SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO

MERCIA BREDA STELLA

ESTUDO DA MEMBRANA ERITROCITÁRIA EM β TALASSEMIA HETEROZIGÓTICA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Mercia Breda Stella e aprovada pela Comissão Julgadora
26/11/98

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas

Orientador(a):
Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles

CAMPINAS
1998

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
V. Ex.
TOMBO BC/ 36603
PROC. 429/99
C [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 20/02/99
N.º CPD

CM-00120835-5

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Stella, Mercia Breda

St38e Estudo da membrana eritrocitária em β talassemia heterozigótica/Mercia Breda Stella. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.

90f.:ilus

Orientadora: Nilce Correa Meirelles

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Talassemia. 2. Lipídeos. 3. Antioxidantes. I. Meirelles, Nilce Correa. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

Campinas, 26 de novembro de 1998.

Banca Examinadora:

Titulares

Profª Drª Nilce Correa Meirelles (Orientadora)
(Instituto de Biologia – UNICAMP)
Assinatura

Profª Drª Satie Hatsushika Ogo
(Instituto de Biologia – UNICAMP)
Assinatura

Profª Drª Arlete Emily Cury
(Depto A. Clínicas e Toxicológicas – FCF - USP)
Assinatura

Profª Drª Claudia Regina Bonini Domingos
(Depto de Biologia – UNESP – São J. R. Preto)
Assinatura

Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto
(Faculdade de C. Farmacêuticas – USF)
Assinatura

Suplentes

Prof. Dr. Sérgio Marangoni
(Instituto de Biologia – UNICAMP)
Assinatura

Prof. Dr. Edson Antunes
(Depto de Farmacologia – UNICAMP)
Assinatura

Ao Heryck e à Bárbara

Pelas horas que não convivemos

Pelos passeios que não fizemos

Pela paciência e confiança que me dedicaram

Pelo apoio que me deram

Pela compreensão e carinho que me dispensaram

Eu vos amo...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por existirem

À Dra. Nilce pela liberdade, apoio e confiança que sempre depositou em mim.

À Dra. Satie pelo acompanhamento do projeto e sugestões que vieram enriquecer o texto deste trabalho.

Ao Edson Rodrigues, amigo que sempre se dispôs a me ajudar nos esclarecimentos práticos deste trabalho.

Ao Prof. Sanches pelas cobranças e incentivo para o término deste trabalho.

À Mariane pelo incentivo e por permitir meu contato com as hemoglobinopatias.

À Marisa Boscacci Marques pela acolhida na Unicamp e pelos nossos "papos", mesmo que por pouco tempo.

À Sônia Valéria P. Malheiros M. Fernandes pela amizade e leitura deste trabalho.

À Marilena Jucá pelas constantes informações através do telefone.

À Maria Angélica e ao Leandro pelo apoio na preparação dos reagentes.

Ao Everaldo, Marcelo, Marcos (Kito) e Márcio pelo valioso apoio técnico prestado.

À Vânia, Maria Júlia e Rosana Corrêa pela colaboração técnica.

À Andréia, Marina e Míriam, secretárias do departamento, pela colaboração ao longo destes anos.

À Daniela P. Moreirea, da Uniscience,. pela doação de Kit.

Aos doadores que voluntariamente permitiram a realização desta tese.

À Universidade São Francisco por permitir a realização dos experimentos em seus laboratórios.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Apoio financeiro PICD – USF e FAEP – UNICAMP.

SUMÁRIO

	Pag
1 – Introdução	
1.1. Considerações Gerais	01
1.2. Colinesterase	09
1.3. Fragilidade Osmótica	12
1.4. Lipídeos	14
1.5. Dano Oxidativo	18
2 – Objetivos	27
3 – Materiais e Métodos	
3.1. Equipamentos, Reagentes e Soluções	28
3.2. Obtenção das Amostras	30
3.3. Colinesterase	30
3.4. Fragilidade Osmótica	32
3.5. Extração e Quantificação de Lipídeos	34
3.6. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e Glutationa Peroxidase	35
3.7. Determinação do Malondialdeído	39
3.8. Níveis de Colesterol, HDL-colesterol, Triglicerídeos, Ácido Úrico, Bilirrubina e Ferro Séricos	40
3.9. Análise Estatística	45
4 – Resultados	47
5 – Discussão	62
6 – Conclusões	74
7 – Abstract	75
8 – Referências Bibliográficas	76
9 – Anexo	88

ABREVIATURAS

AChE = Acetilcolinesterase

ADP = Adenosina difosfato

ATP = Adenosina trifosfato

Br D = Bilirrubina direta

Br I = Bilirrubina indireta

Br T = Bilirrubina total

C = Colesterol

C/PI = Proporção colesterol fosfolipídeos

CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média

ChE = Colinesterase

COD – ANA = Colesterol oxidase – aminoantipirina

DHBS = Ácido 3,5 dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato

DTNB = Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico

GPO-ANA = Glicerol-3-fosfato oxidase – aminoantipirina

GPx = Glutationa peroxidase

GSH = Glutationa reduzida

Hb = Hemoglobina

Hb A = Hemoglobina A

Hb A_2 = Hemoglobina A_2

Hb F = Hemoglobina fetal

HCM = Hemoglobina corpuscular média

HDL = Lipoproteína de alta densidade

INT = Cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium

KH_2PO_4 = Fosfato de potássio monobásico ou fosfato monopotássico

LDL = Lipoproteína de baixa densidade

Lp(a) = Lipoproteína a

L-PC = Lisofosfatidilcolina

MDA = Malondialdeido

mRNA = Ácido ribonucleico mensageiro

Na_2HPO_4 = Fosfato dissódico ou fosfato de sódio dibásico

NaH_2PO_4 = Fosfato de sódio monobásico ou fosfato monossódico

$O_2^{\bullet -}$ = Ânion superóxido

PC = Fosfatidilcolina

PE = Fosfatidiletanolamina

PK = Piruvato quinase

PI = Fosfolipídeo

PS = Fosfatidilserina

QM = quilomicron

SD = Desvio padrão

SEM = Erro médio padrão

SNC = Sistema nervoso central

SOD = Superóxido dismutase

TBA ou TBARS = Ácido tiobarbitúrico

UOD-ANA = Uricase – aminoantipirina

VCM = Volume corpuscular médio

VLDL = Lipoproteína de muito baixa densidade

XOD = Xantina oxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página	Título
1	2	Seqüência maturativa da série eritróide.
2	15	Distribuição assimétrica de fosfolipídeos em membranas de eritrócitos humanos.
3	16	Diagrama esquemático da membrana de hemácia.
4	39	Reação de dosagem do MDA.
5	49	Quantidade de hemácias de indivíduos normais e talassêmicos.
6	49	Quantidade de hemoglobina de indivíduos normais e talassêmicos
7	50	Volume corpuscular médio das hemácias de indivíduos normais e talassêmicos.
8	50	Hemoglobina corpuscular média das hemácias de indivíduos normais e talassêmicos.
9	51	Concentração de hemoglobina corpuscular média das hemácias de indivíduos normais e talassêmicos.
10	53	Atividade da acetilcolinesterase de membrana eritrocitária de indivíduos normais, família C, família O e todos os indivíduos talassêmicos.
11	54	Curva de fragilidade osmótica de hemácias de pacientes com β talassemia heterozigótica (famílias B, C e S) comparada a de indivíduos normais.
12	55	Curva de fragilidade osmótica de hemácias de pacientes com β talassemia heterozigótica (famílias O) comparada a de indivíduos normais.

13	56	Média das curvas de fragilidade osmótica das famílias C e O.
14	58	Conteúdo de colesterol da membrana eritrocitária de indivíduos normais, família C, família O e todos indivíduos talassêmicos.
15	58	Conteúdo de fosfolipídeos da membrana eritrocitária de indivíduos normais, família C, família O e todos indivíduos talassêmicos.
16	59	Proporção molar colesterol/fosfolipídeos da membrana eritrocitária de indivíduos, família C, família O e todos os indivíduos talassêmicos.
17	69	Formação de superóxido na presença de complexos de ferro.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página	Título
1	47	Dados hematológicos
2	52	Atividade colinesterásica e fragilidade celular média de indivíduos normais e com β talassemia heterozigótica.
3	57	Conteúdo de colesterol e fosfolipídeos em $mgmL^{-1}$ de hemácias.
4	60	Produção de MDA e mecanismos de defesa antioxidante em portadores de talassemia e controle normal.
5	61	Características séricas de pacientes normais e β talassêmicos.

RESUMO

Breda Stella, M. Estudo da membrana eritrocitária em β talassemia heterozigótica Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 1998. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 90p.

β talassemia é uma desordem genética caracterizada pela redução ou ausência de produção da cadeia β da globina. Há duas variedades principais de β talassemia: β° talassemia, na qual nenhuma cadeia β-globina é produzida, e β^{+} talassemia, na qual a cadeia β-globina é produzida mas em proporção reduzida. A anemia nas talassemias humanas é causada por uma combinação de ineficaz eritropoiese (hemólise intramedular) e hemólise de eritrócitos no sangue periférico. A estrutura e função da hemácia é mantida através da assimetria fosfolipídica e o dano oxidativo é um mecanismo pelo qual a estrutura e função da bicamada pode ser alterada. A composição fosfolipídica assimétrica da membrana das hemácias é mantida durante a vida das células, com fosfatidilcolina e esfingomielina localizados na monocamada externa e fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina na monocamada interna. O dano oxidativo é um componente importante na patofisiologia de hemácias de β talassêmicos. A cadeia α isolada gera espécies reativas de oxigênio, eleva os níveis de heme e ferro, e diminui o conteúdo de grupos sulfidril na membrana. Em nossos resultados, os níveis aumentados de MDA e da atividade das enzimas antioxidantes SOD e GPx revelam que houve peroxidação lipídica e dano oxidativo na membrana eritrocitária. Os níveis séricos de ferro, colesterol e triglicerídeos foram maiores para os talassêmicos que em indivíduos normais. O aumento de ácido úrico (agente anti-oxidante), ferro livre (catalisador de reações oxidativas) e de ânion superóxido indicam que as cadeias α livres interagem com a membrana da hemácia promovendo a lise celular com aumento dos níveis de bilirrubina. Os conteúdos de colesterol e fosfolipídeos da membrana eritrocitária β talassêmica estavam alterados levando a um aumento da proporção colesterol/fosfolipídeos. O aumento da resistência osmótica e diminuição da atividade da acetilcolinesterase refletem a desestabilização da membrana causada pelas modificações no perfil lipídico e oxidativo apresentadas pelos indivíduos β talassêmicos.

Palavras chave

β talassemia, membrana eritrocitária, composição lipídica, acetilcolinesterase, dano oxidativo, antioxidantes.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

Talassemia designa um conjunto de anemias hereditárias, motivadas por modificações genéticas que consistem na alteração da síntese de uma das cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Tais alterações caracterizam-se por um decréscimo ou ausência de uma das subunidades da molécula de hemoglobina normal. A diminuição de síntese de uma cadeia provoca o aumento da outra, que forma precipitados dentro das hemácias, promovendo alterações na membrana eritrocitária. Normalmente as hemácias se apresentam hipocrômicas e com anormalidades na forma e tamanho, sendo a poiquilocitose caracterizada por células em alvo e hemácias fragmentadas (Pornvaree et al, 1987; Ióvine & Selva, 1985; Naoum, 1987).

Como a principal função das hemácias é o transporte de oxigênio, não é de se estranhar que as hemoglobinas sejam os seus principais constituintes. A síntese das hemoglobinas inicia-se na fase pré-eritroblástica da diferenciação eritrocitária e, pode continuar por alguns dias após a célula da série vermelha ter perdido o núcleo e se transformado em reticulócito. São conhecidas quatro hemoglobinas embrionárias (Gower 1, Gower 2, Portland 1 e Portland 2), duas hemoglobinas fetais (F136 glicina e F136 alanina) e duas hemoglobinas adultas (A_1 e A_2) (Ramalho, 1986). (**Figura 1**).

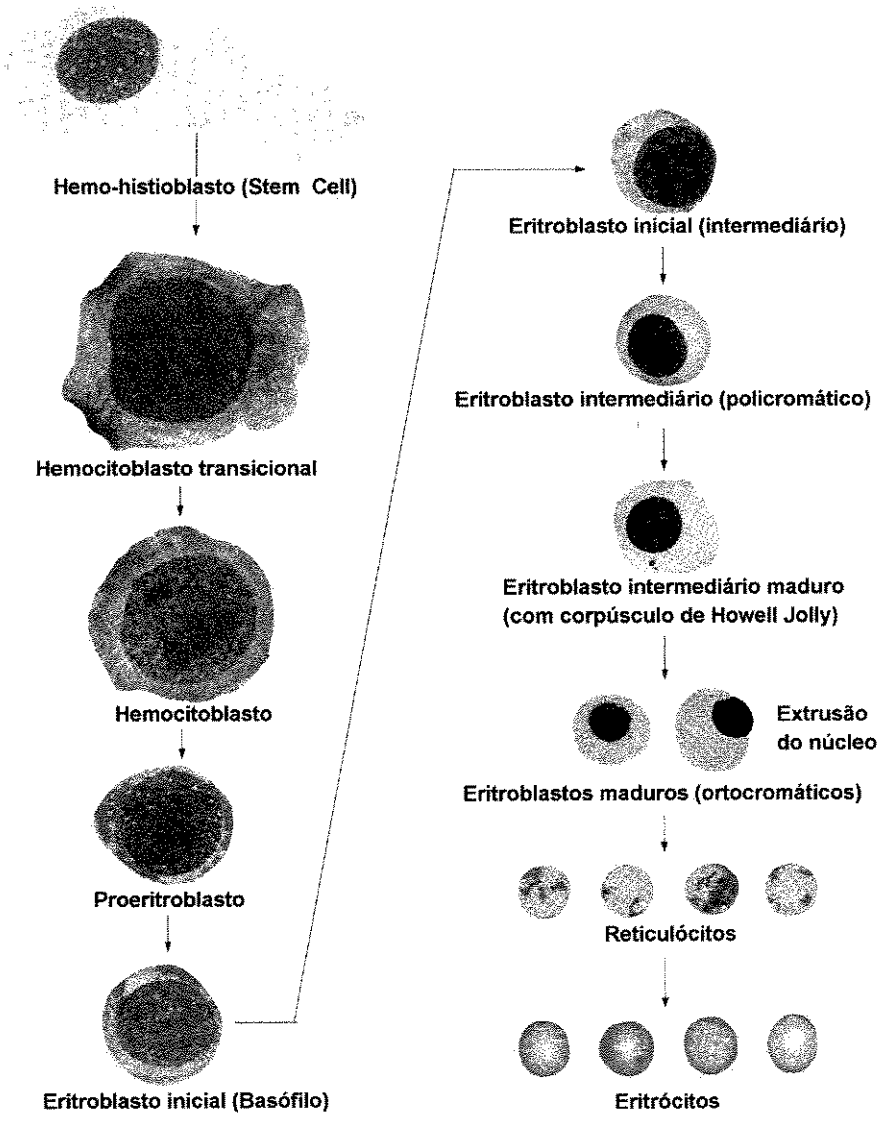

Figura 1: Seqüência maturativa da série eritróide. (McDonald et al. 1989. Adaptado pela autora).

Essas hemoglobinas são proteínas conjugadas, de massa molecular em torno de 68 Kd, que apresentam quatro grupos prostéticos tetrapirrólicos contendo ferro (ferroprotoporfirina IX ou heme). Sua fração proteica, a globina, é constituida por quatro cadeias polipeptídicas, cada uma das quais ligada a um grupo heme. Essa ligação deve ocorrer logo após a síntese da cadeia, estando ela ainda a nível ribossômico.

As hemoglobinas normais diferem entre si pela sua globina, existindo seis tipos de cadeias polipeptídicas que podem entrar na sua composição, ou seja, cadeias alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), épsilon (ε) e dzeta (ζ). Na maioria das hemoglobinas normais, a fração globínica é constituída por duas cadeias alfa e por duas cadeias não alfa, regra essa desobedecida por apenas três hemoglobinas embrionárias (Ramalho, 1986; Noreen, 1992).

Usualmente representam-se as hemoglobinas normais pela composição das suas globinas, ou seja:

Hemoglobina embrionária Gower 1 = $\varepsilon_2\zeta_2$

Hemoglobina embrionária Gower 2 = $\alpha_2\varepsilon_2$

Hemoglobina embrionária Portland 1 = $\gamma_2\zeta_2$

Hemoglobina embrionária Portland 2 = ζ_4

Hemoglobinas fetais = $\alpha_2\gamma_2$

Hemoglobina adulta A_1 = $\alpha_2\beta_2$

Hemoglobina adulta A_2 = $\alpha_2\delta_2$

As hemoglobinas não são o produto primário dos genes, mas, o resultado da combinação de cadeias polipeptídicas. Essas sim, podem ser interpretadas como sendo o produto primário dos genes, possuindo cada cadeia hemoglobínica, o seu "locus" genético. Em alguns casos, a cadeia hemoglobínica possui dois "loci" genéticos.

O "locus" correspondente à cadeia α permanece em atividade durante toda a vida do indivíduo e o seu ritmo normal de síntese é bastante elevado, uma vez que ela entra na composição de quase todas as hemoglobinas. As pertubações graves desse ritmo de síntese podem ser incompatíveis com a sobrevivência. Existem evidências de haver, pelo menos na maioria das pessoas, dois "loci" genéticos responsáveis pela produção de cadeia α. Por outro lado, existem provas de estreita união entre os "loci" das cadeias β e δ, bem como de existir mais de um "locus" genético comandando a síntese das cadeias gama (loci γG e γA). Sabe-se que os "loci" das cadeias β, δ, γG, γA e ε estão localizados na porção distal do braço menor do cromossomo 11, enquanto, os "loci" das cadeias α e ζ estão localizados no cromossomo 16 (Ramalho, 1986).

A hemoglobina A ou A_1 é a única que utiliza a cadeia β para sua constituição, portanto, é afetada por transcrição de um gene β defeituoso. Os indivíduos portadores da β talassemia exibem um decréscimo ou ausência da Hb A e um aumento em Hb A_2 e/ou Hb F, desde que as cadeias β não sejam produzidas em quantidades adequadas.

Os indivíduos β talassêmicos representam um grupo heterogêneo de alterações genéticas caracterizadas pela supressão total (alelos β^0) ou parcial (alelos β^+) da síntese das cadeias beta da hemoglobina. Essas alterações foram introduzidas em nosso país sobretudo pelos maciços contingentes imigratórios italianos que vieram para o Sul e Sudeste Brasileiro a partir da segunda metade do século passado (Ramalho et al,1985). É importante ressaltar que em nosso meio a forma mais freqüente da talassemia é a β^0, na qual a síntese da beta globina está totalmente suprimida (Zago et al, 1981).

As β talassemias resultam, em sua maior parte, de mutações originárias de substituições de apenas um nucleotídeo (mutação de ponto) no gene da β globina. Desde 1980, tem sido intensificado o estudo dessas mutações através do emprego de técnicas como: clonagem e seqüenciamento do gene β mutante, reação em cadeia da polimerase (PCR) e, até o momento foram descritas 135 mutações que conduzem à talassemia beta (Martins, 1993).

Dentre essas mutações, destaca-se um tipo de mutação que é a substituição do nucleotídeo citosina pela timina na posição 39, determinando o aparecimento de um novo código de terminação. Desse modo, ocorre uma supressão total da síntese da globina, caracterizando um alelo β^0. É a alteração de maior prevalência nas populações da bacia do Mediterrâneo, estimada em 95% dos beta talassêmicos da Sardenha, 53,7% de Portugal,

36% da Sicilia, 17% da Grécia, 21,9% da Bulgária, 4% da Turquia e Líbano e 2,16% do Egito e, estima-se ser a mutação mais freqüente no Brasil (em torno de 60%) (Martins et al, 1993).

Clinicamente, a talassemia β pode aparecer sob as formas *major, intermédia, minor e mínima.* Os doentes com talassemia *major*, ou anemia de Cooley, apresentam anemia hemolítica grave e são quase sempre portadores de dois alelos talassêmicos β (genótipos $\beta^0\beta^0$, $\beta^+\beta^+$ ou $\beta^0\beta^+$). Já os pacientes com talassemia *intermédia,* apresentam anemia hemolítica moderada ou leve e podem ser homozigotos de determinados tipos de genes β^+, como, por exemplo, do gene β^+ (Negro), ou, senão, podem ser heterozigotos $\beta^0\beta$. Os indivíduos com talassemia *mínima*, que são clinicamente assintomáticos, e os com talassemia *minor*, que apresentam anemia hipocrômica e microcítica, são sempre heterozigotos dos genes da talassemia β (genótipos $\beta^0\beta$ ou $\beta^+\beta$). O que diferencia, portanto, as formas *mínima* e *minor* de talassemia β é a presença ou não de anemia. Assim, por exemplo, um paciente com talassemia *mínima* pode desenvolver anemia durante a gravidez, passando a apresentar a talassemia *minor* . Por esta razão, os heterozigotos dos genes da talassemia β são designados, genericamente, como portadores do traço ou estigma talassêmico β independente da forma clínica que manifestam (Ramalho, 1986).

As talassemias que aparecem como uma conseqüência da síntese não balanceada das cadeias globínicas, são caracterizadas por

alterações das proteínas da membrana plasmática e dos grupos tiol, causando deformidade nos eritrócitos.

As alterações das proteínas do citoesqueleto adjacentes à membrana, que determinam uma alteração de forma nos eritrócitos, têm sido atribuídas ao excesso de cadeias α da hemoglobina na β talassemia. No entanto, é difícil determinar a exata relação entre o excesso de cadeia α globina, padrão de proteína esquelética e danos de tiol, e as alterações de forma nos eritrócitos talassêmicos, desde que essas alterações já tenham ocorrido "in vivo" e podem refletir alterações mediadas por globina e/ou defeito induzido nas hemácias dentro ou durante a extrusão da medula óssea talassêmica (Scott et al,1992; Advani et al, 1992 e Shinar et al, 1987).

O excesso de cadeia α leva a uma menor sobrevida das hemácias, indicando que é um fator importante na patogenia das manifestações hemolíticas presentes na talassemia β.

Nos pacientes não esplenectomizados é possível observar grande quantidade de eritrócitos gutiformes, com corpúsculos de inclusão acumulados na sua parte delgada. Após a esplenectomia, não são observadas mais células gutiformes e os eritrócitos apresentam numerosos vacúolos que contêm inclusões de cadeias α parcialmente digeridas. Esses achados indicam que o baço tem atuação sobre as hemácias que possuem corpúsculos de inclusão, deformando-as e tornando-as gutiformes, sugerindo

que a deformação das hemácias seria decorrente de uma forte atração exercida pelo baço sobre as inclusões nelas contidas.

Além de estarem associadas com a deformação dos eritrócitos, os corpúsculos de inclusão causam alteração da permeabilidade da membrana dessas células, permeabilidade essa acentuadamente aumentada a favor do sódio e do potássio. Provavelmente a lesão da membrana resulta de traumatismos mecânicos, quando os corpúsculos de inclusão são extraídos das hemácias durante a passagem através dos sinusóides esplênicos. Tal lesão poderia seguir-se, também, à ligação dos grupos sulfidrila da membrana com as cadeias α precipitadas. A anormalidade no funcionamento da membrana ocorre mais intensamente nas populações de células que apresentam maior desequilíbrio na síntese de cadeias hemoglobínicas. As células que apresentam maior quantidade de hemoglobina fetal, em conseqüência da maior síntese compensatória de cadeias gama, não apresentam um grau tão acentuado de lesão de membrana e têm uma sobrevida mais longa (Ramalho, 1986).

Estudos comparativos com hemácias e membranas isoladas de indivíduos com α e β talassemia, apresentaram maior rigidez em relação à dos normais. Contudo, as membranas dos β talassêmicos são menos estáveis e facilmente fragmentadas, enquanto que as dos α talassêmicos são mais estáveis que a dos indivíduos normais (Advani et al, 1992).

Todas essas observações de alterações de membranas provocadas por desestabilização do citoesqueleto nos eritrócitos, foram efetuadas em relação às α e β talassemias, sem se preocupar com o tipo específico de alteração molecular.

1.2 - Colinesterase

As colinesterases, são enzimas que hidrolisam esteres de colina para formar colina e o ácido graxo correspondente. Dois tipos distintos de colinesterases são bem reconhecidos: acetilcolinesterase (AChE) e colinesterase (ChE), cujas atividades foram evidênciadas por Alles & Hanes, 1940.

A acetilcolinesterase, conhecida como colinesterase específica ou colinesterase dos eritrócitos (acetilcolina acetilhidrolase, EC 3.1.1.7), está usualmente localizada nas membranas de eritrócitos de vertebrados e não vertebrados, bem como de outros tecidos: pulmão, baço e sistema nervoso central. A enzima controla o fluxo iônico em membranas excitáveis e têm um papel essencial em processos de condução nervosa para junção neuromuscular.

A colinesterase, conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase inespecífica (acilcolina acilhidrolase, EC 3.1.1.8), ocorre principalmente no coração, fígado, pancreas e substância branca do cérebro.

A colinesterase catalisa a hidrólise de ésteres de colina com alta velocidade para butirilcolina, butiriltiocolina e outros ésteres de butiril. Já a acetilcolinesterase catalisa a hidrólise de ésteres de colina com alta afinidade para acetilcolina, acetiltiocolina e outros ésteres de acetil (Brown et al, 1981).

O papel biológico da AChE envolve a hidrólise de acetilcolina na junção sináptica, estando presente nas membranas pré e pós-sináptica do sistema nervoso central (SNC) e periférico (Politoff et al, 1975). Por outro lado, a função fisiológica da ChE plasmática não está muito clara, e alguns autores acreditam que sua principal função envolve a hidrólise de ésteres de colina produzidos "in vivo" e que poderiam inibir a AChE (Lehmann & Silk, 1953).

Em geral, as colinesterases são inibidas por uma variedade de drogas como: organofosfatos, organosulfonados, carbamatos, clorofórmio, cafeína, ácido ρ-aminobenzóico e outros. Alguns desses compostos agem como inibidores reversíveis formando ligações não covalentes com a enzima, por exemplo a atropina, o clorofórmio e o ácido ρ-aminobenzóico (Lott & Wolf, 1986). Compostos do tipo organofosfatos, organosulfonados e carbamatos atuam como inibidores irreversíveis através de ligação covalente com o grupo seril presente no sítio ativo da enzima (Brown et al, 1981).

Heller e Hanahan (1972) mostraram que a atividade da acetilcolinesterase em eritrócitos humanos está associada com a membrana. A utilização de enzimas proteolíticas reduz ou abole a atividade da

acetilcolinesterase, sem causar hemólise ou alteração da atividade da lactato desidrogenase intracelular; portanto a acetilcolinesterase está acessível a enzimas proteolíticas sugerindo sua ligação à superfície externa da membrana.

Em 1921, Key foi o primeiro a observar que a densidade dos eritrócitos no sangue total aumenta com a idade das células *in vivo*. Através de uma simples centrifugação, pode-se separar as células vermelhas em duas classes "jovens" e "velhas". A atividade da acetilcolinesterase foi menor nas células velhas.

Reticulócitos têm atividade da acetilcolinesterase insignificante; esta é rapidamente adquirida com a maturação dos eritrócitos. A atividade por célula alcança um máximo e então, depois de um período constante, declina de novo em direção ao final da vida da célula (Galbraith & Watts, 1981).

Alterações na atividade da acetilcolinesterase (AChE) têm sido notadas em paralelo a alterações no conteúdo lipídico de eritrócitos humanos. Há um decréscimo na proporção colesterol/fosfolipídeo com a idade das células, e isto é acompanhado por um decréscimo na atividade de enzimas ligadas à membrana, incluindo AChE. Pacientes com β talassemia *minor* e anemia hemolítica autoimune têm valores de atividade para AChE dentro da faixa de referência, mas redução dos níveis enzimáticos foram encontrados em outros pacientes com anemia hemolítica autoimune, β talassemia *major* e hemoglobinúria paroxística noturna (Lawson & Barr, 1987).

A acetilcolinesterase é uma enzima essencial no sistema nervoso, onde termina a ação da acetilcolina na membrana pós-sináptica. Entretanto, AChE é também encontrada em tecidos não colinérgicos tais como células hematopoiéticas, onde sua função não está bem conhecida. AChE de eritrócitos é um dímero ligada por pontes dissulfeto, cada subunidade está fixada na membrana eritrocitária por uma metade glicofosfatidilinositol. As formas cerebral e eritrocitária possuem um grande domínio catalítico comum mas diferem em seu resíduo C-terminal da cadeia polipeptídica, devido ao diferente processamento dos mRNAs e modificação póstranscricional, sendo que a AChE eritrocitária têm 26 aminoácidos a menos que a cerebral (Boschetti et al, 1996).

1.3 - Fragilidade Osmótica

Resistência osmótica indica a habilidade de eritrócitos receberem água sem que ocorra lise, esta habilidade é determinada pela proporção de sua superfície de área para com volume (Tietz, 1990).

As características semipermeáveis da superfície da membrana de um eritrócito faz de cada célula um osmômetro que muda em volume com mudanças na pressão osmótica do meio externo.

Um eritrócito normal de forma discoidal preserva sua forma quando suspenso em soro ou em solução salina artificial. A mesma célula suspensa em água destilada, rapidamente sofrerá uma transformação de

discoidal para esférica e lisará. A lise ocorre quando um excesso de água entra na célula e estende a membrana a ponto de provocar a saída de hemoglobina.

A fragilidade osmótica reduzida é uma caracteristica bem conhecida de eritrócitos talassêmicos (Rietti, 1925; Greppi, 1928). Isto é atribuído à redução no volume das células talassêmicas, devido ao seu baixo conteúdo hemoglobínico enquanto sua superfície de área permanece normal. Assim, as hemácias podem acumular grande quantidade de água em solução hipotônica antes do volume crítico para lise ser atingido (Dacie & Lewis, 1984).

Vettore et al (1974) confirmaram que a fragilidade osmótica de eritrócitos talassêmicos é bem mais reduzida sob incubação a 37°C por 24 horas em solução de NaCl. Dacie (1960) relatou um caso de anemia de Cooley em que ocorre uma redução do volume e uma perda de potássio após incubação dos eritrócitos. Gunn et al (1972) demonstraram que a % média de hemólise (50%) em indivíduos com talassemia *minor* foi na concentração de NaCl de 0,25 a 0,38 g/dL contra 0,38 a 0,43 g/dL, para indivíduos normais. Após a incubação por 24 horas a 37°C, a fragilidade osmótica para células normais aumentou (0,48 a 0,53 g/dL) enquanto que em células talassêmicas tornam-se mais resistentes à lise osmótica (0,15 a 0,33 g/dL).

1.4 - Lipídeos

A maioria das membranas possui um ladeamento específico, ou assimetria, o que também é explicado pelo modelo mosaico fluído. As camadas interna e externa da membrana plasmática das células animais diferem em composição que inclui diferença nos lipídeos e proteínas. A camada lipídica interna da membrana eritrocitária humana contém principalmente fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (aminofosfolipídeos), enquanto a camada externa contém principalmente fosfatidilcolina e esfingomielina (colinafosfolipídeos). (**Figura 2**)

O ladeamento das membranas biológicas é mantido e preservado em grande parte pela resistência da bicamada de fosfolipídeos à transferência de moléculas individuais, de uma face da membrana para a outra. Esta resistência é causada pela grande quantidade de energia necessária para empurrar as cabeças carregadas, polares, dos fosfolipídeos ao longo da base hidrocarbonada da membrana. Uma molécula lipídica polar na superfície de uma membrana é, portanto, livre para se mover no seu próprio lado da bicamada, mas é impedida de se deslocar da superfície externa.

No que se refere a bicamada lipídica dos eritrócitos, os fosfolipídeos encontram-se em um arranjo assimétrico que perfaz 75 a 80% dos que contém colina (fosfatidilcolina e esfingomielina) localizados no lado externo da membrana, enquanto que no lado interno permanecem os

aminofosfolipídeos (~100% de fosfatidilserina e 80% de fosfatidiletanolamina). Acredita-se que essa disposição lipídica deve-se à ligação das proteínas periféricas especificamente com a fosfatidilserina (Hebbel, 1991). (**Figura 2**).

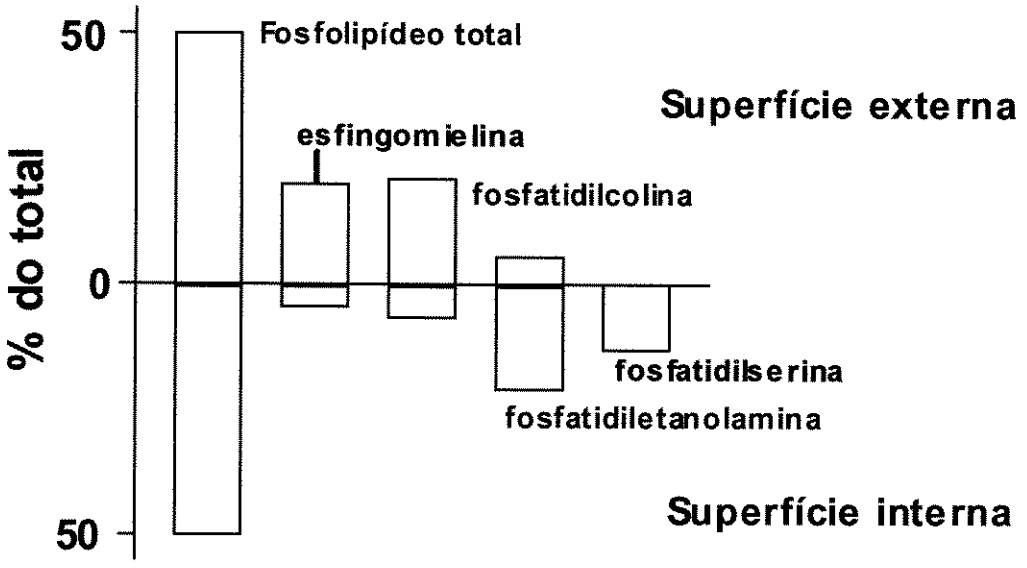

Figura 2: Distribuição assimétrica de fosfolipídeos em membranas de eritrócitos humanos. (Gennis, 1989. Adaptado pela autora)

O lado interno da membrana das hemácias é composto por um emaranhado de proteínas, o qual é responsável pela manutenção da forma, estabilidade e deformação dos eritrócitos (**Figura 3**).

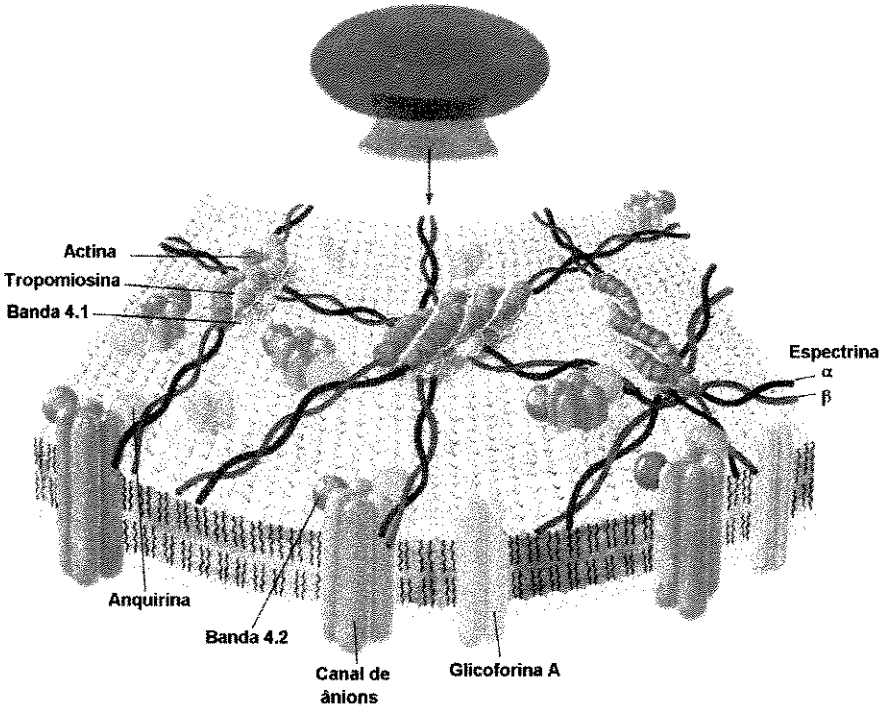

Figura 3: Diagrama esquemático da membrana de hemácia. (Voet & Voet, 1995. Traduzido pela autora)

Os maiores componentes deste complexo citoesqueleto de proteínas, incluem α e β espectrina, anquirina, proteína 4.1 e actina. Há evidências que a integridade do citoesqueleto é essencial para manter a assimetria lipídica. A assimetria lipídica está diminuída em células que apresentam deficiência ou de espectrina ou de proteína 4.1 (Gennis, 1989), além disso, eritrócitos β talassêmicos são moderadamente deficiêntes de espectrina (23% de espectrina a menos que o normal) e esta deficiência pode contribuir para a fragilidade da membrana (Shinar et al, 1989).

As membranas lipídicas são vitais para a manutenção da integridade celular e, além disso, a fluidez da membrana eritrocitária está condicionada pela relação entre as concentrações de colesterol e fosfolipídeos. Peroxidação de lipídeos da membrana pode resultar na união de lipídeos e proteínas da membrana e em morte das hemácias (Sansinanea et al, 1994).

Uma diminuição da proporção fosfolipídeo/colesterol tem sido associada com a diminuição da fragilidade osmótica de eritrócitos. Isto sugere que o dano provocado pela peroxidação lipídica na membrana pode ter um papel na alteração da organização lipídica e no aumento de fragilidade (Sansinanea et al, 1994).

Yuan et al (1994) sugerem que o acúmulo do excesso de cadeia globina nas talassemias afeta a assimetria lipídica normal e leva à exposição de fosfatidilserina para o lado externo. Assim, indivíduos com α e β

talassemias tem tendência a desenvolver uma assimetria fosfolipídica anormal, que pode contribuir para a remoção periférica e hemólise.

1.5 – Dano Oxidativo

Efeitos prejudiciais causados por espécies reativas de oxigênio ocorrem como uma conseqüência de um não balanceamento entre a formação e a inativação dessas espécies. O dano oxidativo pode estar envolvido na patogenia de doenças tais como câncer, aterosclerose e desordens neurológicas. Inativação e renovação das espécies reativas de oxigênio depende de reações envolvendo sistemas de defesa antioxidante. A capacidade de defesa antioxidante é determinada por uma interação dinâmica entre componentes individuais, tais como vitamina A, E e C e β–caroteno, glutationa redutase (GSH), e diversas enzimas antioxidante. Os mais importantes antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (CuZn-SOD; EC 1.15.1.1), a qual catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em H_2O_2, a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e a glutationa peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) que clivam a H_2O_2 a H_2O. Esta usa GSH como um doador de hidrogênio assim a GSH é oxidada. A regeneração de GSH (redução) é catalisada pela glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2) (Andersen et al, 1997).

As hemácias são suscetíveis ao dano oxidativo como um resultado do alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados de suas membranas e das altas concentrações celular de oxigênio e hemoglobina. O

envolvimento de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica em várias condições patológicas tais como aterosclerose, isquemia e anemia falciforme têm estimulado o interesse em pesquisar o processo de peroxidação lipídica. O dano oxidativo também gera anormalidades na hemoglobina e uma intensidade do stress oxidativo levando a lise dos eritrócitos.

O dano oxidativo nas células pode ser causado pela formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e H_2O_2. Nos eritrócitos, a superódixo dismutase (SOD) catalisa a degradação de $O_2^{\bullet -}$ resultando na produção de H_2O_2 e oxigênio. A H_2O_2 é reduzida à H_2O e oxigênio pela catalase e glutationa peroxidase (GPx) (Jansson et al, 1985).

$$2H^+ + 2O_2^{\bullet -} \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{catalase} H_2O + {}^1/_2 O_2$$

A superóxido dismutase é uma enzima que protege a célula do efeito deletério do radical superóxido livre (O_2^-). O superóxido pode ser gerado nas hemácias por autoxidação da hemoglobina. Autoxidação da oxihemoglobina ou cadeias isoladas de oxihemoglobina produzem superóxido, entretanto autoxidação de hemoglobinas instáveis ou de cadeias α e β isoladas, liberam superóxido em grande proporção que autoxidam a Hb A. Acúmulo excessivo de cadeias α e β é típico em hemácias de indivíduos

talassêmicos o que favorece a produção de superóxido (Yenchitsomanus & Wasi, 1983).

A peroxidação lipídica é um dos melhores e mais estudados exemplos de reação em cadeia iniciada por um radical livre. A maior parte dos ácidos graxos insaturados susceptíveis a oxidação estão presentes no lado interno da bicamada lipídica. Malondialdeido (MDA) é um produto formado a partir da peroxidação de ácidos graxos insaturados e é considerado um indicador da peroxidação lipídica (Sansinanea et al, 1994).

Em pacientes com talassemia *major* não transfundidos, o alto conteúdo de cadeias livres de hemoglobina, que produz ânion superóxido mais facilmente é considerado o primeiro fator para o aumento da peroxidação da membrana levando à produção de dez vezes maior de malondialdeído que o normal e conseqüêntemente à hemólise (Mavelli et al, 1982).

Além das enzimas que favorecem a análise da alteração lipídica da membrana, a análise da concentração de creatina em eritrócitos têm sugerido ser um indicador da idade dos eritrócitos, hemólise e eritropoiese. Se a concentração de creatina de eritrócitos de pacientes com traço talassêmico for normal, é sugestiva de que os eritrócitos têm uma idade normal, embora em β^0 talassemia, anemia falciforme e anemia hemolítica a concentração aumente (Beyer & Alting, 1996).

Os eritrócitos normais são protegidos contra a combinação danosa do ânion superóxido e ferro por mecanismos endógenos

extremamente eficientes tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase e vitamina E. Microcitose é uma conseqüência fisiopatológica de redução do conteúdo de hemoglobina nas hemácias devido a um defeito na síntese de cadeias globina ou de heme. Essas células são caracterizadas por uma menor sobrevida a dano oxidativo de membrana. Dados experimentais sugerem que dano oxidativo de hemácias microcíticas pode resultar de diferentes mecanismos operando juntos: excesso de cadeias globina não pareadas intracelular, aumento do conteúdo intracelular de ferro não hemoglobínico ou diminuição da concentração de hemoglobina. Enquanto nenhum mecanismo está claro porque elevados danos oxidativos ocorrem em hemácias β talassêmicas, diversos estudos mostraram que o excesso de cadeia globina autoxidada, libera heme e gera superóxido ($O_2^{\bullet -}$) a uma proporção oito vezes maior que a hemoglobina normal.

De acordo com Vives Corrons et al (1995) a pirimidina-5'-nucleotidase é a enzima mais sensível a dano de grupo-SH *in vivo*, a qual se encontra reduzida em β talassemia. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tais como malondialdeído (MDA) e outros aldeídos monofuncionais, são produtos secundários da peroxidação lipídica, gerados em excesso em hemácias talassêmicas. A determinação da produção de MDA por eritrócitos *in vivo* é geralmente usada como um amplo indicador de sensibilidade de hemácias à estímulo pro-oxidante.

Em 1995, Shalev et al, estudou membranas de hemácias talassêmicas e falcêmicas em relação ao depósito de ferro, que mediaria uma variedade de disfunção da membrana através de indução oxidativa. Incubou hemácias de pacientes com talassemia *intermedia* e tratou pacientes com quelante de ferro, verificando que a terapia tanto *in vitro* como *in vivo* atenua a resposta a molondialdeído de membranas de hemácias talassêmicas, bem como houve uma redução do conteúdo de heme das membranas de indivíduos tratados com o quelante de ferro durante um período de três meses de estudo.

Livrea et al, 1996 avaliou o stress oxidativo e o estado antioxidante em β talassemia *major*, pela análise de malondialdeído e associou o nível de ferritina ao efeito deletério do alto nível de ferro. Seus resultados sugerem que a determinação dos produtos de peroxidação se igualam com avaliação de antioxidantes através de uma simples determinação da toxicidade do ferro em talassemia.

O dano oxidativo induzido foi proposto ser o mecanismo para a perda da assimetria fosfolipídica da membrana eritrocitária. Em anemia falciforme, talassemia e diabetes bem como em erotrócitos em envelhecimento, uma aparente correlação entre dano oxidativo e a perda da assimetria de fosfatidilserina tem sido reportada. Os dados obtidos por de Jong et al, 1997, mostram que as hemácias não expõem fosfatidilserina na superfície da membrana como resultado de um stress oxidativo induzido, mas

pode interferir na atividade da aminofosfolipídeo translocase e induz a randomização do cálcio de fosfolipídeos da membrana.

A organização fosfolipídica da membrana eritrocitária é mantida rigidamente por um sistema complexo de enzimas. Entretanto, diversos elementos deste sistema são sensíveis ao dano oxidativo. Um componente importante na destruição de hemácias de β talassêmicos é a produção de espécies reativas de oxigênio e a liberação de ferro redox ativo. Quando Kuypers et al, 1996 incubaram hemácias a 37ºC por 24 horas com a introdução de excesso de cadeia α, e verificaram que as células β talassêmicas apresentavam perda da deformabilidade indicando dano oxidativo, conservando uma distribuição de fosfolipídeo endógeno normal. Através do estudo transmembrânico de spin para fosfatidilcolina observaram uma perda completa de lisofosfatidilcolina no controle, enquanto que nos β talassêmicos não, sugerindo um reparo ao dano oxidativo. Kuypers et al, 1998, estudando a assimetria fosfolipídica da membrana, notaram que em β talassemia a exposição de fosfatidilserina em subpopulações de células ocorre na membrana inteira ou localizada em possíveis regiões ricas em cadeias α ligadas a membrana. E levantou a hipótese de que esses sítios de membrana em que o ferro da cadeia globina se acumula e causa o dano oxidativo, pode ser importante na perda da organização da membrana lipídica.

Linpisarn et al, 1991 com a finalidade de esclarecer o efeito do ferro na peroxidação lipídica, analisaram três pontos: 1º O efeito de uma única

injeção intravenosa de ferro na peroxidação lipídica em vários tecidos e no plasma de ratos foram examinados através da reação com ácido tiobarbitúrico. As concentrações de malondialdeído foram significativamente elevadas no baço, coração e plasma após três horas da injeção. A concentração de malondialdeído plasmática foi 70 vezes maior que o controle 24 horas após a injeção de ferro. Houve um decréscimo do nível de MDA após 6 dias e foi observado que em hemácias a peroxidação lipídica não foi afetada pelo ferro. 2º Experimentos *in vitro* demonstraram que a adição de ferro como cloreto férrico, ferro dextran, ferritina e hemosiderina em honogenato de fígado normal acelera a produção de MDA. 3º Comparando-se os níveis de MDA e ferro dos controles com os dos baços de oito pacientes talassêmicos notou-se um aumento relativo.

O nível, estrutura e função das lipoproteínas plasmáticas foram determinados em 67 pacientes homozigotos para β talassemia e comparados a indivíduos normais ou a pacientes heterozigotos da mesma família e com pacientes com anemia falciforme ou ferropriva. O colesterol total, LDL e HDL colesterol se apresentavam baixos para pacientes com anemia falciforme e β talassemia homozigota. O baixo nível de colesterol, LDL e HDL foi independe da idade, transfusão sangüínea e esplenectomia. A estrutura e a composição das lipoproteínas foram anormais em indivíduos homozigotos para β talassemia. O LDL apresentava maior densidade, rico em triglicerídeos e pobre em éster de colesterol, enquanto o HDL existia como três populações

ricas em triglicerídeos e pobres no conteúdo de éster de colesterol. As partículas de LDL e HDL modificadas podem ser absorvidas rapidamente do plasma pela atividade de monócitos e macrófagos. (Goldfarb et al, 1991).

Pacientes com β talassemia homozigótica mostram um perfil de lipoproteínas anormal. Em heterozigotos assintomáticos o padrão lipídico é marcadamente menos afetado e está nitidamente relacionado a uma diminuição do risco cardiovascular. Os achados indicam que os pacientes com β talassemia homozigótica apresentam diminuição significativa dos níveis de colesterol, LDL-colesterol, HDL-colesterol, apo A-I, apo B e aumento no nível de triglicerídeo em relação aos heterozigotos ou controle. Entretanto em pacientes com β talassemia heterozigótica a diminuição do perfil ao risco cardiovascular estava aparente (baixos níveis de LDL-colesterol e apo B, e baixo valor de hematócrito), justificando a baixa prevalência para doença cardíaca isquêmica, mas não foi detectado modificação no nível plasmático de Lp(a) (Maioli et al, 1997).

Quando, Altamentova et al, 1997, estudaram pacientes β talassêmicos com severa anemia hemolítica em relação a lipoproteína de baixa densidade (LDL), primeiro exploraram o possível envolvimento de fosfolipídeos na interação oxidativa de LDL com hemoglobina, uma vez que a superfície da LDL é composta em grande parte de fosfolipídeos. A afinidade de ligação e a interação oxidativa de três variantes da Hb (Hb A e cadeias α e β isoladas) com LDL e lipossoma foram comparadas. Seus estudos revelaram

que capacidade da hemoglobina sofrer autoxidação é o ponto chave para a reatividade oxidativa da LDL. Portanto, modificações nas partículas de LDL em β talassemia reflete a oxidação da lipoproteína pelas cadeias α em circulação.

2 – OBJETIVOS

Visando o estudo da membrana eritrocitária de indivíduos portadores de β talassemia heterozigótica comparando-as com indivíduos normais, os objetivos foram:

1- Verificar a fragilidade osmótica das hemácias de indivíduos pertencentes à diferentes famílias talassêmicas.

2- Medir a atividade da acetilcolinesterase eritrocitária (AChE).

3- Determinar o conteúdo de colesterol e fosfolipídeos da membrana eritrocitária.

4- Relacionar o conteúdo de colesterol e fosfolipídeo com a atividade colinesterásica e fragilidade osmótica.

5- Observar a possível diferença na peroxidação lipídica.

6- Determinar as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GP_x).

7- Determinar os níveis séricos de colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos, ferro, ácido úrico e bilirrubina.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Equipamentos, Reagentes e Soluções

3.1.1 - Equipamentos: tubos de vacutainer de 5 mL com Na_2EDTA ou heparina; centrífuga Combate – Celm; Cobas Minus Vet – Roche; Cobas Mira Plus – Roche; espectrofotômetro E 225 D - Celm acoplado ao sistema para bioquímica SB 215 P; banho-maria – Fanenn, modelo 312, evaporador rotatório – Tecnal, modelo TE-120.

3.2.1 - Reagentes e Soluções: Todos os reagentes utilizados eram de grau analítico e conservados em frascos âmbar e sob refrigeração.

a) Tampão fosfato 100 mM pH 7,7: Dissolver 6,9 g de $NaH_2PO_4.H_2O$ em 500 mL de água destilada (solução A). Dissolver 14,19 g de Na_2HPO_4 em 1000 mL de água destilada (solução B). Ajustar o pH para 7,7 por adição da solução A em B.

b) Iodeto de acetiltiocolina 16,71 mM: Dissolver 10 mg de iodeto de acetiltiocolina (Sigma A-5751) em 2,0 mL de tampão fosfato.

c) Ácido 5.5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,277 mM: Dissolver 11 mg de DTNB (Sigma Q-1250) em 50 mL de tampão fosfato 100 mM e acrescentar 50 mL de água destilada.

d) Cloreto de sódio tamponado a 10 g/dL: Dissolver 18 g de NaCl, 2,73 g de Na_2HPO_4 e 0,486 g de NaH_2PO_4 em 200 mL de água destilada. A partir desta solução de NaCl a 10%, preparar uma solução a 1%,

e a partir desta prepara-se uma bateria de tubos em duplicata com concentrações variáveis de 0,1 a 0,8%.

e) Álcool etílico, clorofórmio, álcool n-butílico e álcool isopropílico P.A. da Merck.

f) Sistema diagnóstico de colesterol COD-ANA, triglicerídeos, ferro e ácido úrico - Labtest.

g) HCl 1N: Pipetar 8,1 mL de ácido clorídrico P.A. e completar o volume para 100 mL com água destilada.

h) Nitrato de magnésio 10% em etanol: Dissolver 10 g de nitrato de magnésio em 100 mL de etanol P.A.

i) Molibdato-ascórbico: Ácido ascórbico 10% - dissolver 10 g de ácido ascórbico em 100 mL de água destilada. Molibdato de amônio 0,42% em H_2SO_4 1N – Dissolver 420 mg de molibdato de amônio em 100 mL de ácido sulfúrico 1N. Preparar uma solução contendo uma parte de ácido ascórbico 10% e seis partes molibdato de amônio 0,42% em ácido sulfúrico 1N.

j) Sistema diagnóstico de superóxido dismutase (Ransod), glutationa peroxidase (Ransel), HDL-colesterol e bilirrubina - Randox Laboratories Ltd.

k) MDA (1,1,3,3 tetraethoxypropane, Sigma T 9889): Dissolver 2,2 mg de malondialdeído em 10 mL de álcool etílico, obtendo-se uma solução 1mM. A partir dessa solução foi confeccionada uma curva padrão com as concentrações de 5, 10, 15 e 20 nmols.

l) Ácido tiobarbitúrico 10 mM (2 – Thiobarbituric acid, Sigma T 5500): Dissolver 144,1 mg de TBA em 100 mL de KH_2PO_4 75 mM.

3.2 - Obtenção das Amostras

A coleta de sangue se realizou através de punção venosa por meio de tubos vacutainer sem anticoagulante e, utilizando-se Na_2EDTA (sal do ácido etilenodiaminotetracético) ou heparina como anticoagulante. O material que não foi manipulado imediatamente, foi acondicionado e transportado em recipiente refrigerado por no máximo 4 horas.

O sangue foi coletado como descrito acima, a partir de voluntários humanos (com declaração de autorização) portadores de β talassemia. As amostras de sangue de indivíduos normais foram obtidas do Laboratório Universitário de Análises Clinicas da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP.

3.3 - Colinesterase

1. **Princípio**: acetiltiocolina é hidrolisada pela AChE em ácido acético e tiocolina.

$$\text{Acetiltiocolina} + H_2O \xrightarrow{\text{AChE}} \text{Ácido acético} + \text{Tiocolina}$$

A atividade catalítica é determinada pelo aumento do ânion amarelo, 5-tio-2-nitrobenzoato, produzido a partir da tiocolina reagindo com DTNB (ácido 5.5"-ditio-bis-2-nitrobenzóico)(Ellman et al, 1961).

2. **Preparo da amostra**: Foi utilizado de 500 μL a 1000 μL de sangue total para a preparação da papa de hemácias. Às amostras de sangue total foi adicionado 2,5 mL de tampão fosfato 100 mM pH 7,7 e levado a centrifugação 3.000 rpm (1.500 g) por 10 minutos, a fase superior foi retirada por aspiração, tomando-se o cuidado de retirar também o halo leucocitário e, ambos foram desprezados. O sedimento, constituído basicamente por eritrócitos, foi lavado por 3 vezes com tampão fosfato 100 mM pH 7,7 e mantido em suspensão do mesmo tampão (1,0 mL) para a determinação da atividade da AChE (Ellman et al, 1961).

3. **Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase**: Os eritrócitos lavados em tampão fosfato 100 mM pH 7,7 e mantidos em suspensão do mesmo tampão foram quantificados através de contagem em um Cobas Minus Vet (Roche).

Considerando que a acetilcolinesterase encontra-se ligada à membrana eritrocitária, foi desnecessária a hemólise para a medida de atividade. Assim, uma alíquota da suspensão eritrocitária (100 μL), devidamente diluída em 900 μL de tampão fosfato , foi utilizada no ensaio de atividade.

O meio de reação foi constituído de iodeto de acetiltiocolina 0,5 mM, tampão fosfato 100 mM pH 7.7, DTNB 0,32 mM . A medida da atividade foi efetuada de maneira contínua através da variação da absorbância em 405 nm à temperatura de 37ºC, durante o tempo de 3 minutos, como descrito por Ellman et al, 1961. A atividade da acetilcolinesterase será expressa em nU/ eritrócito.

4. **Medida de Atividade Colinesterásica**: a) Efetuar a contagem de eritrócitos na papa de hemácias suspensa no tampão. b) Diluir 100 μL da suspensão eritrocitária em 900 μL de tampão fosfato 100 mM pH 7.7. c) Medida da atividade: Tomar 20 μL da suspensão do ítem b, 30 μL de acetiltiocolina e 950 μL de DTNB. Iniciar a reação pela adição do substrato.

O tubo branco para medida de atividade consistiu de tampão, substrato e DTNB. Não foi necessário um branco para cada determinação, contudo, faz-se um branco antes da primeira e após a última medida de atividade do dia.

O cálculo consistiu em dividir o ΔA/min. pelo fator e este pelo número de eritrócitos em milhões.

3.4 - Fragilidade Osmótica

O envoltório da hemácia é uma membrana semipermeável. Quando hemácias são colocadas em uma solução hipertônica, elas perdem

líquido (e por isso se contraem e tornam-se crenadas) até que o equilíbrio osmótico seja estabelecido com o fluído circulante. Quando, entretanto, as hemácias são colocadas em solução hipotônica, elas embebem líquido (e assim se dilatam) até que o equilíbrio osmótico seja estabelecido ou até que elas se rompam. Segue-se, então, um limite à hipotonicidade da solução que as hemácias normais podem suportar.

A curva de fragilidade osmótica foi desenvolvida de acordo com o método de Dacie e Lewis (1970), a partir 5,0 mL de soluções de NaCl tamponadas de concentrações variáveis de 0,1 à 0,8% adicionados 20 μL de sangue total, homogeneizados e incubados a 37°C por 24 horas. Os tubos provenientes da incubação foram centrifugados a 3.000 rpm (1.500 g) por 10 minutos, e nos sobrenadantes foram determinadas as absorbâncias à 540 nm referentes a quantidade de hemoglobina liberada. O tubo que continha a concentração de NaCl 0,8% foi utilizado como branco e o de 0,1% como padrão de hemólise de 100%. A cada determinação foi executado em paralelo o mesmo procedimento controle de uma espécime normal.

Foram feitos os cálculos de cada leitura dos sobrenadantes em comparação ao 100% de hemólise. A fragilidade celular média, foi definida como a concentração de NaCl na qual 50% dos eritrócitos são hemolisados, calculados através do gráfico.

3.5 - Extração e Quantificação de Lipídeos

Amostras de sangue (5 mL) foram centrifugadas a 3.000 rpm (1.500 g) por 10 minutos, o plasma assim como o halo leucocitário foram descartados. As hemácias foram então lavadas por três vezes com 2,0 mL de solução salina (NaCl 0,9%) gelada, centrifugadas a 3.000 rpm (1.500 g) por 10 minutos.

A extração dos lipídeos foi executada de acordo com o método utilizado por Garnica et al (1994), onde 1,0 mL de células vermelhas lavadas foram pipetadas em um tubo de ensaio de 50 mL, adicionados 1,0 mL de água destilada para promover a hemólise, homogeneizado e deixado em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionados lentamente e sob agitação, 11,0 mL de isopropanol. Depois de permanecer por uma hora em temperatura ambiente e sob agitação ocasional, foram adicionados 7,0 mL de clorofórmio, nas mesmas condições. Após outra hora, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1.500 rpm (380 g).

Alíquotas de 2,0 mL de sobrenadantes (contendo o extrato lipídico) foram separadas, para serem utilizadas nas determinações de colesterol e fosfolipídeos. As alíquotas foram secas em evaporador rotatório e permaneceram por um dia em dessecador a vácuo, contendo sílica gel dessecante.

O extrato seco de um dos tubos foi resuspenso em 1,0 mL de isopropanol e o colesterol foi determinado pelo método enzimático-

colorimétrico (colesterol COD-ANA, Labtest, Sistema para Diagnóstico, de acordo com o método de Trinder). O extrato lipídico do outro tubo foi utilizado para determinação dos fosfolipídeos como fósforo orgânico, de acordo com o método descrito por Ames & Dubin (1960).

O conteúdo de colesterol (C) e fosfolipídeos (Pl) foram expressos em mg por mL de hemácias e, também foi calculada a proporção molar C / Pl presentes na mesma quantidade de extrato lipídico.

3.6 – Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) e Glutationa Peroxidase (GPx)

3.6.1 – CuZn-Superóxido Dismutase

A determinação da atividade da CuZn-SOD foi executada utilizando o sistema diagnóstico (Ransod, Randox Labs. cat. nº SD 125, Crumlin, UK) baseado no método desenvolvido por McCord & Fridovich, 1969.

1. **Princípio da SOD**: Acelerar a dismutação do radical tóxico superóxido ($O_2^{\bullet -}$), para oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Este método emprega xantina e xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido o qual reage com cloreto de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium (INT) para formar uma formazona vermelha, produto utilizado como detector. A SOD inibe a formação da formazona vermelha e a atividade é determinada como % de inibição comparada à uma curva de calibração com SOD purificada.

$$Xantina \xrightarrow{XOD} Ácido\ úrico + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{INT} Formazona$$

$$2\,O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

2. **Preparo da amostra para SOD**: Centrifugar 0,5 mL de sangue por 10 minutos a 3.000 rpm (1.500 g) e aspirar o plasma. As hemácias foram lavadas por quatro vezes com 3,0 mL de solução de NaCl 0,9% centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm (1.500 g) após cada lavagem. Às hemácias lavadas foi adicionado 2,0 mL de água destilada gelada, misturados e mantido por 15 minutos a 4ºC. O lisado foi diluído 25 vezes com tampão fosfato 0,1 mM pH 7,0.

3. **Medida de Atividade da SOD**: A atividade foi determinada com 50 μL da amostra diluída e 1,7 mL de substrato (xantina), misturar e adicionar 0,25 mL de xantina oxidase (sendo o meio de reação composto 0,05 mM de xantina e 0,025 mM INT no reagente principal e 800 U/L de xantina oxidase no reativo de partida), misturar e ler a absorbância inicial (A_1) depois de 30 segundos e ler a A_2 depois de 3 minutos. A temperatura utilizada foi de 37ºC a um comprimento de onda de 505 nm. A concentração final dos reagentes usados na análise foram 0,05 mM de xantina e INT 0,025 mM no reagente principal e 80 U/L de xantina oxidase no reagente de início.

Uma curva padrão deve ser feita previamente às determinações com os padrões provenientes do sistema diagnóstico.

Os cálculos são efetuados através da diferença de absorbâncias dividido por 3. Esse resultado são subtraídos de 100 para se obter a % de inibição. A partir do log da % de inibição para os padrões foi feito um gráfico de valores de log versus % de inibição. Faz-se o mesmo cálculo para as amostras e verifica-se através do gráfico o valor do log, calculando-se o antilog se determina o valor da SOD em U/mL, dividindo-se pelo valor da hemoglobina em g/mL, obtém-se o valor em U/g Hb.

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \Delta A / \min \; de \; padrão \; ou \; amostra$$

$$100 - \frac{(\Delta A_{amostra \; / \min .} \; x \quad 100)}{(\Delta A_{branco \; / \min .})} \quad = \quad \% \; inibição$$

$$SOD \; unidades \; / \; gHb = \quad \frac{SOD \; unidades \; / \; mL}{gHb \; / \; mL}$$

3.6.2 – Glutationa Peroxidase

A atividade total da GPx foi determinada pela ação da enzima sobre terc-butil hidroperóxido como substrato (Paglia & Valentine, 1967).

4. **Princípio da GPx**: A glutationa peroxidase (GPx) catalisa a oxidação da glutationa, que em presença da glutationa redutase (GR) e NADPH, é reduzida com concomitante oxidação do NADP. O decréscimo em absorbância é determinado a 340 nm à 37ºC.

$$2\,GSH \;+\; ROOH \xrightarrow{GP_x} ROH \;+\; GSSG \;+\; H_2O$$

$$GSSG \;+\; NADPH \;+\; H^{+} \xrightarrow{GR} NADP^{+} \;+\; 2GSH$$

5. **Preparo da amostra para GPx**: 0,05 mL de sangue heparinizado com 1,0 mL do agente diluente do sistema diagnóstico foram incubados a 37ºC por 5 minutos e adicionar 1,0 mL de reagente de Drabkin's. É recomendado que a amostra seja analisada 20 minutos após a adição do Drabkin's, o qual inibe a atividade da peroxidase de hemoglobina.

6. **Medida da atividade da GPx**: Utilizando o método semi-micro do sistema diagnóstico, e acrescentado 20 μL de amostra diluída com 1,04 mL do reagente mais hidroperóxido, misturados e feitas as leituras após um, dois e três minutos de aspirada a mistura no espectrofotômetro. Há a necessidade de fazer concomitantemente um branco onde se substitui a amostra por água destilada. A concentração do reagente utilizado por análise era glutationa 4 mM, glutationa redutase 0,5 U/L e NADPH 0,28 mM reconstituído com tampão fosfato 0,05 M, pH 7,2 com 4,3 mM de EDTA. O hidroperóxido estava em concentração igual a 0,18 mM diluído com água deionizada antes do uso.

Os cálculos são efetuados através da subtração do valor da ΔA/min. do branco da ΔA/min. da amostra e este valor multiplicado pelo fator fornecido pelo sistema de diagnóstico resultando em U/L, dividindo este pelo valor de hemoglobina g/dL obtemos os valores em U/g Hb.

$$U / L \; de \; Hemolisado \quad = \quad 8412 \quad x \quad \Delta A \, 340 \; nm / \min .$$

$$GPx \; U / gHb = \quad \frac{U / L}{Hb \; g / dL}$$

3.7 – Determinação do Malondialdeído

A dosagem de MDA (malondialdeído) é um método muito simples, baseado na reação deste com o ácido tiobarbitúrico em condições ácidas e aquecimento. O método do ácido tiobarbitúrico (TBA) para dosagem do MDA foi originalmente proposto por Kohn & Liversedge, 1944 de acordo com a reação representada na **Figura 4**.

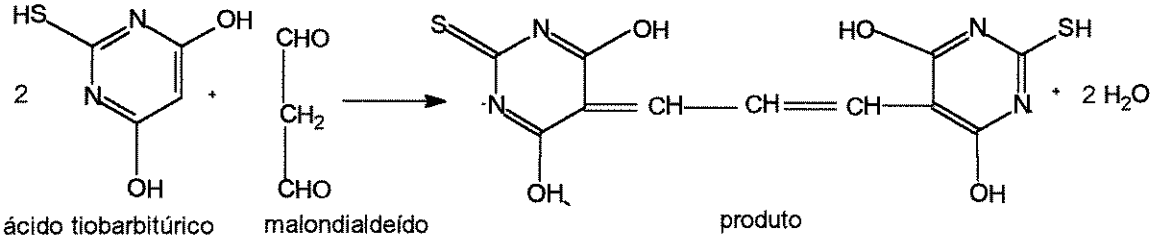

Figura 4: Reação de dosagem do MDA (Percário, 1996. Adaptado pela autora)

O MDA é um pequeno aldeído de três carbonos, produzido em sistemas lipídicos como resultado de processos de peroxidação lipídica, que reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo MDA-TBA que apresenta cor rósea e pico máximo de absorbância em 535 nm.

A dosagem consiste em reagir 500 μL de plasma com 1,0 mL do reagente do ácido tiobarbitúrico 10 mM, em seguida leva-se ao banho-maria a 95ºC por 60 minutos, após a incubação, arrefecer à temperatura ambiente ou em água corrente. Adicionar 4,0 mL de álcool butílico, homogeneizar e centrifugar a 3.000 rpm (1.500 g) por 15 minutos. Separar 3,0 mL de sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm.

3.8 – Níveis de Colesterol, HDL-colesterol, Triglicerídeos, Bilirrubina, Ácido úrico e Ferro Séricos

O sangue foi coletado em tubos de vacutainer sem anticoagulante permanecendo a 37ºC para que ocorresse a retração do coágulo, logo após foram centrifugados por 10 minutos a 5.000 rpm (4.000 g). O soro obtido foi utilizado para as determinações dos níveis de colesterol, HDL-colesterol, triglicerídeo, ácido úrico, ferro e bilirrubina séricos.

3.8.1 – Colesterol

1. **Princípio**: Os níveis de colesterol foram determinados pelo método enzimático – colorimétrico colesterol COD-ANA, Labtest, de acordo com as seguintes reações:

$$\acute{E}ster\ de\ colesterol \xrightarrow{colesterol\ \ esterase} Colesterol + \acute{A}cidos\ graxos$$

$$Colesterol + O_2 \xrightarrow{colesterol\ \ oxidase} Colest-4-en-3-ona + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + Fenol + 4-aminoantipirina \xrightarrow{peroxidase}$$
$$Antipirilquinonimina + 4H_2O$$

2. **Determinação**: Foi utilizado 20 μL de soro ou padrão de colesterol para 2,0 mL de reativo (sendo o reativo composto de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0; colesterol esterase 250 UL; colesterol oxidase 250 UL; peroxidase 1000 UL; 4-aminoantipirina 0,5 mM e fenol 2,4 mM), misturar e ler a absorbância em 500 nm, após a permanência a 37ºC por 10 minutos.

O cálculo constitui em dividir a absorbância da amostra pela absorbância do padrão e multiplicar pela concentração do padrão.

3.8.2 – HDL – colesterol

1. **Princípio:** Utiliza - se o mesmo princípio da determinação de colesterol, porém é executada uma pré incubação do soro ou padrão com tampão ciclodextrina sulfato 0,5 mM que causa a formação de complexos solúveis em água com LDL, VLDL e QM. Estes complexos são resistentes a ação enzimática e portanto com a adição do reativo só a HDL – colesterol sofre a ação dos componentes do sistema.

2. **Determinação**: Utilizando-se 3 μL de amostra ou padrão foram adicionados a 150 μL de tampão ciclodextrina sulfato e após 5 minutos foi efetuada a leitura de absorbância (A_1), e então adicionados 55 μL do

reativo, misturar e após exatamente 5 minutos efetuar a leitura de absorbância (A_2).

O cálculo constitui em dividir o valor ΔA ($A_2 - A_1$) da amostra pelo ΔA ($A_2 - A_1$) do padrão e multiplicar pela concentração do padrão.

3.8.3 – Triglicerídeos

1. **Princípio**: Os níveis de triglicerídeos foram determinados pelo método enzimático – colorimétrico triglicerídeos GPO-ANA, Labtest, de acordo com as reações abaixo:

$$Triglicerídeos \xrightarrow{lipase\ lipoprotêica} Glicerol + Ácidos\ graxos$$

$$Glicerol + ATP \xrightarrow{gliceroquinase\ (Mg^{+2})} Glicerol-3-fosfato + ADP$$

$$Glicerol-3-fosfato + O_2 \xrightarrow{glicerol\text{-}3\text{-}fosfato\ oxidase} Dihidroxiacetona + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + 4-aminoantipirina + Fenol \xrightarrow{peroxidase}$$

$$Antipirilquinonimina + 4H_2O$$

2. **Determinação**: Foi utilizado 20 µL de soro ou padrão de triglicerídeo para 2,0 mL de reativo (constituído de tampão fosfato 50 mM, pH 7,5; lipase lipoprotêica 1400 U/L; gliceroquinase 1000 U/L; glicerol-3-fosfato oxidase 3500 U/L; peroxidase 440 U/L; 4-aminoantipirina 0,7 mM, ATP 0,18 mM; fenol 5,44 mM e íons magnésio), misturar e incubar por 10 minutos a 37ºC, ler as absorbâncias a 510 nm.

O cálculo consiste em dividir a absorbância da amostra pela absorbância do padrão e multiplicar pela concentração do padrão.

3.8.4 – LDL-colestrol

A concentração do LDL-colesterol pode ser calculada utilizando a equação de Friedewald que é muito exata para amostra cuja concentração de triglicerídeos não ultrapasse 400 mg/dL.

Equação de Friedewald:

VLDL- colesterol = triglicerídeo / 5

LDL- colesterol = colesterol total – (HDL + VLDL)

3.8.5 – Ácido úrico

1. **Princípio:** Os níveis de ácido úrico foram determinados pelo método enzimático – colorimétrico ácido úrico UOD-ANA, Labtest, de acordo com as reações abaixo:

$$Ácido\ úrico + O_2 + H_2O \xrightarrow{uricase} Alantoína + CO_2 + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + DHBS + 4-aminoantipirina \xrightarrow{peroxidase}$$

$$Antipirilquinonimina + 4\,H_2O$$

2. **Determinação**: Foi utilizado 50 µL de soro ou padrão de ácido úrico para 2,0 mL de reativo (constituído de tampão fosfato 50 mM, pH 7,5; uricase 84 U/L; peroxidase 750 U/L; 4-aminoantipirina 1 mM; ácido 3,5

dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato (DHBS) 4 mM), misturar e incubar por 10 minutos a 37ºC, ler as absorbâncias a 520 nm.

O cálculo consiste em dividir a absorbância da amostra pela absorbância do padrão e multiplicar pela concentração do padrão.

3.8.6 – Ferro

1. **Princípio:** Os níveis de ferro foram determinados pelo método colorimétrico, Labtest que se baseia em: o ferro ligado à transferrina, em meio ácido, se dissocia em íon férrico que é reduzido a forma de íon ferroso por adição da hidroxilamina. Após a adição de ferrozine ($C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2$) forma-se um complexo magenta brilhante cuja absorbância, medida a 560 nm, é proporcional à quantidade de ferro na amostra.

2. **Determinação**: Foi utilizado 500 µL de soro ou padrão de ferro para 2,0 mL de solução redutora (constituída de cloreto de hidroxilamina 0,36 M; tiosemicarbazida 0,014 M e t-octilfenoxipolietoxietanol 0,5 mM pH 2,2), homogeneizar e determinar a absorbância da amostra (A_1) em 560 nm. Adicionar uma gota de ferrozine (solução 0,0095 M de 3-(2-piridil)-5-6-bis(4-ácido fenil sulfônico) –1,2,4 triazina) e incubar por 10 minutos a 37ºC, ler as absorbâncias a 560 nm.

O cálculo consiste em dividir a ΔA ($A_2 - A_1$) da amostra pela absorbância do padrão e multiplicar pela concentração do padrão.

3.8.7 – Bilirrubina

1. **Princípio:** Os níveis de bilirrubina foram determinados pelo método colorimétrico, Randox que se baseia na determinação da bilirrubina total em presença de cafeína mediante a reação com ácido sulfanílico diazotado; a bilirrubina direta se determina na ausência de cafeína.

2. **Determinação**: Foi utilizado 20 μL de soro para 100 μL de reativo 3 (constituído de cafeína 0,26 M, benzoato de sódio 0,52 M) e 20 μL de reativo 2 (nitrito de sódio 25 mM, ácido sulfanílico 29 mM em ácido clorídrico 0,17 N), homogeneizar e determinar a absorbância da amostra (A_{BrD}) em 550 nm, após 10 minutos a temperatura ambiente e permanecendo por 20 minutos nas mesmas condições efetuar as leituras de absorbância da bilirrubina total (A_{BrT}) da amostra.

O cálculo consiste em multiplicar a absorbância da biliruubina direta por 14,4 e absorbância da bilirrubina total por 10,8.

3.9 – Análise Estatística

Os resultados da curva de resistência osmótica foram expressos como média ± erro médio padrão das porcentagens de hemólise obtidas em cada doador de uma mesma família.

A comparação de médias foi feita usando o test *t* de Student's não pareado bi-caudal, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Os resultados apresentados nos gráficos em barra expressam as médias ± desvio padrão.

4 - RESULTADOS

Dados hematológicos: A partir das amostras de sangue coletadas, foram determinados os dados hematológicos laboratoriais dos indivíduos β talassêmicos de acordo com os métodos convencionais, **Tabela 1**.

Tabela 1 – Dados hematológicos.

	Sexo / Idade	Hb (g/dL)	Hemácias ($x10^6$ /mm^3)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Família B						
A.B.	F / 31	11,7	5,35	65	21,6	33,4
Família C						
M.F.Q.C.A.	F / 42	10,9	6,29	60	17,3	29,0
J.C.A.	F / 12	11,1	6,39	59	17,3	29,6
M.Y.Q.C.G.	F / 43	10,2	5,33	63	19,1	30,4
L.C.G.	F / 13	10,8	5,70	62	18,9	30,4
Média		10,8	5,93	61	18,2	29,9
Família O						
C.N.O.	F / 84	11,8	5,67	68	20,8	30,4
$M.O.R._1$	F / 46	11,1	5,61	63	19,7	31,4
A.P.O.R.	F / 21	12,0	5,41	71	22,1	31,3
$M.O.R._2$	M / 17	12,2	5,91	65	20,6	31,8
A.L.O.R.	F / 10	11,8	5,54	66	21,2	32,0
Média		11,8	5,63	67	20,9	31,4
Família S						
P.B.E.	F / 21	11,1	6,25	58	17,8	30,7
Média Geral		*11,3	*5,76	*64	*19,7	*30,9

* $p < 0,0001$. Resultados estão expressos em média

Índices hematológicos padrões foram utilizados para estudo de hemácias normais e para identificar hemácias talassêmicas como células microcíticas e hipocrômicas. A média de hemácias contadas foi maior em talassêmicos [(5,76 ± 0,38) x 10^6 / mm^3] que em hemácias normais [(4,93 ± 0,41) x 10^6 / mm^3] (**Figura 5**). Uma anemia moderada foi observada, com valor de hemoglobina (11,34 ± 0,61 g/dL) que para células normais foi de (14,52 ± 1,12) (**Figura 6**). Como conseqüência do menor valor de VCM em talassêmicos (63,64 ± 3,91 fL) (**Figura 7**) do que em eritrócitos normais (84,11 ± 3,06 fL), os índices HCM e CHCM foram caracteristicamente menores em talassêmicos (19,66 ± 1,72 pg e 30,94 ± 1,21g/dL) que em hemácias normais (29,45 ± 1,17 pg e 35,03 ± 0,47 g/dL) **(Figura 8 e 9**). O resultados estão expressos pelos valores da média e estimativa do desvio padrão (SD). A comparação entre cada um dos vários dados hematológicos em relação aos normais nos dá um alto grau de significância com valores de $p < 0,0001$. (**Tabela 1**)

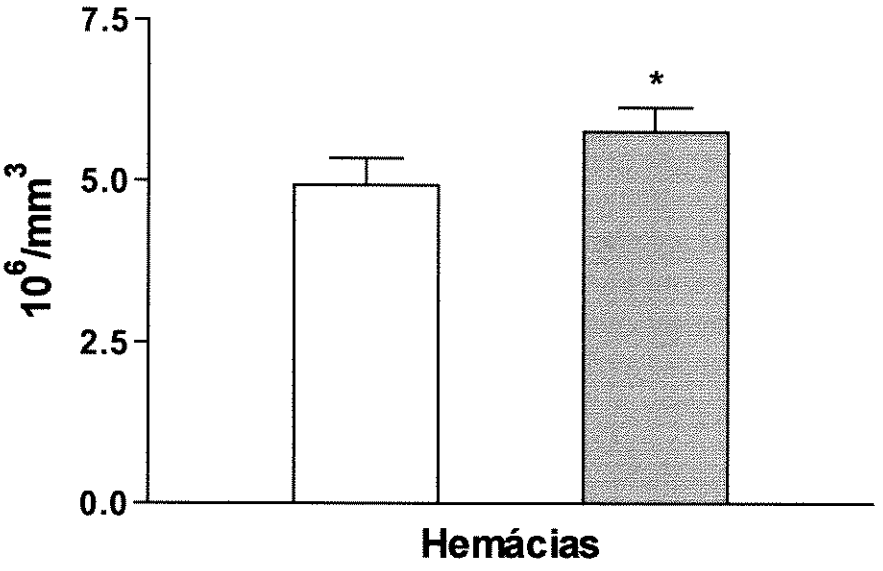

Figura 5: Quantidade de hemácias em indivíduos normais (❑) e talassêmicos (▒). *p < 0,0001.

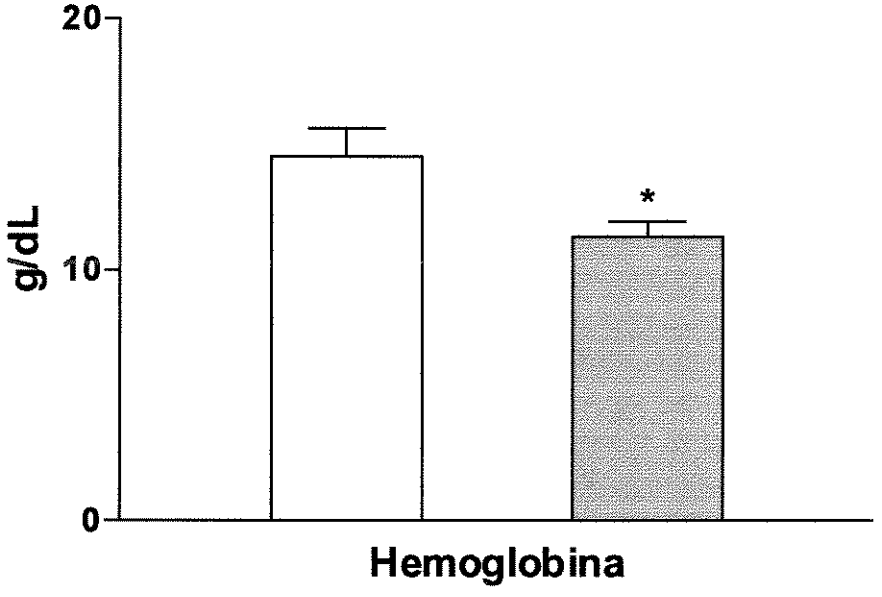

Figura 6: Quantidade de hemoglobina das hemácias de indivíduos normais (❑) e talassêmicos (▒). *p < 0,0001.

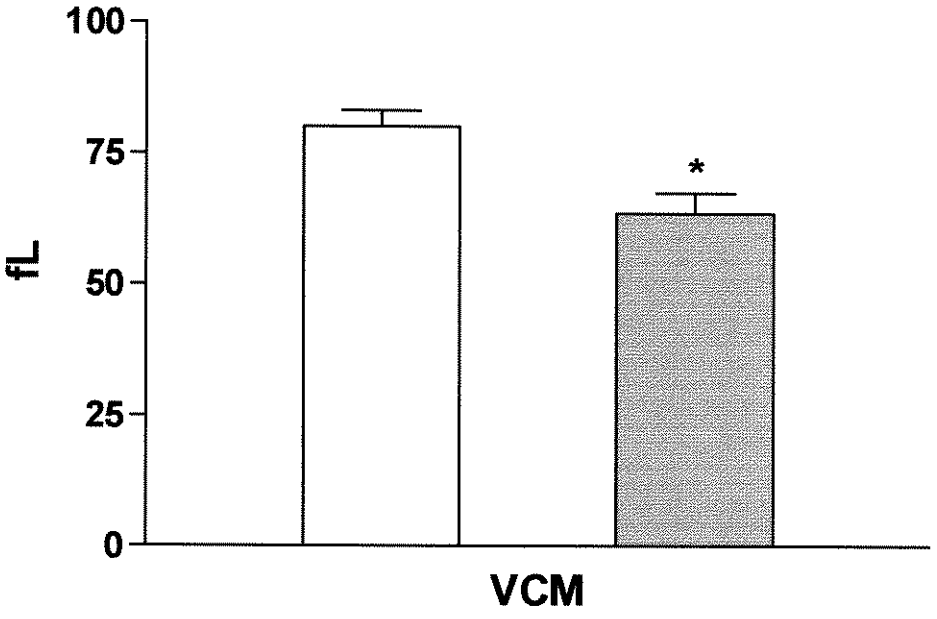

Figura 7: Volume corpuscular médio das hemácias de indivíduos normais (❑) e talassêmicos (▒). *p < 0,0001.

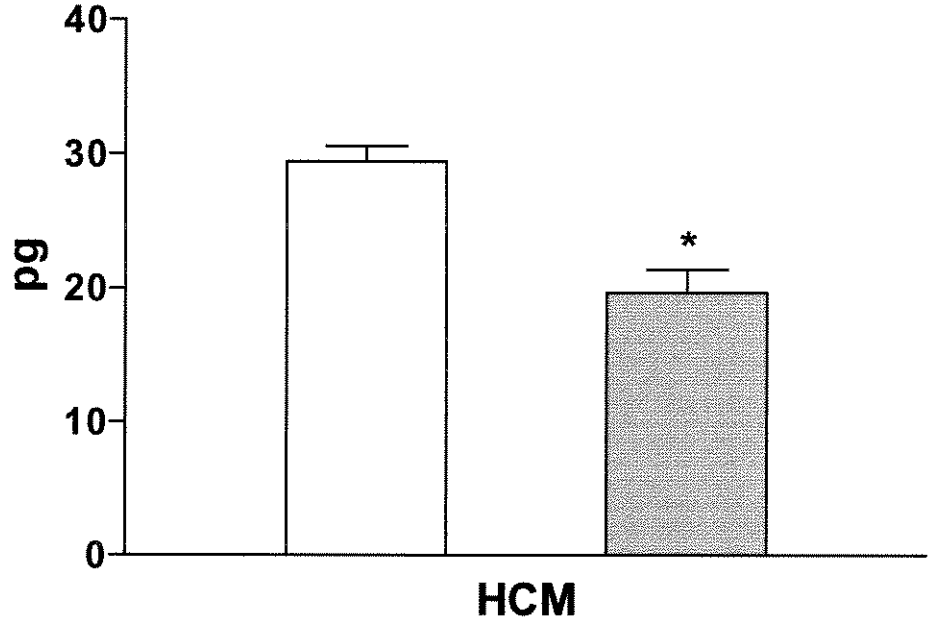

Figura 8: Hemoglobina corpuscular média das hemácias de indivíduos normais (❑) e talassêmicos (▒). *p < 0,0001.

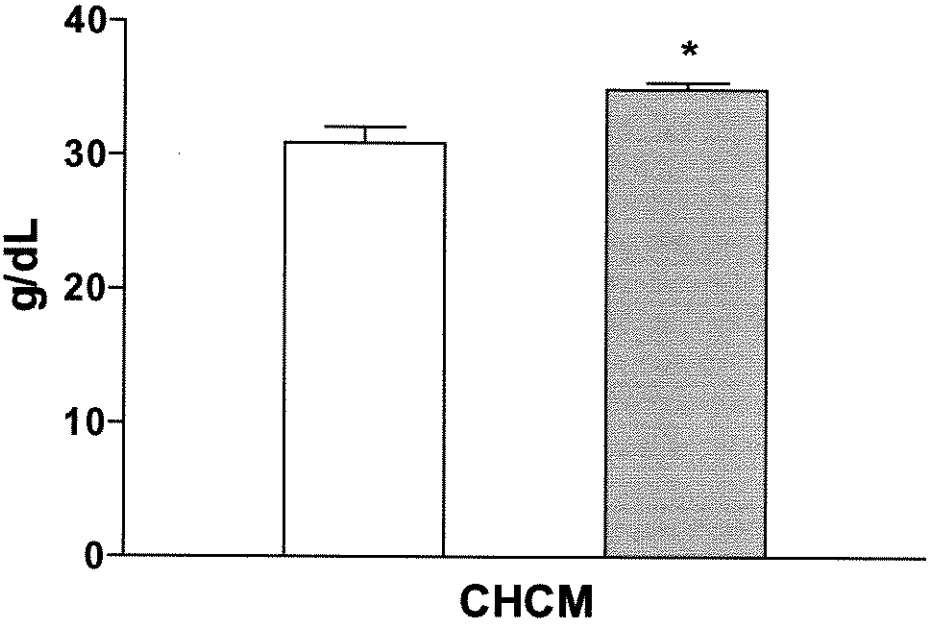

Figura 9: Concentração de hemoglobina corpuscular média das hemácias de indivíduos normais (❑) e talassêmicos (▒). *p < 0,0001.

Atividade da acetilcolinesterase: A análise da atividade da acetilcolinesterase (AChE) das famílias B, C, O e S em relação à indivíduos normais e, em comparação com valores de referência (Tietz, 1990), revela que a maioria dos valores está abaixo dos valores de referência (**Tabela 2**). A análise estatística apresentou extrema significância para as médias das famílias C e O e para os valores médios de todos os indivíduos com traço talassêmico em relação a média dos indivíduos normais (**Figura 10**).

Tabela 2: Atividade colinesterásica e fragilidade celular média de indivíduos normais e com β talassemia heterozigótica.

Indivíduos	Atividade colinesterásica (nU/eritrócito)	% Média de hemólise (% NaCl)
Normais (n=10)	0,88 - 1,13	0,51
Média	1,05 ± 0,08	
Família B		
A.B.	0,92	0,44
Família C		
M.F.Q.C.A.	0,14	0,30
J.C.A.	0,13	0,31
M.Y.Q.C.G.	0,14	0,28
L.C.G.	0,14	0,30
Média	* 0,14 ± 0,005	
Família O		
C.N.O	0,40	0,41
$M.O.R._1$	0,34	0,42
A.P.O.R.	0,56	0,40
$M.O.R._2$	0,41	0,41
A.L.O. R	0,41	0,42
Média	* 0,42 ± 0,08	
Família S		
P.B.E.	0,12	0,37
Média Geral	* 0,34 ± 0,25	

* $p < 0,0001$. Resultados expressos como média (SD)

De acordo com Pinilla et al, 1994 ocorre um declínio na atividade específica em enzimas de membrana (AChE) e intracelular (piruvato quinase, PK) dependentes da idade das hemácias.

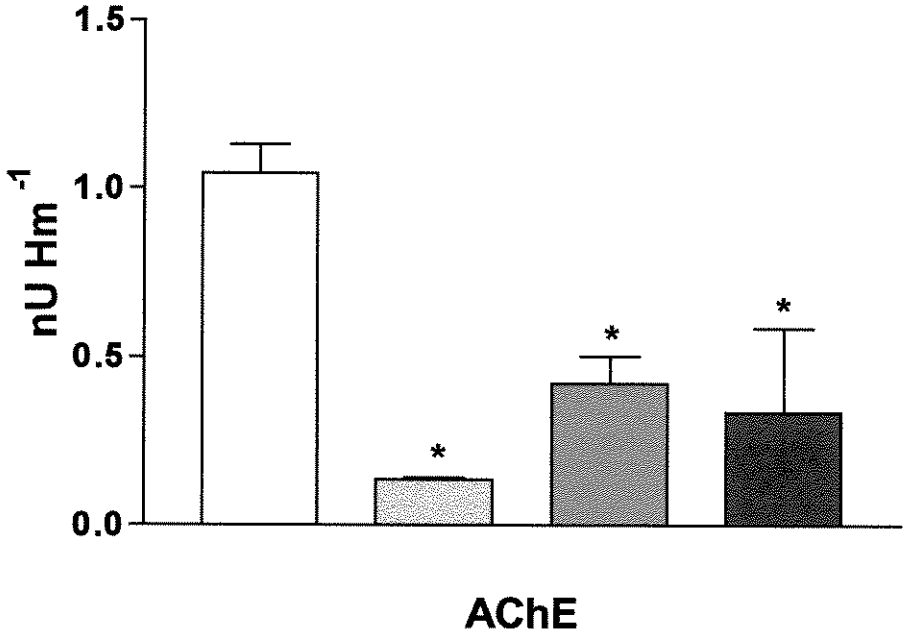

Figura 10: Atividade da acetilcolinesterase de membrana eritrocitária de indivíduos normais (❑), família C (▒), família O (▒) e todos os indivíduos talassêmicos (■). *p < 0,0001.

Fragilidade osmótica: As curvas de fragilidade osmótica de hemácias normais e das amostras de indivíduos com β talassemia heterozigótica estão representadas nas figuras 11 e 12. A fragilidade celular média após incubação de 24 horas a 37°C, para hemácias normais foi de 0,51 (50% de lise a 0,51 g/dL de NaCl) entretanto as hemácias talassêmicas foram mais resistentes a lise osmótica (50% de lise entre 0,28 a 0,44 g/dL de NaCl), como mostra a **Tabela 2**.

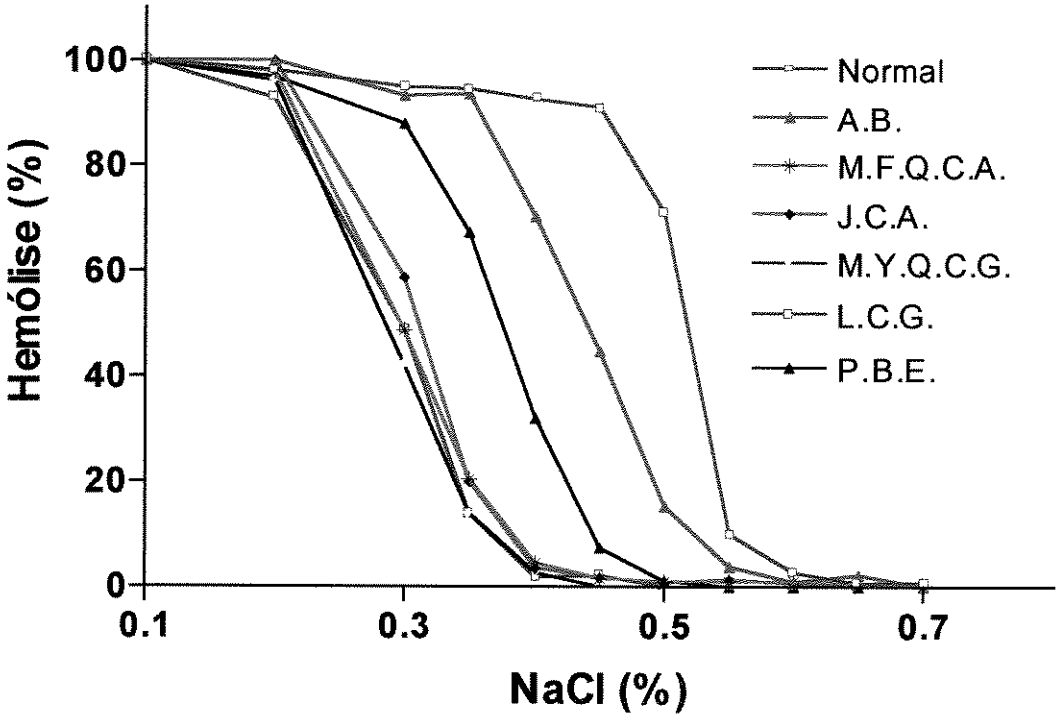

Figura 11: Curva de fragilidade osmótica de hemácias de pacientes com β talassemia heterozigótica (famílias B, C e S) comparada a de indivíduos normais (n=10). Incubação por 24 horas a 37°C.

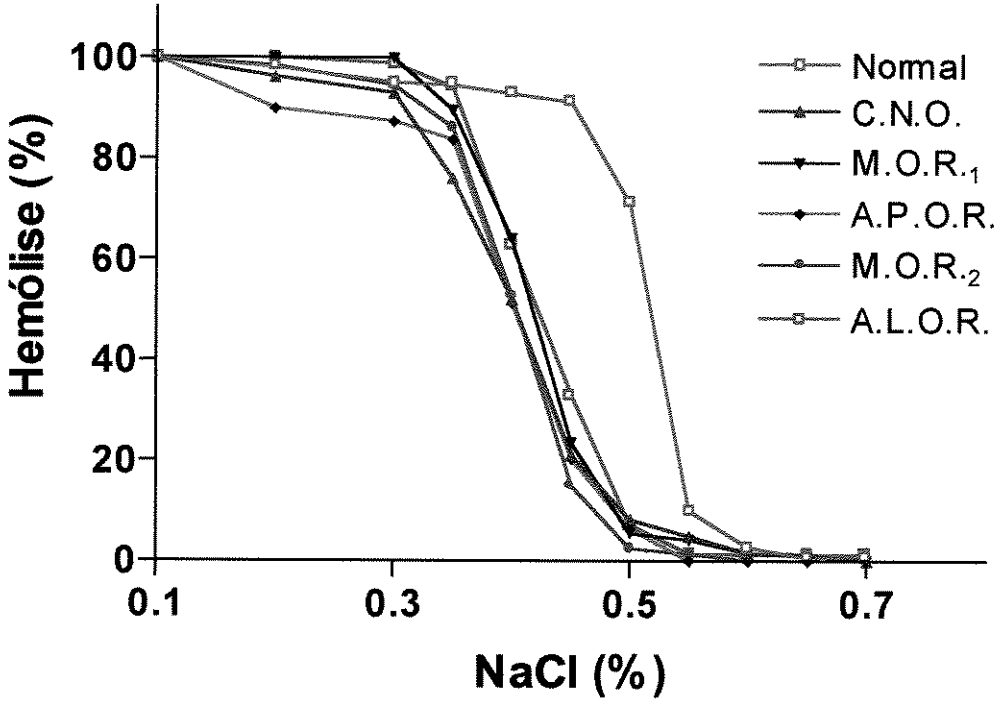

Figura 12: Curva de fragilidade osmótica de hemácias de pacientes com β talassemia heterozigótica (família O) comparada a de indivíduos normais (n=10). Incubação por 24 horas a 37°C.

As curvas de fragilidade osmótica das famílias C e O foram expressas como média dos pontos e analisadas através do erro médio padrão, e estão representadas na **Figura 13**.

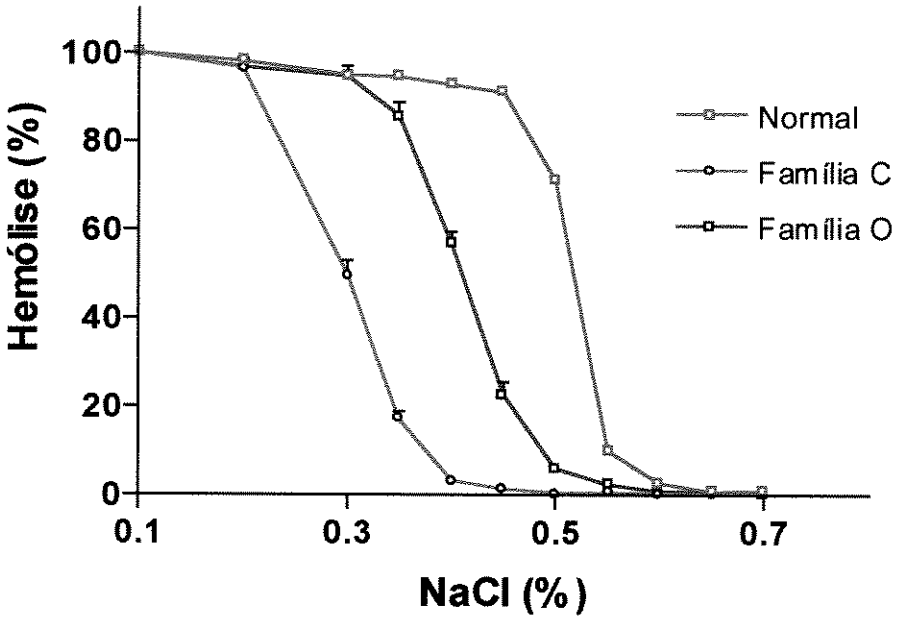

Figura 13 : Média das curvas de fragilidade osmótica das famílias C e O . Análise do erro médio padrão (SEM) em relação à normal.

Quantificação de lipídeos: Os lipídeos extraídos a partir de hemácias de indivíduos normais e das amostras de β talassemia heterozigótica foram analisados frente ao seu conteúdo de colesterol e fosfolipídeos em mg por mL de células. O conteúdo de colesterol, expresso como mg de colesterol por mL de hemácias, foi muito significante na família C quando comparado com indivíduos normais (1,25 ± 0,05 vs 1,14 ± 0,06; $p < 0,001$), e significante na família O (1,02 ± 0,11, $p < 0,01$).(**Tabela 3 e Figura 14**). Já para as famílias B e S os valores foram maior e menor que a média dos normais, respectivamente (**Tabela 3**).

O conteúdo de fosfolipídeo não difere entre as famílias C e O e o grupo normal (2,05 ± 0,36 e 2,12 ± 0,17 vs 2,23 ± 0,25), enquanto que os

valores para as famílias B e S em relação aos normais se encontram um pouco inferior.(**Tabela 3**) (**Figura 15**).

Tabela 3: Conteúdo de colesterol e fosfolipídeos em $mgmL^{-1}$ de hemácias.

Indivíduos	mg de colesterol/mL de hemácias	mg de fosfolipídeos/ mL de hemácias
Normais (n=10)	1,14 ± 0,06	2,23 ± 0,25
Família B		
A.B.	1,25	1,36
Família C		
M.F.Q.C.A.	1,21	1,77
J.C.A.	1,22	2,57
M.Y.Q.C.G.	1,25	1,84
L.C.G.	1,31	2,01
Média	**1,25 ± 0,05	2,05 ± 0,36
Família O		
C.N.O.	0,90	2,37
$M.O.R._1$	1,00	1,92
A.P.O.R.	1,00	2,00
$M.O.R._2$	1,00	2,12
A.L.O.R.	1,20	2,19
Média	*1,02 ± 0,11	2,12 ± 0,17
Família S		
P.B.E.	0,93	1,83
Média Geral	1,11 ± 0,14	1,99 ± 0,32

** $p < 0,0094$, * $p < 0,01$. Resultados expressos como média (SD)

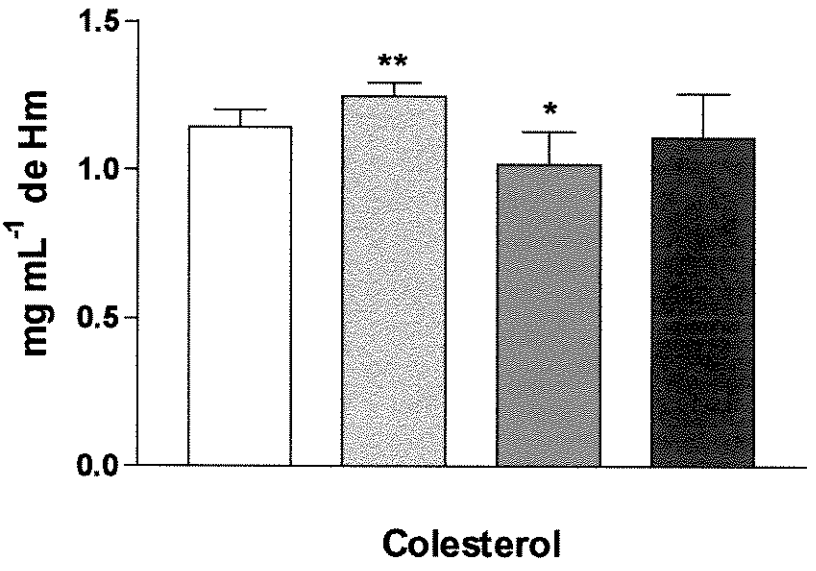

Figura 14: Conteúdo de colesterol da membrana eritrocitária de indivíduos normais (❑) , família C (▒) , família O (▒) e todos os indivíduos talassêmicos (■). *p < 0,01 e **p < 0,001.

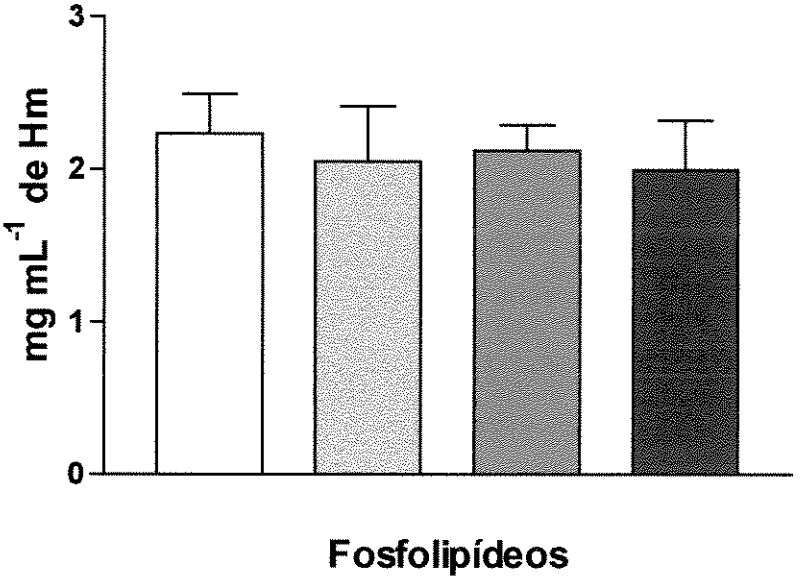

Figura 15: Conteúdo de fosfopídeos da membrana eritrocitária de indivíduos normais (❑) , família C (▒), família O (▒) e todos os indivíduos talassêmicos (■).

Fazendo-se a análise comparativa da proporção molar dos níveis de colesterol e fosfolipídeos (C / Pl) entre os indivíduos normais e as famílias B, C, O e S, podemos observar um aumento da proporção nas famílias B, C e S, enquanto que na família O não se notou alteração. Embora estatisticamente não observamos diferenças significativas, como mostra a **Figura 16.**

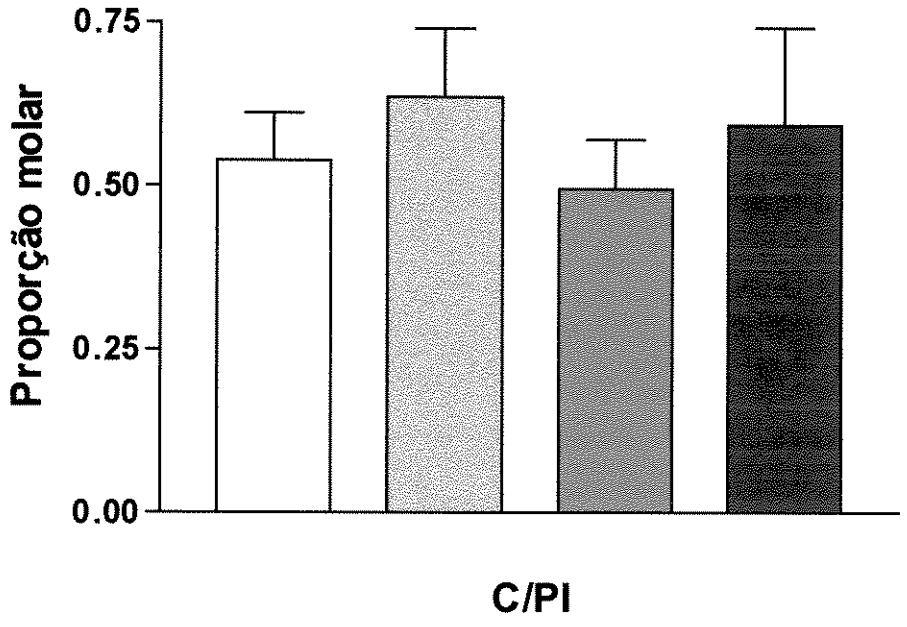

Figura 16: Proporção molar colesterol/fosfolipídeos da membrana eritrocitária de indivíduos normais (❑), família C (▒), família O (▒) e todos os indivíduos talassêmicos (■) .

Lipoperoxidação e antioxidantes: Com o objetivo de verificar se a alteração na quantidade de hemoglobina produzida causa alguma alteração na peroxidação lipídica dos indivíduos considerados traço talassêmico comparados aos indivíduos normais, fizemos a determinação dos

níveis de MDA como também a atividade da SOD e GPx. Os nossos resultados estão expressos na **Tabela 4.**

Tabela 4: Produção de MDA e mecanismos de defesa antioxidante em portadores de talassemia e em controle normal.

	MDA (nmol/gHb)	SOD (U/gHb)	GPx (U/gHb)
Família B	151,5	528,7	66,0
Família C	*321,9 ± 186,2	**362,0 ± 39,9	**233,7 ± 32,7
Família O	196,7 ± 32,4	348,7 ± 200,0	*218,6 ± 91,0
Família S	129,5	987,4	124,3
Média Geral	239,9 ± 140,8	*445,6 ± 234,9	*194,6 ± 82,5
Normais	148,6 ± 42,7	129,5 ± 47,8	79,7 ± 16,4

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Os resultados estão expressos como média (SD).

Observando os resultados da determinação de MDA das famílias, podemos notar que os valores são diferentes, porém só existe diferença significativa ($p < 0,05$) para a família C em comparação aos normais. O mesmo não acontece quando se verifica a atividade da SOD, a família C ($p < 0,001$) apresentou-se extremamente significante enquanto que todos os indivíduos talassêmicos ($p < 0,05$) significante em relação aos normais. Maior diferença significativa foi observada com a atividade da glutationa peroxidase, a média de todos os indivíduos talassêmicos bem como a família O ($p < 0,05$) são significantes enquanto a família C ($p < 0,001$) é extremamente significante comparados aos normais.

Ainda, com a finalidade de se associar o grau de indução a peroxidação lipídica entre o nível de ferro circulante e o MDA produzido, bem como a quantidade de superóxido formado através do aumento do ferro e a possível oxidação de LDL-colesterol e os efeitos antioxidantes do ácido úrico

e o efeito dessas substâncias em favorecer a hemólise, algumas determinações séricas foram analisadas de acordo com a **Tabela 5**.

Tabela 5: Características séricas de pacientes normais e β talassêmicos.

	Unidades	β Talassêmicos	Normais
Lipídeos			
Colesterol	mmol/L	4,6 (3,2 – 5,9)	4,4 (3,3 - 4,9)
HDL-colesterol	mmol/L	1,7 (1,3 – 2,3)	1,5 (0,9 - 2,1)
LDL-colesterol	mmol/L	2,4 (1,12 – 3,83)	2,5 (1,59 - 2,96)
Triglicerídeo	mmol/L	1,26 (0,9 – 1,73) *	0,9 (0,62 - 1,78)
Ácido úrico	mg/dl	3,8 (2,95 – 5,26)	3,3 (2,09 – 4,6)
Bilirrubinas			
Total	mg/dL	0,55 (0,25 – 1,0)	0,32 (0,20 – 0,59)
Indireta	mg/dL	0,38 (0,18 – 0,67) *	0,20 (0,12 – 0,34)
Ferro	μmol/L	19,6 (11,3 – 29,7) *	11,5 (5,7 - 23,4)

Resultados estão expressos como média, valores entre parênteses representa intervalo de dados obtidos. * $p < 0,05$.

Observamos um pequeno aumento do colesterol, bem como diminuição de LDL-colesterol e aumento de triglicerídeos existindo diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos normais. Os níveis de ácido úrico, bilirrubina e ferro ($p < 0,05$, mostrando serem significativamente diferentes quando comparados com os normais) aumentaram comprovando que há desestabilização da membrana através da interação do ferro e avaliação do grau de hemólise pela bilirrubina e defesa antioxidante com ácido úrico.

5 – DISCUSSÃO

Vários estudos têm sugerido que a assimetria fosfolipídica da membrana é ubíqüa. Em termos gerais, o lado externo de membranas plasmáticas eucarióticas são formadas predominantemente com os colinafosfolipídeos (esfingomielina e fosfatidilcolina [PC]), entretanto a maioria dos aminofosfolipídeos (fosfatidilserina [PS] e fosfatidiletanolamina [PE]) estão presentes no lado interno da membrana. Esta localização seletiva, pressupõe que biomembranas assimétricas estão agrupadas e mantidas por mecanismos específicos que controlam o posicionamento dos lipídeos da transbicamada. Em 1984, tornou-se claro que a assimetria foi gerada pela atividade translocase aminofosfolipídeo ATP-dependente que especificamente transporta PS e PE por meio da bicamada.

Embora a assimetria estabeleça uma regra para células normais, especialmente o aparecimento de PS na superfície da célula, está associado com muitos fenômenos fisiológicos e patológicos (Zwaal & Schroit, 1997).

A perda da assimetria normal está presente em patologias de eritrócitos tais como anemia falciforme (Kuypers et al, 1996).

A eritropoiese ineficaz e a redução da sobrevivência de eritrócitos circulantes são os responsáveis pela anemia na β talassemia. O dano da membrana induzido pelo excesso de cadeias α da hemoglobina livres tem papel crucial na pequena vida dos eritrócitos, mas as relativas

contribuições das múltiplas alterações de membrana para a patogênese desta doença ainda não está bem conhecida (De Franceschi et al, 1996).

Em certas anemias hemolíticas, tais como, esferocitose hereditária e anemia hemolítica adquirida, a resistência da hemácia a soluções hipotônicas está reduzida. O teste de fragilidade osmótica depende da osmose, porém a ruptura real da célula resulta da alteração de seu formato e da resistência diminuída a forças osmóticas mais que de uma alteração na composição da célula ou sua osmolaridade, daí o uso da palavra fragilidade.

As células que são esferocíticas rompem-se mais facilmente que as outras e, de fato, o teste de fragilidade osmótica pode ser visto como o mais sensível índice do grau de esferocitose. Reciprocamente, resistência aumentada contra lise em solução hipotônica é observada em hemácias na talassemia, anemia falciforme e anemia ferropriva, provavelmente porque as células nestas condições têm uma maior relação entre área superficial e volume celular, e.g., células – alvo (Raphael, 1986).

Através das figuras 11 e 12 e figura 13 notamos que há um comportamento diferenciado para cada família talassêmica. De acordo com os dados da literatura (Gunn et al, 1972) onde as células normais apresentaram 50% de lise entre 0,48 – 0,53 g/100 mL NaCl, enquanto as células de talassemia *minor* foram mais resistentes a lise osmótica (50% de lise a 0,15 – 0,33 g/100 mL NaCl). Quando Knox-Macaulay & Weatherall, 1974, compararam β talassemia heterozigótica e outras anemias hipocrômicas

observaram que a fragilidade celular média após incubação por 24 horas foi de 0,19 – 0,30 % de NaCl enquanto que a imediata era 0,31 – 0,42 % de NaCl.

Pela tabela 2 notamos que os indivíduos das famílias B, C, O e S são menos resistentes (50% de lise entre 0,28 a 0,44 % de NaCl) comparados aos dados da literatura (0,19 a 0,30 % de NaCl) mas são mais resistentes quando em relação ao nosso controle (0,51 % de NaCl), mostrando que os nossos resultados estão dentro do esperado para a β talassemia.

Comparando os dados hematológicos obtidos (tabela 1) (Hb=11,34 ± 0,61 g/dL, Hm= 5,76 ± 0,38 x 10^6/mm^3, VCM= 63,64 ± 3,91 fL, HCM= 19,66 ± 1,72 pg e CHCM= 30,94 ± 1,21 g/dL) e a fragilidade osmótica (tabela 2) dos indivíduos das famílias B, C, O e S, os nossos resultados confirmam que os indivíduos eram β talassêmicos. Comparando-se os dados hematológicos do estudo de Joy Ho et al, 1996, que fez a análise molecular de genótipos de famílias talassêmicas e através de dados estatísticos (Roldán et al, 1997) podemos sugerir que os indivíduos por nós analisados poderiam ser molecularmente pertencentes às mutações β talassemicas β^0 39 ou β^+IVS1-110, pois são as mais prevalentes no Brasil bem como na Itália.

A acetilcolinesterase (AChE) está envolvida primariamente em transmissão sináptica colinérgica no sistema nervoso, mas também foi encontrada em células hematopoiéticas: hemácias, plaquetas, linfócitos e

possivelmente em granulócitos. Desde 1928, sabe-se da existência da enzima nos eritrócitos humanos em grande quantidade. Sua função não está definida, mas sua presença têm estimulado muitas investigações que têm contribuído para o conhecimento sobre sua localização na membrana eritrocitária, sua estrutura molecular, sua relação com a maturação celular e sua atividade em certas doenças (Lawson & Barr, 1987).

Os dados da literatura nos mostram que pacientes com β talassemia *minor* podem ter valores de atividade da AChE dentro da faixa de normalidade e uma diminuição na atividade para aqueles com β talassemia *major* (Lawson & Barr, 1987). Os nossos resultados (tabela 2) revelaram que pacientes com β talassemia heterozigótica (traço talassêmico) têm seus níveis de AChE com praticamente a metade da atividade para a família O, um décimo de atividade para as famílias C e S e dentro da normalidade para a família B. Isto pode resultar em um grau de maior ou menor gravidade da doença para esses indivíduos, mesmo que assintomáticos, pois se relacionarmos a atividade da AChE com a resistência à hemólise podemos perceber que quanto menor a atividade da AChE mais resistente à hemólise são os eritrócitos.

Além disso, Di Francesco & Brodbeck (1981) mostrou que a atividade da AChE se mantinha, mesmo com a membrana eritrocitária com níveis de colesterol reduzido, embora a interação com fosfolipídeos pertencentes à membrana lipídica seja hábel para manter a atividade

conformacional da enzima, mostrando que a atividade da enzima é estabilizada através de lipídeos.

Durante a estocagem de sangue feita em bancos de sangue, observa-se a transformação das hemácias de discóides para esferócitos. Essa transformação ocorre devido às alterações em sua membrana, que inclui a perda da acetilcolinesterase, outras proteínas de membrana, colesterol, fosfolipídeos e o conteúdo de hemoglobina. A formação de vesículas tem sido associada ao dano oxidativo de espectrina, deficiência de banda 4.1 e a ligação de espectrina (Dumaswala et al, 1996).

Portanto, alterações no conteúdo lipídico podem ocorrer a partir de danos oxidativos provocados possivelmente pelo alto conteúdo de cadeias α que interagem com o citoesqueleto, promovendo diminuição na atividade da acetilcolinesterase bem como favorecendo a lise celular precoce (Scott et al, 1993 e Lawson & Barr, 1987).

Verificamos através da extração de lipídeos e quantificação de colesterol e fosfolipídeos (tabela 3) que a quantidade de colesterol para as famílias B e C estavam aumentadas, enquanto que para as famílias O e S estavam diminuídas, quando comparados aos normais. Em relação aos fosfolipídeos podemos notar que houve, para a maioria dos casos, uma diminuição da concentração, sendo que como descrevemos anteriormente, a concentração de colesterol não afeta a atividade da AChE e sim alterações de fosfolipídeos, os nossos resultados comparados aos de Di Francesco &

Brodbeck, 1981, mostraram que o fator determinante da alteração da atividade da AChE são os fosfolipídeos.

Tanto a concentração de colesterol quanto a de fosfolpídeos alteram a fluidez da membrana eritrocitária. A peroxidação de lipídeos da membrana pode resultar numa interação contrária de lipídeos e proteínas da membrana e levar a morte celular (Sansinanea et al, 1994). Portanto a proporção colesterol/fosfolipídeos das famílias B, C e S aumentaram, enquanto da família O se manteve igual aos indivíduos normais.

Sansinanea et al, 1994, associam o decréscimo na proporção fosfolipídeo/colesterol com diminuição da fragilidade osmótica de eritrócitos e, ainda sugerem que a peroxidação lipídica pode ter um papel na organização fosfolipídica alterada e o aumento da fragilidade.

Lipídeos de membrana parecem ser um dos determinantes no transporte através da mesma. Hashimoto & Yawta (1987) estudaram a relação metabólica entre o transporte de membrana e anormalidade dos lipídeos de membranas de eritrócitos humanos normais tratados com fosfolipase A_2. Seus estudos indicaram que o transporte de membrana (Na^+/Ca^{+2}) foi afetado por alteração dos lipídeos da membrana em hemácias humanas incubadas com fosfolipase A_2. A conversão de fosfatidilcolina (PC) em lisofosfatidilcolina (L-PC) induz um marcante aumento no influxo de Na^+.

O aumento da peroxidação lipídica é um achado comum resultante da influência de radicais livres. O aumento da formação de

espécies ativas de oxigênio têm sido implicados com cerca de cem condições de fisiopatologias (Gutteridge, 1993). Uma estratégia relativa de monitorar as reações de radicais livres *in vivo* é a medida de defesas antioxidantes presentes nas hemácias e no plasma humano. Medida do produto de ataque das espécies reativas de oxigênio ao ácido úrico têm sido potencial marcador do dano oxidativo (Grootveld & Halliwell, 1987). Os nossos pacientes (tabela 5) apresentaram valores médios de 3,8 mg/dL (2,95 – 5,26) em relação aos normais 3,3 mg/dL (2,09 – 4,6) mostrando que o sistema de defesa plasmático está eficiente.

Malonaldeído (MDA) é o produto mais largamente empregado como indicador de stress oxidativo. A determinação de MDA tem dado excelente resultado numa grande variedade de situações clínicas em que ocorre stress oxidativo, por exemplo: lipofuchinose (Favier et al, 1991), fibrose cística, miopatia de Duchene (Hunter & Mohamed, 1986), câncer de mama (Boyd & McGuire, 1991), AIDS (Revillard et al, 1992), artrite reumatóide (Lunee et al, 1984), diabetes (Faure et al, 1993), leucemia (Hammonda et al, 1992).

Dependendo da técnica utilizada a sensibilidade para os valores normais de MDA varia de 4 μmol/L nos testes colorimétricos, 2,5 μmol/L por fluorescência até 0,60 μmol/L por HPLC. (Favier et al, 1995).

Os nossos valores (tabela 4) estão de acordo com os encontrados na literatura quando Vives Corrons et al, 1995, analisaram traço

talassêmico vs anemia por deficiência de ferro, bem como Mavelli et al, 1982, ao analisarem pacientes com talassemia *major* vs amenia de Fanconi, indicando que as espécies reativas de oxigênio interagem com os lipídeos da membrana favorecendo a peroxidação lipídica.

Os mecanismos de defesa analisados pela determinação das atividades da SOD e GPx também estão favorecidos nos nossos pacientes (tabela 4) visto que todos os valores da SOD se encontravam aumentados e somente a GPx para a família B que se encontrou reduzida. Estes dados também são compatíveis com os encontrados por Vives Corrons et al, 1995.

Outro aspecto interessante a ser analisado diz respeito aos níveis de ferro sérico e seus efeitos na membrana eritrocitária. Quando o ferro é ligado ao fosfato, nucleotídeos como ADP ou ATP, EDTA, oxalato ou malonato ele catalisa a transferência de um elétron para o oxigênio (**Figura 17**).

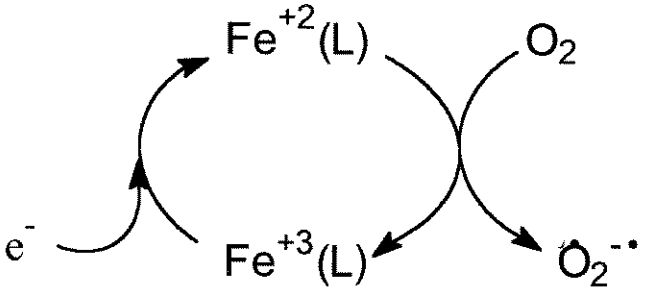

Figura 17: Formação de superóxido na presença de complexos de ferro.

O ferro pode ser estocado como óxido férrico ou hidróxido na ferritina, a proteína de estoque. Ele é liberado como íon ferroso. O sistema

fisiológico redutor específico não foi ainda identificado. Todavia têm sido demonstrado que as flavinas reduzidas são excelentes agentes redutores para a mobilização do ferro da ferritina. Isto sugere que NAD(P)H: flavina óxido redutase pode estar envolvida na redução do ferro – ferritina.

Assim, a liberação do ferro sob condições aeróbicas é acompanhada pela formação de significante quantidade de espécies reduzidas de oxigênio. Este processo tem que ser altamente controlado por enzimas protetoras. Todavia este sistema pode estar saturado na superprodução de ferro (hemocromatose, transfusão sangünea em pacientes talassêmicos) e o stress oxidativo catalisado por complexo de ferro pode ser dramático. (Favier et al, 1995).

Os resultados das dosagens de ferro sérico encontrados para os β talassêmicos (109,6 μg/dL ± 36,3) e normais (64,5 μg/dL ± 36,2) corroboram a hipótese de que o ferro favorece a indução espécies reativas de oxigênio , colaborando para o stress oxidativo. Comparando os resultados dos talassêmicos [19,6 μmol/L(11,3 – 29,7)] e os controles [11,5 μmol/L (5,7 – 23,4)] (tabela 5) com os obtidos por Young et al, 1994, nos indivíduos portadores de hemocromatose hereditária (hemocromatose 24,8 μmol/L e controle 17,8 μmol/L) notamos que há semelhança.

O mecanismo de ação de metais de transição ou hemeproteínas, como hemoglobina e mioglobina, na oxidação de LDL se

processa cataliticamente pela propagação da oxidação de hidroperóxidos pré -formados:

$$LOOH + M^{(n+1)+} \longrightarrow LOO^{\bullet} + M^{n+}$$

$$LOOH + M^{n+} \longrightarrow LO^{\bullet} + M^{(n+1)+}$$

$$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$$

$$LO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOH + L^{\bullet}$$

$$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$$

$$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$$

Níveis elevados de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos induzem desestabilização do anel do heme e liberam ferro da hemoglobina e pode ser iniciado o processo de oxidação da membrana e de LDL (Paganga et al, 1992).

Os níveis de colesterol e LDL-colesterol (tabela 5) nos pacientes β talassêmicos foram aproximadamente iguais (4,6 μmol/L e 2,4 μmol/L) aos indivíduos normais (4,4 μmol/L e 2,5 μmol/L), porém a fração HDL-colesterol aumentou seus valores (1,7 μmol/L e normais 1,5 μmol/L). Isto mostra um comportamento diferente dos indivíduos com β talassemia heterozigótica porém compatível com a literatura. Já os níveis de triglicerídeos (tabela 5) dos pacientes por nós analisados foram maiores (1,26 μmol/L) em relação aos normais (0,91 μmol/L); os dados da literatura mostram que em pacientes talassêmicos homozigotos os níveis de triglicerídeos podem

aumentar ou permanecer iguais aos de indivíduos normais ou β talassemia heterozigótica (Maioli et al, 1997; Altamentova et al,1997), portanto concluímos que não só os homozigotos podem alterar os níveis de lipídeos circulantes, como também os heterozigotos.

Na ausência de doença hepática, hiperbilirrubinemia não conjugada é freqüentemente devido a hemólise ou a síndrome de Gilbert's, uma anormalidade hereditária do metabolismo da bilirrubina. Em hemólise, hiperbilirrubinemia é devido ao aumento de produção de bilirrubina, a qual excede a capacidade do fígado em remover e conjugar o pigmento (Marshall, 1995). Os níveis de bilirrubina total [0,55 (0,4 – 1,0) e indireta [0,38 (0,29 – 0,67) (tabela 5) se encontravam aumentados, em relação aos normais (BrT= 0,32; 0,2 – 0,59 e BrI= 0,20; 0,12 – 0,34) indicando que o aumento de ferro induz a lipoperoxidação, de acordo com os valores de MDA (tabela 4), favorecendo a uma hemólise mais acentuada o que é prejudicial aos indivíduos β talassêmicos pois a sua eritropoiese já está prejudicada. Isto associado a alteração dos conteúdos lipídicos pode ser um dado a comprovar a menor vida média dos eritrócitos dos β talassêmicos heterozigóticos, porém não tendo efeito em sintimatologia para esses pacientes.

A avaliação destes fatores em conjunto podem expressar um maior ou menor grau da gravidade da doença, embora na forma heterozigótica sem sintomatologia aparente, o que notamos é que indivíduos na fase de pré-adolescência têm sintomas clínicos bem evidentes. Todavia muitos

parâmetros são avaliados através de biologia molecular, entretanto uma forma mais viável de se determinar alguma forma de gravidade da doença e de em menor tempo, acreditamos ser a análise desses parâmetros e esperamos ter contribuído para o estudo da β talassemia heterozigótica.

6 – CONCLUSÕES

Recapitulando, os resultados dos pacientes talassêmicos demonstraram : 1. Maior resistência a hemólise hipoosmótica em todas as famílias estudadas; 2. Diminuição significativa na atividade da acetilcolinesterase; 3. Variabilidade na razão molar dos conteúdos de colesterol e fosfolipídeos; 4. A existência de peroxidação lipídica e dano oxidativo nas membranas eritrocitárias, devido aos níveis de malonaldeido encontrados; 5. Aumento significativo da atividade das enzimas antioxidantes SOD e glutationa peroxidase; 6. Valores maiores dos níveis séricos de ferro, colesterol e triglicerídeo; 7. Elevação de bilirrubina e ácido úrico utilizados como marcadores de hemólise e de produção de ânion superóxido.

Diante dessas evidências podemos concluir que o excesso de cadeia α livre e o aumento dos níveis de ferro contribuem para uma peroxidação lipídica, verificada pelos níveis de MDA, favorecendo a hemólise constatada pelo aumento significativo dos níveis de bilirrubina indireta. O dano oxidativo provocado à membrana leva a produção de ânion superóxido que estimula a atividade da SOD e GPx. Todo esse efeito favorece a uma desestabilização da membrana levando a alterações no conteúdo lipídico e como conseqüência diminuição da atividade da AChE e aumento da resistência osmótica.

7 - ABSTRACT

Breda Stella, M. Study of erythrocytic membrane in hetrozigothic β-thalassemia.Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 1998. Tese (Doutorado) – Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1998. 90p.

β-thalassemia is a genetic disorder characterized by the reduction or absence output of β-globin chains. There are two main varieties of β-thalassemia, i.e., β° thalassemia, in which no β-globin chains are produced, and β^{+} thalassemia, in which some β-globin chains are produced but at a reduced rate. A combination of ineffective erythropoiesis (intramedulary hemolysis) and hemolysis of adult red blood cells in the peripheral blood cause the anemia in the human thalassemias. The asymmetric phospholipid composition of the membrane of the red blood cells is maintained during the life of the cell, with phosphatidylcholine and sphingomyelin placed in the outer monolayer and phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the inner monolayer. The structure and function of cell is maintained through of the phospholipid asymmetry and oxidative injury is one mechanism by which the structure and function of the lipid bilayer may be altered. Oxidative damage as an important component in the pathophysiology of the β-thalassemic red blood cell. Isolated α-hemoglobin chains generate reactive oxygen species, elevate heme and iron levels, and decrease membrane sulfhydryl content. In our results, the increase in MDA levels, as well in superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities revealed the presence of lipid peroxidation and oxidative damage in erythrocytic membrane. The plasma levels of iron, cholesterol and triglycerides were higher in thalassemic than in normal patients. The increase of uric acid (a anti-oxidant), free iron (an oxidative reaction catalysts) and of superoxide anion indicate that the interaction of α-globin chains with the RBC membrane promotes cell rupture with an increase of bilirrubin. Cholesterol and phospholipid content of β-thalassemic erythrocytes membrane were modified and a higher cholesterol/phospholip molar ratio was found. The increase osmotic resistance and the decreased of acetylcholinesterase activity may reflect a membrane structure perturbation triggered by the altered lipid and oxidative profiles of β-thalassemic membranes.

Key Words

β-thalassemia, membrane erythrocytes, lipid composition, acetylcholinesterase, oxidative damage, antioxidants

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADVANI, R.; SORENSON, S.; SHINAR, E.; LANDE, W.; RACHMILEWITZ, E.; SCHRIER, S.L. Characterization and Comparison of the Red Blood Cell Membrane Damage in Severe Human α and β Thalassemia. **Blood 79** (4) :1058-63, 1992.

- ALLES, G.A. & HANES, R.C. Cholinesterase in the Blood of Man. **J. Biol. Chem. 133**: 375-90, 1940.

- ALTAMENTOVA, S.M., MARVA, E.; SHAKLAI, N. Oxidative Interaction of Unpaired Hemoglobin Chains with Lipids and Proteins: A Key for Modified Serum Lipoproteins in Thalassemia. **Arch. Biochem. Biophys. 345** (1): 39-46, 1997.

- AMES, B.N. & DUBIN, D.T. The Role of Polyamines in the Neutralization of Bacteriophage Deoxyribonucleic Acid. **J. Biol. Chem. 235** (3) :769–75, 1960.

- ANDERSEN, H.R.; NIELSEN, J.B.; NIELSEN, F.; GRANDJEAN, P. Antioxidative Enzyme Activities in Human Erythrocytes. **Clin. Chem. 43** (4): 562-68, 1997.

- BEYER, C. & ALTING, I.H. Enzymatic Measurement of Creatine In Erythrocytes. **Clin. Chem. 42** (2) : 313–18, 1996.

- BOSCHETTI, N.; BRODBECK, U.; JENSEN, S.P.; KOCH, C.; NORGAARD-PEDERSEN, B. Monoclonal Antibodies Against a C-terminal Peptide of

Human Brain Acetylcholinesterase Distinguish between Erythrocyte and Brain Acetylcholinesterases. **Clinical Chem. 42** (1) : 19-23, 1996.

- BROWN, S.S., KALOW, W., WHITTAKER, M.; WORONICK, C.L. The Plasma Cholinesteerases: A New Perspective. **Adv. Clin. Chem. 22**: 1-123,1981.

- BOYD, N.F. & McGUIRE, V. The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. **Free Rad. Biol. Med. 10**: 185–90, 1991.

- DACIE, J.V. **The Haemolytic Anaemias, Parte I.** p. 206, Churchill, London, 1960.

- DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. **Practical Haematology**. 6th ed., Churchill, London, 1984.

- DE FRANCESCHI, L.; ROUYER-FESSARD, P.; ALPER, S.L.; JOUAULT, H.; BRUGNARA, C.; BEUZARD, Y. Combination Therapy of Erythropoietin, Hydroxyurea, and Clotrimazole in a β Thalassemic Mouse: A Model for Human Therapy.**Blood 87** (3) : 1188–95, 1996.

- DI FRANCESCO, C. & BRODBECK, U. Interation of Human Red Cell Membrane Acetylcholinesterase with Phospholipids. **Biochim. Biophys. Acta 640**: 359–64, 1981.

- DUMASWALA, U.J.; DUMASWALA, R.U.; LEVIN, D.S.; GREENWALT, T.J. Improved Red Blood Cell Preservation Correlates With Decreased Loss of Bands 3, 4.1, Acetylcholinesterase, and Lipids in Microvesicles. **Blood 87** (4) : 1612–16, 1996.

- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES JR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. **Biochem. Pharmacol. 7**: 88 - 95, 1961.

- FAURE, P., CORTICELLI, P., RICHARD, M. J., ARNAUD, J., COUDRAY, C., HALIMI, S.; FAVIER, A. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic Ketotic patients; influence on insulin therapy. **Clin. Chem. 39** (5): 789–93, 1993.

- FAVIER, A., WILKE, B., ARNAUD, J., RICHARD, M.J., DUCROS, V.; VIDAILHET, M. **Antioxidizing then paradoxal prooxidizing effect of selenite supplementation in phenylkeetonuric (Pku) children. *In*: B. Momcilovic** (ed.): Trace Elements in Man and Animals 7, Imi, Zagreb, pp 7 – 15/7–17, 1991.

- FAVIER, A.E.; CADET, J.; KALYANARAMAN, B.; FONTECAVE, M.; PIERRE, J-L. **Analysis of Free Radicals in Biological Systems.** Basel: Birkhäuser Verlag, pp 83 - 5/ 106-7, 1995.

- GALBRAITH, D.A. & WATTS, D.C. Human Erythrocyte Acetylcholinesterase in Relation to Cell Age. **Biochem. J. 195** : 221-28, 1981.

- GARNICA, J.J.P.; PIERUCCI, F.; VOZZI, G.; COSMI, E.V.; ANCESCHI, M.M. The cholesterol to phospholipids ratio (C/PL) of the erythrocyte membrane in normotensive, hypertensive pregnant and in cord blood as assessed by a simple enzymatic method. **Scand J. Clin. Lab. Invet. 54**: 631-35, 1994.

- GENNIS, R.B. **Biomembranes: Molecular Structure and Function.** New York, Springer Verlag New York inc., 154-57, 1989.

- GOLDFARB, A.W., RACHMILEWITZ, E.A.; EISENBERG, S. Abnormal Low and High Density Lipoproteins in Homozygous Beta-thalassemia. **Br. J. Haematol. 79** (3): 481-86, 1991.

- GREPPI, E. **Ittero Emolitico Familiare con Aumento delle Resistenza dei Globuli.** pt. 2, 8, I. Minerva Médica, 1928.

- GROOTVELD, M. & HALLIWELL, B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids. A potential index of free radical reactions *in vivo*? **Biochem. J. 243**: 803–08, 1987.

- GUNN, R.B.; SILVERS, D.N.; ROSSE, W.F. Potassium Permeability in β Thalassemia *Minor* Red Blood Cells. **J. Clin. Invest. 51**: 1043-50, 1972.

- GUTTRIDGE, J.M.C. Invited review free radicals in desease process: a complication of cause and consequence. **Free Rad. Res. Comm. 19**: 141–58, 1993.

- HAMMONDA, A., SOLIMAN, S., TOLBA, K., EL-KABBANY, Z.; MAKHLOUF, M. Plasma concentrations of lipid peroxidation products in children with acute lymphoblastic leukemia. **Clin. Chem. 38**: 594–95, 1992.

- HASHIMOTO, M. & YAWTA, Y. A Possible Mechanism of Increased Sodium Influx in Red Cells With Abnormal Membrane Lipid Levels Induced by Phospholipase A_2. **Am. J. Hematol. 26** : 17–26, 1987.

- HEBBEL, R.P. Beyond Hemoglobin Polymerization: The Red Blood Cell Membrane and Sickle Disease Pathophysiology. **Blood 77** (2): 214-37, 1991.

- HELLER, M. & HANAHAN, D.J. Human Erythrocyte Membrane Bound Enzyme Acetylcholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta 225** : 251-72, 1972.

- HUNTER, M.I. & MOHAMED, J.B. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in Duchenne muscular dystrophy. **Clin. Chim. Acta 155**: 123–32, 1986.

- IÓVINE, E. & SELVA, A.A. **El Laboratório en la Clínica**, 3ª ed., Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana S. A., 101-2, 1985.

- JANSSON, L.T.; PERKKIÖ, M.V.; WILLIS, W.T.; REFINO, C.J.; DALLMAN, P.R. Red Cell Superoxide Dismutase Is Increased in Iron Deficiency Anemia. **Acta Haemat. 74**: 218–21, 1985.

- JONG, K., GELDWERTH, D. & KUYPERS, F. A. Oxidative damage does not alter membrane phospholipid asymetry in human erythrocytes. **Biochemistry 36** (22): 6768-76, 1997.

- JOY HO, P.; ROCHETTE, J.; FISHER, C.A.; WONKE, B.; JARVIS, M.K.; YARDUMIAN, A.; THEIN, S.L. Moderate Reduction of β-Globin Gene Transcript by a Novel Mutation in the 5' Untranslated Region: A Study of Its Interaction With Other Genotypes in Two Families. **Blood 87** (3) : 1170–78, 1996.

- KNOX-MACAULAY, H.H. & WEATHERALL, D.J. Studies of Red-Cell Membrane Function in Heterozygous β Thalassaemia and Other Hypochronic Anaemias. **British J. Haematol. 28** : 277–97, 1974.

- KOHN, H. I. & LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and menadione. **J. Pharmacol. Experimen. Ther. 82**: 292-300, 1944.

- KUYPERS, F.A.; LEWIS, R.A.; HUA, M.; SCHOTT, M.A.; DISCHER, D.; ERNST, J.D.; LUBIN, B.H. Detection of Altered Membrane Phospholid Asymmetry in Subpopulations of Human Red Blood Cells Using Fluorescently Labeled Annexin V. **Blood 87** (3) : 1179–87, 1996.

- KUYPERS, F. A., YUAN, J., LEWIS, R.A., SNYDER, L.M., KIEFER, C.R., BUNYARATVEJ, A., FUCHAROEN, S., MA, L., STYLES, L., de JONG, K.; SCHRIER, S.L. Membrane phospholipid asymmetry in human thalassemia. **Blood 91**(8): 3044–51, 1998.

- LAMCHIAGDHASE, P.; WILAIRAT, P.; SAHAPHONG, S.; BUNYARATVEJ, A.; FUCHAROEN, S. Defective Spectrin Dimer Self-association in Thalassemic Red Cells. **Eur. J. Haematol. 38** : 246-50, 1987.

- LAWSON, A.A & BARR, R.D. Acetylcholinesterase in Red Blood Cells. **American J. Hematol. 26** : 101-12, 1987.

- LEHMANN, H. & SILK, E. Succinylmonocholine. **Br.Med.J**. 1: 767-68, 1953.

- LINPISARN, S., SATOH, K., MIKAMI,T., ORIMO, H., SHINJO, S.; YOSHINO, Y. Effects of Iron on Lipid Peroxidation. **Int. J. Hematol. 54** (3): 181-88, 1991.

- LIVREA, M. A., TESORIERE, L., PINTAUDI, A. M., CALABRESE, A., MAGGIO, A., FREISLEBEN, H. J., D'ARPA, D., D'ANNA, R.; BONGIORNO, A. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Beta-thalassemia *major*: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. **Blood 88** (9): 3608-14, 1996.

- LOTT, J.A. & WOLF, P.L. **Clinical Enzymology - A Case Oriented Approach. In Acetylcholinesterase and Cholinesterase**. New York, Field, Rich and Associates Inc, 1986, cap. 1, p. 1-26.

- LUNEE, J., HALLORAN, S.P., WHITE, A.G.; DORMANDY, T.L. Free radical oxidation (peroxidation) products in serum and synovial fluid. **J. Rheum. 8**: 233–45, 1984.

- MAIOLI, M., VIGNA, G.B., TONOLO, G., BRIZZI, P., CICCARESE, M., DONEGA, P., MAIOLI, M.; FELLIN, R. Plasma Lipoprotein Composition, Apolipoprotein(a) Concentration and Isoforms in Beta-thalassemia. **Atherosclerosis 131** (1): 127-33,1997.

- MARSHALL, W. J. **Clinical Chemistry**. 3ª ed., London: Mosby, 1995, p. 75.

- MARTINS, C.S.B. **Caracterização Molecular de Heterozigotos da Talassemia Beta**, Campinas, 1993 (Tese de Doutorado apresentada no Curso de Ciências Biológicas – Genética, UNICAMP).

- MARTINS, C.S.B.; RAMALHO, A.S.; SONATI, M.F.; GONÇALVES, M.S.; COSTA, F.F. Molecular Characterisation of β Thalassemia Heterozygotes in Brazil. **J. Med. Genet. 30** (9) : 797-98, 1993.

- MAVELLI, I.; CIRIOLO, M.R.E; ROTILIO, G.; DE SOLE, P.; CASTORINO, M.; STABILE, A. Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Catalase In Oxidative Hemolysis. A Study of Fanconi's Anemia Erythrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm. 106** (2) : 286–90, 1982.

- McCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Na enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem. 244**: 6049-55, 1969.

- McDONALD, G.A.; PAUL, J.; CRUICKSHANK, B. **Atlas de Hematologia.** (Parte integrante), 5ª ed., São Paulo: Editorial Médica Panamericana, 1989.

- NAOUM, P. C. **Diagnóstico das Hemoglobinopatias**. São Paulo: Sarvier. Cap. 12 pg. 99–119, 1987.

- NOREEN, W.E. Thalassemias: Simple Screening for Hereditary Anemias. **Nurse Pract. 17** (2) : 53 - 6, 1992.

- PAGANGA, G.; RICE-EVANS, C.; RULE, R.; LEAKE, D. The Interaction between Ruptured Erythrocytes and Low-density Lipoproteins. **FEBS 303** (2 -3): 154 - 58, 1992.

- PAGLIA, D.E. & VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med. 70**: 158-69, 1967.

- PERCÁRIO, S.; VITAL, A.C.C.; JABLONKA, F. Dosagem do Malondialdeído (MDA). **Newslab 18**: 46 – 50, 1996.

- PINILLA, M.; DE LA FUENTE, J.; GARCÍA-PÉREZ, A.I.; JIMENO, P.; SANCHO, P. & LUQUE, J. Biochemical Characterization of Human Erythrocytes Fractionated by Counter-current Distribution in Aqueous Polymer Two-phase Systems. **J. Chromatography A 668**: 165–71, 1994.

- POLITOFF, A., BLITZ, A.L.; ROSE, S. Incorporation of Acetylcholinesterase into synaptic vesicles is associated with blockade of synaptic transmission. **Nature 256**: 324-25, 1975.

- PORNVAREE, L.; WILAIRAT, P.; SAHAPHONG, S.; BUNYARATVEJ, A.; FUCHAROEN, S. Defective Spectrin Dimer Self-association in Thalassemic Red Cells. **Eur. J. Haematol. 38**: 246–50, 1987.

- RAMALHO, A.S.; MAGNA, L.A.; COSTA, F.F.; GROTTO, H.Z. Talassemia um Problema de Saúde Pública no Brasil? **Rev. Bras. de Genética**. VIII **4**: 747–54, 1985.

- RAMALHO, A. S. As Hemoglobinopatias Hereditárias - Um problema de Saúde Pública no Brasil. **Rev. Bras. de Genética**. cap. II pg. 4-6, cap. VIII pg. 76-8, 1986.

- RAPHAEL, S. S. **Lynch: Técnicas de Laboratório.** São Paulo: Editora Manole, 872–73, 1986.

- REVILLARD, J.P., VINCENT, C.A., FAVIER, A., RICHARD, M.J., ZITTOUN, M.; KAZATCHINE, M. Lipid peroxidation in human immunodeficiency virus infection. **J. Acquired Immune Deficiency Syndromes 6**: 637–38, 1992.

- RIETTI, F. **Sugli Itteri Emolitici Primitivi.** Nota Preventiva. Atti Accademia di Scienze Mediche di Palermo, 2, 14, 1925.

- ROLDÁN, A.; GUTIÉRREZ, M.; CYGLER, A.; BONDUEL, M.; SCIUCCATI, G.; TORRES, A.F. Molecular Characterization of β-Thalassemia Genes in a Argentine Population. **Am. J. Hematol. 54**: 179–82, 1997.

- SANSINANEA, A.; CERONE, S.; NAJLE, R ; AUZA, N. Lipid Peroxidation in Erythrocyte Membranes of Sheep with Chronic Copper Poisoning. **J. Clin. Biochem. Nutr. 17** : 65-72, 1994.

- SCOTT, M.D.; ROYER-FESSARD, P.; SODA, M.; LUBIN, B.H.; BEUZARD, Y. α and β Haemoglobin Chain Induced Changes in Normal Erythrocyte Deformability: Comparison to β Thalassaemia Intermedia and Hb H Disease. **Britsh J. of Haematol. 80** (4): 512-26, 1992.

- SCOTT, M.D., van den BERG, J.J.M., REPKA, T., ROUYER-FESSARD, P., HEBBEL, R.P., BEUZARD, Y.; LUBIN, B.H. Effect of Excess α-Hemoglobin Chains on Cellular and Membrane Oxidation in Model β-Thalassemic Erythrocytes. **J. Clin. Invest. 91**: 1706-12, 1993.

- SHALEV, O., REPKA, T., GOLDFARB, A., GRINBERG, L., ABRAHAMOV, A., OLIVIERI, N.F., RACHMILEWITZ, E.A.; HEBBEL, R.P. Deferiprone (L1) Chelates Pathologic Iron Deposits from Membranes of Intact Thalassemic and Sickle Red Blood Cells both in *vitro* and *in vivo*. **Blood 86** (5): 2008-13, 1995.

- SHINAR, E.; SHALEV, O.; RACHMILEWITZ, E.A.; SCHRIER, S.L. Erythrocyte Membrane Skeleton Abnormalities in Severe β Thalassemia. **Blood 70** (1): 158-164, 1987.

- SHINAR, E.; RACHMILEWITZ, E.A.; LUX, S.E. Differing Erythrocyte Membrane Skeletal Protein Defects in Alpha and Beta Thalassemia. **J. Clin. Invest. 83** (2) : 404-10, 1989.

- TIETZ, N.W. **Clinical Guide to Laboratory Tests.** 2th ed., Philadelphia: W.B.Saunders Co, 418-21, 1990.

- VETTORE, L.; FALEZZA, G.C.; CETTO, G.L.; DE MATTEIS, M.C. Cation Content and Membrane Deformability of Heterozygous β Thalassaemic Red Blood Cells. **British J. Haem. 27**: 429-37, 1974.

- VIVES CORRONS, J.L.; MIGUEL-GARCIA, A.; PUJADES, M.A.; MIGEL-SOSA, A.; CAMBIZZO, S.; LINARES, M.; DIBARRART, M.T.; CALVO, M. A.Increased Susceptibility of Microcytic Red Blood Cells to *in vitro* Oxidative Stress. **Eur. J. Haematol. 55**: 327–31, 1995.

- YUAN, J.; KUYPERS, F.A.; LEWIS, R.A.; FUCHAROEN, S.; BUNYARATVEJ, A.; SCHRIER, S.L. Membrane Lipid Asymmetry in Thalassemic Red Blood Cells. **Blood 84** (10):.259a, 1994.

- YENCHITSOMANUS, P. & WASI, P. Increased Erythrocyte Superoxide Dismutase Activities in β^0- Thalassaemia/Haemoglobin E and In Haemoglobin H Diseases. **J. Clin. Pathol. 36** : 329–33, 1983.

- YOUNG, I.S., TROUTON, T.G., TORNEY, J.J., McMASTER, D., CALLENDER, M.E.; TRIMBLE, E.R. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Hereditary Haemochromatosis. **Free Radical Biology & Medicine 16** (3): 393-97, 1994.

- ZAGO, M.A.; COSTA, F.F.; BOTURA, C. Beta- thalassemia in Brazil. **Rev. Pesq. Med. Biol. 14**: 383, 1981.

- ZWAAL, R.F.A. & SCHROIT, A.L. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. **Blood 89** (4): 1121–32, 1997.

9 – ANEXO

Resumos apresentados em congressos:

MERCIA BREDA STELLA, CARMEM SILVIA BERTUZO MARTINS, ANTONIO SERGIO RAMALHO; NILCE CORREA MEIRELLES. Estudo sobre anormalidades de membranas de eritrocitos em indivíduos β talassêmicos. **RBAC**, vol 27(4): 28, 1995.

STELLA, M. B. & MEIRELES, N. C. Estudo de membranas de eritrocitos em β talassemia heterozigótica. **LECTA**, número especial, p. 87, 1997.

MERCIA BREDA STELLA & NILCE CORREA MEIRELLES. Stress oxidativo e estado antioxidante em β talassemia. Anais do II Simpósio de Farmácia, p.79, 1998.