *HFE*.
- avaliar a frequência do polimorfismo de *GST*.
- analisar a capacidade antioxidante e a peroxidação lipídica pelos métodos de capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox e dosagem do malondialdeído respectivamente.

## **Material e Método**

### 3 - Material e Método

#### 3.1 - Casuística

Foram analisadas 446 amostras de sangue de indivíduos doadores e de pacientes, que foram colhidas por punção venosa, em tubos com EDTA 5% para triagem de hemoglobinopatias e biologia molecular, e em tubos com heparina para testes bioquímicos, após assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Um questionário foi aplicado para avaliação de interferentes ambientais (Anexo I). Os indivíduos incluídos na casuística foram provenientes do Hemocentro de São José do Rio Preto - SP, Unesp/Ibilce – Campus de São José do Rio Preto - SP, Hospital Apoio de Brasília – DF e Hemocentro da Santa Casa de São Paulo – SP.

Os portadores do traço falciforme, foram detectados no Hemocentro de São José do Rio Preto e sua Hb anormal confirmado por biologia molecular no, Lhgdh-Unesp. Com o intuito de analisar a influência dos polimorfismos de GSTs e estresse oxidativo nos indivíduos com Hb AS, com e sem a co-herança dos mutantes C282Y e H63D no gene *HFE*, identificamos os polimorfismos desse gene *HFE* em todos os portadores do traço falcêmico, que já estavam cadastrados em nosso banco de dados. Assim, obtivemos 45 amostras com os polimorfismos do gene *HFE* e 173 sem esses polimorfismos. Analisamos para os polimorfismos de *GSTs*, todos os portadores com Hb AS e para as mutações no gene *HFE*. Devido à importância destas co-heranças, convocamos todos os portadores de Hb AS para uma segunda coleta, na qual analisamos o estresse oxidativo nessas amostras. Responderam à convocação 21 portadores de Hb AS com o polimorfismo no gene *HFE* e 19 portadores de Hb AS sem o polimorfismo no gene *HFE*.

Para as análises relacionadas com os Doentes Falciformes realizamos coletas utilizando dois tubos, um contendo EDTA e; outro Heparina ambos os procedimentos foram realizados na mesma data, totalizando 86 amostras para todas as etapas, exceto em três delas, não foi possível colher o tubo com heparina.

No grupo controle, foram analisados 142 amostras, sendo que, 22 indivíduos foram excluídos na primeira etapa, pois apresentaram resultados discordantes do padrão normal de Hemoglobinas (Hb AA), entre eles um portador de Hb F acima de 1,0%, dois portadores de

beta talassemia e seis com Hb A<sub>2</sub> diminuída. Foram excluídas também 13 amostras de sangue que apresentaram problemas na extração de DNA, totalizando 120 amostras utilizadas na Etapa I. Na segunda etapa, das 120 amostras, apenas 98 apresentaram resultados na amplificação para os polimorfismos de GSTs. Com a necessidade de uma segunda coleta em tubos contendo heparina, para as dosagens bioquímicas, nove indivíduos foram excluídos do grupo dos 98, pois não realizaram a segunda coleta, sendo assim, para a Etapa III utilizamos 89 amostras.

Os grupos de trabalho foram estabelecidos da seguinte forma:

Etapa I: Análise da frequência dos polimorfismos C282Y e H63D do gene *HFE*.

Grupo A) Portadores de traço falciforme (n = 218)

Grupo B) Portadores de Doença Falciforme (n = 86)

Grupo C) Grupo controle – Hb AA (n = 142)

Etapa II: Análise dos Polimorfismos para *GSTs*

Grupo A) Portadores de traço falciforme (n = 61)

Grupo B) Portadores de Doença Falciforme (n = 86)

Grupo C) Grupo controle – Hb AA (n = 98)

Etapa III: Análise da peroxidação lipídica (MDA) e capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC)

Grupo A) Portadores de traço falciforme (n = 40)

Grupo B) Portadores de Doença Falciforme (n = 83)

Grupo C) Grupo controle – Hb AA (n = 89)

Os grupos de trabalho, anteriormente descritos, os polimorfismos avaliados e as quantificações de MDA e TEAC, como resultados, estão apresentados nos Anexos II.

### **3.2 - Considerações Éticas**

A população do estudo foi composta por doadores de sangue e pacientes, de ambos os gêneros, do Hemocentro de São José do Rio Preto, Hemocentro da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Hospital Apoio de Brasília e por alunos da Unesp/Ibilce.

Na pesquisa foram incluídos doadores com idade entre 18 e 65 anos, sem distinção de etnia, com aspecto físico saudável, hematócrito mínimo de 38% (para mulheres) ou 40% (para homens) e máximo de 55%, critérios estes incluídos nos procedimentos de seleção de doadores de sangue do Hemocentro. Os pacientes com doença falciforme foram selecionados entre os atendidos nos ambulatórios dos hemocentros descritos acima e do Hospital Apoio de Brasília.

Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, em cumprimento à Resolução CNS 196/96, os participantes da pesquisa responderam um questionário, para a nossa avaliação dos fatores que pudessem interferir no estresse oxidativo. Os sujeitos da pesquisa ficaram expostos somente a um risco considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de hematoma no local da punção. Todas as informações fornecidas pelos sujeitos da pesquisa e os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram mantidos em sigilo, sendo que estes últimos, só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Amostras de DNA armazenadas no Lhgdh - Unesp para estudos posteriores com outros marcadores genéticos, após obtenção de novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido obtido pelo pesquisador, segundo a Resolução CNS 134/05.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), e desenvolvido obedecendo aos princípios éticos estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), sob protocolo número 0007.0.229.140-05.

### **3.3 - Métodos**

Foram separados de acordo com os polimorfismos avaliados e os protocolos encontram-se no Apêndice.

#### **3.3.1 Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias:**

##### **Preparação de hemolisados:**

###### *Fundamento:*

As células foram lisadas com saponina para obtenção da solução de Hb, para que as amostras fossem submetidas aos procedimentos eletroforéticos.

**Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36 % (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)***Fundamento:*

Técnica utilizada para detectar talassemias do tipo beta, principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e em outras hemoglobinopatias, como nos heterozigotos para Hb C.

**Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)***Fundamento:*

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados no microscópio de luz, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos.

**Eletroforese em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965)***Fundamento:*

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

**Eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968)***Fundamento:*

Técnica utilizada para diferenciar alguns tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino e caracterização semi-quantitativa de Hb Fetal.

**Cromatografia líquida de alta performance (INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, 1994)***Fundamento:*

Cromatografia de troca catiônica em que moléculas com cargas positivas são adsorvidas em uma fase estacionária da coluna cromatográfica, seguida por eluições induzidas pela passagem de um líquido com alta concentração de cátions. O eluato é

detectado opticamente e quantificado computando a área do gráfico correspondente à fração eluída.

### **3.3.2 – Dosagens Bioquímicas:**

#### **Dosagem do Malondialdeído (MDA) (PERCÁRIO *et al.*, 2004).**

##### *Fundamento:*

O método foi baseado na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar o complexo MDA-TBA, de cor rósea e absorção máxima de 535 nm.

#### **Dosagem da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (Re *et al.*, 1999).**

##### *Fundamento:*

A presente dosagem objetiva a capacidade anti-oxidante total de amostras biológicas. O potencial anti-oxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente anti-oxidante conhecido, o trolox, análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Trata-se de uma técnica calorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínaácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), produzindo diretamente o radical cation ABTS•<sup>+</sup>, cromóforo de coloração verde/azul, com absorbância máxima nos comprimentos de onda de 734nm.

### **3.3.3 Metodologias moleculares para análise dos polimorfismos**

#### **Extração de Sangue Periférico (PENA *et al.*, 1991)**

##### *Fundamento:*

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de sangue total. Os tampões de lise rompem os eritrócito e glóbulos brancos. O fenol utilizado para a remoção de proteínas e enzimas contaminantes. O DNA precipitado com etanol.

## **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

### *Fundamento:*

A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares, sob a ação da enzima DNA polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde.

## **PCR – AE para Hb S**

### *Fundamento:*

Para o polimorfismo de Hb S, o DNA amplificado a partir de duas misturas. Está metodologia utiliza três iniciadores para cada mistura, o primeiro utiliza-se o par de iniciadores específicos (B5`a e B5`b) para o trecho de interesse e o iniciador específico onde ocorre a mutação (BS) e a segunda mistura utiliza-se o iniciador específico (BA) para o alelo normal em seguida a visualização dos produtos de amplificação foi realizado gel de agarose 1,5%, em corrida de 80 Volt (V) por 30 minutos, corados com brometo de etídio 0,2% e visualizados em luz ultravioleta (UV).

## **PCR-RFLP para Hb S**

### *Fundamento:*

O DNA foi amplificado com iniciadores específicos (P277 e P278) para a Hb S e seguido de digestão enzimática com *Dde* I. Para a verificação dos produtos de amplificação foi realizado gel de agarose 1,5%, em corrida de 80 V por 30 minutos, corados com brometo de etídio 0,2% e visualizados em UV.

## **PCR-RFLP para análise do polimorfismo do gene *HFE***

### *Fundamento:*

A pesquisa dos polimorfismos C282Y e H63D realizada por meio da técnica de PCR-RFLP, modificada (LYNAS, 1997) e a digestão enzimática dos produtos amplificados obtida com a utilização das enzimas *Bcl* I, para o polimorfismo H63D e *Rsa* I para o polimorfismo C282Y. A análise dos produtos de amplificação e digestão foi realizada em

gel de agarose 2%, em corrida de 80 V por 30 minutos, corados com brometo de etídio 0,2% e visualizados em luz UV.

### **PCR – RFLP para o polimorfismo *GSTP1***

#### *Fundamento:*

Amplificação do DNA por PCR e análise do polimorfismo de *GSTP1* por RFLP, com a enzima de restrição *Bsm*I, isômero da enzima *Alw* 26I. Análise foi realizada nos fragmentos de DNA, obtida pela ação das enzimas de restrição, por eletroforese em gel de poli(acrilamida) 6% não desnaturado, sob corrente constante de 120 V, por 45 minutos. Após a eletroforese, o gel será corado com brometo de etídio (0,2 mg/L) por 10 minutos e os fragmentos de DNA visualizados sob iluminação ultravioleta.

### **PCR – MULTIPLEX para os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1***

#### *Fundamento:*

A pesquisa dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada por meio da técnica de PCR-MULTIPLEX, os segmentos são amplificados a partir dos iniciadores específicos e necessitam de uma banda controle, gerada pela amplificação do gene *CYP 1*. Para verificação dos produtos de amplificação foi realizado gel de agarose 1,5%, em corrida de 80 V por 45 minutos, corados com brometo de etídio 0,2% e visualizados em UV, sendo assim identificada pela presença ou ausência dos alelos (genótipo nulo).

#### **3.3.4 – Análise estatística**

Para os resultados foram utilizados testes estatísticos descritivos e inferenciais. Nas análises inferenciais, os dados foram testados quanto à normalidade e homocedasticidade. Quando as condições de normalidade e homocedasticidade foram satisfeitas, aplicamos os testes paramétricos, ANOVA - complementada por Tukey, para comparar três ou mais grupos, e Teste t em dois grupos. Quando os dados foram não paramétricos, mesmo após transformação de valores, utilizamos os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis complementado por Dunn, para comparar três ou mais grupos e Mann-Whitney para dois grupos (ZAR, 1999). Todos os testes estatísticos foram realizados pela ferramenta BioEstat 3.0.

## **Resultados**

#### 4- Resultados

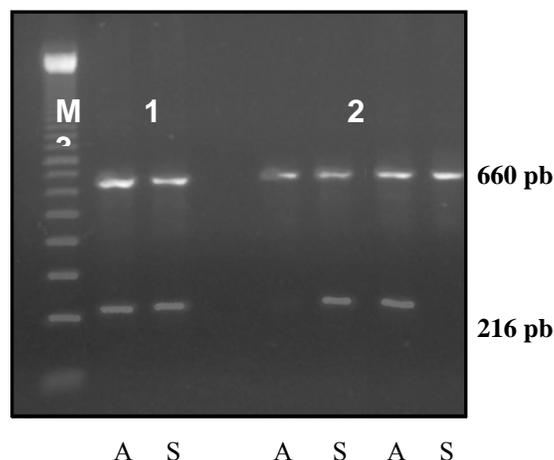
A separação dos grupos de trabalho foi realizada após a triagem das amostras pelas metodologias clássicas, para o diagnóstico de hemoglobinopatias, sendo o conjunto dividido em três grupos:

Grupo A: Traço falciforme (n = 218)

Grupo B: Portadores de Doença falciforme (n = 86)

Grupo C: Grupo Controle – Hb AA (n = 120)

Como o objetivo geral do trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante em portadores de Hb S e mutantes no gene *HFE*, realizou-se a confirmação da presença da Hb S por PCR-AE (Figura 6) e/ou PCR-RFLP. A frequência dos polimorfismos de C282Y e H63D no gene *HFE*, consistiu a primeira etapa do trabalho, para definição dos indivíduos a serem avaliados. Ainda nessa definição avaliou-se os polimorfismos de GST (Etapa II), para então estabelecer os grupos a serem avaliados quanto a peroxidação lipídica (MDA) e capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC) – Etapa III.



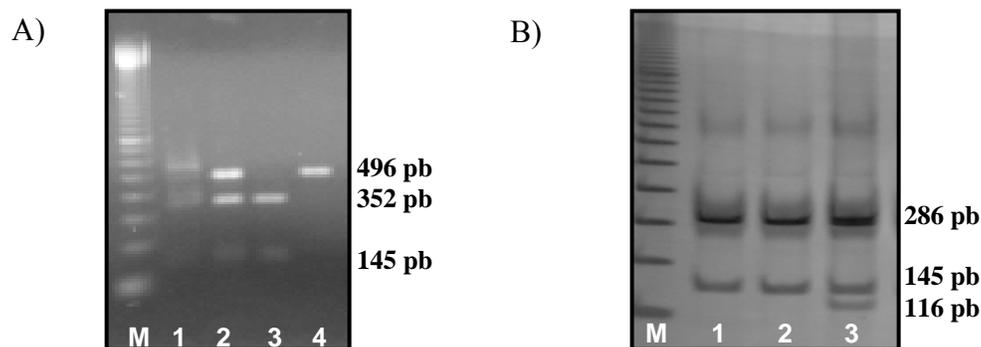
**Figura 6:** Foto de gel de agarose a 1.5%, com iluminação UV.

PCR-AE para Hb S. 1- heterozigoto para mutação Hb S; 2- homozigoto para a mutação Hb S; 3- Ausência da mutação para Hb S.

Marcador - M – P.M 100pb; A – mix para o alelo da Hb A; S – mix para o alelo da Hb S

### Etapa I – Análise da frequência dos polimorfismos C282Y e H63D do gene *HFE*

A presença dos mutantes C282Y e H63D foi avaliada nos três grupos de trabalho, por PCR-RFLP (Figura 7).



**Figura 7:** A) Foto de gel de agarose 1,5% para identificação da mutação H63D. Marcador (M); 1 e 2- heterozigotos para H63D; 3- ausência de mutação; 4- homozigoto para H63D. B) Foto de gel de poliacrilamida 8% para identificação da mutação C282Y. 1 e 2- ausência de mutação; 3- heterozigoto para C282Y.

No grupo A foram encontradas 45 amostras (20.6%), com presença das mutações analisadas para o gene *HFE*, sendo 39 (17.8%) na forma heterozigota e três (1.40%) na forma homozigota para a mutação H63D; para a mutação C282Y, duas (0.9%) amostras foram heterozigotas e uma (0.5%) amostra foi heterozigota para ambas mutações.

No grupo B, foram encontradas 18 (20.9%) amostras com alteração no gene *HFE*, sendo 15 (17.4%) heterozigotas para a mutação H63D e três (3.5%) heterozigotas para a mutação C282Y.

No grupo C, foram detectados 34 (28,3%) portadores de polimorfismos no gene *HFE*, sendo 28 (23.3%) de heterozigotos e um (0.8%) homozigoto para a mutação H63D; três (2.5%) heterozigotos para a mutação C282Y e dois (1.7%) duplo heterozigotos. Os resultados descritos acima estão resumidos na Tabela 1, e a Figura 8 ilustra essa distribuição entre os grupos avaliados.

**Tabela 1:** Frequências genotípica, absoluta e relativa, para os polimorfismos (C282Y e H63D) do gene *HFE* nos grupos A, B e C.

Grupos de Estudo	C282Y/WT n (%)	H63D/H63D n (%)	H63D/WT n (%)	H63D/C282Y n (%)	WT/WT n (%)	Total n (%)
A	2 (0.9)	3 (1.4)	39 (17.8)	1 (0.5)	173 (79.4)	218 (100)
B	3 (3.5)	—	15 (17.4)	—	68 (79.1)	86 (100)
C	3 (2.5)	1 (0.8)	28 (23.3)	2 (1.7)	86 (71.7)	120 (100)

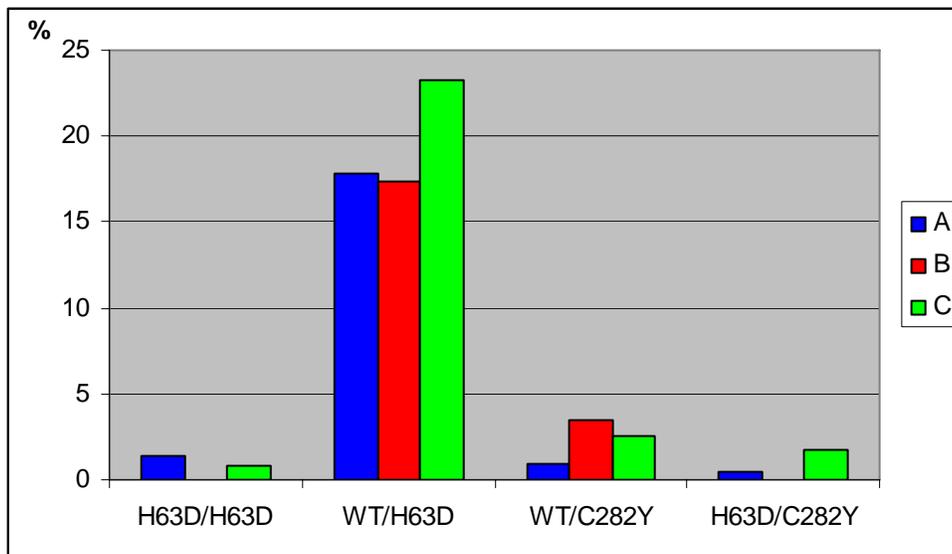
Legenda: WT = alelo selvagem.

n = número de amostras

A frequência alélica para as mutações H63D e C282Y do gene *HFE* nas amostras com traço falciforme foi de 10.5% e 0.7%, respectivamente; nos portadores de doença falciforme foi de 8.7% e 1.7% e a frequência alélica nas amostras com Hb normais foi de 13.3% e 2.1%, respectivamente, conforme se observa na Tabela 2.

**Tabela 2** – Frequência alélica das mutações C282Y e H63D do gene *HFE* em indivíduos do grupo A,B e C.

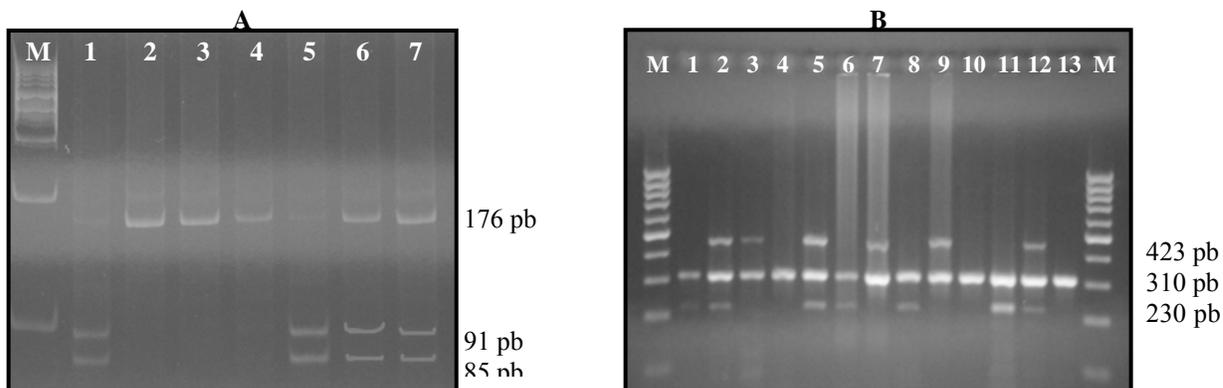
Grupos de Estudo	Mutação do gene <i>HFE</i>	n	Número de alelos estudados	Número de alelos mutantes	Frequência alélica (%)
A	H63D	218	436	46	10.5
	C282Y	218	436	3	0.7
B	H63D	86	172	15	8.7
	C282Y	86	172	3	1.7
C	H63D	120	240	32	13.3
	C282Y	120	240	5	2.1



**Figura 8:** Representação da frequência genotípica dos polimorfismos no gene *HFE* para os três grupos avaliados.

## Etapa II – Análise dos polimorfismos para os genes *GSTs*

A presença dos polimorfismos *GSTP1* e *GSTM/T* foram avaliadas nos três grupos de trabalho, por PCR-RFLP e PCR- Multiplex, conforme ilustra a Figura 9.



**Figura 9:** **A)** Foto de gel de poliacrilamida 6% para *GSTP1* – 1 e 5 – V/V; 2, 3 e 4 – I/I; 6 e 7 – I/V. **B)** Foto de gel de agarose 1,5% para *GSTM/T* – 1, 6, 8 e 11 – M/M; 2, 5 e 12 – M/T; 3, 7 e 9 – T/T; 4, 10 e 13 – Nulo. M – Marcador de peso molecular (100 pb)

Para as análises da frequência dos polimorfismos de *GSTs*, no grupo A, foram analisados 61 amostras com e sem a mutação no gene *HFE*. Destas 42 amostras com alguma das mutações e 19 sem mutações no gene *HFE*.

No grupo B, todas as amostras foram triadas para *GSTs*. No grupo C, com 120 amostras avaliadas para o gene *HFE*, foram analisadas 98 amostras para os genes *GSTM1* e *GSTT1* e 96 para o gene *GSTP1*. A diferença de amostras nesse grupo foi devido a não amplificação de algumas amostras para esses polimorfismos.

Assim, nessa etapa os grupos analisados ficaram estabelecidos como:

Grupo A: 61 amostras

Grupo B: 86 amostras

Grupo C: 98 amostras

No grupo A, os polimorfismos de *GSTM/T* foram presentes em 18 (29.5%) amostras para o genótipo M/T; para a presença do genótipo T/T 20 (32.8%) amostras; o genótipo M/M foi identificado em seis (9.3%) amostras e em 17 (27.9%) o genótipo foi nulo.

No grupo B foram encontradas 25 (29%) amostras com a presença dos alelos M/T; 16 (18.6%) apresentaram o genótipo T/T; 33 (38.4%) para os genótipos M/M e para o genótipo nulo foram encontrados 12 (14%) amostras.

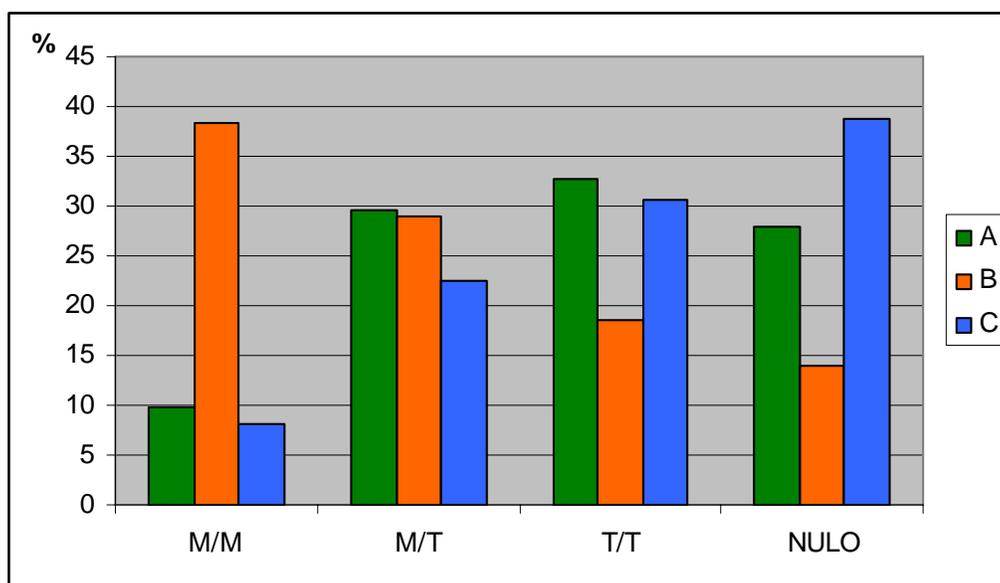
No grupo C, os polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* foram encontrados em 22 (22.5%) amostras com a presença do genótipo M/T, 30 (30.6%) com o alelo T; 8 (8.2%) com o alelo M e 38 (38.7%) com o genótipo nulo para ambos os polimorfismos. Os resultados das frequências desses genótipos, nos três grupos avaliados, estão representados na Tabela 3 e podem ser visualizados na Figura 10.

A frequência alélica para as mutações M e T do gene *GST* nas amostras com o traço falciforme foi de 24.5% e 47.5% respectivamente. Para o polimorfismo de *GSTM/T* nas amostras com doença falciforme foi de 52.9% para M e 33.1% para T. A frequência alélica no grupo C, para as mutações M e T do gene *GSTM/T*, foi de 19.4% e 41.8%, respectivamente, conforme se observa na Tabela 4.

**Tabela 3:** Frequência genotípica dos polimorfismos de GST nos para os alelos *GSTM1* e *GSTT1*.

Grupos de Estudo	M/M N (%)	M/T N (%)	T/T N (%)	NULO N (%)	Total N (%)
A	6 (9.8)	18 (29.5)	20 (32.8)	17 (27.9)	61 (100)
B	33 (38.4)	25 (29)	16 (18.6)	12 (14)	86 (100)
C	8 (8.2)	22 (22.5)	30 (30.6)	38 (38.7)	98 (100)

Legenda: M/M= presença do alelo para *GSTM1* e ausência de alelo para *GSTT1*; T/T= presença do alelo para *GSTT1* e ausência de alelo para *GSTM1*; M/T= presença dos alelos para *GSTM1* e *GSTT1*; NULO= ausência para os alelos de *GSTM1* e *GSTT1*.

**Figura 10:** Representação gráfica da frequência genotípica dos polimorfismos de GSTM/T nos grupos A, B e C.

**Tabela 4** – Frequência alélica das mutações M e T do gene *GSTM1* e *GSTT1* em amostras do grupo A, B e C.

Grupos de estudo	Mutação do gene GSTM/T	n	Número de alelos estudados	Número de alelos mutantes	Frequência alélica (%)
A	M	61	122	30	24.6
	T	61	122	58	47.5
B	M	86	172	91	52.9
	T	86	172	57	33.1
C	M	98	196	38	19.4
	T	98	196	82	41.8

Para a avaliação do polimorfismo de *GSTP1*, no grupo A, 26 (42.6%) amostras apresentaram o genótipo I/I, 27 (44.3%) o genótipo I/V e oito (13.1%) o genótipo V/V. No grupo B, o polimorfismo de *GSTP1* esteve presente em 32 (37.2%) amostras com o genótipo I/I, 39 (45.4%) com o genótipo I/V e 15 (17.4%) com o genótipo V/V. No grupo C, 44 (45.8%) amostras foram I/I, 43 (44.8%) obtiveram o genótipo I/V, e nove (9.4) amostras foram V/V, conforme a Tabela 5 e ilustrados na Figura 11.

**Tabela 5:** Frequência para o polimorfismo *GSTP1* nos grupos avaliados.

Grupos de estudo	I/I N (%)	I/V N (%)	V/V N (%)	Total N (%)
A	26 (42.6)	27 (44.3)	8 (13.1)	61 (100)
B	32 (37.2)	39 (45.4)	15 (17.4)	86 (100)
C	44 (45.8)	43 (44.8)	9 (9.4)	96 (100)

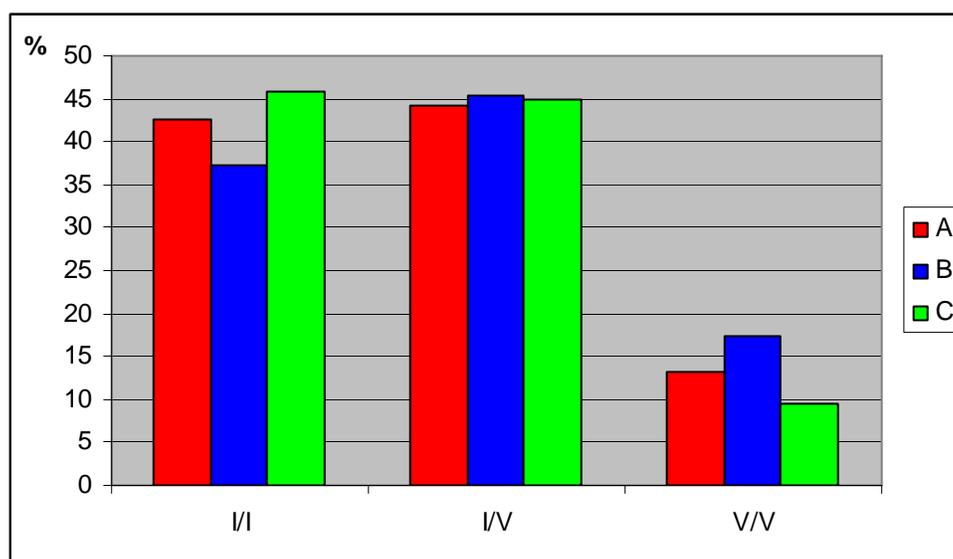
Legenda: I/I= presença dos alelos isoleucina (homozigoto selvagem); I/V= presença do alelo isoleucina e alelo valina (heterozigoto); V/V= presença dos alelos valina (homozigoto mutante).

A frequência alélica para o polimorfismo de *GSTP*, nas amostras com o traço falciforme, foi de 64.7% para o alelo normal (I) e 35.2% para o alelo mutante (V). No

grupo B, foi de 59.8% para o alelo normal (I) e de 40.1% para o alelo mutante (V) e a frequência alélica para o polimorfismo de GSTP, no grupo C, foi de 68.2% para o alelo normal (I) e de 31.8% para o alelo mutante (V) como descrito na Tabela 6.

**Tabela 6** – Frequência alélica do polimorfismo de GSTP1 nas amostras dos grupos A, B e C.

Grupos de Estudo	Mutação do gene GSTP	n	Número de alelos estudados	Número de alelos mutantes	Frequência alélica (%)
A	I	61	122	79	64.7
	V	61	122	43	35.2
B	I	86	172	103	59.8
	V	86	172	69	40.1
C	I	96	192	131	68.2
	V	96	192	61	31.8



**Figura 11:** Representação gráfica da frequência genotípica do polimorfismo de GSTP1 nos grupos A, B e C.

### **Etapa III – Análise da peroxidação lipídica (MDA) e capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC)**

Somente os indivíduos que retornaram para a segunda coleta de amostras, após convocação, foram incluídos nessa etapa. Nas amostras colhidas apenas com o anticoagulante EDTA não foi possível realizar os testes, por causa da interferência nos

resultados. Para o grupo A as dosagens foram realizadas em 40 amostras; para o grupo B em 83 amostras e para o grupo C em 89 amostras.

Nos resultados obtidos para esses grupos foram utilizados testes estatísticos para definir os valores de média, desvio padrão e valores mínimo e máximo. Para o grupo A, a média foi de 294.5 ng/mL; para o grupo B média de 666.5 ng/mL e para o grupo C, a de 277.7 ng/mL para a análise da peroxidação lipídica.

Para o teste do TEAC observamos no grupo A a média de 2.14 mM/L; no grupo B de 2.1 mM/L e no grupo C, a média de 2.07 mM/L. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 7 e ilustrados nas Figuras 12 e 13. A média obtida nos valores de TEAC para o grupo C foi utilizada como valor de referência para as comparações estatísticas realizadas com os demais grupos.

**Tabela 7:** Estatística descritiva obtida para os valores de MDA e TEAC nos grupos A, B e C.

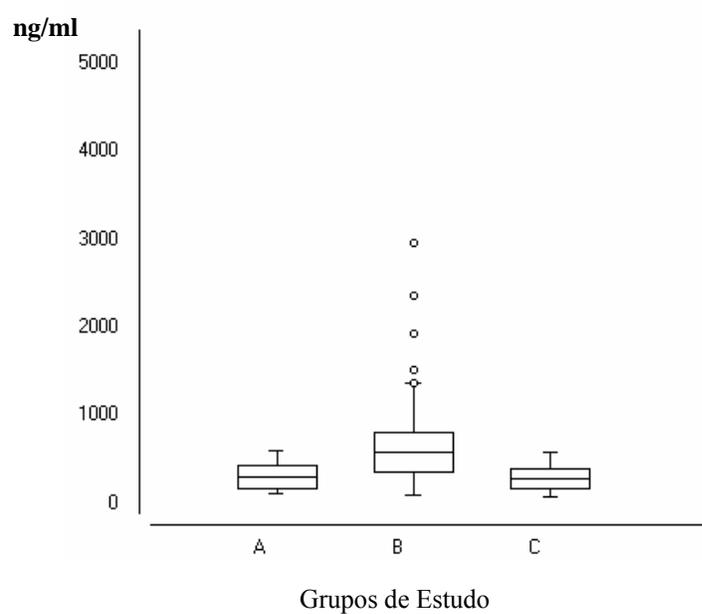
Grupos	MDA (ng/ml)			TEAC (mM/L)		
	A	B	C	A	B	C
Número de amostras	40	83	89	40	83	89
Valor mínimo	112	102	74	2.04	1.88	1.78
Valor máximo	600	2971	578	2.27	2.3	2.31
Mediana	284.4	585	279	2.15	2.12	2.08
Média	294.4	666.5	277.7	2.14	2.1	2.07
Desvio Padrão	127.6	432.1	108.3	0.04	0.09	0.11

\* Valor de referência: MDA = 440 ng/ml; TEAC = 2.07 mM/L

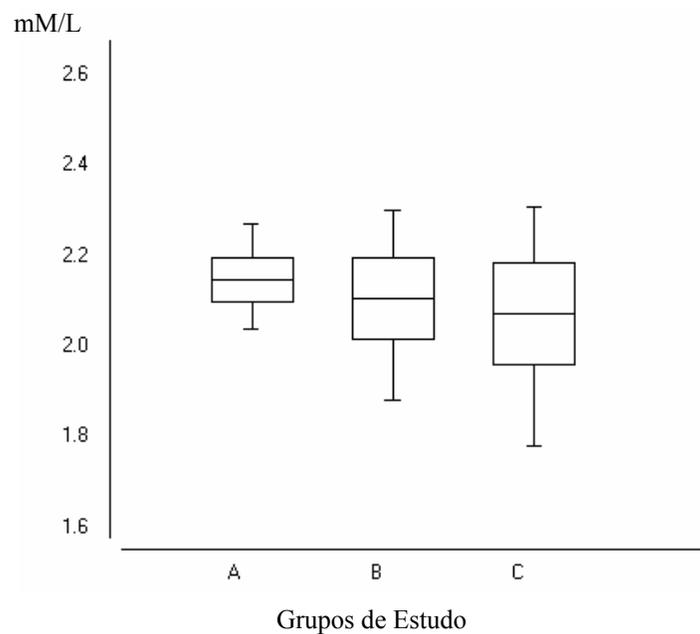
A representação gráfica ilustrada na Figura 12 demonstra a diferença entre os grupos avaliados, quanto ao fenótipo de hemoglobinas, em relação à dosagem de MDA. A avaliação mostrou diferença estatisticamente significativa no grupo B, quando comparados com os grupos A e C ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis. Entre os grupos A e C não houve diferença estatisticamente significativa.

O gráfico da Figura 13 ilustra a diferença entre os grupos avaliados, quanto ao fenótipo de hemoglobinas, em relação à dosagem de TEAC. A avaliação mostrou diferença estatisticamente significativa no grupo A, quando comparado com o grupo C ( $p < 0,05$ ) pelo

teste de Kruskal-Wallis. Entre os grupos B e A, B e C não houve diferença estatisticamente significativa.



**Figura 12** – Representação gráfica dos valores médios de MDA nos grupos avaliados.



**Figura 13** – Representação gráfica dos valores médios de TEAC nos grupos avaliados.

Devido às coletas em diferentes localidades, para as amostras do grupo B, houve a necessidade de realizar testes estatísticos entre essas amostras, uma vez que observamos diferença de idade entre eles, assim, estabeleceu-se os seguintes grupos:

BHBR – Hospital Apoio de Brasília – crianças e adolescentes

BHSJ – Hemocentro de São José do Rio Preto – adultos

BHSP – Hemocentro da Santa Casa de São Paulo – adultos

Nos resultados obtidos, observamos, para o subgrupo BHBR, médias de 379 ng/mL e 2.08 mM/L para MDA e TEAC, respectivamente; BHSJ obteve a média de 860 ng/mL para MDA e de 2.05 mM/L para TEAC, e o subgrupo BHSP as médias foram de 675 ng/mL e 2.14 mM/L de MDA e TEAC, respectivamente. Os resultados estão representados na Tabela 8 e ilustrados na Figura 14 para o MDA e Figura 15 para o TEAC.

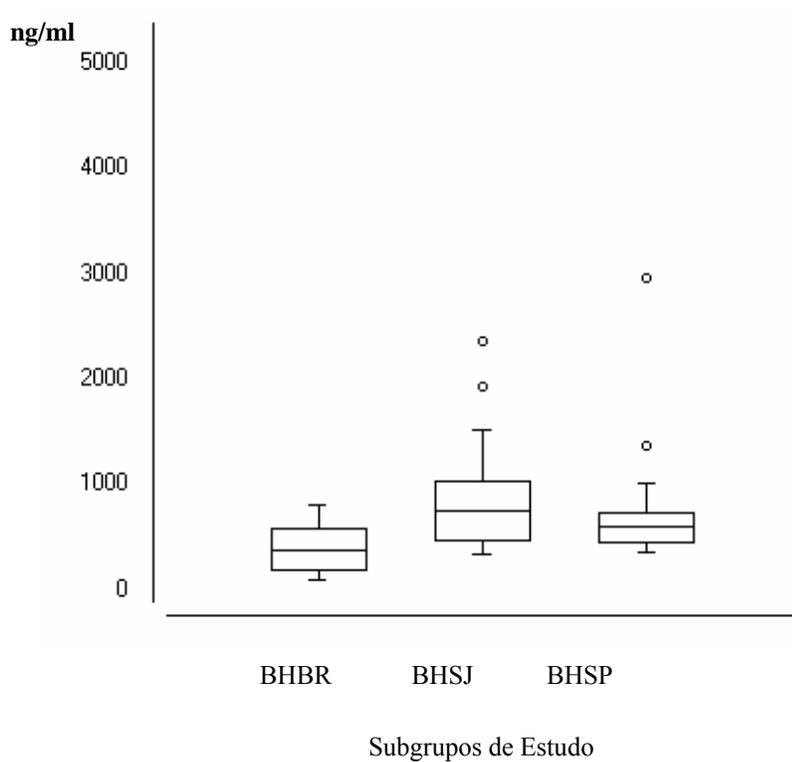
**Tabela 8:** Descrição dos valores médios para as quantificações de MDA e TEAC nos subgrupos do grupo B.

<b>Subgrupo B</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>MDA (ng/mL)</b>	<b>TEAC (mM/L)</b>
BHBR	18	379	2.08
BHSJ	25	860	2.05
BHSP	40	675	2.14

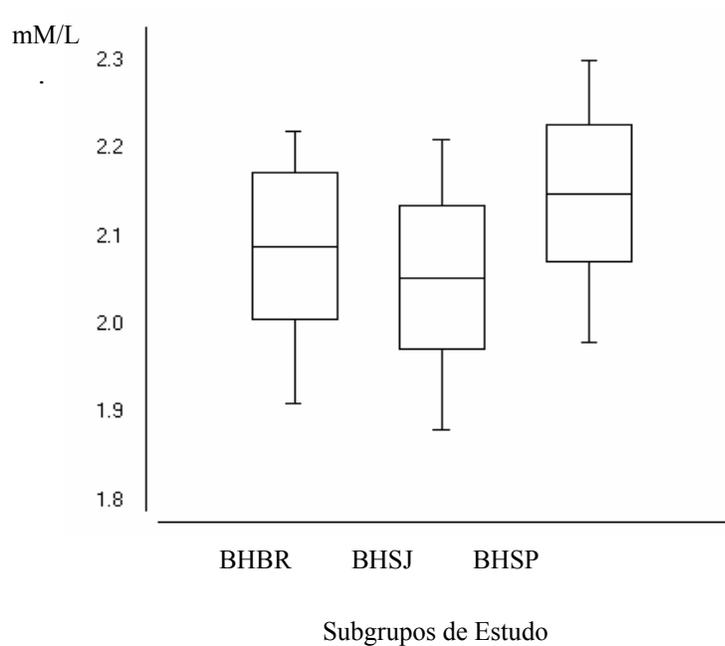
\* Valor de referência MDA: 440 ng/ml; TEAC: 2.07 mM/L

A Figura 14 demonstra as diferenças entre os subgrupos avaliados quanto a diferentes localidades em relação à dosagem de MDA. A avaliação entre eles mostrou diferença estatisticamente significativa quando comparados BHBR e BHSJ, BHBR e BHSP ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis. Entre os grupos BHSJ e BHSP não houve diferença estatisticamente significativa.

A Figura 15 ilustra as diferenças avaliadas quanto à dosagem de TEAC que mostrou diferença estatisticamente significativa entre BHBR e BHSP, BHSJ e BHSP, ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA; entre os subgrupos BHBR e BHSJ não houve diferença estatisticamente significativa.



**Figura 14** – Ilustração gráfica dos valores médios do MDA nos subgrupos do grupo B avaliados.



**Figura 15** – Representação gráfica dos valores médios do TEAC nos subgrupos de B avaliados.

A avaliação estatística para os diferentes fenótipos de Hb separados por gênero, quanto aos valores médios de MDA e TEAC, mostrou que as diferenças não foram significantes entre os gêneros de cada grupo considerando  $p < 0.05$ , conforme representado na Tabela 9.

**Tabela 9:** Comparação entre os diferentes fenótipos de Hb, separados por gênero, com os valores médios de MDA e TEAC.

Grupo	Gênero	Número de amostras	MDA (ng/ml)	TEAC (mM/L)
<b>A</b>	F	12	245	2.13
	M	28	315.6	2.15
<b>B</b>	F	51	703.9	2.11
	M	32	606.8	2.1
<b>C</b>	F	41	265.2	2.09
	M	48	288.4	2.06

Valor de referência MDA: 440 ng/ml; TEAC: 2.07 mM/L

Com relação à idade, foi realizado para os grupos A e C uma divisão em duas faixas etárias, sendo a primeira até 39 anos (A1 e C1) e a segunda maior do que 40 anos (A2 e C2). Para o grupo B, a faixa etária foi dividida em três sendo, a primeira dos seis meses aos 17 anos (B1), a segunda dos 18 aos 39 anos (B2) e a última após os 40 anos (B3). Com esta separação, foram avaliados os valores médios de MDA e TEAC e, não observamos diferença significativa ( $p < 0.05$ ), exceto para grupo B, com diferença significativa para a faixa etária menor (B1) e os demais (B2 e B3). Os resultados estão representados na Tabela 10 e ilustrados na Figura 16.

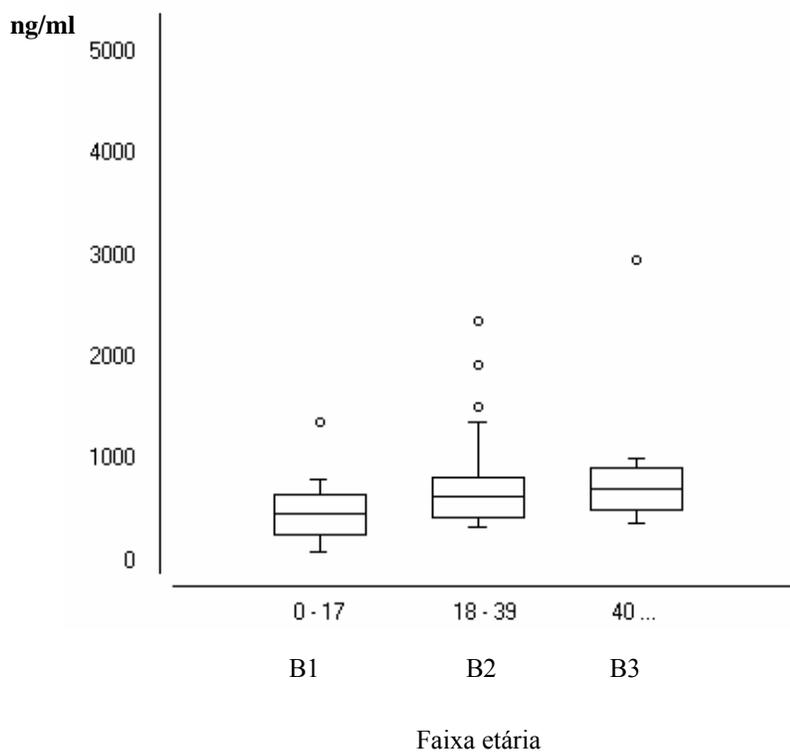
Foram realizados testes estatísticos entre todos os polimorfismos do gene *HFE* e *GST*, encontrados em cada grupo, com relação às dosagens de MDA e observamos que não houve diferença significativa.

**Tabela 10:** Comparação entre os diferentes fenótipos de Hb, separados por idade, com os valores médios de MDA e TEAC.

Grupos	Faixa etária	Número de amostras	MDA (ng/ml)	TEAC (mM/L)
<b>A</b>	<b>A1 (18 - 39)</b>	<b>24</b>	321	2.16
	<b>A2 (40 - 65)</b>	<b>16</b>	253	2.13
<b>B</b>	<b>B1 (6m - 17)</b>	<b>32</b>	325*	2.08
	<b>B2 (18 - 39)</b>	<b>38</b>	735*	2.11
	<b>B3 (40 - 65)</b>	<b>13</b>	888*	2.13
<b>C</b>	<b>C1 (18 - 39)</b>	<b>71</b>	286.7	2.08
	<b>C2 (40 - 65)</b>	<b>18</b>	242.2	2.03

Valor de referência MDA: 440 ng/ml; TEAC: 2.07 mM/L

\* - Teste estatístico significante considerando intervalo de confiança (  $p < 0.05$  )



**Figura 16** – Representação gráfica dos valores médios do MDA, no grupo B separados em três faixas etárias.

Para as dosagens de TEAC observamos diferença significativa no grupo A, entre as amostras com as mutações do gene *HFE* e ausência das mutações do gene *HFE*, Tabela 11; e entre as amostras com o genótipo M/T e T/T. No grupo C entre as amostras com o genótipo M/M em comparação com os demais genótipos do gene *GSTM1* e *GSTT1*, a diferença foi significativa (Tabela 12), as Figuras 17, 18 e 19 ilustram essa representação.

Para os demais testes, entre os grupos com diferentes fenótipos de Hb e os polimorfismos dos genes *HFE* e *GSTs*, não houve diferença estatística significativa.

**Tabela 11:** Descrição dos valores médios para as quantificações de TEAC no grupo A, com ou sem os polimorfismos do gene *HFE*.

Grupo	TEAC	
	C/HFE (n)	S/HFE (n)
A	2.13 (21)	2.16 (19)

Valor de referência: TEAC: 2.07 mM/L

( $p < 0.05$ ) – Teste t

C/HFE = presença de mutação no gene *HFE*

S/HFE = Ausência de mutação no gene *HFE*

N = número de amostras

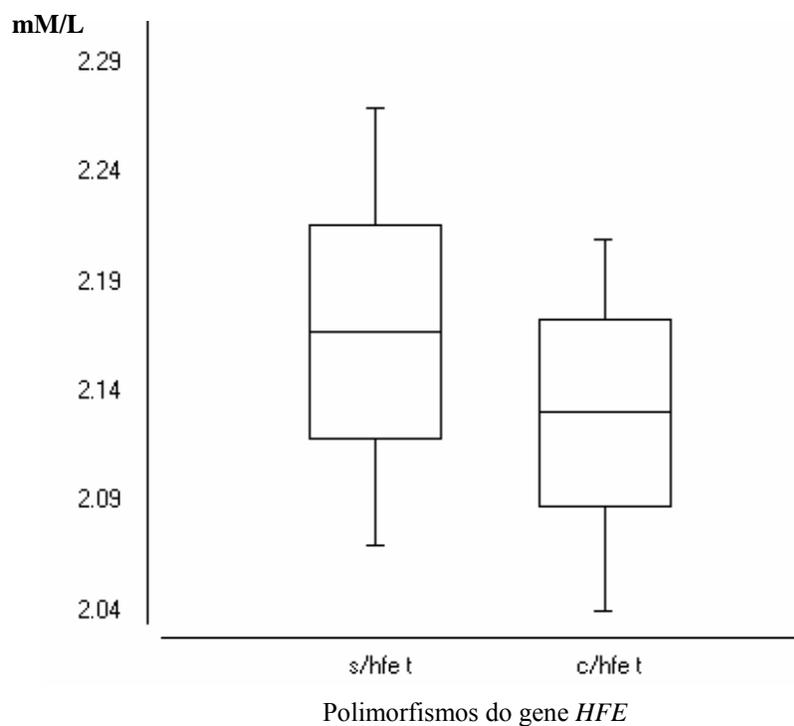
**Tabela 12:** Descrição dos valores médios para as quantificações de TEAC no grupo A e C, com relação aos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1*.

Grupo	M/M (n)	M/T (n)	NULO (n)	T/T (n)
A	2.14 (6)	2.12* (13)	2.14 (9)	2.17* (12)
C	2.19* (6)	2.06* (20)	2.07* (35)	2.05* (28)

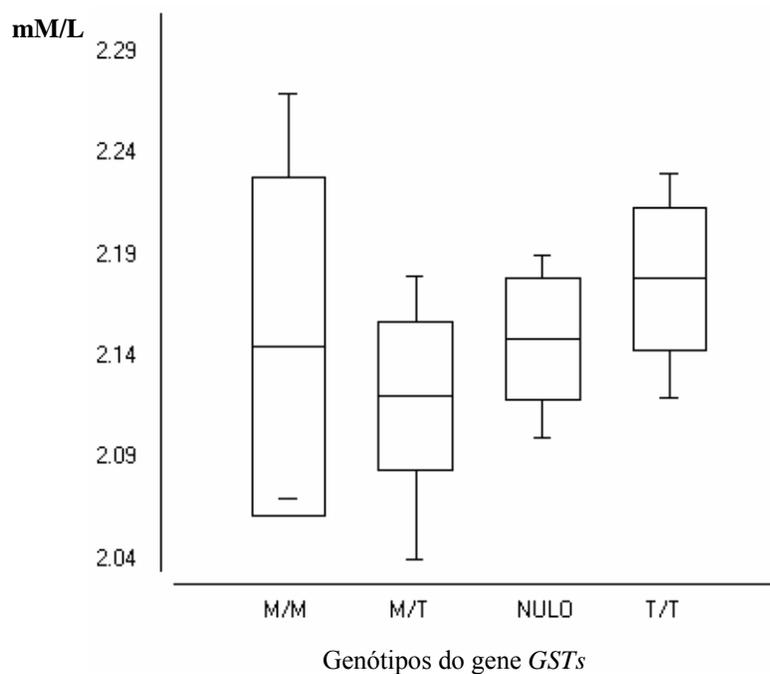
Valor de referência: TEAC: 2.07 mM/L

( $p < 0.05$ ) – Kruskal-Wallis

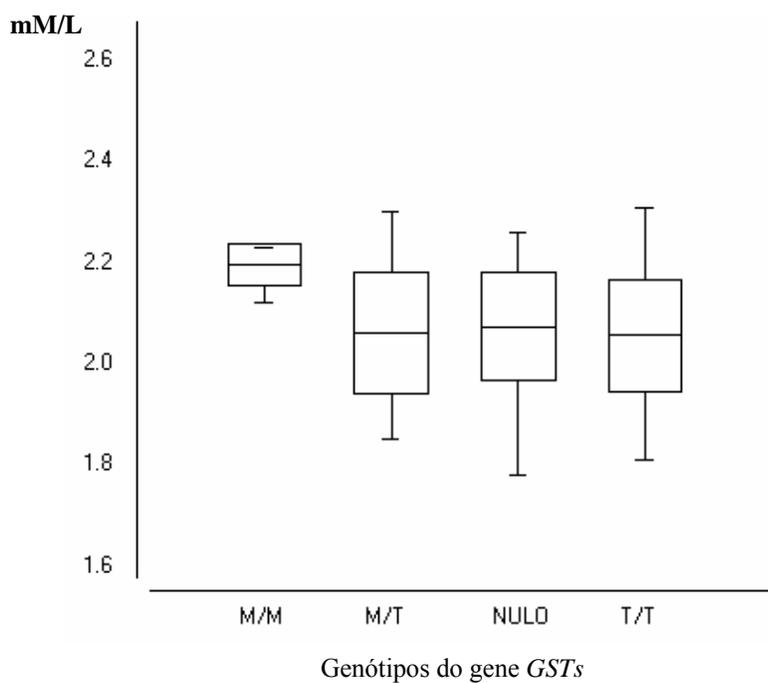
N = número de amostras



**Figura 17** – Representação gráfica dos valores médios de TEAC, no grupo A em amostras com e sem os polimorfismos do gene *HFE*.



**Figura 18** – Representação gráfica dos valores médios de TEAC, no grupo A com diferença significativa entre os genótipos M/T e T/T.



**Figura 19** – Representação gráfica dos valores médios de TEAC, no grupo C, com diferença significativa entre os genótipos M/M e os demais.

Dessa forma, mensuramos o estresse oxidativo pelas dosagens de MDA e TEAC, e estimamos a capacidade antioxidante dos grupos, que foi avaliada e comparada com os outros defeitos genéticos propostos nesse trabalho.

## **Discussão**

## 5 – Discussão

As populações brasileiras caracterizam-se em geral, por apresentarem grande heterogeneidade genética, derivada da contribuição dos seus grupos étnicos formadores, já muito diversificados, e dos diferentes graus com que eles se inter cruzaram nas várias regiões do país (SALZANO; FREIRE-MAIA, 1967; PENA, 2000).

Os dados obtidos por Pena (2000) corroboram a natureza triíbrida da população brasileira, a partir de ameríndios, europeus e africanos, já defendida por autores como Sérgio Buarque de Holanda, Gilberto Freyre e Darcy Ribeiro. Assim, a nossa população é considerada um ótimo material para os estudos comparativos intra e interétnicas, bem como sobre os efeitos da mestiçagem (SALZANO; FREIRE-MAIA, 1967).

Essa diversidade de etnias que constitui a nossa população tem proporcionado um magnífico campo de pesquisas aos geneticistas que estudam as hemoglobinas humanas e tem permitido não só identificar genes típicos de outras etnias em indivíduos de grupos aparentemente não miscigenados, como quantificar o grau de mistura presente em determinado grupo (SALZANO; FERIRE-MAIA, 1967; SALZANO, 1986).

A anemia falciforme é uma das doenças hematológicas mais comuns em todo o mundo, atingindo expressiva parcela da população mundial. No Brasil, a anemia falciforme tem significativa importância em virtude da prevalência, que segundo dados do Ministério da Saúde, está em torno de 2 milhões de pessoas portadoras do traço falciforme e mais de 8 mil afetados com a forma homozigota.

Devido a manifestação clínica diversificada da doença falciforme, decidimos pesquisar os polimorfismos dos genes *HFE* e *GST* avaliando assim a influência dessas co-heranças no estresse oxidativo.

A presença da mutação para Hb S torna os eritrócitos frágeis e com tempo de vida útil diminuído. A hemólise devido à oxidação gerada pela presença da Hb S e a herança concomitante dos defeitos no metabolismo do Ferro podem ser causadores de danos oxidativos levando a peroxidação dos lipídeos de membrana. As enzimas de detoxificação têm papel fundamental na redução desses danos. Essas situações foram analisadas em conjunto nesse estudo.

O ferro, elemento essencial para múltiplos processos metabólicos atua como cofator para inúmeras enzimas, participa do transporte de oxigênio, síntese de DNA e transferência de

elétrons, fundamentadas nas propriedades químicas de oxi-redução. Em termos de toxicidade, o depósito crônico de ferro, geralmente, está associado a hemocromatose hereditária, consumo excessivo de ferro pela dieta e freqüentes transfusões sanguíneas, requeridas para alguns tipos de anemia (BONINI-DOMINGOS, 2008).

As freqüências dos polimorfismos no gene *HFE*, descritas na literatura, demonstram que essas mutações são a forma mais comum de defeitos metabólicos do ferro em caucasóides. A hemocromatose por defeitos no gene *HFE* é um excelente exemplo de “efeito fundador”, segundo o qual, uma doença genética pode surgir de uma mutação pontual de origem, nesse caso, de Celtas ou Vikings (PIETRANGELO, 2006).

Nossos dados confirmam, a grande influência de europeus na formação étnica da região sudoeste do Brasil, apesar do grupo de estudo incluir indivíduos com uma mutação de origem africana como Hb S. Em nosso trabalho encontramos uma freqüência alélica similar ao encontrado nos indivíduos da Itália, sendo a freqüência alélica da mutação C282Y variando de 0.7% a 2.1% e da mutação H63D de 8.7% a 13.3%,.

A maioria dos pacientes, caucasóides de origem européia, com hemocromatose são portadores da mutação C282Y, enquanto menos de 6% são heterozigotos para C282Y e H63D, o que torna a mutação C282Y a mais freqüente nas populações do norte europeu, com valores de 5% a 10%, e rara em grupos étnicos da Ásia e África (MERRYWEATHER *et al.*, 1997). Segundo Cassanelli *et al.* (2000) em indivíduos saudáveis da Itália, a freqüência alélica de C282Y foi de 1.6% e de H63D de 13.3%.

AGOSTINHO, *et al.*, (1999), verificou que a freqüência de C282Y é três a oito vezes menor em brasileiros quando comparados aos caucasóides do norte da Europa, enquanto a freqüência alélica de H63D é praticamente similar. TORRES, *et al.*, (2008), avaliou os polimorfismos do gene *HFE* em populações brasileiras de áreas endêmicas para Malária, a maioria deles foi heterozigota para H63D com freqüências variando de 5% a 9%. A freqüência de homozigotos foi baixa e nenhum indivíduo apresentou as duas mutações simultaneamente.

O grupo A (Hb AS) apresentou 20.6% de freqüência genotípica para os polimorfismos no gene *HFE*, sendo que três homozigotos para H63D. Ressaltamos que a co-herança entre os defeitos genéticos para Hb S e *HFE*, podem agravar a geração de

radicais livres e a manifestação clínica nesses indivíduos, mesmo sendo doadores de sangue e portadores dos defeitos em heterozigose.

No grupo B (DF), a frequência genotípica da heterozigose para C282Y, foi mais elevada do que nos outros grupos e a frequência de heterozigotos para H63D foi similar, aumentando assim, o risco de cruzamentos e confirmando a necessidade do aconselhamento genético.

Entre os grupos avaliados o que apresentou maior frequência genotípica para os polimorfismos do gene *HFE* foi o grupo C (Hb AA), Neste estudo, as frequências encontradas para os defeitos do gene *HFE* foram similares, tanto na presença quanto na ausência de Hb S, sendo a mutação H63D a mais prevalente. Destacamos que a presença dos defeitos no gene *HFE* em homozigose ou dupla heterozigose predispõem a uma sobrecarga oxidante em indivíduos que já possuem outro defeito genético, com potencial lesão de membrana celular do eritrócito.

Muitos mecanismos estão envolvidos na proteção dos danos celulares causados por xenobióticos. Entre estes mecanismos podemos citar a variabilidade populacional quanto às frequências dos polimorfismos nos genes de detoxificação/metabolização. A geração de radicais livres e estresse oxidativo têm sido relacionados a diversas patologias como: hipertensão (MARINHO *et al.*, 2006) e lesões de pele (MC. CARTY *et al.*, 2007) sendo que, a ausência de proteção devido à nulidade de *GSTM1* e *GSTT1* pode estar associada com a patogênese dessas doenças.

Nesse contexto, a família de GSTs cataliza a remoção de lipídeos oxidados e xenobióticos, incluindo os halometanos de eritrócitos humanos. Indivíduos com deleção desses genes apresentam, alto nível de espécies reativas de oxigênio, em relação às diversas patologias citadas (SHARMA *et al.*, 2000).

Na avaliação dos polimorfismos de *GSTM* e *GSTT*, a frequência foi similar em todos os grupos estudados, sendo que para os genótipos com presença apenas do alelo T e para o genótipo com a nulidade de ambos alelos M e T, grupo B, demonstrou ser cerca de duas vezes menor do que as frequências encontradas nos demais grupos para esse genótipo.

Também, encontramos uma variedade de frequência nos polimorfismos de GSTs avaliados, sendo predominante a etnia caucasóide no grupo C, e no grupo B a descendência de não caucasóide. Para os grupos A e C, quando comparados para a presença dos

polimorfismos de GSTs e etnia, as freqüências genóticas dos polimorfismos foram similares ao grupo B, no qual houve diferença na presença do alelo M, cerca de aproximadamente, quatro vezes a mais do que nos grupos A e C.

Rossini, *et al.*, (2002), pesquisando polimorfismos das GSTs na população brasileira, encontrou freqüências genóticas diferentes para presença dos alelos M e T em relação aos resultados obtidos no nosso trabalho quando comparamos caucasóide e não caucasóides. Porém, houve concordância na baixa freqüência genótica para a ausência dos alelos M e T com as amostras de indivíduos não caucasóides do grupo B, sugerindo que a baixa freqüência de nulidade nos doentes falciformes pode ser devido a algum efeito protetor, devendo ser melhor investigada.

O polimorfismo GSTP1, que devido a modificação estrutural de uma Isoleucina no códon 105 por uma valina, diminui a sua atividade enzimática, alterando, as propriedades de detoxificação da célula, está associado ao câncer gástrico (RANGANATHAN *et al.*, 2005 ), cirrose quando associada a hemocromatose hereditária (STICKEL *et al.*, 2005) e lesões de pele (McCARTY *et al.*, 2007).

Nas detecções do gene *GSTP1*, a diferença entre as freqüências genóticas em relação aos grupos avaliados não obteve diferença significativa como as descritas para *GSTM1* e *GSTT1*, mas observamos que o genótipo V/V é o mais freqüente no grupo B, aproximadamente duas vezes maior. Para o genótipo I/V a freqüência foi similar entre os grupos e no genótipo I/I (selvagem) o grupo B obteve uma freqüência genótica 5% menor do que os grupos A e C. Comparando com os resultados obtidos por Rossini, *et al.* (2002) não houve similaridade entre as freqüências encontradas para os genótipos I/I e I/V, apenas para o genótipo V/V. Quando as freqüências genóticas são comparadas quanto à etnia observamos que não houve semelhanças entre os nossos resultados obtidos para o grupo B e os encontrados por Rossini em indivíduos não caucasóides, sendo nossos resultados semelhantes aos encontrados por Watson *et al.*, 1998, para um grupo de Afro-americanos. Ressaltamos mais uma vez a característica miscigenada da população brasileira.

Destacamos ainda que alta freqüência do genótipo V/V, em doentes falciformes, pode afetar a detoxificação celular, devido aos vários fatores expostos, genéticos e ambientais, a que estão expostos esses doentes.

Os grupos de estudo não evidenciaram aumento da peroxidação lipídica por medidas do MDA quando avaliados os valores médios, exceto para o grupo B, situação esperada, pois, a herança em homozigose da Hb S ou em interação com outros defeitos de Hb, causam anemia hemolítica, agravada pelas transfusões freqüentes e o excesso de ferro decorrente desse procedimento terapêutico, além de infecções recorrentes.

Observamos no grupo A maior média em relação aos demais grupos. O grupo B apresentou-se com uma a média intermediária de capacidade antioxidante, mas esperava-se desses indivíduos uma capacidade antioxidante reduzida, devido ao aumento da peroxidação lipídica, avaliada pela quantificação do MDA, e o uso de medicamentos quelantes de ferro, que têm sido identificados como antioxidantes doadores de hidrogênio para o radical superóxido. Uma explicação para o possível aumento de capacidade antioxidante nesses indivíduos refere-se às recentes transfusões, e em alguns casos, apesar de sua toxicidade, a hidróxiuréia, utilizada para aumentar a concentração da Hb F e a vasodilatação, estimulando a liberação de óxido nítrico no endotélio vascular e diminuição do estresse oxidativo no paciente.

Dividindo o grupo B pelas localidades, observamos que os pacientes de Brasília apresentaram menor valor de peroxidação lipídica e capacidade antioxidante, aproximando-se do valor de referência. Esse fato, provavelmente, deveu-se a constituição desse grupo, formado principalmente de crianças e adolescentes. Os pacientes de São José do Rio Preto apresentaram a maior média de peroxidação lipídica e a menor capacidade antioxidante entre as médias desses subgrupos de B. Os valores obtidos para as amostras de São Paulo não apresentaram diferença significativa nos valores de MDA quando comparados com as amostras de São José do Rio Preto, porém, quanto a capacidade antioxidante, a diferença foi significativa, podendo ser influenciada pelo tratamento utilizado nos pacientes de São Paulo.

As comparações entre os gêneros de cada grupo não apresentou diferença estatisticamente significativa para as dosagens de MDA e TEAC. Nas avaliações entre faixas etárias os valores de MDA foram estatisticamente significantes no grupo B para o subgrupo B1, quando comparados com os valores obtidos para as demais faixas etárias. Esse fato, provavelmente, foi devido ao metabolismo do jovem ser maior do que o de adultos e idosos.

Experimentos em animais demonstram que o ferro livre induz a elevação da peroxidação lipídica e oxidantes, iniciando pela reação de Fenton, o aumento da peroxidação na membrana celular, induzindo o aumento das espécies reativas de oxigênio, e provocando maior dano na célula.

Nas análises do MDA, as mutações no gene *HFE* não apresentaram, em nenhum dos grupos, influência sobre o estresse oxidativo. A presença dessas mutações é essencial para o diagnóstico de HH, mas sua presença somente não é suficiente para explicar o amplo espectro de conseqüências metabólicas e patogênicas atribuídos para a doença, pois existem muitos fatores intrínsecos ao indivíduo, como a idade, gênero, genes modificados, ou adquiridos, dieta, abuso de álcool, exercendo importante papel na penetrância fenotípica (PIETRANGELO, 2006).

A capacidade celular de manter a concentração de glutathiona durante o estresse oxidativo é importante na prevenção da integridade e perda de função celular. A detecção dos polimorfismos permite o entendimento da diminuição nos níveis de GST no plasma e as inferências nos valores de MDA e TEAC.

Nós observamos que não houve correlação entre os polimorfismos de GSTs e dosagens de MDA dentro dos grupos avaliados. Como no polimorfismo do gene *HFE*, essas alterações genéticas podem influenciar o agravamento de doenças, mas não como fatores isolados.

Nas análises de TEAC, as mutações do gene *HFE*, não apresentaram diferença estatisticamente significativa, exceto pelo grupo A, no qual os indivíduos com presença de mutação no gene *HFE* obtiveram uma média menor do que os indivíduos sem mutação. Assim, podemos inferir que os indivíduos com a presença de mutações no gene *HFE* têm uma menor capacidade antioxidante em relação aos indivíduos com ausência destas mutações, podendo a co-herança destes defeitos influenciar essa comparação.

Observamos também a diferença nas dosagens de TEAC em comparação aos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1*, nos grupo A e C, para o grupo A, o genótipo M/T apresentou-se com diferença estatisticamente significativa em relação ao genótipo T/T, o qual podemos inferir que tem uma capacidade antioxidante reduzida no genótipo M/T em relação ao genótipo T/T, mas a média do genótipo M/T está acima do valor de referência que obtivemos no grupo C.

No grupo C obtivemos diferença estatisticamente significativa entre os genótipos M/M e os demais que apresentaram valores médios similares ao valor de referência, sendo assim, observamos que o valor médio do grupo C com o genótipo M/M está acima do considerado normal.

## **Conclusões**

## **Conclusões**

Observamos que os níveis de MDA nos doentes falciformes foram aumentados com diferença significativa.

Os níveis de TEAC estão elevados no grupo de portadores do traço falcêmico e doentes falciformes.

As frequências do gene HFE apresentaram-se similares às encontradas em outros estudos em nossa região, sendo a mutação H63D a mais prevalente.

Destacamos a baixa frequência de nulidade para os alelos M e T; e a alta frequência do genótipo V/V no grupo de doentes falciformes.

Nos doentes falciformes não observamos influência dos polimorfismos pesquisados no estresse oxidativo.

## **Referências**

## 7 – Referências

AGOSTINHO, M.F.; *et al.* Mutations analysis of the *HFE* gene in Brazilian populations. **Blood Cells, Molecules and Diseases.** v. 25, n. 3, p. 324 -327, 1999.

BANDEIRA, F.M.G.C.; *et al.* Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** v. 29, n. 2, p.171 - 176, 2007.

BITTENCOURT, P.L.; *et al.* Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Reserch.** v. 35, n. 3, p. 329 – 335, 2002.

BLEUTER, E. **The sickle cell diseases and related disorders.** In Hematology – WILLIAMS, W. J. *et al.* 4<sup>th</sup> Ed. New York, Mc Graw Hill, p. 583 - 609,1983.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Hemoglobinopatias no Brasil: Variabilidade genética e metodologia laboratorial.** São José do Rio Preto, 232 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 1993.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de Hemoglobinopatias e Talassemias,** São José do Rio Preto: HN, 2006.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária no gene *HFE*. O que conhecemos na população brasileira? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** v. 29, n. 4, p.341 – 342, 2008.

CASSANELLI, S.; *et. al.* Frequency and biochemical expression of C282Y/H63D hemochromatosis (HFE) gene mutations in the heathy adult population in Italy. **Journal of Hepatology.** V.34, p. 523 – 528, 2001.

FEDER, J.N.; *et al.* A novel MHC class like gene is mutated in patients with haemochromatosis. **Nature Genetics**. v. 13, p. 399-408, 1996.

FORESTI, R.; *et al.* The interaction of nitric oxide with distinct hemoglobins differentially amplifies endothelial heme uptake and heme oxygenase-1 expression. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 317, n. 3, p.1125-1133, 2006.

FRANCHINI, M.; VENERI, D. Recent advances in hereditary hemochromatosis. **Annals Hematology**. v. 84, p. 347 – 352, 2005.

FRENETTE, P.S.; ATWEH, G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n. 4, p. 850 - 858, 2007.

GATÉ, L.; *et al.* Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidant stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 53, p. 169 - 180, 1999.

HARRIES, L.W., *et al.*; Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. **Carcinogenesis**. v.18, n. 4, p. 641 - 644, 1997.

HONIG, G. R.; ADAMS III, J.G. **Human Hemoglobin Genetics**. Springer-Verlag Wien: New York, 1986.

INSTRUCTION MANUAL OF BIO-RAD, Variante  $\beta$ -Thalassemia Short Program Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, 1999.

KRETZCHMAR, M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 48, p. 439 – 446, 1996.

LANDI, S.; Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Environmental Carcinogenesis Division**. v. 463, n. 3, p. 247 - 283, 2000.

LIMDI, J.K.; CRAMPTON, J.R. Hereditary haemochromatosis. **Quarterly Journal of Medicine**. v. 97, p.315 - 324, 2004.

LYNAS, C. A cheaper and more rapid polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for the detection of the HLA-H gene mutations occurring in hereditary hemochromatosis. **Blood**. v. 90, p. 4235 - 4236, 1997.

MARENGO – ROWE, A. J. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetato. **Journal of Clinical Pathology**. v.18, p.790 - 792, 1965.

MARINHO, C; *et al.* *GST M1/T1* and MTHFR polymorphism as risk factors for hypertension. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 353, p. 344 – 350, 2007.

MC BRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J. Free radicals, exercise and antioxidants. **Journal of Strength and Conditioning Research**. v. 13, p.175 - 183, 1999.

MC CARTY, K. M.; *et al.* Arsenic Methylation, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* Polymorphisms, and Skin Lesions. **Environmental Health Perspectives**. v. 115, n. 3, p. 341 – 345, 2007.

MERRYWEATHER-CLARKE, A.T.; *et al.* Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. **Journal of Medical Genetics**. v. 34, p. 275 - 278, 1997.

MORRIS; RUCKNAGEL; JOINER. Deoxygenation-Induced Changes in Sickle Cell-sickle Cell Adhesion. **Blood**. v. 81, p. 3138 - 3145, 1993.

NAGEL, R.L.; *et al.* The Senegal DNA haplotype is associated with the amelioration of anemia in African American sickle cell anemia patients. **Blood**. v. 77, p. 1371 - 1375, 1991.

NAOUM, P. C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia Hemoterapia**. v. 18, p. 75 - 81, 1996.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.

NAOUM, P. C; NAOUM, F. A. **Doença das Células Falciformes**, São José do Rio Preto: Sarvier, 2004.

NETO, G.C.; PITOMBEIRA, M.S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 1, p. 51 - 56, 2003.

PENA, S. D. J; et al. Retrato molecular do Brasil. **Ciência Hoje**. v. 27, p. 16-25, 2000.

PERCÁRIO, S.; *et al.* Dosagem do dialdeído malônico, **NEWSLAB**, v. 6, p. 46 -50, 2004.

PIETRANGELO, A. Physiology of iron transport and the HFE gene. **American Journal of Physiology**. v. 282, p. 6403 - 6414, 2002.

PIETRANGELO, A. Hereitary haemochromatosis: a new look at na old disease. **New England Journal of Medicine**. v. 350, p.2383 - 2387, 2004.

PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1763, p. 700 – 710, 2006.

RANGANATHAN, P. N; *et al.* Characterization of the molecular forms of glutathione S-transferase P1 in human gastric câncer cells (Kato III) and in normal human erythrocytes. **Biochemical Journal**. v. 386, p. 525 – 533 , 2005.

RE, R.; *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biological Medical**. v. 26, p. 1231-1237, 1999

ROSSINI, A; *et al.* Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**. v. 1, n. 3, p. 233 – 240, 2002.

SALZANO, F. M.; FREIRE-MAIA, N. **Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos**. Companhia Editora Nacional. São Paulo, 1967.

SALZANO, F. M. Em busca das raízes. **Ciência Hoje**.v. 5, p. 48-53, 1986.

SHARMA, R.; *et al.* Transport of glutathione-conjugates in human erythrocytes. **Acta Biochimica Polonica**. v. 47, n. 3, p. 751 - 762, 2000.

SHELDON, J.H. **Haemochromatosis**. London: Oxford University Press; 1935.

SILVESTRONI, E.; BIANCO, I.; Screening for microcytemia in Italy: analyses of data collected in the past 30 years. **American Journal of Human Genetics**. v. 27, n. 2, p. 198 - 212, 1975.

SOUZA, P.C. **Avaliação dos produtos de degradação oxidativa da hemoglobina S em eritrócitos de doentes falcêmicos**. São José do Rio Preto, Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, 1999.

STEINBERG, M. H. Pathophysiology of sickle cell disease. **Clinical Haematology**. v. 11, p. 163 - 184, 1998.

STICKEL, F. *et al.* Prediction of Progression to cirrhosis by a glutathione S – transferase P1 polymorphism in subjects with hereditary hemochromatosis. **American Medical Association**. v. 165, p. 1835 – 1840, 2005.

TANINGHER, M.; *et al.* Drug metabolism polymorphisms as modulator of cancer susceptibility. **Mutation Research**. v. 436, n. 3, p. 227 - 261, 1999.

TORRES, F. R.; *et al.* Frequency of the *HFE* C282Y AND H63D polimorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. **Genetics and Molecular Research**. v. 7, n. 1, p. 60 – 64, 2008

VELLA, F. Acid agar gel electrophoresis of human hemoglobins. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 49, n. 3, p. 440 - 442, 1968.

VICARI, P.; *et al.* Genetic polymorphisms of glutathione S – transferase mu1 and theta1 in patients with acquired aplastic anemia: A Brazilian experience, **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, n. 4, p. 344 – 345, 2008.

WATSON, M.A.; *et al.* Human glutathione S – transferase P1 polymorphism: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. **Carcinogenesis**. v. 19, p. 275 – 280. 1998.

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

WINTERBOURN, C. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. **Seminars in Hematology**. v. 27, p. 41 - 50, 1990.

ZAGO, M.A. Hemoglobinopathies: prevalence and variability, **Revista Paulista de Medicina**. v. 104, n. 6, p. 300 - 304, 1986.

ZAGO, M. A. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. In \_\_\_\_\_. **Considerações Gerais**, Brasília: ANVISA, 2001.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**, New Jersey: Prentice Hall, 1999.

ZUNTAR, I.; *et al.* The glutathione S-transferase polymorphisms in a control population and in Alzheimer's disease patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 42, n. 3, p. 334 - 339, 2004.

**Anexo I- TCLE e Questionário**

## Anexo I- TCLE e Questionário

### UNESP – São José do Rio Preto

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “**Influência do polimorfismo de *GST* e peroxidação lipídica no fenótipo de Hb S e mutantes no gene *HFE***” sob responsabilidade do Pós-Graduando Nelson Cazu Tokamoto Junior. O estudo será realizado com amostras de sangue para diagnóstico de hemoglobinas anormais, hemocromatose e capacidade antioxidante, visando esclarecer as diferenças de manifestação entre os diferentes indivíduos. O risco pode ser considerado mínimo, caracterizado pela possibilidade de mancha roxa no local da picada da agulha de coleta. Você poderá consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou por telefone para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e, estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. O material biológico cedido será armazenado e você poderá ser chamado para dar a sua autorização para novo(s) projeto(s). Caso isso seja impossível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 347/2005.

Assim, concordo em participar do projeto de pesquisa em questão.

Nome: \_\_\_\_\_ R.G.: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 2007.

\_\_\_\_\_  
Usuário/ responsável legal

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

OBS: Este termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador.

**Nelson Cazu Tokamoto Junior**

**Cargo/função: Pós-graduando; Biomédico**

**Intituição IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP – Universidade Estadual Paulista**

**Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – CEP: 15054-000.**

**São José do Rio Preto – SP, Fone: (17) 3221-2392**

Questionário a ser respondido pelos participantes do projeto de pesquisa “**Influência do polimorfismo de GST e peroxidação lipídica no fenótipo de Hb S e mutantes no gene HFE**” sobre estresse oxidativo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome completo: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) feminino ( ) masculino

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade e estado aonde mora: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_

Telefone residencial: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Telefone comercial: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Etnia: \_\_\_\_\_

Local de nascimento (indicar cidade, estado e país): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Profissão atual: \_\_\_\_\_

Tem contato com produtos químicos? (Exemplos: solvente, cola, tinta, pesticida, herbicida, fertilizante, óleos de motor, gasolina, fumaça, material radioativo, outras substâncias)

( ) não

( ) sim – Quais? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Fuma?

( ) não

( ) sim - A quanto tempo? \_\_\_\_\_

Se fumava, quanto tempo faz que você parou de fumar? \_\_\_\_\_

Toma bebidas alcoólicas?

não

sim - A quanto tempo? \_\_\_\_\_

- Com que frequência você toma? \_\_\_\_\_

- Que tipo de bebida você toma? \_\_\_\_\_

- Quando foi a última vez que você ingeriu bebida alcoólica? \_\_\_\_\_

Você tem algum tipo de doença? (hipertensão, diabetes, colesterol, triglicérides, reumatismo, outras)

não

sim

Quais? \_\_\_\_\_

Já teve anemia?

não

sim {  uma vez  
 algumas vezes  
 freqüentemente

Toma medicamentos?

não

sim – Quais? \_\_\_\_\_

Você toma vitaminas ou complementos alimentares? (Exemplo: vitamina C, vitamina E, chá verde, cogumelo do sol, outros)

não

sim, regularmente.

sim, não regularmente

Se a resposta for sim, indicar quais vitaminas ou complementos alimentares você toma:

---

Você está ou esteve em dieta no último ano?

não

sim

Se sim, qual o tipo de dieta?

perda de peso

condição médica

vegetariana

pouco sal

pouca gordura ou baixo colesterol

ganho de peso

outra

Você compra sua comida pronta? \_\_\_\_\_

Como é a sua alimentação? (tipos de carnes, frutas, vegetais, cereais, leite e derivados, bolachas, doces, refrigerantes e outros) \_\_\_\_\_

---

---

---

**Muito obrigado por sua consideração em dispor o seu tempo para preencher este questionário.**

**Nelson Cazuo Tukamoto Junior**

**Cargo/função: Pós-graduando/Biomédico**

**Intituição IBILCE – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas**

**UNESP – Universidade Estadual Paulista**

**Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – CEP: 15054-000.  
São José do Rio Preto – SP, Fone: (17) 3221-2392.**

**Anexo II- Tabelas**

**Tabela 13:** Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos pesquisados e dosagens bioquímicas aplicadas no grupo A (Hb AS) com ausência das mutações no gene *HFE*.

Cadastro	Gênero	Idade	Etnia	Hb	H63D	C282Y	GSTM/T	GSTP	MDA	TEAC	P.Q.	Fuma	Álcool	MED	VIT
HE23	M	26	NC	AS	N	N	M/M	I/I	222	2,23	Não	Não	Não	Não	Não
HE81	M	25	NC	AS	N	N	T/T	I/V	376	2,23	Sim	Não	Sim	Não	Não
HE80	F	45	NC	AS	N	N	T/T	I/V	239	2,23	Não	Não	Não	Não	Não
CH327	F	33	C	AS	N	N	T/T	I/V	154	2,17	Não	Não	Não	Não	Não
HE44	M	44	NC	AS	N	N	T/T	I/V	393	2,18	Não	Não	Não	Não	Não
HE32	M	20	NC	AS	N	N	M/M	V/V	171	2,27	Não	Não	Não	Não	Não
HE46	M	50	C	AS	N	N	NULO	I/V	291	2,15	Sim	Sim	Sim	Não	Não
CH431	M	47	NC	AS	N	N	M/T	I/V	137	2,15	Sim	Não	Sim	Sim	Não
HE68	M	45	NC	AS	N	N	NULO	I/V	120	2,14	Sim	Sim	Sim	Não	Não
HE37	M	55	NC	AS	N	N	NULO	I/I	461	2,18	Sim	Não	Não	Não	Não
HE58	M	53	NC	AS	N	N	T/T	V/V	137	2,15	Não	Não	Não	Não	Não
CH434	M	32	C	AS	N	N	M/T	I/V	256	2,16	Sim	Não	Sim	Não	Não
CH312	M	27	NC	AS	N	N	NULO	I/V	410	2,18	Não	Não	Não	Não	Não
HE01	M	21	C	AS	N	N	M/M	V/V	137	2,1	Não	Não	Não	Não	Não
HE09	F	22	NC	AS	N	N	T/T	I/I	154	2,17	Não	Sim	Sim	Não	Não
CH323	M	31	C	AS	N	N	T/T	I/I	324	2,17	Não	Não	Sim	Não	Não
HE65	F	52	C	AS	N	N	M/M	V/V	137	2,07	Não	Não	Sim	Sim	Não
HE82	M	27	C	AS	N	N	M/T	I/V	410	2,14	Não	Não	Não	Não	Não
HE83	M	47	NC	AS	N	N	M/T	I/I	290	2,11	Sim	Não	Sim	Não	Não

Legendas:

C – Caucasóide

F – Feminino

Hb – Hemoglobina;

I/I, I/V e V/V – Genótipos do gene *GSTP1*

M – Masculino

MED – Medicamentos;

N – Normal

NC – Não caucasóide;

MDA – Malondialdeído

M/M, M/Y, T/T e NULO – Genótipos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

P.Q –produtos químicos

TEAC – capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox

VIT - Vitaminas

**Tabela 14:** Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos pesquisados e dosagens bioquímicas aplicadas no grupo A (Hb AS) com mutações no gene *HFE*.

Cadastro	Sexo	Idade	Etnia	Hb	H63D	C282Y	GSTM/T	GSTP	MDA	TEAC	P.Q	Fuma	Álcool	MED	VIT
CH 93	F	66	C	AS	HET	N	M/T	I/V	428	2,11	Não	Não	Não	Sim	Não
CH 102	M	41	C	AS	HET	N	M/T	I/I	297	2,12	Sim	Não	Sim	Sim	Não
CH 193	M	30	C	AS	HET	N	M/T	I/I	112	2,08	Sim	Sim	Sim	Não	Não
CH 320	F	27	C	AS	N	HET	M/T	V/V	223	2,13	Sim	Não	Não	Sim	Sim
CH 326	M	36	C	AS	HET	N	NULO	I/I	186	2,13	Não	Não	Sim	Não	Não
CH 422	M	57	C	AS	HET	N	T/T	I/V	260	2,12	Não	Não	Sim	Não	Não
HE08	M	54	C	AS	HET	N	M/T	I/I	260	2,09	Não	Não	Sim	Não	Não
HE12	M	34	C	AS	HET	N	M/M	I/V	394	2,09	Sim	Não	Sim	Não	Não
HE15	M	34	C	AS	HET	N	T/T	I/V	429	2,21	Não	Não	Sim	Não	Não
HE19	F	23	C	AS	HET	N	T/T	I/I	279	2,15	Sim	Não	Não	Não	Não
HE20	M	30	C	AS	HET	N	M/M	I/I	566	2,11	Não	Sim	Sim	Não	Sim
HE24	F	31	C	AS	HET	N	NULO	I/V	360	2,15	Não	Não	Não	Sim	Não
HE25	M	15	C	AS	HET	N	NULO	I/I	372	2,19	Sim	Não	Sim	Não	Sim
HE30	M	20	C	AS	HOM	N	M/T	V/V	600	2,18	Não	Não	Não	Não	Não
HE34	M	27	NC	AS	HET	N	T/T	I/I	316	2,15	Não	Sim	Sim	Não	Não
HE50	M	26	NC	AS	HET	N	T/T	I/I	502	2,21	Sim	Não	Sim	Não	Não
HE72	F	32	C	AS	HET	N	M/T	I/V	353	2,12	Não	Não	Não	Sim	Não
HE75	M	21	C	AS	HET	N	NULO	I/V	409	2,12	Não	Não	Sim	Não	Não
HE76	F	42	C	AS	HET	N	NULO	I/I	185	2,1	Não	Não	Sim	Não	Não
CH 142	F	42	C	AS	HET	N	M/T	I/V	149	2,14	Não	Não	Sim	Não	Não
CH 213	F	63	C	AS	N	HET	M/T	I/V	279	2,04	Não	Não	Não	Sim	Não

**Tabela 15:** Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos pesquisados e dosagens bioquímicas aplicadas no grupo C (Hb AA)

Cadastro	Gênero	Idade	Etnia	Hb	H63D	C282Y	GSTM/T	GSTP	MDA	TEAC	P.Q	Fuma	Álcool	MED	VIT
LN 14	F	62	C	AA	N	N	Nulo	I/V	253	1,96	não	não	não	sim	não
LN 31	F	21	C	AA	HET	N	NULO	I/V	209	1,86	não	não	não	sim	não
LN 33	F	37	C	AA	N	N	T/T	V/V	312	2,01	sim	não	sim	sim	não
LN 34	M	27	C	AA	HET	N	NULO	I/I	366	2	sim	não	sim	não	não
LN 37	F	24	C	AA	N	N	M/T	I/V	222	2,3	não	não	sim	não	não
LN 38	F	20	C	AA	N	N	NULO	I/I	136	2,26	não	não	sim	sim	não
LN 40	M	24	C	AA	N	HET	T/T	I/I	279	1,99	sim	não	sim	não	sim
LN 41	M	19	C	AA	N	N	T/T	I/I	348	2,1	não	não	sim	não	não
LN 42	M	24	NC	AA	HET	N	NULO	I/V	305	2,09	sim	não	sim	não	não
LN 43	F	23	C	AA	N	N	M/T	I/I	366	2,15	não	não	não	sim	não
LN 44	F	24	C	AA	N	HET	T/T	I/V	409	2,07	não	não	não	não	não
LN45	F	42	NC	AA	N	N	T/T	I/I	195	2,24	não	não	não	não	sim
LN 46	M	23	C	AA	N	N	T/T	I/V	479	2,31	sim	não	sim	não	não
LN 48	F	25	C	AA	N	N	M/T	I/V	479	2,17	não	não	sim	sim	sim
LN49	F	22	NC	AA	N	N	T/T	I/I	366	1,99	não	sim	sim	sim	sim
LN 51	F	46	NC	AA	HET	N	M/T	I/I	183	2,02	não	não	sim	sim	não
LN 53	F	26	C	AA	N	N	NULO	I/V	348	2,14	sim	não	sim	sim	não
LN 55	F	27	C	AA	N	N	NULO	I/I	348	2,15	sim	não	sim	sim	não
LN 56	F	29	NC	AA	N	N	M/T	V/V	470	2,17	sim	não	sim	sim	não
LN 57	M	60	C	AA	N	N	T/T	I/V	235	2,17	não	não	sim	não	não
LN58	F	51	C	AA	N	N	NULO	I/V	181	2,15	sim	não	não	sim	não
LN 59	F	26	C	AA	N	N	T/T	I/V	214	1,81	sim	não	não	não	não
LN 60	F	20	C	AA	HET	N	NULO	I/I	343	2,13	sim	não	não	não	sim
LN 61	F	43	C	AA	N	N	NULO	I/I	144	2,08	sim	não	não	não	não
LN 62	F	30	C	AA	HET	N	T/T	I/V	217	2,18	sim	não	sim	não	não
LN 63	F	26	C	AA	N	N	M/T	V/V	374	2,08	sim	não	não	sim	não
LN 64	M	25	C	AA	HET	HET	NULO	I/V	343	2,15	não	não	sim	sim	não
LN 65	F	22	C	AA	HET	HET	M/T	I/I	144	2,16	não	não	não	não	não
LN 66	F	28	C	AA	N	N	M/T	I/V	451	2,14	sim	não	sim	não	sim
LN 67	F	22	C	AA	N	N	T/T	I/I	253	2,09	sim	não	sim	sim	não
LN 68	M	20	C	AA	HOM	N	M/T	I/I	181	2,2	não	não	sim	não	não

Tabela 15: Continuação.

Cadastro	Gênero	Idade	Etnia	Hb	H63D	C282Y	GSTM/T	GSTP	MDA	TEAC	P.Q	Fuma	Álcool	MED	VIT
LN 69	F	22	C	AA	N	N	T/T	I/V	181	2,2	sim	não	sim	sim	não
LN 70	M	26	C	AA	N	N	NULO	I/I	289	2,13	sim	não	sim	não	não
LN 71	M	33	C	AA	HET	N	T/T	I/V	325	2,18	não	não	sim	sim	não
LN 72	F	21	C	AA	N	N	T/T	I/V	199	2,14	não	não	sim	não	não
LN 73	F	23	C	AA	N	N	M/M	I/I	469	2,12	não	não	não	sim	não
LN 74	M	23	C	AA	N	N	M/T	I/V	361	2,11	sim	não	sim	não	não
LN 75	M	20	C	AA	HET	N	T/T	I/I	578	2,15	não	não	sim	não	não
LN 77	M	28	C	AA	N	N	M/T	V/V	204	2,18	sim	não	sim	não	não
LN79	M	33	NC	AA	N	N	M/M	I/V	167	2,23	sim	não	sim	não	não
LN 82	F	19	C	AA	HET	N	NULO	I/V	297	2,16	não	não	não	não	não
LN 83	F	49	NC	AA	N	N	NULO	V/V	242	2,2	sim	sim	não	sim	não
LN 85	M	25	C	AA	N	N	M/M	I/I	397	2,23	não	sim	sim	não	não
LN 86	M	30	NC	AA	HET	N	NULO	I/I	260	2,17	não	sim	sim	não	não
LN 88	M	22	C	AA	N	N	M/M	I/I	279	2,19	não	não	sim	não	não
LN 89	M	18	C	AA	N	N	NULO	I/I	223	2,17	não	não	não	não	não
LN 93	F	22	C	AA	N	N	M/M	I/I	297	2,21	sim	não	sim	sim	não
LN 94	M	37	NC	AA	N	N	NULO	I/I	372	2,14	não	não	sim	não	não
LN 96	F	22	C	AA	N	N	NULO	V/V	428	2,12	sim	não	sim	não	não
LN 97	M	27	NC	AA	N	N	NULO	I/V	223	2,1	não	não	não	não	não
LN 98	M	46	NC	AA	HET	N	T/T	I/I	149	2,06	sim	não	não	não	não
LN 99	F	50	C	AA	N	N	M/M	I/V	149	2,2	sim	não	não	não	não
LN 100	M	36	C	AA	HET	N	NULO	I/I	112	2,04	sim	não	sim	não	não
LN 101	M	22	C	AA	HET	N	NULO	I/V	391	2,21	não	não	não	não	não
LN 102	F	47	C	AA	HET	N	NULO	I/V	242	1,9	sim	não	não	não	não
LN 103	F	18	C	AA	HET	N	NULO	I/V	74	2,08	não	não	não	não	não
LN 104	F	31	C	AA	HET	N	NULO	I/V	112	2,1	sim	não	sim	não	não
LN 105	M	22	C	AA	N	N	NULO	I/I	223	2,22	não	não	não	não	não
LN 106	F	35	NC	AA	N	N	NULO	I/V	93	2,04	não	não	não	não	não
LN 108	M	33	NC	AA	N	N	T/T	I/I	113	2,03	não	sim	sim	não	não
LN 109	M	24	NC	AA	N	N	T/T	I/I	186	2,05	não	não	sim	não	não
LN 110	M	40	NC	AA	N	N	NULO	I/V	112	2,07	não	não	sim	não	não

Tabela 15: Continuação.

Cadastro	Gênero	Idade	Etnia	Hb	H63D	C282Y	GSTM/T	GSTP	MDA	TEAC	P.Q	Fuma	Álcool	MED	VIT
LN 112	M	31	C	AA	N	N	NULO	I/I	130	2,09	não	não	sim	não	não
LN 114	M	37	C	AA	HET	N	T/T	I/V	223	2,02	não	não	sim	não	não
LN 115	M	56	C	AA	N	N	M/T	I/I	242	1,85	não	não	sim	não	não
LN 116	M	27	C	AA	N	N	T/T	I/V	260	2,08	não	não	sim	não	não
LN 117	M	32	C	AA	HET	N	T/T	I/I	223	2	não	não	sim	não	não
LN 118	M	55	NC	AA	N	N	M/T	I/V	316	2,01	sim	não	não	não	não
LN 119	M	21	C	AA	N	N	M/T	I/V	260	2	não	não	sim	não	não
LN 120	M	29	NC	AA	N	N	M/T	I/V	353	1,93	não	não	sim	não	não
LN 121	F	25	C	AA	N	N	M/T	I/V	397	1,98	sim	não	não	não	não
LN 122	M	45	C	AA	N	N	T/T	I/I	372	1,91	sim	não	sim	não	não
LN 124	M	37	C	AA	N	HET	M/T	V/V	409	1,93	não	não	não	não	não
LN 125	F	35	C	AA	N	N	NULO	I/I	316	1,95	sim	não	sim	não	não
LN 126	M	27	NC	AA	N	N	M/T	I/V	335	1,95	sim	não	não	não	não
LN 127	M	46	C	AA	N	N	T/T	I/I	279	1,96	sim	não	sim	não	não
LN 129	M	29	C	AA	HET	N	T/T	I/V	372	1,96	não	não	sim	não	não
LN 130	M	29	C	AA	N	N	T/T	I/V	316	2,03	não	não	sim	não	não
LN 131	M	25	C	AA	N	N	T/T	I/I	186	1,94	não	não	sim	não	não
LN 132	M	43	C	AA	N	N	NULO	I/V	397	1,78	não	não	sim	não	não
LN 133	F	19	NC	AA	N	N	NULO	I/I	167	1,98	não	não	não	não	não
LN 134	M	22	C	AA	HET	N	NULO	I/V	409	2,03	não	sim	sim	não	não
LN 135	M	41	C	AA	N	N	NULO	I/V	483	2,03	não	não	não	não	não
LN 137	M	30	C	AA	N	N	M/T	I/I	316	1,94	não	não	sim	não	não
LN 138	F	31	C	AA	N	N	T/T	I/I	111	1,99	não	não	não	não	não
LN 139	M	26	C	AA	N	N	M/T	I/I	279	1,95	não	não	não	não	não
LN 140	F	43	NC	AA	N	N	NULO	I/I	186	1,95	não	não	não	não	não
LN 141	M	34	NC	AA	N	N	NULO	I/V	186	1,96	não	sim	sim	não	não
LN 142	F	27	C	AA	N	N	T/T	I/I	297	1,93	não	não	sim	sim	não

**Tabela 16:** Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos pesquisados e dosagens bioquímicas aplicadas no grupo B (Doente Falciformes) provenientes do Hospital de Apoio de Brasília.

Cadastro	Gênero	Idade	Etnia	Hb	H63D	C282Y	GSTM/T	GSTP	MDA	TEAC	P.Q	Fuma	Álcool	MED	VTI
HBBR-1	F			S/B?	N	N	M/M	I/V	239	1,91					
HBBR-2	M			SS	N	N	T/T	I/I	802	2,11					
HBBR-3	F	6M	NC	SC	N	N	M/M	V/V	239	2,01	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-4	M	10	NC	S/B?	N	N	T/T	I/I	683	2,11	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-5	F	7	NC	SS	N	N	M/T	I/I	324	2,06	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-6	F			SC	N	N	M/M	I/V	461	2,22					
HBBR-7	M	2	NC	S/B?	N	N	T/T	I/V	444	1,94	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-8	F	20	NC	SC	N	N	M/T	I/V	239	2,05	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-9	M	9	NC	S/B?	N	N	M/T	I/I	393	2,14	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-10	M	10	NC	SS	N	N	M/T	I/V	409	2,18	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-11	M	12	NC	SS	N	N	NULO	I/V	581	2,2	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-12	M	6	NC	S/B?	N	N	M/T	I/V	324	2,06	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-13	F	9	NC	S/B?	N	N	NULO	I/V	273	2,13	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-14	M	12	NC	SS	N	HET	M/T	V/V	102	2,17	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-15	M			SS	N	N	M/M	I/V	170	2,02					
HBBR-16	M			SC	HET	N	T/T	I/V	187	2,11					
HBBR-17	F	3	NC	S/B?	N	N	M/M	I/V	666	2,07	Não	Não	Não	Sim	Não
HBBR-18	F	3	NC	S/B?	N	N	M/M	V/V	290	2,12	Não	Não	Não	Sim	Não

**Tabela 17:** Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos pesquisados e dosagens bioquímicas aplicadas no grupo B (Doente Falciformes) provenientes do Hemocentro de São José do Rio Preto.

Cadastro	Gênero	Idade	Etnia	Hb	H63D	C282Y	GSTM/T	GSTP	MDA	TEAC	P.Q	Fuma	Álcool	MED	VIT
HBSJ-1	M	34	C	S/B*	HET	N	M/T	V/V	651	2	Não	Não	Sim	Não	Sim
HBSJ-2	M	27	NC	SS	N	N	M/M	I/V			Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-4	F	43	NC	S/B*	N	N	NULO	I/V	818	2,04	Não	Sim	Não	Sim	Sim
HBSJ-5	F	30	NC	SS	N	N	M/M	I/I			Sim	Não	Sim	Sim	Sim
HBSJ-6	F	47	NC	SS	HET	N	M/T	I/V	1004	1,94	Não	Não	Não	Não	Sim
HBSJ-7	F	33	NC	SS	N	HET	NULO	I/I	948	2,04	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-8	F	41	NC	S/B*	N	N	T/T	V/V	948	2,03	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-9	F	15	NC	S/B CD39	N	N	T/T	I/I	706	2,06	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-10	F	25	NC	SS	N	N	T/T	I/I	892	1,88	Sim	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-11	F	24	C	SS	N	N	M/T	I/V	576	2,05	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-12	M	29	NC	SS	N	N	M/T	I/I	2362	2,04	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-13	F	35	NC	S/B*	HET	N	M/T	V/V	502	2,02	Não	Não	Não	Não	Sim
HBSJ-14	M	28	NC	S/B CD39	HET	N	M/T	I/I	613	1,99	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-15	F	20	NC	SS	N	N	M/T	V/V	1376	2,05	Não	Não	Sim	Sim	Sim
HBSJ-16	F	27	NC	S/B*	N	HET	M/T	I/I	1524	2,11	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-17	F	27	NC	S/B*	N	N	M/M	V/V	837	2,18	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
HBSJ-18	M	18	NC	S/B*	N	N	T/T	V/V	372	2,21	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-19	M	23	C	S/B*	N	N	M/T	V/V	725	2,13	Sim	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-20	M	20	NC	S/B CD39	HET	N	T/T	I/V	335	2,16	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-21	M	17	NC	S/B CD39	HET	N	T/T	I/I	558	2,11	Sim	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-22	M	27	NC	SS	N	N	M/T	I/I	600	2,03	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-23	F	36	NC	SC	N	N	NULO	I/V			Não	Não	Não	Não	Sim
HBSJ-24	F	16	C	S/B CD39	N	N	M/T	I/I	632	1,94	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-27	M	24	NC	SS	N	N	T/T	I/I	725	2,1	Sim	Não	Não	Não	Não
HBSJ-30	F	19	NC	S/B*	N	N	M/M	I/V	1930	2,14	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSJ-31	M	18	NC	SS	N	N	M/T	I/V	803	1,92	Sim	Não	Sim	Sim	Não
HBSJ-34	F	25	NC	SS	N	N	T/T	I/V	461	2,06	Não	Não	Não	Não	Sim
HBSJ-35	M	16	NC	S/B?	N	N	NULO	I/V	598	2,12	Não	Não	Não	Sim	Sim

**Tabela 18:** Resultados obtidos para as análises de frequência dos polimorfismos pesquisados e dosagens bioquímicas aplicadas no grupo B (Doente Falciformes) provenientes do Hemocentro da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Cadastro	Gênero	Idade	Etnia	Hb	H63D	C282Y	GSTP	GSTM/T	MDA	TEAC	P.Q	Fuma	Alcool	MED	VIT
HBSP-1	F	20	NC	SS	N	N	I/V	M/T	614	2,22	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSP-2	F	44	NC	S/B?	Het	N	I/I	M/M	598	2,17	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-3	F	27	NC	SS	N	N	I/I	M/M	598	2,25	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-4	F	38	NC	SS	N	N	I/V	M/M	649	2,17	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-5	F	48	NC	SS	N	N	I/I	M/T	478	2,19	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-6	M	17	NC	SS	N	N	I/I	M/M	478	2,13	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-7	F	50	NC	SS	N	N	I/I	M/T	2971	2,25	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-8	F	19	NC	SS	N	N	I/V	NULO	580	2,22	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-9	F	23	NC	S/B?	N	N	V/V	T/T	888	2,25	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-10	F	21	C	S/B?	Het	N	I/V	NULO	529	2,3	Sim	Não	Não	Sim	Não
HBSP-12	F	13	NC	SS	N	N	I/I	M/M	533	2,06	não	não	não	Sim	Não
HBSP-13	F	24	NC	SS	N	N	I/I	M/M	809	2,11	não	não	sim	Sim	Não
HBSP-15	F	25	NC	SS	N	N	I/V	M/M	568	2,07	não	não	não	Sim	Sim
HBSP-16	M	18	NC	SS	N	N	I/V	M/M	482	2,17	não	não	não	Sim	Não
HBSP-17	F	46	NC	SS	N	N	I/V	M/M	826	2,07	não	não	não	Sim	Sim
HBSP-18	M	14	NC	S/B?	Het	N	I/V	NULO	722	2,16	não	não	não	Sim	Não
HBSP-19	F	9	NC	SS	N	N	I/V	NULO	361	2	não	não	não	Sim	Sim
HBSP-20	M	18	NC	S/B?	Het	N	V/V	T/T	430	2,02	não	não	não	Sim	Sim
HBSP-21	M	13	NC	SS	N	N	I/V	M/M	1376	2,07	não	não	não	Sim	Não
HBSP-22	F	42	NC	SS	N	N	I/V	M/T	379	2,04	não	não	não	Sim	Não
HBSP-23	M	29	NC	SS	N	N	I/V	M/M	637	2,02	sim	não	não	Sim	Sim
HBSP-24	F	13	NC	SS	N	N	I/I	M/M	722	1,98	não	não	não	Sim	Não
HBSP-25	M	31	NC	SC	N	N	I/V	T/T	379	2,17	Não	Não	sim	Sim	Não
HBSP-26	F	42	NC	S/B?	N	N	I/I	M/M	585	2,21	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-27	F	24	NC	SS	N	N	I/I	M/M	654	2,18	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-28	F	28	NC	SS	N	N	I/I	T/T	568	2,15	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-29	F	24	NC	SS	N	N	I/I	M/M	568	2,17	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-30	F	30	NC	SS	N	N	I/V	M/M	430	2,21	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-31	M	25	NC	SS	N	N	I/I	M/M	654	2,19	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-32	F	21	NC	S/B?	N	N	I/V	M/M	568	2,19	Sim	Não	Não	Sim	Não

**Tabela 18:** Continuação.

<b>Cadastro</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Etnia</b>	<b>Hb</b>	<b>H63D</b>	<b>C282Y</b>	<b>GSTP</b>	<b>GSTM/T</b>	<b>MDA</b>	<b>TEAC</b>	<b>P.Q</b>	<b>Fuma</b>	<b>Alcool</b>	<b>MED</b>	<b>VIT</b>
HBSP-33	F	45	NC	S/B?	N	N	I/I	NULO	740	2,13	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSP-34	F	33	NC	SS	N	N	V/V	M/M	585	2,15	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSP-35	F	9	NC	S/B?	Het	N	I/V	M/T	602	2,2	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSP-36	F	44	NC	SS	N	N	I/V	M/M	1015	2,19	Não	Não	Não	Sim	Sim
HBSP-37	M	17	NC	S/B?	Het	N	V/V	NULO	774	2,19	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-38	F	13	NC	S/B?	Het	N	I/I	M/T	533	2,04	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-39	M	42	NC	S/B?	N	N	I/I	M/M	533	2,16	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-40	F	13	NC	S/B?	Het	N	V/V	M/M	413	2,13	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-42	M	18	NC	S/B?	N	N	I/I	M/M	516	2,12	Não	Não	Não	Sim	Não
HBSP-43	F			SS	N	N	I/V	M/T	654	2,28					

## **Apêndice – Métodos**

## Apêndice – Métodos

### Metodologias clássicas para o diagnóstico de hemoglobinopatias:

Foram realizadas as metodologias de triagem de hemoglobinopatias para caracterização das Hb variantes, as quais foram listadas a seguir:

### Preparação de hemolisados:

Para que as amostras fossem submetidas a procedimentos eletroforéticos e testes bioquímicos as células foram lisadas para a obtenção da solução de Hb utilizando duas metodologias:

- Hemolisado Rápido - com saponina (Naoum, 1990).
- Solução de Hb - com clorofórmio (Naoum, 1990).

*Hemolisado Rápido:* com saponina

Reativo hemolisante:

Saponina P.A.	1 g
Água destilada	100 mL

*Procedimento:*

- Em placa de Kline foi colocado 1 volume de sangue com 1 volume de reativo hemolisante, com posterior homogeneização até a hemólise completa da mistura;
- O hemolisado pôde ser utilizado após 5 minutos e, no máximo, até 4 horas depois da sua preparação.

*Solução de Hb:* com Clorofórmio

*Procedimento:*

- Para lavar os eritrócitos, centrifugou-se 1mL de sangue colhido com anticoagulante com solução salina a 0,85%, a 1.500 rpm, durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante. O processo foi realizado três vezes, no mínimo.
- Ao volume de eritrócitos lavados, adicionou-se outro de água destilada, homogeneizando a solução. A seguir, adicionou-se um volume de clorofórmio idêntico ao do hemolisado formado. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 2.000 rpm, por 20 minutos.

- A solução de Hb sobrenadante, ou hemolisado, foi retirada por meio de pipeta Pasteur e transferida para um tubo limpo com identificação da amostra. A concentração do hemolisado, preparado conforme a metodologia apresentada, variou de 10 a 15 g/dl.

### **Resistência globular osmótica em solução de NaCl a 0,36 % (SILVESTRONI; BIANCO, 1975)**

#### *Princípio:*

Técnica utilizada para detectar talassemias do tipo beta, principalmente na forma heterozigota, pois nesses casos os eritrócitos microcíticos são mais resistentes à hemólise nesta solução. A resistência globular não é específica para talassemia beta heterozigota, já que resultados positivos são encontrados também em anemias carenciais e em outras hemoglobinopatias, como nos heterozigotos para Hb C.

#### Reagentes:

Solução estoque - NaCl a 10% - pH 7,4

- |  |        |
|--|--------|
| ➤ NaCl   | 9,0 g  |
| ➤ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                   | 1,36 g |
| ➤ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O | 0,28 g |
| ➤ Água destilada q.s.p                               | 100 mL |

#### Solução trabalho

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| ➤ NaCl 10%             | 36 mL  |
| ➤ Água destilada q.s.p | 1000mL |

#### *Procedimento:*

Em tubo de hemólise colocou-se 2,0 mL de solução de NaCl a 0,36% e 10 µL de sangue total, agitando por inversão, suavemente. A leitura foi feita após 10 minutos.

#### *Interpretação:*

O tubo de hemólise com a amostra na solução de NaCl a 0,36% foi colocado a 2,0 cm de uma folha branca com linhas negras. O teste foi interpretado como positivo quando

não se visualizou as linhas negras, pois a resistência aumentada à hemólise do eritrócito, torna a amostra opaca. Em amostras com resistência normal à hemólise visualizou-se facilmente as linhas através da solução.

### **Análise, a fresco, da morfologia eritrocitária (BONINI-DOMINGOS, 2006)**

Os esfregaços sanguíneos, a fresco, foram analisados ao microscópio de luz, quanto ao tamanho, forma e quantidade de Hb nos eritrócitos. Os resultados foram divulgados da seguinte maneira, segundo padronização do LHGDH para cada um dos parâmetros avaliados.

- alterações discretas: (+)
- alterações moderadas: (++)
- alterações acentuadas: (+++)
- células normais: (N)

### **Eletroforese em pH alcalino (MARENGO; ROWE, 1965)**

#### *Princípio:*

Técnica utilizada para qualificação e quantificação de Hb normais e grande parte das Hb anormais com mobilidades eletroforéticas diferentes das Hb normais.

#### *Reagentes:*

Tampão TRIS-EDTA-BORATO (TEB), pH 8,6

- Tris hidroximetil aminometano 10,2 g
- Ácido etilenodiaminotetracético 0,6 g
- Ácido Bórico 3,2 g
- Água destilada q.s.p 1000 mL
- Conservado em geladeira

#### *Corante:*

Ponceau

- Ponceau S 0,5 g
- Ácido tricloroacético 5,0 g
- Água destilada q.s.p 100 mL

*Solução descorante:*

➤ Ácido acético glacial	100 mL
➤ Metanol	50 mL
➤ Água destilada q.s.p	1000mL

*Procedimento:*

- As fitas de acetato de celulose foram embebidas em tampão TEB por 15 minutos, no mínimo, e seis horas, no máximo.
- Após serem secas em folhas de papel absorvente, as fitas foram colocadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão utilizado para embeber as fitas, conectando-as com os compartimentos eletrolíticos por tecido absorvente (pano multi-uso).
- A solução de Hb foi aplicada a 1,0 cm da extremidade da fita em contato com o pólo negativo.
- Passaram-se 300 volts por 30 minutos.
- As frações foram analisadas, primeiramente, sem coloração e coradas com Ponceau. Para corá-las, as fitas foram colocadas no corante por cinco minutos e, posteriormente, em solução descorante por 30 minutos, com agitação da vasilha.

**Eletroforese em pH ácido (VELLA, 1968)***Princípio:*

Técnica utilizada para diferenciar alguns tipos de Hb que migram em posições semelhantes na eletroforese em pH alcalino e caracterização semi-quantitativa de Hb Fetal.

*Reagentes:*

Tampão Fosfato pH 6,2 - Para uso nos compartimentos eletrolíticos e confecção do gel:

➤ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,02 g
➤ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	7,66 g
➤ Água destilada q.s.p	1000 mL

Conservar em geladeira

### Gel de Ágar-Fosfato

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| ➤ Ágar-ágar             | 500 mg |
| ➤ Tampão fosfato pH 6,2 | 25 mL  |

#### *Procedimento:*

- Os componentes do gel de ágar-fosfato foram adicionados a um erlenmeyer de 250 ml e levados ao forno microondas até completa dissolução, tomando cuidado para a mistura não ferver.
- Foram pipetados 5,0 ml do gel em lâminas de microscópio que gelificaram à temperatura ambiente. As amostras foram aplicadas na porção média da lâmina, inserindo o aplicador com cuidado para não partir totalmente o gel.
- Para conexão do gel com os compartimentos eletrolíticos foi utilizado tecido absorvente (pano multi-uso).
- Passaram-se 100 volts por 30 minutos.
- As frações foram analisadas sem corar e coradas com Ponceau.

### **Cromatografia líquida de alta performance (Instruction Manual of Bio-Rad, 1994)**

#### *Princípio:*

O equipamento utilizado foi o VARIANT (BIO-RAD Laboratories) com Kit de análise para Beta Talassemia Heterozigota. A HPLC neste equipamento consiste da cromatografia de troca iônica em um sistema fechado, no qual duas bombas de êmbolo duplo e uma mistura de tampões de diluição, com controles de gradientes pré-programados passam pela coluna, detectando as alterações de absorbância a 415 nm. O filtro secundário de 690 nm corrige a linha de base para efeitos provocados pela mistura de tampões com forças iônicas diferentes (Eastman et al., 1996). As mudanças na absorbância são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância versus tempo. Os dados de análise provenientes do detector são processados por um integrador embutido e impressos no relatório da amostra de acordo com o tempo de retenção. O tempo de retenção é o tempo transcorrido entre a injeção da amostra até o ápice do pico da Hb. Cada Hb tem um tempo de retenção característico. No final da análise da amostra, uma cópia do cromatograma e os dados do relatório são automaticamente impressos.

*Procedimento:*

Para o Kit Beta Thalassemia Short:

Em um tubo de 1,5 mL, fornecido pelo fabricante, foram misturados 5  $\mu$ L de sangue total com 1,0 mL de solução hemolisante fornecida no kit de análise.

Após a hemólise total, as amostras foram acondicionadas nos recipientes adequados e alojadas no equipamento para realização dos procedimentos de leitura e análise das frações.

*Interpretação:*

A quantificação das diferentes frações de Hb em uma amostra foi realizada a partir dos valores percentuais e de tempo de retenção fornecidos pela calibração específica, e emitidos em modelo próprio que incluiu valores numéricos e perfil cromatográfico. Aos valores de Hb A<sub>0</sub> obtidos pela HPLC foram incluídas as subfrações de Hb A glicosilada e Hb A acetilada, denominadas P2 e P3 respectivamente, identificadas separadamente pelo aparelho. Os valores de Hb A<sub>2</sub> considerados normais foram de 2,0 a 3,5% e os de Hb F até 1,3%, previamente estabelecidos e fornecidos pelo fabricante.

**Dosagens Bioquímicas:****Dosagem do Malondialdeído (MDA) (PERCÁRIO, 2004)***Princípio:*

Este é um processo extremamente complexo que culmina com a destruição da membrana celular, inicia-se com a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno, posicionado entre as duas bandas insaturadas da molécula lipídica. Formando um novo radical livre lipídico, com carbono central que, na presença de O<sub>2</sub>, dá origem a lipoperóxidos. Estes são posteriormente transformado em MDA, o qual é passível de ser dosado e tem sido usado como um marcador da atividade deletéria dos radicais livres. A dosagem do malondialdeído (MDA) é um método simples, baseado na reação deste com o ácido tiobarbitúrico em condições ácidas e aquecimento, e tem sido a forma mais utilizada de avaliação da peroxidação lipídica da membrana. O método se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em pH baixo e temperatura elevada, para formar o complexo MDA-TBA, de cor rósea e absorção máxima em 535nm. Esta dosagem pode ser realizada em soro, plasma, líquidos corporais e homogenados de tecido.

### **Preparos dos Reagentes.**

- Água ultrapura (deionizada e destilada) ou Água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>)
- Cloreto de Potássio (KCl) 1,15%
- Fosfato Monobásico de Potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) – Tampão fosfato 75Mm (pH 2,5)
- Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 10 nM
- Solução Padrão MDA (1,1,3,3, tetrahidroxipropano) 20μM
- Álcool n-Butílico

### **PREPARO DE PLASMA.**

O sangue foi coletado em tubo heparinizado e identificado. Permaneceu por um período de 20 minutos em descanso, sob Banho Maria a 38°C. Após, centrifugar a 1500rpm, durante 20min. Foi separado em recipiente (tudo de Eppendorf de 3ml) devidamente identificado de acordo com o protocolo de identificação de peças da pesquisa 1ml (ou mais) de plasma (quantidade mínima aceitável 800μl) que estará pronto para a dosagem do MDA.

### **PREPARO FINAL DOS CONTROLES E AMOSTRAS**

- Está é a etapa final de preparação, a qual antecede a leitura dos valores de absorvância em espectrofotômetro. Não esquecer que o reagente TBA (ácido tiobarbitúrico) deverá ser sempre preparado no dia da dosagem do MDA, na medida que o mesmo não pode ser estocado.
- Recomenda-se que os tubos de ensaio tenham paredes reforçadas, resistentes a alta temperatura (dimensões de 11x100, parede de 2mm).
- O tubo de ensaio de número 1 recebeu nesse momento 0,5ml (500μl) de água destilada. **Estes serão os tubos de controle branco.**
- O tubo de ensaio de número 2 recebeu 0,5ml (500μl) da Solução Padrão MDA 20μM. **Estes serão os tubos de controle padrão MDA.**
- Por fim, os tubos de ensaio de número 3 em diante deverão receber 0,5ml (500μl) das amostras.
- Após a pipetagem das amostras, todos os tubos devem foram colocados em Banho Maria à temperatura de 94°C, onde permaneceu durante 1h. Um cuidado interessante neste ponto a fim de se evitar perda ou contaminação das amostras com água

condensada dentro do Banho Maria é de tampar cada tubo utilizando-se uma bola-de-gude.

- Após uma hora em Banho Maria à 94°C, as amostras foram resfriadas. Durante este tempo já poderá se observar uma coloração transparente nos tubos 1 (controle branco) e rósea nos tubos 2 (controle padrão MDA).
- Terminado o resfriamento, acrescentou a cada tubo de ensaio 4ml do reagente álcool n- Butílico. Nessa etapa, foi usado um dispensador automático de 4ml.
- Os tubos foram cuidadosamente tampados com rolhas apropriadas. À seguir, cada um deles, individualmente, foi misturado em agitador de tubos tipo vortex, para que haja a máxima extração do MDA para a fase orgânica.
- Por fim, centrifugou os tubos a 2500rpm durante 10 minutos
- Terminado a centrifugação a amostra obteve duas fases. Uma ao fundo, transparente e límpida e outra mais superficial de coloração mais ou menos rósea, de acordo com a quantidade de MDA na amostra.
- Foi retirado 3 ml da fase mais superficial e realizou-se a leitura em 535 nm no espectrofotômetro.

Cálculo do valor de MDA da amostra.

- O valor final de MDA da amostra, em ng/ml (ou nmol/ml) é obtido pelo emprego da seguinte fórmula:

**MDA = A média x F, onde:**

**A média = (A1+A2)/2**

$F = ([\text{padrão MDA}] \times 440,61) / A \text{ padrão MDA}$ , como a solução padrão MDA utilizada tem concentração de 10nM temos:

$F = 10 \times 440,61 / A \text{ padrão MDA}$ ,

**$F = 4406,1/A \text{ padrão MDA}$**

**Dosagem da Capacidade Anti-oxidante Total em Equivalência ao Trolox (TEAC) modificado (Re e et al, 1999).**

A presente dosagem objetiva a capacidade anti-oxidante total de amostras biológicas. O potencial anti-oxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um

potente anti-oxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Seguir-se-á o método proposto por Miller *et al* (1993), modificado por Re *et al* (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de mensuração. Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínaácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ), produzindo diretamente o radical cation  $ABTS^{\bullet+}$ , cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815nm. A adição de anti-oxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade anti-oxidante, concentração de anti-oxidantes e duração da reação. Assim a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cation  $ABTS^{\bullet+}$ , é determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do trolox como padrão, sob as mesmas condições. Os resultados finais foram expressos em micromoles por litro (mM/l) correspondente a concentração do trolox com capacidade antioxidante equivalente a da amostra que se pretende estudar, padrão de medida este denominado TEAC (trolox equivalente antioxidant capacity).

## PREPARO DE REAGENTES

### PBS pH7.2

Solução Salina Isotônica com pH 7.2 foi usada como solvente no preparo de reagentes e diluição de amostras.

- 1,48g de  $Na_2HPO_4$  (Fosfato de Sódio Dibásico)
- 0,43g de  $NaH_2PO_4$  (Fosfato de Sódio Monobásico)
- 7g de NaCl
- $H_2O$  destilada ----- 1 litro

Ajustar em pHmêtro para pH 7.2, acrescentar mais  $Na_2HPO_4$  ou Ácido Acético se necessário. Volume final: 1l.

### SOLUÇÃO DE ESTOQUE ABTS<sup>++</sup>

Sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) – ABTS: Sigma-Aldrich® (A1888).

A solução de estoque ABTS<sup>++</sup> foi preparada de 12 a 16h antes das dosagens.

Dever-se-á misturar uma solução do sal diamônio ABTS a 7mM com uma solução de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> – Sigma-Aldrich P5592) cuja concentração final seja de 2,45mM.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$140\text{mM} \times 352\mu\text{l} = C \times 20.000\mu\text{l}$$

$$C \approx 2,45\text{mM}$$

(A) ABTS 7mM: 0,0768g ----- 20 ml de PBS

(B) K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> 140mM: 0,7560g ----- 20 ml de PBS

- Retirar com pipeta automática 352μl da solução (A) e misturar a esta 352μl da solução (B):

$$19,648\text{ml de (A)} + 352\mu\text{l* de (B) **}$$

\* pipetar 176μl + 176μl

\*\* A concentração final de (B) nessa mistura será 2.45 mM

- Foram preparados 20ml da solução de estoque ABTS<sup>++</sup>.
- A mesma deve permanecer NO ESCURO, em temperatura ambiente (em bancada) durante 12-16h para formar o radical cátion ABTS<sup>++</sup>
- O radical é estável por cerca de dois dias estocado desta forma, no escuro, à temperatura ambiente<sup>2</sup>.

### SOLUÇÃO DE TRABALHO DE ABTS<sup>++</sup>

- Misturar a solução de estoque ABTS a PBS até que a absorbância a 734nm seja de  $0.7 \pm 0.02$  (concentração de ABTS  $\pm 47\mu\text{M}$ ), equilibrada a 30°C.

A expectativa é diluir 2289 μl da solução de estoque ABTS em 200ml de PBS.

- Calibrar espectrofotômetro na leitura de 734nm, zerando com PBS.
- Preparar Erlenmeyer com 200ml de PBS.

- Começar com 1800 $\mu$ l da solução de estoque ABTS, misturar ao PBS, homogenizar e ler o espectro. Subir ou diluir até atingir valor de leitura de  $0.7 \pm 0.02$  a 30°C, ou seja, de 0,680 a 0,720.

Atingido esse valor está pronta a solução de trabalho ABTS<sup>++</sup>

#### SOLUÇÃO DE ESTOQUE DE TROLOX (2.5mM).

Trolox (Aldrich Chemical Co 23,881-3), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico.

- Cálculo base: 0,647g de TROLOX (Aldrich 23,881-3) em 1l de PBS. Não usar em hipótese alguma água destilada, essa solução deve ser preparada em PBS.
- Logo, para 200ml – 0,1294g de Trolox  
para 100ml – 0,0647g de Trolox

Atenção !

- Material de difícil dissolução.
- Medir o volume desejado em PBS.
- Colocar apenas uma parte deste volume em placa agitadora magnética, turbilhonar com leve aquecimento.
- Acrescentar todo o soluto (trolox), despejando-o diretamente no solvente (PBS) sem diluir antes – retirar o material que ficará retido lavando o becker com PBS.
- Esperar diluir por completo.
- Esta solução é estável por uma semana quando estocada a 4°C ou 6 meses se estocada a -20°C<sup>1</sup>.

#### PREPARO DAS AMOSTRAS

##### PLASMA.

- Colher o sangue usando anticoagulante (heparina).
- Centrifugar a 1500rpm durante 20 minutos.
- Pipetar a camada superficial amarela (correspondente ao plasma) cuidadosamente.
- Estocar em freezer a -20°C ou em gelo caso seja prontamente analisado.
- Afim de resguardar a estabilidade, têm sido demonstrado que amostras de soro, estocadas por 9 semanas a -20°C perdem 27% de sua capacidade antioxidante. Já para

Miller e Rice-Evans (1993)<sup>1</sup>, a capacidade anti-oxidante do soro, quando analisada pelo método original de supressão do radical cátion ABTS, é estável por pelo menos 6 meses a -20°C. Amostras de sangue e saliva estocadas em nitrogênio líquido mantém sua capacidade anti-oxidante por muitos meses.

#### ROTINA DE DOSAGEM

- Adequamos o método para leitura em espectrofotômetro em temperatura ambiente: 25°C.
- O volume final de cada amostragem para leitura será de 3ml (3000µl).
- Se a capacidade anti-oxidante da amostra que se pretende estudar não é conhecida ou se espera que ela seja superior a escala estabelecida na curva padrão (0 a 2,5mM), é prudente realizar as dosagens da mesma sob diversas diluições.
- Convém que sejam feitas amostragens para leitura em duplicatas (A1 e A2) para termos maior certeza dos resultados, nesse caso aceitar diferenças de até 10% entre a média das leituras A1 e A2. Para a realização da curva padrão, convém que sejam feitas triplicatas.
- A leitura deve ser feita em espectrofotômetro, a 734nm.

#### REALIZANDO AS LEITURAS

- Em uma cubeta colocar com pipeta automática 2970µl da solução de trabalho ABTS<sup>++</sup> outrora preparada. Realizar leitura da absorbância a 734nm e anotar o valor (corresponderá a T0).
- Retirar a cubeta e imediatamente acrescentar 30µl da solução de trolox acionando neste exato momento o cronômetro.
- Homogenizar a mistura manualmente por 20 segundos e re-iniciar leitura (734nm) anotando o valor decorridos exatos 5 minutos (corresponderá a T5).
- Repetir o procedimento para cada solução de trolox (tubos de A-F).
- Fazer em triplicata anotando os resultados na tabela do PROTOCOLO CURVA PADRÃO DA ATIVIDADE ANTI-OXIDANTE DO TROLOX. Aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorbâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.
- Fazer o mesmo procedimento com as amostras biológicas a serem estudadas. Fazer também um controle branco (com 30µl de PBS) e um padrão (com 30µl de Trolox 1mM

– feito conforme tubo D no quadro 1). Realizar a dosagem das mesmas em duplicatas anotando os valores referentes de T0 e T5 na tabela do PROTOCOLO DE DOSAGEM DA CAPACIDADE ANTI-OXIDANTE TOTAL EM EQUIVALÊNCIA AO TROLOX (anexo-2). Aceitar diferenças de até 10% entre a média das absorvâncias de 5 minutos (T5) e os valores individuais.

### CÁLCULO DOS RESULTADOS

- Defina o Valor Médio da absorvância em T5 conforme descrito no item anterior.
- Calcule a Atividade Anti-oxidante Total (TAA) de cada amostra usando a seguinte fórmula:

$$TAA = \frac{T0 - T5}{T0}$$

- Calcule o valor corrigido da Atividade Anti-oxidante total de cada amostra (TAAc) de cada amostra subtraindo o valor de TAA das amostras biológicas e do Padrão do valor de TAA encontrado para o Branco:

$$TAAc = TAA - TAA \text{ do Branco}$$

### Metodologias moleculares para análise dos mutantes

#### Extração de Sangue Periférico (PENA et al., 1991)

##### *Princípio:*

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de sangue total. Os tampões de lise rompem os eritrócito e glóbulos brancos. O fenol é utilizado para a remoção de proteínas e enzimas contaminantes. O DNA é precipitado com etanol.

##### *Reagentes:*

1. Solução de lise 1 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células vermelhas)

➤ Sacarose 0,32M	10,95 g
➤ Tris HCl 10mM	1 mL
➤ MgCl <sub>2</sub> 5mM	0,5 mL
➤ Triton 1% 100x	1 mL
➤ Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

## 2. Solução de lise 2 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células brancas)

- 0,075 M de NaCl 2,19 g
- 0,02 M de EDTA 20 mL
- Água mili-Q q. s. p. 500 mL

## 3. Proteinase K (20 mg/mL)

- Proteinase K 20 mg
- Água mili-Q q.s.p. 1 mL

Conservar em freezer.

## 4. Fenol

## 5. Clorofórmio : álcool isoamílico (24:1)

## 6. Etanol 70%

## 7. KCl 2M

*Procedimento:*

Amostras de sangue periférico, colhidas com EDTA, foram colocadas em microtubos e o volume foi completado para 1,5 mL com solução de lise 1. Após 10 minutos de agitação, foi centrifugado por cinco minutos a 6500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foram acrescentados 1,0 mL de solução de lise 1, esse passo foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 450 $\mu$ L de solução de lise 2; 25 $\mu$ L de SDS à 10% e 5  $\mu$ L de proteinase K 20 mg/mL. Após homogeneização, o microtubo foi colocado em banho-maria por três horas a 37°C.

Após esse período de incubação, foram adicionados 500 $\mu$ L de fenol, o material foi homogeneizado e centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Após centrifugação, a fase superior foi transferida para outro microtubo e adicionados 500 $\mu$ L da solução de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1.

O material foi homogeneizado e, novamente, centrifugado por cinco minutos a 7000 rpm. Esse último passo foi repetido por mais uma vez. O sobrenadante foi colocado em tubo com 50 $\mu$ L de solução de KCl 2M gelada e acrescentado 500 $\mu$ L etanol 100% bem gelado. O tubo foi invertido várias vezes até a precipitação do DNA.

O material foi novamente centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm e o sobrenadante desprezado. O DNA no fundo do tubo foi lavado com 200 $\mu$ L etanol 70% (gelado), para reiniciar a hidratação e o sobrenadante, após centrifugação, foi desprezado. Após a evaporação do etanol, o DNA foi solubilizado com 50 $\mu$ L de água ultra pura e conservado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares, sob a ação da enzima DNA polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde.

Reagentes:

- Água ultra pura
- DNA polimerase com tampão e cloreto de magnésio
- DMSO
- dNTP
- Iniciadores (desenhado de acordo com a técnica a ser desenvolvida)

### **Preparo de Géis**

#### **Gel de Agarose**

Gel de Agarose 1 %

- Agarose ultra puro 250 mg
- TEB 1x
- Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

Gel de Agarose 1,5 %

- Agarose ultra puro 375 mg
- TEB 1x
- Aquecimento por 1 minuto no microondas, com potência máxima.

### Gel de Poliacrilamida

- Limpar bem as placas com álcool e papel higiênico, bem como o pente e os espessadores;
- Montagem da placa:
- Passar glicerina nas bordas;
- Colocar os cliques;
- \* É importante ter as placas sempre limpas e certificar que elas estão bem alinhadas;
- \* Observar se não há vazamento:
- Polimerização: ocorre com o aumento da temperatura.

### Gel de poliacrilamida 6%

- Reagentes:
  - acrilamida 40%      6 ml
  - água                    30 ml
  - TBE 10x                4 ml
  - perssulf. Amônio    220 µl
  - TEMED                 22 µl

### Gel de poliacrilamida 8%

- Reagentes:
  - acrilamida 30%      4ml
  - água                    8ml
  - TBE 5x                 3ml
  - perssulf. Amônio    105µl
  - TEMED                 5,5µl
- Aplicou-se mistura na placa (já com o pente encaixado)
- Após 40 minutos, depois de bem polimerizado, as amostras foram aplicadas.
- Preparo das amostras
  - Em cada tubo foram colocados 2 µl de tampão de carregamento e 4 micro l de amostra de DNA.
  - No tubo P – colocou-se 2 µl de padrão e 2 micro l de tampão de carregamento.

## PCR – AE para Hb S

### *Princípio:*

Para o polimorfismo de Hb S, o DNA foi amplificado a partir de duas misturas, esta metodologia utiliza três iniciadores para cada mix, o primeiro utiliza-se o par de iniciadores específicos (B5 a e B5 b) para o trecho de interesse e o iniciador específico onde ocorre a mutação (BS) e o segundo mix utiliza-se o iniciador específico (BA) para o alelo normal.

Iniciadores:

B5 a: 5' – GGC TGT CAT CAC TTA GAC CTC A – 3'

B5 b: 5' – AGA AGG GGA AAG AAA ACA TCA A – 3'

BA: 5' – CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCT C – 3'

BS: 5' – CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCA – 3'

A mistura da reação foi preparada com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para a Sala de Amplificação, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 3 minutos à 94°C; 30 ciclos de 45 segundos minuto à 94°C, anelamento durante 1 minuto 60°C e 30 segundos de extensão; extensão final de 10 minutos à 72°C e ∞ 4°C.

Amplificou-se um fragmento de DNA com uma banda controle de 660 pb, como a mutação ocorre na substituição do ácido glutâmico na posição seis da cadeia por uma valina (GAG > GTG) utilizamos os dois iniciadores específicos (BS e BA), sendo assim, para a confirmação da Hb S e Hb A as misturas com a presença destes iniciadores específicos formariam uma banda de 216 pb e a não amplificação deste trecho significa que não há o alelo pesquisado. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio

## PCR-RFLP para Hb S

Para a amplificação do segmento que codifica a Hb S foram utilizados os seguintes iniciadores:

*Iniciador 1* – P277: 5' – GGCAGAGCCATCTATTGCTTA – 3'

*Iniciador 2* - P278: 5' – ACCTTAGGGTTGCCATAAC – 3'

A mistura da reação foi preparado com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para o termociclador, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 30 ciclos de 30 segundos à 94°C, anelamento durante 30 segundos à 55°C; extensão 1 minuto à 72°C, extensão final por 10 minutos à 94°C e ∞ 4°C.

Amplificou-se um fragmento de DNA de 288 pb, que foi digerido com a enzima *DdeI* (15 U). Como a mutação no códon 6 (GAG → GTG) elimina um sítio de restrição para enzima *DdeI* (C ↓ TNAG), após a digestão, o alelo normal gera dois fragmentos de 201 pb e 88 pb e, o alelo mutante gera um de 288 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

### **PCR-RFLP para Análise do Polimorfismo do Gene *HFE***

#### *Princípio:*

A pesquisa dos polimorfismos C282Y e H63D foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP, modificada (Lynas, 1997) e a digestão enzimática dos produtos amplificados obtida com a utilização das enzimas *Bcl I*, para o polimorfismo H63D e *Rsa I* para o polimorfismo C282Y.

Para a amplificação do segmento que codifica o polimorfismo do gene *HFE* (C282Y e H63D) foram utilizados os seguintes iniciadores:

#### **C282Y**

*Iniciador 1* – L282: 5' – GGG TAT TTC CTT CCT CCA ACC – 3'

*Iniciador 2* – R282: 5' – CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC – 3'

#### **H63D**

*Iniciador 1* – L282: 5' – GGG TAT TTC CTT CCT CCA ACC – 3'

*Iniciador 2* – R282: 5' – CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC – 3'

A mistura da reação foi preparado com um volume final de 25µL e os microtubos foram transportados para a Sala de Amplificação, onde se realizou a reação de amplificação nas seguintes condições: 1 ciclo de 3 minutos à 94°C; 30 ciclos de 45 segundos minuto à 94°C, anelamento durante 30 segundos 58°C e 1 minuto de extensão; extensão final de 5 minutos à 72°C e ∞ 4°C.

Para a mutação C282Y amplificou-se um fragmento de DNA de 441 pb, que foi digerido com a enzima *Rsa I* (7 U). Como a mutação, ocorre em uma troca de guanina para adenina no nucleotídeo 845 que leva a uma substituição de uma cisteína para uma tirosina no aminoácido de posição 282, criando um sítio de restrição para enzima *RSA I* (CT ↓ AC), após a digestão, o alelo normal gera dois fragmentos de 286 pb e 145 pb, o alelo mutante gera três fragmentos de 296 pb, 116 pb e 29 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, sob corrente constante de 100V por 50 minutos e visualizados na coloração de prata.

Na mutação H63D amplificou-se um fragmento de DNA de 496 pb, que foi digerido com a enzima *Bcl I* (11 U). Como a mutação ocorre em uma troca de uma citosina para uma guanina no nucleotídeo 187, resulta na substituição de uma histidina para um ácido aspártico na posição do aminoácido 63, eliminando um sítio de restrição para a enzima *Bcl I* (T ↓ GATCA), após a digestão, o alelo normal gera dois fragmentos de 358 pb e 138 pb, o alelo mutante não ocorre o corte, formando assim um fragmento de 496 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 80V por 30 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

### **PCR – RFLP para o polimorfismo *GSTP1***

Para a amplificação do segmento que codifica o polimorfismo do gene *HFE* (C282Y e H63D) foram utilizados os seguintes iniciadores:

*Iniciador 1:* 105F – 5' – ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA – 3'

*Iniciador 2:* 105R – 5' – TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT – 3'

A desnaturação inicial do DNA foi obtida a 94°C por 5 minutos e a mistura de reação submetida em seguida a 40 ciclos de 94° C por 1 minuto, anelamento de 62° C por 3 minutos, extensão de 72° C por 1,5 minuto e com ciclo final a 72° C por 7 minutos.

O produto de amplificação da PCR foi submetido à enzima de restrição *Bsma I* isômero da enzima *Alw 26I* (5U) que elimina um sítio de restrição, o produto da amplificação após o adicionamento da enzima é colocado em banho Maria à 37° C, por 4 horas, para clivagem das seqüências amplificadas dos alelos Val<sub>105</sub>/Val<sub>105</sub>, Val<sub>105</sub>/Ile<sub>105</sub> e Ile<sub>105</sub>/Ile<sub>105</sub> (alelo normal) em regiões específicas. Após digestão, o alelo normal gera um

fragmento de 176 pb, o alelo mutante gera dois fragmentos um de 91 pb e 85 pb. Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel poliacrilamida 6% sob corrente constante de 120 V por 45 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio por cinco minutos.

### **PCR – MULTIPLEX para os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1***

A pesquisa dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* foi realizada por meio da técnica de PCR-MULTIPLEX, os segmentos são amplificados a partir dos seus segmentos específicos e necessitam de uma banda controle, gerada pela amplificação do gene *CYP 1*.

Para a amplificação dos segmentos que codifica os polimorfismos do gene *GST* (*GSTM1* e *GSTT1*) foram utilizados os seguintes iniciadores:

CYP1 – 5' – GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT – 3'

CYP2 – 5' – CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC – 3'

*GSTM1* – 5' – GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C – 3'

*GSTM2* – 5' – GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G – 3'

*GSTT1* – 5' – TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC – 3'

*GSTT2* – 5' – TCA CCG ATC ATG GCC AGC A – 3'

A desnaturação inicial do DNA foi obtida a 94° C por 4 minutos e a mistura da reação submetida em seguida de 40 ciclos de 94° C por 2 minutos e 59° C por 1 minuto, extensão de 72° C por 1 minuto e com ciclo final a 72° C por 10 minutos.

Os polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* não necessitam de restrição enzimática, sendo identificados pela presença ou ausência de alelos. O produto pós PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, sob corrente constante de 100V por 40 minutos, separando fragmentos com 423 pb (*GSTT1*), 310 (CYP controle) e 230 pb (*GSTM1*). Os produtos amplificados e digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, sob corrente constante de 100V por 40 minutos e visualizados sob luz UV, após coloração com brometo de etídio.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)