CAROLINA GARCIA DE MACEDO

**Estudo das paraoxonases 1, 2 e 3 em pacientes
portadores de anemia falciforme**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo
2013

CAROLINA GARCIA DE MACEDO

**Estudo das paraoxonases 1, 2 e 3 em pacientes
portadores de anemia falciforme**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Macedo, Carolina Garcia de

Estudo das paraoxonases 1, 2 e 3 em pacientes portadores de anemia falciforme /
Carolina Garcia de Macedo. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia .

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Anemia falciforme 2.Paraoxonase 3.Polimorfismo genético
4.Inflamação 5.Estresse oxidativo 6.Lipídeos/sangue

USP/FM/DBD-156/13

Dedicatória

Aos meus pais Carlos e Célia, ao meu irmão Bernardo, pelo amor incondicional, por acreditarem sempre em mim e por ser essa família unida e maravilhosa.

A toda minha família e amigos.

Aos pacientes do ambulatório Hemoglobinopatias do Serviço de Hematologia do HCFMUSP, que apesar de todos os problemas que cada um passa em sua vida devido à doença, me ajudaram gentilmente a compor o grupo caso deste trabalho.

Agradecimentos

A Deus, por minha existência, por minha saúde, por ter aberto portas para as escolhas que fiz até este momento de minha vida, sempre me dando forças para continuar em meu caminho.

Aos meus pais, meu irmão e a todos meus familiares por terem me ensinado o caminho certo da vida, pelo o amor incondicional, incentivo, apoio em todas as minhas decisões e por não terem medido esforços para que eu chegasse e concluísse mais esta etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski pela orientação, oportunidade e por acreditar no meu trabalho e na minha competência para realizá-lo.

À Dr^a. Luciana Morganti Ferreira Maselli pela orientação, pela amizade, contribuição, pelas dúvidas esclarecidas e dedicação para realização desta dissertação.

À minha amiga Denise Sanches Cerdeira Chaves, pelos ensinamentos, pelo carinho, apoio nas horas mais difíceis, pelas palavras amigas e por todas as risadas.

À Dr^a Débora Levy, por todos os ensinamentos.

À Karolline Santana da Silva e Cleide Menarbin Appolonio, pela solidariedade, pelo carinho e pela amizade desde o primeiro dia no laboratório e pela ajuda para a realização deste trabalho.

À Dr^a Sandra Fátima Menosi Gualandro, ao Dr. Guilherme Henrique Hencklain Fonseca e à Dr^a Liliana Mitie Suganuma pela fundamental

assistência no ambulatório Hemoglobinopatias do Serviço de Hematologia do HCFMUSP, bem como na parte clínica, com seus valiosos conhecimentos.

À Linah, Rosângela, Nathália, Naná, Adriana, Carola, Bruna, André, Vivi e colegas de trabalho do laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, pelo apoio, amizade e ensinamentos.

A todos os pacientes que gentilmente colaboraram com este estudo.

Aos funcionários do Serviço de Coleta de Sangue do Hospital das Clínicas da FMUSP pelo apoio durante o período das coletas.

Às minhas amigas Fernanda Yochicuni, Marília Zuttion e Roberta Corrêa pela amizade, pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão nos momentos felizes e de desespero.

Aos meus afilhados Maria Eduarda e Lucca.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória, nem a derrota.”

Theodore Roosevelt

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular LIM/31 da Disciplina Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Apo	Apolipoproteína
ARE	arilesterase
AVE	Acidente vascular encefálico
C	Cisteína
Ca	Cálcio
CAR	República Centro Africana
DF	Doença falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP, DTTP)
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fe	Ferro
FNU4HI	Enzima de restrição Fnu4H I
G	Unidade de medida da força centrífuga relativa
GC-SF	Fator estimulador de colônias granulocitárias
Glu	Ácido glutâmico
GPX	Glutathione peroxidase
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteína de alta densidade

Hinf I	Enzima de restrição originada de <i>Haemophilus influenzae</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HU	Hidroxiuréia
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
kDa	kilodaltons
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
K	Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
mM	Milimolar
M	Molar
MDA	Malondialdeído
mg/dL	Miligramas/decilitro
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido Nítrico
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPs	Organofosforados
PAF	Fator Ativador de Plaquetas

pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PON	Paraoxonase
<i>Primer(s)</i>	Sequência(s) de oligonucleotídeo(s) iniciadora(s)
RFLP	Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
STA	Síndrome Torácica Aguda
TAE	Tampão tris acetato
TBE	Tampão tris borato
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	Tampão tris EDTA
TEM	Tampão tris EDTA NaCl
TMO	Transplante de Medula Óssea
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade internacional
U/L	Unidades por litro
Val	Valina
VCAM-1	Moléculas de adesão vascular
VCM	Volume Corpuscular Médio
W	Watts

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa genético da família PON em humanos.	5
Figura 2. Estrutura tridimensional da PON1	8
Figura 3. Frequências do gene β S em diferentes regiões do Brasil	27
Figura 4. Fisiopatologia da anemia falciforme	31
Figura 5. Esquema dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados dos polimorfismos 55LM e 192QR, no gene da <i>PON1</i> (multiplex)	42
Figura 6. Esquema dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados dos polimorfismos 148AG, no gene da <i>PON2</i>	43
Figura 7. Esquema dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados dos polimorfismos 311SC, no gene da <i>PON2</i>	45
Figura 8. Curva de amplificação do SNP C_59001773_10 de PON3 em PCR em tempo real	47
Figura 9. Níveis séricos de Proteína C reativa em indivíduos HbSS e em indivíduos saudáveis.....	59
Figura 10. Distribuição genotípica para o polimorfismo 192QR no gene da PON1	61
Figura 11. Frequência alélica para o polimorfismo 192QR no gene da PON1 ...	62
Figura 12. Distribuição genotípica para o polimorfismo 55LM no gene da PON1	62
Figura 13. Frequência alélica para o polimorfismo 55LM no gene da PON1	62

Figura 14. Atividade da enzima arilesterase. Resultados expressos em U/mL. .65

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sequência 5'→3' de <i>primers</i> utilizadas para a determinação dos polimorfismos 55LM e 192QR, no gene da <i>PON1</i>	40
Tabela 2. Sequência 5'→3' de <i>primers</i> utilizadas para a determinação dos polimorfismo 148AG, no gene da <i>PON2</i>	42
Tabela 3. Sequência 5'→3' de <i>primers</i> utilizadas para a determinação dos polimorfismo 311SC, no gene da <i>PON2</i>	44
Tabela 4. Dados demográficos dos grupos estudados	55
Tabela 5. Perfil lipídico do grupo de pacientes com anemia falciforme e indivíduos do grupo controle.	57
Tabela 6. Dados hematológicos dos pacientes	58
Tabela 7. Concentração de PCR no plasma da população estudada.....	59
Tabela 8. Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos para os polimorfismos 148AG e 311SC de <i>PON2</i> e dos 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT no gene da <i>PON3</i> , nos indivíduos dos grupos caso e controle.....	63
Tabela 9. Concentração de anti-LDL oxidada no soro da população estudada.	68

Resumo

Macedo CG. Estudo das paraoxonases 1, 2 e 3 em pacientes portadores de anemia falciforme [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Os membros da família paraoxonase (PON1, PON2 e PON3) tem sido objeto de grande interesse por prevenir o estresse oxidativo e o processo inflamatório, condições que estão em evidência em pacientes que possuem anemia falciforme. A anemia falciforme é causada por uma mutação pontual no gene β globina que resulta em uma alteração na estrutura da molécula, gerando a HbS. Sua fisiopatologia envolve múltiplas alterações nos eritrócitos falcêmicos, hemólise, ativação de mediadores inflamatórios, disfunção das células endoteliais, episódios vaso-oclusivos e estresse oxidativo. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da enzima PON1, relacionando-as com os polimorfismos PON1 192 e 55, PON2 311 e 148 e PON3 10340, 2115, 45486 e 55146, bem como avaliar marcadores de inflamação e o perfil lipídico em pacientes portadores de anemia falciforme. A casuística foi composta por 43 indivíduos com anemia falciforme e 43 indivíduos saudáveis. O sangue foi coletado, para as determinações bioquímicas e determinação das atividades arilesterase e paraoxonase da PON1. O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método de extração salina. A análise dos polimorfismos foi realizada por PCR/RFLP e por PCR em tempo real. A pesquisa de autoanticorpos anti-LDL oxidada foi feita por ELISA. Em relação ao polimorfismo do gene da PON1 192QR foi encontrada uma diferença significativa entre o genótipo 192RR, que apresentou maior frequência no grupo caso (32,6%) do que no grupo controle (13,9%) ($p=0,0064$). A atividade arilesterase apresentou valores significativamente menores nos pacientes com anemia falciforme ($p<0,001$). Houve correlação positiva entre atividade arilesterase e as variáveis apolipoproteína A1 (Apo A1) ($p=0,0042$), colesterol total (CT) ($p=0,0066$) e lipoproteína de alta densidade (HDL) ($p=0,0283$) e correlação negativa com leucócitos ($p=0,04$). Em relação à atividade paraoxonase foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre a atividade da enzima e a transferrina ($p=0,0094$). Os títulos de anticorpos anti-oxLDL diferiram significativamente entre os grupos, grupo caso apresentando valores maiores quando comparados ao grupo controle ($p<0,001$). O mesmo aconteceu para a dosagem dos níveis séricos de Proteína C Reativa ($p<0,001$). Concentrações significantemente diminuídas de CT, lipoproteína de baixa densidade (LDL), HDL e Apo A1 e B foram observadas nos pacientes com anemia falciforme em relação ao grupo controle ($p<0,01$). Conclusões: Os pacientes falciformes estão apresentaram mais estresse oxidativo que os indivíduos saudáveis, o que poderia influenciar na gravidade da doença.

Descritores: Anemia falciforme; Paraoxonase; Polimorfismo genético; Inflamação; Estresse oxidativo; Lipídeos/sangue.

Summary

Macedo CG. Study of paraoxonases 1, 2 and 3 in patients with sickle cell anemia [dissertation]. São Paulo: Medicine School, University of São Paulo; 2013.

The members of paraoxonase family (PON1, PON2 and PON3) have been the subject of great interest by preventing oxidative stress and inflammation, conditions that are evident in patients who have sickle cell anemia. Sickle cell anemia is caused by a point mutation in the β globin gene that results in a change in structure of the molecule, generating the HbS. Its pathophysiology involves multiple changes in sickle cell erythrocytes, hemolysis, activation of inflammatory mediators, endothelial cell dysfunction, vaso-occlusive episodes and oxidative stress. Thus, the objective of this study was to evaluate the activity of PON1 enzyme, associating them to the PON1 192 e 55, PON2 311 e 148 e PON3 10340, 2115, 45486 e 55146 polymorphisms, as well as evaluating inflammation markers and lipid profile in patients with sickle cell anemia. The casuistry has consisted of 43 individuals with SCD and 43 healthy. Blood was collected for biochemical studies and determination of arylesterase and paraoxonase activities of PON1. DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by extraction saline. The analysis of the polymorphisms was performed by PCR / RFLP and real time PCR. The determination of autoantibodies anti-oxidized LDL was performed by ELISA. Regarding the PON1 192QR gene polymorphism was found a significant difference between genotype 192RR, with the highest frequency in the case group (32.6%) than in the control group (13.9%) ($p = 0.0064$). The arylesterase activity values were significantly lower in patients with sickle cell anemia ($p < 0.001$). A positive correlation between arylesterase activity and variables apolipoprotein A1 (Apo A1) ($p = 0.0042$), total cholesterol (TC) ($p = 0.0066$) and high density lipoprotein (HDL) ($p = 0.0283$) and negative correlation with leukocytes ($p = 0.04$). Regarding paraoxonase activity was found a positive and significant correlation between the enzyme activity and transferrin ($p = 0.0094$). The titers of anti-oxLDL differed significantly between groups, with higher values in the case group compared to the control group ($p < 0.001$). The same happened to the determination of serum C-reactive protein ($p < 0.001$). Significantly decreased concentrations of TC, low density lipoprotein (LDL), HDL and Apo A1 and B were observed in patients with sickle cell disease in the control group ($p < 0.01$). Conclusions: Patients with sickle cell disease presented more oxidative stress than healthy ones, which could influence in the severity of the disease.

Descriptors: Anemia, sickle cell; Paraoxonase; Polymorphism, genetic; Inflammation; Oxidative stress; Lipids/blood.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Paraoxonases (PON).....	8
3.1.1 Paraoxonase 1 (PON1)	10
3.1.1.1 PON1 e HDL	13
3.1.1.2 Polimorfismos de PON1 e sua atividade enzimática.....	14
3.1.2 Paraoxonase 2 (PON2)	16
3.1.3 Paraoxonase 3 (PON3)	18
3.1.3.1 Polimorfismos genéticos de PON3	19
3.2 Anemia Falciforme	20
3.2.1 Epidemiologia	25
3.2.2 Fisiopatologia da anemia falciforme	27
3.2.3 Anemia falciforme, estresse oxidativo e alterações lipídicas	32
4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Casuística.....	35
4.2 Reagentes	36
4.3 Obtenção das amostras de soro/plasma	37
4.4 Técnicas Moleculares	37
4.4.1 Extração do DNA genômico.....	37
4.4.2 Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico.....	39
4.4.3 Análise dos polimorfismos 192QR e 55LM no gene da <i>PON1</i> (PCR multiplex)	39
4.4.4 Análise do polimorfismo 148AG no gene da <i>PON2</i>	42

4.4.5 Análise do polimorfismo 311SC no gene da <i>PON2</i>	44
4.4.6 Análise dos polimorfismos 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT no gene da <i>PON3</i>	45
4.5 Determinações bioquímicas	47
4.6 Atividade enzimática da PON1	48
4.6.1 Determinação da atividade arilesterase (ARE) da PON1 sérica ...	48
4.6.2 Determinação da atividade paraoxonase da PON1 sérica	50
4.7 Pesquisa de autoanticorpos anti-LDL oxidada.....	51
4.8 Análise estatística	53
5. RESULTADOS	55
5.1 Características clínicas e demográficas das populações do estudo.....	55
5.2 Dosagem dos níveis séricos de Proteína C Reativa (PCR).....	59
5.3 Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da PON1, 148AG e 311SC, no gene da PON2 e, 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT no gene da PON3 ..	60
5.4 Análise descritiva da atividade arilesterase (ARE) e paraoxonase (PON)	64
5.5 Detecção de autoanticorpos anti-LDL oxidada	68
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	79
8. ANEXOS	81
9. REFERÊNCIA	99

1.Introdução

O processo inflamatório constitui uma resposta imune do organismo, frente a patógenos, células danificadas, entre outros fatores. Pode ocorrer de modo agudo, curto, como resposta benéfica ao estímulo danoso. A inflamação crônica, por sua vez, onde há persistência do estado inflamatório, pode resultar no dano tecidual (Pierce et al., 2009).

O estado homozigoto para hemoglobina S é denominado anemia falciforme. A inflamação tem papel importante no processo vaso-oclusivo nesta doença; leucócitos, citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão estão aumentados no sangue periférico dos pacientes com anemia falciforme.

O processo oxidativo da HbS aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos eritrócitos, causando obstruções na microcirculação, levando ao dano celular e tecidual (Dias-Da-Motta et al., 1996; Wagener et al., 2001). As EROs geradas contribuem para a peroxidação lipídica de membrana e agressão às proteínas teciduais e de membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Aparentemente esse estresse oxidativo torna as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) mais susceptíveis à oxidação, com subsequente dano às células endoteliais. Além disso, pacientes com HbS frequentemente apresentam hemólise, com liberação de Hb nos compartimentos vasculares. A Hb, por sua vez, é um potente oxidante de LDL, exacerbando, portanto, o processo de lesão celular e tecidual (Belcher et al., 1999).

Estudos clínicos e epidemiológicos demonstram que a HDL, heterogênea em tamanho e densidade, apresenta ação ateroprotetora dada sua capacidade de promover o efluxo de colesterol a partir dos macrófagos arteriais repletos de colesterol e ativados. Estudos recentes, contudo, reconhecem que a heterogenicidade física da HDL está associada às suas múltiplas funções que envolvem tanto os seus componentes lipídicos como os protéicos, sendo a Apo A1 seu constituinte proteico mais abundante. Apresenta propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes associada às enzimas ligadas à HDL (paraoxonase, fator ativador de plaquetas acetilhidrolase – PAF – e glutathione peroxidase, bem como lípase hepática, proteína de transferência de ésteres de colesterol e lecitina colesterol acetiltransferase) (Van Lenten et al., 2006).

É através da sua propriedade de transportar lipídios dos tecidos para o fígado (transporte reverso) que a HDL promove um dos seus principais efeitos protetores. Porém, outras ações dessa lipoproteína têm sido relatadas e demonstram sua importância nos mecanismos de proteção da HDL. Entre esses mecanismos, se encontram a proteção antioxidante, inibição das moléculas de adesão celular, ativação de leucócitos, indução da produção de óxido nítrico (NO), entre outras (Lima et al., 2006).

Quanto à sua proteção antioxidante, já foi demonstrado que a HDL previne modificações oxidativas da LDL tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo a oxidação da LDL e a formação de células espumosas através da captação da LDL oxidada por macrófagos, o processo primordial da aterosclerose (Mackness et al., 1993).

O principal mecanismo pelo qual a HDL inibe a formação da LDL oxidada é através da hidrólise enzimática dos hidroperóxidos de fosfolípidios. A paraoxonase (PON) é uma família de enzimas, composta por três membros, PON1, PON2 e PON3. A PON1 está fortemente associada a Apo A1. Cerqueira et al, 2010, observaram em pacientes portadores de anemia falciforme, que apresentavam seqüestro esplênico e que foram submetidos à esplenectomia, apresentavam níveis de HDL reduzidos. Sabe-se que a PON1 apresenta atividade anti-inflamatória e anti-aterogênica por conta de sua capacidade em gerar produtos de peroxidação lipídica e prevenir acúmulos de lipídios oxidados em lipoproteínas (Aviram et al., 1998; Mackness et al., 1996; Deakin et al., 2004). Portanto, níveis de HDL, podem estar associados aos quadros clínicos mais graves na anemia falciforme (Cerqueira et al., 2010).

Deste modo, faz-se necessário estudar os membros da família PON, visando avaliar o envolvimento destas enzimas nos processos de inflamação e estresse oxidativo, da população brasileira com diagnóstico de anemia falciforme.

2.Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade da enzima PON1, relacionando-as com polimorfismos, assim como com os polimorfismos nos genes de *PON2* e *PON3*, marcadores de inflamação e perfil lipídico em pacientes portadores de anemia falciforme.

2.2Objetivos específicos

- a) Determinar a distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos nos genes da *PON1* (192QR e 55LM), *PON2* (148AG e 311SC) e *PON3* (10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT) em portadores de anemia falciforme e em indivíduos saudáveis;
- b) Avaliar as atividades arilesterase e paraoxonase desempenhadas pela enzima PON1, no soro destas populações;
- c) Avaliar os marcadores de inflamação (fibrinogênio e Proteína C Reativa - PCR) nos indivíduos portadores de anemia falciforme;
- d) Avaliar o perfil lipídico dos participantes do estudo;
- e) Determinar, no plasma de indivíduos portadores de anemia falciforme, os indicadores da peroxidação lipídica.

3. Revisão de Literatura

3.1 Paraoxonase (PON)

A paraoxonase (PON) é uma família multigênica de enzimas (La Du, 1996), composta por três membros *PON1*, *PON2* e *PON3*, que estão localizados adjacente no braço longo do cromossomo 7 (entre q21.3 e q22.1) de humanos e no cromossomo 6 de ratos (Primo-Parmo et al., 1996). Nos humanos, os genes da *PON* compartilham 79 a 90% e 81 a 91% de similaridade em aminoácidos e em nucleotídeos, respectivamente (Primo-Parmo et al., 1996; Boright et al., 1998; Mackness et al., 2002) e possuem nove éxons, oito íntrons e uma sequência de promotores TATA-less (La Du et al., 1999; Campo et al., 2004). Estudos demonstram que a grande homologia estrutural destes genes estaria vinculada a existência de um precursor evolucionário comum (Hegele, 1999; Sorenson et al., 1999) (Figura 1).

Figura 1. Mapa genético da família PON em humanos. FONTE: Li et al., 2003 (modificado)

Originalmente, demonstrou-se que a enzima PON é responsável pela hidrólise do *paroxon*, produto do catabolismo do inseticida *paration*. Este composto está diretamente associado à nomenclatura atribuída aos membros da família paraoxonase (Costa et al., 2003; Khersonsky et al., 2005). A PON também é capaz de hidrolisar outros substratos metabólitos de compostos organofosforados (OPs), como oxon, diazoxon, “agentes nervosos” (sarin, soman), ésteres aromáticos (fenilacetato, tiofenilacetato e 2-naftilacetato) e lactonas aromáticas e alifáticas (dihidrocumarina, homocisteína tiolactona) (Costa et al., 2003; Draganov et al., 2004). Assim, estudos sugerem que o nome PON seja inadequado e sem qualquer associação com a atividade paraoxonase (Watson et al., 1995; Aviram et al., 2000; Draganov et al., 2004).

A atividade da enzima PON1 está presente no soro, podendo também ser encontrada em eritrócitos e cérebro. O tecido hepático, além de concentrar parte desta atividade, representa a fonte primária da enzima encontrada no plasma (Mackness, 1989; Costa et al., 2003; Draganov et al., 2005).

Apesar dos 60 anos de pesquisa, a função exata da PON1, PON2 e PON3, no organismo humano, ainda não foi completamente elucidada (Van Himbergen et al., 2006; Précourt et al., 2011). Após a sua descoberta, a PON tem sido objeto de estudo em diversos campos de pesquisa (Van Himbergen et al., 2006; Goswami et al., 2009). Assim, a família PON pode estar associada a inúmeros eventos fisiopatológicos como doença

aterosclerótica coronariana (Pérez-Herrera et al., 2008; Shin, 2009; Précourt et al., 2011), síndrome metabólica (Flekac et al., 2008; Kordi-Tamandani et al., 2011) e distúrbios neurológicos (Lawlor et al., 2007; Kucukali et al., 2008).

3.1.1 Paraoxonase 1 (PON1)

A enzima sérica paraoxonase 1 (PON1) foi descoberta no início dos anos 50, após Abraham Mazur, em 1946, ter descrito a primeira hidrólise enzimática de compostos organofosforados nos tecidos de animais (Mazur, 1946; Aldridge et al., 1953). Portanto, o interesse por essa linha de pesquisa aumentou quando surgiram evidências de que a enzima possuía capacidade de proteger a lipoproteína de baixa densidade (LDL) contra modificações oxidativas, bem como poderia reduzir a formação de células espumosas pelos macrófagos e prevenir o desenvolvimento da aterosclerose (Aviram et al., 2004). Polimorfismos no gene da PON1 foram associados a alguns tipos de doenças em humanos, tais como doença coronariana (Ito et al., 2002), doença de Parkinson (Zintzaras et al., 2004) e *Diabetes Mellitus* tipo 2 (Hofer et al., 2006).

Sintetizada e secretada pelo fígado, a PON1 circula na corrente sanguínea e encontra-se fortemente ligada à apolipoproteína A1 (Apo A1), integrante da lipoproteína de alta densidade (HDL) (La Du, 1996; Gupta et al., 2009). A PON1 é definida como uma esterase cálcio-dependente (Marsillach et al., 2008), constituída por 355 aminoácidos, com peso molecular de 43-45 kDa, que possui três cadeias de carboidratos

correspondentes a 15,8% do seu peso (La Du, 1996; Lu et al., 2006; Mackness et al., 1998; Marsillach et al., 2008). É expressa em mamíferos como, ratos, coelhos, camundongos além de seres humanos (Draganov et al., 2004), podendo ser encontrada em peixes, aves e invertebrados (La Du, 1996).

A PON1 possui um modelo de estrutura tridimensional (Harel et al., 2004; Van Himbergen et al., 2006) que auxilia as análises de seu modo de ligação com a HDL e determina seu papel fisiológico (Aviram et al., 2005). No centro da enzima encontram-se dois íons de cálcio, que são necessários para seu funcionamento: um para estabilizar a estrutura da enzima e outro para a atividade catalítica frente aos seus substratos (Harel et al., 2004).

Figura 2. Estrutura tridimensional da PON1. FONTE: Harel et al., 2004 (modificado)

Este modelo indica que a PON1 seria uma enzima ativada de modo interfacial (Harel et al., 2004) e que partículas de HDL, possuidoras de apo A1, ligam-se à PON1 com maior afinidade, promovendo sua melhor estabilização (mais de 100 vezes), além de estimularem sua atividade lactonase (Gaidukov et al., 2006).

Uma modificação no sítio ativo da enzima seria essencial para a proteção contra a oxidação da LDL, mas não para a hidrólise de OPs (Khersonsky et al., 2006). Tal fato sugere a possível existência de mudanças conformacionais no sítio ativo da PON1, que permitem alternar suas funções, ou ainda, a existência de dois sítios ativos, um sítio antioxidante e um para a hidrólise de OPs (Durrington et al., 2001). Assim, a função potencialmente antiaterogênica da PON1 encontra-se relacionada à sua localização nas partículas de HDL e é mediada pela atividade lactonase (Rosenblat et al., 2006; Rosenblat et al., 2011).

Estudos sobre o substrato fisiológico da PON1 foram necessários, a fim de definir as potenciais funções desta enzima. Embora sua atividade seja expressa frente a compostos organofosforados (paraoxonase), ésteres aromáticos (arilesterase), a PON1 demonstrou uma melhor eficiência catalítica contra uma gama de ésteres cíclicos (lactonas), sugerindo que a função lactonase exercida, seja a atividade nativa da PON1 (Draganov et al., 2005). Todos os membros da família de enzimas PON apresentam atividade lactonase, implicando que esta atividade tenha sido conservada durante a sua evolução (Khersonsky e Tawfik, 2005). Assim, as atividades

paraoxonase e arilesterase seriam meramente promíscuas e pouco afetadas pela ligação à HDL (Gaidukov et al., 2005).

3.1.1.1 PON1 e HDL

O efeito protetor da HDL, no desenvolvimento da aterosclerose, ou a relação inversa entre os níveis plasmáticos de HDL e as doenças cardiovasculares têm sido atribuídos ao papel da HDL no transporte reverso do colesterol (Gordon et al., 1989). O potencial da HDL em evitar diretamente alguns dos processos fundamentais da aterogênese tem merecido grande atenção, particularmente ao considerar o seu potencial antioxidante (Mackness e Durrington, 1995). A inibição da oxidação da LDL reduz de modo significativo a enzima peroxidase lipídica que, por sua vez, diminui o acúmulo de colesterol nos tecidos periféricos (Mackness et al., 1993). Esse efeito antioxidante da HDL é atribuído pela presença de algumas proteínas em sua partícula como, apo A1, paraoxonase (PON), a acetil-hidrolase, fator ativador de plaquetas (PAF) e glutathione peroxidase (GPX), enzimas estas que previnem a formação ou degradam produtos bioativos da oxidação da LDL (Assmann e Nofer, 2003).

Já foram relatadas várias funções antioxidativas para a PON, ligada à HDL, as quais incluem inibir a geração, induzida por cobre, de peróxidos lipídicos na LDL, catalisar a quebra dos fosfolipídios oxidados na LDL, a atividade fosfolipase A2-like que hidrolisa fosfolipídios oxidados biologicamente ativos, entre outros (Assmann e Nofer, 2003; Li et al., 2003;).

Também já foi conferido um papel peroxidativo para a PON, devido a sua capacidade de inibir a oxidação da própria HDL, conservando assim suas funções antiaterogênicas e a habilidade em eliminar oxidantes potentes (como os hidroperóxidos e o peróxido de hidrogênio), os quais estão envolvidos na aterosclerose (Li et al., 2003).

3.1.1.2 Polimorfismos de *PON1* e sua atividade enzimática

Variações na sequência de nucleotídeos, quando encontradas em mais de 1% de cromossomos da população, são denominadas de polimorfismos genéticos. De forma simplificada, os alelos específicos em um ou mais *loci* representam o genótipo para aqueles genes, sendo o fenótipo o efeito da ação do gene (Thompson e Thompson, 2002). A *PON1* humana possui 200 polimorfismos genéticos, descritos em regiões codificadoras, reguladoras e intrônicas (La Du et al., 2003; Costa et al., 2005). A atividade enzimática da *PON1* é influenciada parcialmente por tais polimorfismos genéticos (Mohamed Ali et al., 2008).

Os polimorfismos da região codificadora do gene *PON1* tem sido investigados quanto aos seus efeitos sobre a eficiência de hidrólise a substratos específicos e constitui a base molecular da variabilidade interindividual, sugerindo que estes afetam a expressão dos níveis de *PON1* (Agachan et al., 2004; Costa et al., 2011). Além disso, esses mesmos polimorfismos associam-se com inúmeras condições patofisiológicas (Goswami et al., 2009; Hussein et al., 2011; Rajković et al., 2011).

Os polimorfismos de *PON1* mais estudados encontram-se nas posições 192 do gene, onde há uma substituição dos aminoácidos Glutamina (Gln) por Arginina (Arg) (Q→R) e 55, o qual leva a substituição de uma Leucina (Leu) por Metionina (Met) (L→M) (Ng et al., 2005).

O polimorfismo *PON1* 192QR não altera a concentração da enzima em seres humanos (Leviev e James, 2000; Costa et al., 2003), contudo influencia a atividade da enzima PON1, por estar associada com a eficiência catalítica diante de alguns substratos (Rainwater et al., 2009; Richter et al., 2009). O substrato *paroxon* é eficientemente hidrolisado pela aloenzima 192R (Li et al., 2000; Draganov e La Du, 2004) e outros substratos como *soman*, *sarin* e *diazoxon* são mais rapidamente hidrolisados pela aloenzima 192Q (Humbert et al., 1993; Richter et al., 2009). A isoforma 192Q, *in vitro*, promove melhor proteção da LDL contra o acúmulo de peróxidos lipídicos (Mackness et al., 2003; Sepahvand et al., 2007) em detrimento da isoforma 192R, a qual, por sua vez, tem sido considerada um fator de risco independente e positivamente associada com a doença coronariana, devido a menor eficácia antioxidativa (Sanghera et al., 1997; Mackness et al., 1998; Pérez-Herrera et al., 2008; Vaisi-Raygani et al., 2011).

O segundo polimorfismo, na região codificadora do gene da *PON*, ocorre na posição 55 do gene e afeta, de modo menos intenso e independente quanto ao polimorfismo *PON1* 192, a atividade da enzima no plasma (Mackness et al., 2003; Mackness et al., 2000). Sabe-se que a presença do alelo 55M está associada à alteração nas concentrações séricas e à baixa eficiência da PON1 plasmática (Costa et al., 2005).

Diferenças na distribuição do polimorfismo da *PON1* são observadas na população mundial e em função da origem étnica dos indivíduos (Allebrandt et al., 2002; Scacchi et al., 2003; Santos et al., 2005; Ferreira, 2007; Mohamed Ali et al., 2008). O alelo 192Q, no gene da *PON1*, parece ser mais frequente na população asiática, quando comparado ao alelo 192R (Phuntuwate et al., 2005; Sepahvand et al., 2007; Ozturk et al., 2009; Vaisi-Raygani et al., 2011), assim como em regiões temperadas da Europa e da América do Norte (Deakin et al., 2003; Hernandez et al., 2003). Achados similares foram também encontrados em alguns estudos realizados na América do Sul (Gamboa et al., 2006; Santos et al., 2005; Maselli, 2007; Pérez-Herrera et al., 2008). Em outros estudos, no entanto, há pouca diferença na distribuição desses alelos ou são inexistentes (Acuña et al., 2004; Rojas-García et al., 2005; Cataño et al., 2006).

A distribuição alélica do polimorfismo 55LM, também diverge entre as populações no mundo. Estudos indicaram que o alelo 55L parece ser mais frequente quando comparado ao alelo M, (Brophy et al., 2001; Wang et al., 2003; Santos et al., 2005; Rios et al., 2007; Sepahvand et al., 2007).

Em humanos, a enzima *PON1* sofre influência de muitos fatores que podem atuar inibindo ou estimulando sua atividade e expressão. Em recém-nascidos, a atividade da *PON1* sérica é relativamente baixa e aumenta até os 15-25 meses de vida (Marchegiani et al., 2008). Os níveis da enzima voltam a diminuir com o envelhecimento, possivelmente devido ao desenvolvimento de condições relacionadas ao estresse oxidativo (Seres et al., 2004; Lescai et al., 2009). A atividade e expressão da *PON* também se

diferem entre os sexos, reafirmando a existência de uma relação sexo-dependente justificada por fatores hormonais (Rios et al., 2007; Costa et al., 2005). As mulheres apresentam níveis de atividade PON significativamente maiores quando comparadas às médias da mesma atividade nos homens (Faggioni, 2003; Costa et al., 2005; Sumegova et al., 2006).

A atividade enzimática da PON1 ainda exhibe uma variação entre os indivíduos de diferentes etnias, de aproximadamente 10 a 40 vezes (Cataño et al., 2006; Elkiran et al., 2007; Eng et al., 2009; Eom et al., 2011). Alterações na circulação dos níveis de PON1 podem também ser encontradas numa variedade de doenças que envolvem o estresse oxidativo, incluindo doença cardiovascular (Mackness et al., 2004; Gupta et al., 2011), diabetes (Iborra, 2006; Flekac et al., 2008), cânceres (Stevens et al., 2006; Elkiran et al., 2007; Camuzcuoglu et al., 2009), ou até mesmo entre indivíduos saudáveis (Ferreira, 2007; Parra et al., 2010; Singh et al., 2011).

Dados ainda conflitantes demonstram que a atividade da PON1 também pode estar alterada na gravidez, na menopausa, no tabagismo e nas dietas aterogênicas (Faggioni, 2003; Holland et al., 2006; Prakash et al., 2007, Tsakaris et al., 2009).

3.1.2 Paraoxonase 2 (PON2)

A PON2 é um dos três membros, altamente conservados, da família de enzimas paraoxonase (Witte et al., 2011). Com base em uma análise

filogenética, a PON2 é o membro mais antigo, seguido pela PON3 e PON1 (Primo-Parmo et al., 1996; Draganov e La Du, 2004).

A PON2 é uma proteína intracelular, amplamente expressa em tecidos como, pâncreas coração, cérebro, fígado, rim, estômago, baço, pâncreas, pulmão e testículos (Ng et al., 2001; Costa et al., 2003; Levy et al., 2007). Ainda, com localização primária na membrana plasmática e região perinuclear, a PON2 também encontra-se em organelas celulares tais como, retículo endoplasmático, lisossomos e mitocôndrias (Horke et al., 2008; Rothem et al., 2007; Witte et al., 2011).

Estudos recentes sugerem que a atividade nativa de PON2 seja a atividade lactonase (Draganov et al., 2005). Diferentemente da PON1, a PON2 não é capaz de hidrolisar compostos organofosforados (Draganov et al., 2005). No entanto, a PON2 parece estar associada à capacidade de degradar e inativar compostos presentes em bactérias envolvidas em processos infecciosos (Stoltz et al., 2007; Dasgupta et al., 2011). Seus substratos, *in vivo*, ainda não foram elucidados (Stoltz et al., 2007).

Embora o papel fisiológico da PON2 ainda seja parcialmente desconhecido, a sua distribuição nos tecidos sugere um papel exclusivo, além disso, possui propriedades antioxidantes semelhantes a PON1, mesmo que seja ausente no plasma. (Maselli, 2007; Primo-Parmo et al., 1996). Já foi demonstrado que sob estresse oxidativo, o mRNA da PON2 bem como a sua atividade, elevam-se de modo significativo, sugerindo que a PON2 seja responsável por atuar no estresse oxidativo intracelular e/ou localizado,

protegendo as células e tecidos do dano oxidativo. (Maselli, 2007; Reddy et al., 2008).

Devido às suas propriedades antioxidativa e antiaterosclerótica, similares àquelas exercidas pela PON1, a PON2 tornou-se objeto de investigação (Correia e Perry, 2010).

3.1.2.1 Polimorfismos genéticos na *PON2*

O gene da *PON2* expressa uma proteína intracelular, com peso molecular de aproximadamente 43 kDa (Ng et al., 2001; Horke et al., 2008), distribuída por 9 éxons, 8 íntrons e 355 aminoácidos (Li et al., 2003). Mochizuki e colaboradores (1998) identificaram diversas formas de RNA mensageiro (mRNA) do gene da *PON2* produzidas por splicing alternativo ou pelo uso de um segundo sítio de início de transcrição (Mochizuki et al., 1998).

Foram identificados, dois polimorfismos no gene da *PON2*, situados na região codificadora, onde há a substituição de um aminoácido Arginina (Arg) por Glicina (Gly) (A→G), na posição 148, e Cisteína (Cys) por Serina (Ser) (C→S), na posição 311 (Wang et al., 2003).

O polimorfismo localizado na posição 148, do gene da *PON2*, encontra-se associado às variações de lipoproteínas (Boright et al., 1998; Li et al., 2003) e níveis de glicose basal, no plasma, em portadores de *diabetes mellitus* tipo 2 (Hegele et al., 1997; Beer et al., 2006). O genótipo 148GG parece acelerar a hiperglicemia em portadores de diabetes (Calle et al., 2006).

Há evidências de que alterações na glicose plasmática sejam fator predisponente para diversas anormalidades associadas ao aumento da oxidação lipídica, como elevação de triglicérides plasmáticos, decréscimo da concentração de HDL, aumento da pressão sanguínea e redução da densidade das partículas de LDL, os quais constituem fatores de risco para aterosclerose e doença coronariana (Li et al., 2003; Calle et al., 2006).

O polimorfismo, na posição 311 do gene *PON2*, também está relacionado às patologias como, doença arterial coronariana, Alzheimer, infarto isquêmico em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e redução de massa óssea em mulheres pós-menopausa (Janka et al., 2002; Kao et al., 2002; Yamada et al., 2003). Sabe-se que a substituição de uma Cisteína (C) por uma Serina (S), na posição 311, altera a glicosilação da enzima e diminui a atividade lactonase exercida pela mesma (Stoltz et al., 2009).

O polimorfismo *PON2* 311SC parece interagir com o alelo 192R, do gene *PON1*, sendo considerado fator de risco para a doença coronariana (Sanghera et al., 1998). Entretanto, estudos observaram que o risco para esta doença estaria limitada aos indivíduos portadores dos genótipos 55LL/192QQ/ 311SS (Mackness et al., 2001; Rios et al., 2007; Taskiran et al., 2009).

Informações sobre a distribuição alélica dos polimorfismos de *PON2* ainda são escassas (Acuña, 2004; Ferreira, 2007). No entanto, os resultados demonstram que há uma maior frequência dos alelos 148A e 311S na população (Maselli, 2007; Oliveira et al., 2004; Zhang et al., 2006).

3.1.3 Paraoxonase 3 (PON3)

A PON 3 corresponde ao membro menos estudado da família das paraoxonases (Précourt et al., 2011). Sintetizada e secretada pelo fígado, em sua maior totalidade, a PON3 tem sido observada nos rins, pâncreas e intestino de camundongos (Campo et al., 2004; Marsillach et al., 2008; Shih et al., 2010).

Identificada mais recentemente, a PON3 assume em termos de expressão, função e localização, algumas características semelhantes a PON1 e PON2 (Draganov et al., 2000; Sanghera et al., 2008; Précourt et al., 2011). Similar a PON1, a PON3 é uma esterase cálcio dependente que se encontra associada a frações de HDL, no plasma (Gupta et al., 2009). Contrastando, a PON3 expressa limitada atividade arilesterase, ausência da atividade paraoxonase e potencial para hidrolisar lactonas com maior rapidez (Reddy et al., 2001; Campo et al., 2004; Lu; et al., 2006 Gupta et al., 2009). A aparente função desta proteína seria fornecer uma ateroproteção constitutiva basal, sendo necessários maiores estudos *in vivo* visando determinar se a sua atividade estaria envolvida, ou não, na prevenção da aterosclerose (Li et al., 2003). Draganov e colaboradores (2000) demonstraram que a PON3 sérica de coelho também está fortemente associada à fração HDL, apresentando ação lactonase e sendo cerca de 100 vezes mais eficaz que a PON1 de coelho na proteção da LDL contra a oxidação induzida por cobre (Draganov et al., 2004). Do mesmo modo, relataram que PON1 é 200 vezes mais abundante que PON3, embora a contribuição total de PON1 à atividade lactonase, neste modelo animal, seja

menor que 1% durante a purificação de PON1 e PON3 (Draganov et al., 2004). Sob estresse oxidativo, a expressão de PON1 é diminuída enquanto a expressão de PON3 permanece inalterada (Reddy et al., 2001). Lu e colaboradores (2006) relataram sobre a clonagem, expressão, remodelamento e purificação da PON3, utilizando a *Escherichia coli*. A PON3 remodelada possui atividade antioxidante eficaz, conferindo proteção da LDL contra oxidação induzida por íons de cobre (Lu et al., 2006). Camundongos deficientes em apolipoproteína E (apo E), submetidos ao estresse oxidativo, mostraram redução das atividades de PON1 e PON3 (25-45%) quando comparados aos camundongos controle, reafirmando a ação antioxidativa destas enzimas (Aviram e Rosenblat, 2004).

3.1.3.1 Polimorfismos genéticos na *PON3*

O gene da *PON3* expressa uma glicoproteína de 40kDa e distribui-se por nove éxons e oito íntrons (Gupta et al., 2009). Mutações na sequência codificadora do gene da *PON3* foram descritas em 2004, por Campo e colaboradores, que identificaram, no éxon 9, a substituição de aminoácidos Serina (Ser) por Treonina (Thr) (S→T), no códon 311, e Glicina (Gly) por Ácido Aspártico (Asp) (G→D), no códon 324, numa população do sul da Itália. Os resultados demonstraram que a frequência das mutações *missense* de *PON3* são muito baixas quando comparadas com as frequências de *PON1* e *PON2*, obtidas dos polimorfismos de regiões codificadoras (Wang et al., 2003). As consequências funcionais desses dois

polimorfismos ainda não foram descritas (Ng et al., 2005; Précourt et al. 2011).

Estudo realizado por Sanghera e colaboradores (2008) propôs a existência de outras variantes genéticas no gene *PON3*, em portadores de doença autoimune (Sanghera et al., 2008). Os 6 SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo), distribuídos pelas regiões promotora (*PON3* 2115), intrônica (*PON3* 10340), codificadora (*PON3* 30588), de splicing (*PON3* 40512) e 3' UTR - região não traduzida - (*PON3* 45486 e *PON3* 55146) foram analisados e considerados responsáveis por afetar a atividade sérica de PON1, independente do conhecimento das variações genéticas de *PON1* (Sanghera et al., 2008). Embora a PON1 e PON3 exerçam suas funções fisiológicas frente a distintos substratos, ambas podem contribuir sinergisticamente na prevenção de doenças cardiovasculares (Sanghera et al., 2008; Précourt et al., 2011).

3.2 Anemia Falciforme

O termo doença falciforme (DF) é atribuído ao conjunto de doenças genéticas autossômicas, caracterizadas pelas combinações da hemoglobina S com outras hemoglobinas anormais, podendo ser classificadas em formas clínicas distintas: na forma homozigótica, a anemia falciforme (HbSS), e nas formas heterozigóticas, representadas pelas associações de HbS com outras variantes de hemoglobinas, tais como HbC, HbD e as interações com as talassemias (α , β^0 e β^+) (Stuart e Nagel, 2004). Apesar das

particularidades que diferem as DF, todas essas doenças possuem semelhantes manifestações clínicas e hematológicas (Stuart e Nagel, 2004).

A anemia falciforme é um distúrbio genético de caráter autossômico recessivo, que se caracteriza pela homozigose da hemoglobina S, além de ser considerada a doença monogênica hereditária mais comum e mais severa das DF (Rees et al., 2010). A homozigose do gene β^S (Hb SS) é resultado de uma mutação pontual no sexto códon, do éxon 1, cromossomo 11, onde há uma substituição de um nucleotídeo adenina por timina (GAG→GTG), codificando assim uma valina ao invés do ácido glutâmico na sexta posição da cadeia β da hemoglobina ($\beta^6 \text{ glu} \rightarrow \text{val}$). Esta troca de aminoácidos modifica estruturalmente a molécula que, sob determinadas condições, se polimeriza acarretando graves consequências ao indivíduo sintomático (Neto e Pitombeira, 2003; Naoum e Souza, 2004). Por ser uma anomalia da cadeia beta da globina, as características clínicas desta doença só passam a ser percebidas após a estabilização da produção das globinas, que ocorre em torno do sexto mês de vida, quando a síntese da globina gama (fase fetal) é inibida e a síntese da globina beta se faz em plenitude (Pearson, 1989). A anemia falciforme apresenta uma anemia hemolítica crônica, de intensidade moderada ou grave (Rees et al., 2010).

O traço falciforme, heterozigose para essa hemoglobina mutante (Hb AS), define uma situação clinicamente benigna, não sendo classificado como DF, pois seus portadores são geralmente assintomáticos e sua expectativa de vida se assemelha com a da população em geral. Os achados laboratoriais são normais, não apresentando anemia, seus eritrócitos

possuem sobrevida normal, portanto não há hemólise e a concentração de HbA é maior do que a de HbS. Cerca de 300 milhões de indivíduos são portadores do traço falciforme em todo mundo (Murao e Ferraz, 2007; Key e Derebail, 2010).

A HbS, quando exposta a baixas tensões de oxigênio, forma polímeros, ocorrendo a polimerização. O eritrócito sofre uma série de alterações físico-químicas, que culmina na transformação de seu formato bicôncavo para o formato de irregular de foice (eritrócitos falciformes ou drepanócitos) (Bunn, 1997). A célula pode perder sua capacidade de voltar à sua forma discoide bicôncava normal, quando esse processo de falcização se torna repetitivo na microcirculação. Os eritrócitos falciformes, não circulam de modo adequado na corrente sanguínea, levando à obstrução do mesmo, bem como na diminuição drástica da sua sobrevida na circulação sanguínea (10 a 20 dias), enquanto um eritrócito normal possui sobrevida de 120 dias (ANVISA, 2001).

A ocorrência de vasoclusões, principalmente em pequenos vasos, representa o evento fisiopatológico determinante na origem da grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com a doença, tais como crises álgicas, autoesplenectomia, úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda (STA), sequestro esplênico, priapismo, necrose asséptica de fêmur, crises hemolíticas, retinopatia, insuficiência renal crônica, acidente vascular encefálico (AVE), hipertensão pulmonar, entre outros (Di Nuzzo e Fonseca, 2004; Madigan e Malik, 2006; Creary et al., 2007).

Por ser uma doença de alta mortalidade e morbidade , em julho de 2001, no Brasil, criou-se o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) pelo Ministério da Saúde. O diagnóstico neonatal (Teste do pezinho) passou a ser obrigatório em todos os estados. A triagem neonatal deve ser complementada pela confirmação diagnóstica posterior (Ramalho et al., 2002) e a realização de aconselhamento genético aos pais para informá-los sobre a possibilidade de virem a ter outros filhos afetados, orientá-los sobre os sinais e sintomas precoces das complicações, bem como sobre a identificação de outros portadores na família (Siqueira et al., 2002).

A alta mortalidade na DF na infância está associada à infecção bacteriana, sequestro esplênico, crise aplásica, síndrome torácica aguda e acidente vascular encefálico (Mendonça et al., 2009). O diagnóstico e o tratamento precoce da DF aumentam expressivamente a sobrevida e a qualidade de vida dos indivíduos portadores, diminuindo as suas sequelas e atenuando as suas complicações clínicas, mas não possibilita a sua cura (Ramalho et al., 2003).

Estudos demonstram que a expectativa de vida dos doentes falciformes vem aumentando nas últimas décadas, vivendo em média 40 anos, devido ao PNTN, utilização de vacinas e antibióticos profiláticos e ao tratamento com Hidroxiuréia (HU) (NIH, 2002).

Nos dias de hoje, as opções terapêuticas mais eficazes e disponíveis para o tratamento da AF são transplante de medula óssea (TMO) e Hidroxiuréia (HU). Com o advento dos transplantes, é possível a cura total da doença, quando há compatibilidade sanguínea de doadores, porém é um

tratamento de alto risco para o paciente, pois apresenta grande índice de complicações e mortalidade (Johnson et al., 1984; Buchanan et al., 2004; Ferster et al., 2001; Schnog et al., 2004).

A HU é um agente citotóxico, mutagênico e recombinogênico usado no tratamento de diversas doenças neoplásicas, hematológicas e HIV. É relativamente pouco tóxica e seu efeito colateral mielossupressor é reversível (Dover et al., 1986; Charache et al., 1987). Este fármaco diminui a frequência de crises vaso-oclusivas, necessidade de transfusões, internações hospitalares e síndrome torácica aguda. A HU traz benefícios para os pacientes com anemia falciforme por estimular a produção da hemoglobina fetal (HbF), que resulta na diminuição da polimerização da HbS que consequentemente diminui a falcização dos eritrócitos e a hemólise intravascular, que por sua vez, diminui a ativação endotelial e o consumo de óxido nítrico (NO) nos vasos sanguíneos (Eridani e Mosca, 2011). O tratamento crônico com hidroxiureia leva a uma diminuição global da expressão de proteínas de superfície dos neutrófilos, monócitos e linfócitos (Okpala, 2006), reduzindo também a contagem de neutrófilos, uma vez que altos níveis de células brancas são um indicativo dos eventos adversos em pacientes com anemia falciforme (Castro et al., 1994). Esse medicamento também aumenta a taxa de hemoglobina, do VCM (Volume Corpuscular Médio) e reduz a quantidade de reticulócitos circulantes (Charache et al., 1995; Bunn, 1997; McGann e Ware, 2011).

3.2.1 Epidemiologia

Estudos antropológicos sugerem que a anemia falciforme originou-se há milhares de anos, entre os períodos Paleotítico e Mesolítico, nas regiões centro-oeste da África, Índia e leste da Ásia. O fator causal da mutação no gene da hemoglobina normal (HbA) ainda permanece desconhecido (Naoum, 2000).

A distribuição geográfica do gene β^S no continente africano é significativamente semelhante à do *Plasmodium falciparum*. Indivíduos com portadores do traço falciforme conferem uma proteção parcial, principalmente na infância, contra malária, apresentando uma vantagem seletiva em relação a indivíduos que não carregam este gene anormal. A vantagem seletiva do heterozigoto teve como consequência o aumento da frequência do gene da HbS em áreas do mundo em que a malária foi endêmica (Williams et al, 2005; Kreuels et al, 2010).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) milhões de indivíduos em todo o planeta são portadores do gene β^S . Este possui ampla distribuição, abrangendo todos os continentes, sendo mais comum na África, entre população negra. O gene disseminou-se ao redor do mundo através dos fluxos migratórios voluntários e forçados. (Aliyu et al., 2008). A HbS foi introduzida no continente americano principalmente devido ao intenso comércio de escravos provenientes da África, que aconteceu entre os séculos XVI a XIX (Zago et al., 1992). No Brasil, as regiões Norte e Nordeste, receberam o maior afluxo de escravos e, consequentemente, o maior número de seus descendentes. A região Sul, por outro lado, teve um

menor contingente deles e maior imigração de europeus. A prevalência da DF, particularmente da anemia falciforme, reflete a influência da etnia africana nas diversas regiões do país (Watanabe, 2007). Os processos miscigenatórios entre as diferentes etnias que constituem a atual população brasileira ocorreram de forma gradual ao decorrer dos séculos. Dessa forma, o gene da HbS dispersou-se vastamente na população brasileira, interagindo geneticamente com outras hemoglobinas variantes, talassemias, enzimopatias e esferocitoses (Naoum, 2000). A anemia falciforme é considerada a doença monogênica hereditária mais frequente no Brasil. Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil (figura 2), quanto à prevalência da HbS em diferentes regiões brasileiras, estima-se a existência de mais de sete milhões de portadores heterozigotos e de 25 a 30 mil afetados com a forma homozigota (Hb SS), além do nascimento de 3500 novos casos anuais de DF em todo país (Cançado e Jesus, 2007).

Entre os estados brasileiros, a distribuição da anemia falciforme é heterogênea, sendo mais frequente nas regiões em que o tráfico de escravos foi mais intenso, como no nordeste do país, em especial no estado da Bahia (Figura 3). Assim, a prevalência de heterozigotos para a HbS é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%) (Cançado e Jesus, 2007).

Figura 3 . Frequências do gene β S em diferentes regiões do Brasil. FONTE: CANÇADO & JESUS, 2007(adaptado).

3.2.2 Fisiopatologia da Anemia falciforme

Conceituada como “doença molecular”, a anemia falciforme, uma doença genética (Pauling et al., 1949), é caracterizada por anemia hemolítica crônica e fenômenos vaso-oclusivos que levam à dor e à insuficiência múltipla de órgãos. Extremamente heterogênea do ponto de vista clínico, apesar de ser o protótipo de doença monogênica, mendeliana, comporta-se clinicamente como multifatorial e com grande variabilidade fenotípica (Zago e Pinto, 2007).

A substituição de uma adenina por uma timina (GAG $\rightarrow$ GTG) com a codificação de uma valina ao invés de um ácido glutâmico na sexta posição da cadeia da β -globina resulta na formação da HbS. Essa única troca de

aminoácidos é responsável por alterações da molécula da hemoglobina quando desoxigenadas. A HbS oxigenada tem comportamento idêntico a HbA em relação à afinidade pelo oxigênio (Steinberg, 2008) .

O processo primário da fisiopatologia é a polimerização, onde as oxiHbS perdem seu oxigênio e se tornam desoxiHbS, que por sua vez, se organizam em grandes polímeros, que se alinham paralelamente formando “feixes de cristais”, chamados de tactóides (Eaton,1990).

Estas alterações levam ao evento conhecido como falcização, que é a transformação da forma normal do eritrócito para a forma de foice, com consequentes mudanças da reologia dos glóbulos vermelhos e da membrana eritrocitária. Para que esse evento ocorra é necessário que, além de desoxigenadas, as moléculas de HbS estejam em elevada concentração, o que facilita a sua associação. Além disso, a redução da solubilidade da HbS e a sua polimerização também são dependentes do funcionamento de bombas de Na^+/K^+ e $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$, da capacidade antioxidante do eritrócito, do grau de desoxigenação da célula, do pH e, principalmente, da concentração de HbF (Stuart e Nagel, 2004).

Decorrente da completa desoxigenação formam-se células falcizadas, clássicas da anemia falciforme. Em um estado de desoxigenação parcial pode haver pequenas quantidades de polímeros sem anormalidades morfológicas. A quantidade de polímeros aumenta progressivamente com a desoxigenação, até que os eritrócitos se tornem falcizados (Horiuchi et al., 1988). Este fenômeno é reversível com o processo de oxigenação, desde que a membrana celular não seja definitivamente alterada. Quando isto

ocorre formam-se os eritrócitos irreversivelmente falcizados e permanecem anormais independentemente do estado da HbS intracelular (Hebbel, 1991). Os eritrócitos falciformes irreversíveis influenciam intensamente o fluxo sanguíneo, aumentando sua viscosidade, conseqüentemente têm sua capacidade de adesão ao endotélio vascular aumentada, reduzindo a luz dos capilares, provocando estase, resultando em hipóxia tecidual. Esta situação de hipóxia faz com que mais moléculas de HbS sejam desoxigenadas, agravando a situação circulatória, resultando em lesão tecidual (Horiuchi et al., 1988; Searjeant, 2001; Gladwin et al., 2004).

A membrana celular reflete as alterações moleculares que acontecem no interior celular, levando às seguintes manifestações clínicas: aumento da adesão das hemácias ao endotélio, com conseqüente desencadeamento de fenômenos inflamatórios; enrijecimento da membrana e da hemácia, diminuindo sua sobrevivência na circulação; lesões microvasculares; redução do óxido nítrico (NO) - uma substância vasodilatadora que regula o tônus vascular a qual contribui para a vasoconstrição e ativação da inflamação; e ativação da coagulação (Zago e Pinto, 2007).

O estado inflamatório crônico no organismo destes pacientes é decorrente de vários fatores concomitantes que se retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente (Zago e Pinto, 2007). A adesão das hemácias falciformes ao endotélio é o mecanismo pelo qual as alterações moleculares que ocorrem no eritrócito são transmitidas ao tecido. Estas células expressam maior número de moléculas de adesão em sua superfície externa da membrana celular do que as hemácias normais. A propagação do

processo de vaso-oclusão se dá pela interação das moléculas de adesão com o endotélio e outras células (Stuart e Nagel, 2004; Chiang, 2005; Aslan e Freeman, 2007).

As células endoteliais são fundamentais na manutenção da hemostasia e produzem NO (Wood e Grandner, 2007). Com a ocorrência de hemólise crônica das hemácias falcizadas, há uma consequente liberação de hemoglobina livre e arginase (enzima que utiliza o substrato usado na síntese de NO). A depleção desse substrato e o sequestro de NO resultam na vasoconstrição, que por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo favorecendo a falcização de outras hemácias falciformes, ativação plaquetária, exposição do fator tecidual com consequente ativação da coagulação (Gladwin et al., 2004). Um peptídeo pró-inflamatório potente vasoconstritor de grandes e pequenas veias e artérias, chamado endotelina-1, também é liberado pelas células endoteliais. Porém esse peptídeo aumenta as concentrações das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 e estimula os monócitos a secretarem citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , GC-SF). Os neutrófilos ativados por essas citocinas são recrutados para o foco inflamatório, aumentando a produção de peróxidos, expressando mais moléculas de adesão em sua superfície, facilitando sua adesão ao endotélio e a outros neutrófilos, plaquetas, reticulócitos e a eritrócitos falcizados, retroalimentando o fenômeno vaso-oclusivo (Figura 4). A obstrução vascular, devido à hipóxia recorrente, leva a infartos teciduais, causando crise de dor ou danos teciduais crônicos (Labie & Elion, 1999; Stuart & Nagel, 2004; Zago e Pinto, 2007; Morris, 2008;).

Apesar de tantos estudos, os mecanismos de vaso-oclusão não estão completamente elucidados. Esta interação anormal célula-célula, utiliza diversos mecanismos, envolvendo receptores de adesão que são expressos nas células vermelhas e nas células endoteliais (Solovey et al., 2001).

Figura 4. Fisiopatologia da anemia falciforme. A troca de uma Adenina por uma Timina (A→T) resulta na substituição do ácido glutâmico pela valina. Esta mutação pontual faz com que a molécula de HbS se polimerize em seu estado desoxigenado. Os polímeros de HbS lesam a membrana do citoesqueleto, provocando o evento de falcização. Nos vasos as hemácias falcizadas interagem com o endotélio e outras células resultando no evento de vaso-oclusão. A hemólise intravascular libera Hb no plasma levando ao sequestro de óxido nítrico (NO) e promovendo a vaso-constricção, entre outros problemas. EC: células endoteliais; ISC: células irreversivelmente falcizadas; N: neutrófilo; R: reticulócito; RBC: células vermelhas. FONTE: Steinberg, 2008 (adaptada)

3.2.3 Anemia falciforme, estresse oxidativo e alterações lipídicas

A anemia falciforme se caracteriza por um quadro de anemia hemolítica. Um dos fatores que predispõe ao processo hemolítico das células falciformes, induzindo-o as múltiplas consequências patológicas da DF, deve-se a degradação oxidativa da HbS (Steinberg, 1998; Jison et al., 2004). A desoxigenação da HbS favorece a sua meta-hemoglobinização (meta-Hb S) e a consequente elevação desse pigmento dentro da hemácia. Quando a concentração de meta- HbS ultrapassa a ação da enzima meta-Hb redutase, é desencadeada a degradação da meta-Hb S, com formação de hemicromos ou subprodutos do grupo heme, e a precipitação da globina S, oxidada sob a forma de corpos de Heinz (Winterbourn, 1990; Naoum, 1996). A HbS quando submetida à desoxigenação, se polimeriza alterando sua morfologia eritrocitária, tornando-se falcizada (Naoum, 1996). Dentre eventos bioquímicos e polimerizantes da célula, ocorre a degradação oxidativa da HbS, com liberação dos seus produtos de degradação (complexos de Fe^{2+} e Fe^{3+}), que atacam a membrana eritrocitária e catalisam a destruição de hidroperóxidos lipídicos originando radicais alcóxil e peróxil. A geração destes radicais amplia as lesões devido aos processos contínuos de novos ciclos de peroxidação lipídica, resultando na liberação de aldeídos como o malondialdeído (MDA) (Bursaux e Poyart, 1983; Rice-Evans, 1986; Platt, 1989; Dailly et al., 1998; Cesquini et al., 2003).

Comparando-se glóbulos vermelhos de adultos portadores de HbS aos de portadores de HbA, observou-se que as células vermelhas

portadoras de HbS produzem peróxidos, íons superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio em excesso (Naoum e Souza, 2004).

A anemia falciforme geralmente está associada com a diminuição das concentrações de proteínas séricas, hipocolesterolemia e hipotrigliceridemia (El-Hazmi et al., 1987; Erasmus et al., 1990). Existem, entretanto, estudos onde concentrações mais altas de colesterol foram observadas (Djoumessi et al., 1994), assim como para os triglicérides (Erasmus et al., 1990).

Fulbert e Cals (1992) relataram a oxidação de aminogrupos presentes na apo B100 da LDL por radicais livres. A LDL modificada é captada pelos macrófagos, os quais se preenchem com o colesterol esterificado. Estas células aderem-se à parede das artérias formando placas de ateroma, reduzindo o diâmetro das artérias e conduzindo a aterosclerose e, às vezes, a trombose (Fulbert et al., 1992). Já foi observado também que a polimerização de lípidos peroxidados pode produzir lipofuscina, a qual está envolvida no processo aterosclerótico (Djoumessi, 1989). Monnet e colaboradores (1996) observaram níveis de colesterol total, HDL, LDL, apo-A1 e apo-B significativamente mais baixos nos pacientes portadores de anemia falciforme e, particularmente, uma diminuição significativa dos valores de apo-A1 durante as crises de falcização (Monnet et al., 1996). As alterações na estrutura e no conteúdo das lipoproteínas destes indivíduos poderiam modificar suas funções e conduzir a outros riscos, como para infarto do miocárdio (Djoumessi et al., 1994).

Sabe-se que as paraoxonases vêm sendo estudadas quanto aos mecanismos de proteção contra oxidação e comportamento diante dos

processos inflamatórios. Sendo assim, frente à grande frequência de indivíduos falciformes em nossa população, seria de interesse avaliar a ação das enzimas PON nestes pacientes.

4. Casuística, Materiais e Métodos

4.1 Casuística

Após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 07/07/2010 (protocolo de pesquisa nº 0285/10), deu-se início a coleta de dados. Através do Ambulatório de Hemoglobinopatias do Serviço de Hematologia do HCFMUSP, 43 pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS), que se encontravam em estado estável da doença (*steady state*), foram convidados e aceitaram participar do estudo. Todos os participantes foram orientados a ler e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO 1) no período de novembro de 2010 a fevereiro de 2012. Foram excluídos do estudo aqueles pacientes que se recusaram a assinar o TCLE; os que estavam fazendo uso de hidroxiuréia (HU); que apresentaram episódios de crises dolorosas recentes (últimos três meses); que fizeram transfusão sanguínea recente (últimos três meses); menores de 18 anos.

A obtenção dos dados clínicos foi realizada pela busca ativa dos prontuários médicos dos pacientes.

Os casos foram pareados com os controles sadios de acordo com a idade e sexo.

Para a realização da coleta de sangue, os pacientes encontravam-se em jejum de 12 horas. Dos 43 pacientes selecionados, 30 (69,77%) eram do sexo feminino e 13 (30,23%) do sexo masculino, com idade mínima de 21 e

máxima de 68 anos (mediana de 35 anos; média $\pm$ desvio padrão: 38,09 $\pm$ 11,72 anos)

Um segundo grupo, o grupo controle, foi constituído por 43 indivíduos saudáveis, doadores de sangue na Fundação Pró Sangue / Hemocentro de São Paulo. Este grupo foi composto por 13 homens (30,23%) e 30 mulheres (69,77%), com idade mínima de 22 e máxima de 66 anos (mediana de 36 anos; média $\pm$ desvio padrão: 37,39 $\pm$ 11,33 anos).

4.2 Reagentes

Reagentes utilizados na extração do DNA genômico: sacarose e Tris (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA), EDTA e proteinase K (Gibco/ BRL – Grand Island, NY, USA), etanol P.A. (Merck – Darmstadt, Germany).

Reagentes utilizados na PCR: primers obtidos da Operon Biotechnologies (Cologne, Germany); Taq DNA polimerase, dNTPs e tampão de PCR, marcadores de peso molecular de 50 pb adquiridos da Invitrogen (Carlsbad - CA, EUA). As enzimas de restrição Hinf I e Fnu4HI foram adquiridas da Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia) e da New England Biolabs (Beverly – Ma, EUA), respectivamente. Os materiais utilizados para eletroforese e todos os outros reagentes empregados eram puros para análise.

Reagentes utilizados na determinação da atividade da PON1: paraoxon, acetato de fenila, cloreto de cálcio e Tris (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA), HCl (Merck – Darmstadt, Germany).

Reagentes utilizados na pesquisa de anticorpos anti-LDL oxidada: tampão fosfato salino, sulfato de cobre, gelatina e EDTA (Gibco/ BRL – Grand Island, NY, USA), IgG (Thermo Scientific, Rockfordm IL), 3-3'-5-5' tetrametilbenzidina (Sigma Chemical CO –St. Louis, EUA), Ácido Sulfúrico (Merck – Darmstadt, Germany).

4.3 Obtenção das amostras de soro/ plasma

Do sangue periférico, foram coletadas amostras de 15 mL no total – de pacientes 5 mL em tubos com anticoagulante EDTA, 5mL em tubos secos e 5 mL em tubos com Citrato de Sódio; de doadores 5 mL em tubos com anticoagulante EDTA e 10 mL em tubos secos – por meio de sistema a vácuo (Vaccutainer ®). A coleta de sangue dos pacientes foi feita em jejum de 12 horas. Imediatamente após a coleta, os tubos contendo o material biológico foram mantidos a 0°C (banho de gelo) por até 60 minutos. Dentro deste período, foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos a 8°C, para a obtenção de soro e plasma (armazenados a –80°C até o uso). As amostras colhidas com EDTA foram utilizadas para obtenção do DNA genômico.

4.4 Técnicas Moleculares

4.4.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído pelo método de “*salting out*” conforme descrito por Miller e colaboradores (Miller et al., 1998) modificado. A

separação dos leucócitos e purificação do DNA genômico foi realizada em duplicata para cada amostra pesquisada.

Primeiramente as amostras de sangue (500 μ L) foram submetidas à lise celular com 1 mL de tampão de lise de hemácias (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, sacarose 34 mM, MgCl₂ 10 mM, Triton X-100 1%). Após a centrifugação por 10 minutos a 1.700 g, em temperatura de 4°C, obteve-se a sedimentação de leucócitos. Os leucócitos foram novamente ressuspensos em tampão de lise de hemácias e centrifugados por 5 minutos a 960 g a 20°C.

Feita a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 500 μ L de tampão TEN (Tris-HCl 10 mM, pH 8,2, EDTA 2 mM, NaCl 400 mM), mais 5 μ L de SDS 10% e 3 μ L de proteinase K (2 mg/ml). A mistura foi homogeneizada e incubada por 1 hora a 56°C, visando a completa digestão das células. Adicionou-se, 150 μ L de NaCl saturado e em seguida agitou-se vigorosamente por 15 segundos para que ocorresse a sedimentação das proteínas celulares. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 960 g.

O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação em 600 μ L de álcool isopropílico, seguido da centrifugação por 5 minutos a 960 g. O DNA foi lavado com etanol 70%, com a finalidade de remover o excesso de sal. Em seguida foi submetido à secagem por 10 minutos em centrífuga a vácuo modelo Speed Vac AES1010 (Savant Instruments - Farmingdale, NY, EUA). O DNA foi finalmente reidratado e ressuspenso em 100 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM).

4.4.2 Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico

A integridade das amostras do DNA genômico extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel com 5 mm de espessura e medindo 7 x 15 cm, continha brometo de etídeo (0,5 µg/ml) que se intercala entre os nucleotídeos formando um complexo fluorescente mediante exposição à luz ultravioleta. O tampão utilizado, durante a eletroforese, foi o TAE (Tris 40 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 40 minutos, utilizando fonte modelo PowerPac P300 (Bio-Rad, USA). Após eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas em sistema de documentação de géis VDS Image Master, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia).

A quantificação do DNA genômico e a análise do grau de pureza, avaliada pela relação A_{260}/A_{280} = Absorbância em 260 e 280 nm, respectivamente) dos extratos de DNA foram realizadas em espectrofotômetro (Spectrophotometer ND1000 - Thermo Scientific - Wilmington DE, USA). As amostras foram estocadas em alíquotas de 100 µl à -20°C até o uso.

4.4.3 Análise dos polimorfismos 192QR e 55LM no gene da *PON1* (PCR multiplex)

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por meio da amplificação de fragmentos específicos, para cada região pesquisada, seguida da digestão por enzimas de restrição adequadas, permitindo a

diferenciação dos possíveis genótipos de cada polimorfismo estudado (análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição - RFLP).

Conforme metodologia descrita por Motti e colaboradores (2001), modificada, foi possível analisar os polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da PON1. A PCR multiplex utilizou primers desenhados de modo a introduzir um sítio de reconhecimento para enzima de restrição Hinf I, em um alelo de cada produto da PCR. Esta estratégia permitiu a identificação simultânea dos dois polimorfismos da PON1 em um único ensaio de amplificação seguido da análise de restrição (Motti et al., 2001).

Os produtos amplificados possuíam 111 pb e 144 pb, para os polimorfismos PON1 192 e PON1 55, respectivamente. Após a digestão com Hinf I, o fragmento de 111 pb gerou os fragmentos de 77 pb e 34 pb representado pelo alelo R, enquanto o fragmento de 144 pb apresentou os fragmentos de 122 pb e 22 pb no caso do alelo L. As sequências de primers (Motti et al., 2001) utilizadas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Sequências no sentido 5'→3' de primers utilizadas para a determinação dos polimorfismos 55LM e 192QR, no gene da PON1

Primers	Sequências
PON1 55F	GAG TGA TGT ATA GCC CCA GTT TC
PON1 55R	AGT CCA TTA GGC AGT ATC TCCg*
PON1 192F	TTG AAT GAT ATT GTT GCT GTG GGA CCT GAG
PON1 192R	CGA CCA CGC TAA ACC CAA ATA CAT CTC CCA GaA

*Letras minúsculas representam nucleotídeos despareados

As amostras de DNA genômico de cada indivíduo foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 µl contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3; MgCl₂ 7 mM; 600 µM de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 µM de cada primer PON1 192; 0,16 µM de cada primer PON1 55, 1 U de Taq polimerase e 1 µg de DNA genômico. A amplificação envolveu a desnaturação inicial das amostras (95°C por 5 minutos), seguida de 40 ciclos que incluem a desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (61°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos). O termociclador utilizado foi um Thermocycler T3000 – Biometra (Alemanha).

Os produtos da PCR foram digeridos por 16 horas a 37°C com 2 U de enzima Hinf I, preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl₂ 10 mM, β-mercapto etanol 1mM.

Após amplificação e digestão das amostras, as mesmas foram avaliadas em gel de agarose a 4% (contendo agarose em tampão TBE 0,5x), aplicando-se 5 µL de cada amostra nos poços do gel. Foram também aplicados no gel, 5 µL de marcador de peso molecular de 50 pb e amostras amplificadas com genótipo conhecido. A separação foi realizada empregando-se uma corrida de 60 minutos a 60 W constantes

A posterior observação das bandas foi obtida por meio do sistema de documentação de géis VDS Image Master, Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). A figura 5 esquematiza os possíveis perfis eletroforéticos empregando-se a PCR-multiplex.

Produto	Genótipos		
Amplificado PON1			
55 (144 pb)			
<i>Fragmento digerido</i>	LL	LM	MM
144 pb
122 pb
22 pb
Produto	Genótipos		
Amplificado PON1			
192 (111 pb)			
<i>Fragmento digerido</i>	QQ	QR	RR
111 pb
77 pb
34 pb

Figura 5. Esquema dos perfis eletroforéticos dos produtos amplificados dos polimorfismos 55LM e 192QR, no gene da *PON1* (multiplex). Os fragmentos obtidos após digestão com *Hinf I*, 144 pb e 111 pb, referem-se aos genótipos normais; os fragmentos 122pb e 77 pb correspondem ao genótipo mutado. Os fragmentos 34 pb e 22pb não são visíveis no gel.

4.4.4 Análise do polimorfismo 148AG no gene da PON2

A genotipagem do códon 148 da PON2 foi realizada por PCR, conforme descrito por Hegele e colaboradores (1997). As sequências de primers empregadas encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Sequências 5'→3' de primers utilizadas na determinação do polimorfismo 148AG, no gene da PON2

Primers	Sequências
PON2 148F	AGT GGA AAT TTT TAA ATT TGA AGC AG
PON2 148R	TTG TTT GCA AAT GCT GGG GAT

Amostras de DNA genômico de cada indivíduo foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3; MgCl₂ 7 mM; 600 µM de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 µM de cada primer de PON2 148; 1 U de Taq

polimerase e 1 µg de DNA genômico. A amplificação envolveu uma desnaturação inicial das amostras à 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 61°C por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (extensão) por 45 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (extensão). O termociclador empregado foi um Thermocycler T3000 – Biometra (Alemanha).

Os produtos da PCR foram então digeridos por 16 horas a 37°C com 1U de enzima Fnu4H I, preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl₂ 10 mM, β-mercapto etanol 1mM.

O produto amplificado possuía 130 pb. Assim, o fragmento digerido com a enzima, apresentou dois fragmentos menores que codificaram o alelo PON2 148A, e um único fragmento para o amplicon derivado de um alelo PON2, codificando para 148G (Hegele et al.,1997).

As amostras amplificadas e digeridas foram avaliadas em gel de agarose a 3% (contendo agarose em tampão TBE 0,5x), aplicando-se 5 µL de cada amostra nos poços do gel. Foram também aplicados no gel, 5 µL de marcador de peso molecular de 50 pb e amostras amplificadas com genótipo conhecido para esta alteração. A figura 6 representa os possíveis genótipos para o polimorfismo PON2 148AG.

Produto	Genótipos		
<i>Amplificado PON2 148 (130 pb)</i>			
<i>Fragmento digerido</i>	AA	AG	GG
Fragmento Maior
Fragmento Menor

Figura 6. Esquema do perfil eletroforético do produto amplificado do polimorfismo 148AG, no gene da PON2.

4.4.5 Análise do polimorfismo 311SC no gene da PON2

O polimorfismo da posição 311 foi determinado segundo metodologia descrita por Motti e colaboradores (2001), modificada, no gene da PON2. As sequências de primers (Motti et al., 2001) utilizadas encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Sequências 5'→3' de primers utilizadas na determinação do polimorfismo 311SC, no gene da PON2

Primers	Sequências
PON2 311F	GGT TCT CCG CAT CCA GAA CAT TgaA
PON2 311R	TGT TAA GaT ATC GCA TCA TGC C

*Letras minúsculas representam nucleotídeos despareados

Amostras de DNA genômico de cada indivíduo foram submetidas à PCR em uma reação feita em volume de amplificação de 25 µl contendo Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8,3; MgCl₂ 7 mM; 600 µM de cada nucleotídeo trifosfato; 0,16 µM de cada primer da PON2 311; 1 U de Taq polimerase e 1 µg de DNA genômico. A amplificação envolveu a desnaturação inicial das amostras (95°C por 5 minutos), seguida de 40 ciclos: desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (61°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos). O termociclador empregado foi um Thermocycler T3000 – Biometra (Alemanha).

Os produtos da PCR foram digeridos por 16 horas a 37°C com 2 U de enzima Hinf I, preparada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 60 mM, MgCl₂ 10 mM, β-mercapto etanol 1mM. O produto amplificado possuía 196

pb. Após a digestão com Hinf I, os fragmentos originados foram 173 pb e 23 pb, representado pelo alelo S.

Após amplificação e digestão das amostras, as mesmas foram avaliadas em gel de poliacrilamida não desnaturante (Bassam et al., 1991), aplicando-se 10 µL de cada amostra nos poços do gel e 5 µL de marcador de peso molecular de 50 pb. A separação foi realizada empregando-se uma corrida de 50 minutos a 170 W constantes.

A observação das bandas foi obtida pela coloração com nitrato de prata 0,1% (Bassam et al., 1991).

A figura 7 demonstra os possíveis genótipos para o polimorfismo da PON2 311SC.

Produto	Genótipos		
<i>Amplificado PON2 311 (196 pb)</i>			
<i>Fragmento digerido</i>	SS	SC	CC
196 pb
173 pb
23 pb

Figura 7. Esquema do perfil eletroforético do produto amplificado do polimorfismo 311 SC, no gene da PON2.

4.4.6 Análise dos polimorfismos 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT no gene da PON3

As amostras foram diluídas em tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1mM) para permanecer entre a concentração de 1 a 20 ng/µl, de acordo com o Protocolo de Ensaio de Genotipagem SNP TaqMan da Applied Biosystems. As sondas/primers dos SNPs estavam a uma concentração de 40 vezes e foram diluídas a 20 vezes com tampão de diluição TE

(Tris/EDTA). Em seguida foram feitas alíquotas das mesmas para sua estocagem.

Para discriminação alélica específica de Polimorfismos Simples de Nucleotídeos (SNPs), foi utilizado 1 μ l de amostra juntamente com os componentes da reação TaqMan, sendo estes PCR Universal TaqMan Master Mix (concentração de 2X), Primers e Probes FAM e VIC (concentração de 20X).

Os quatro SNPs TaqMan usados neste estudo foram C_11708898_10 (T10340G), C_59001595_10 (C45486A), C_59001773_10 (A2115T) e C_59001534_10 (C55146T).

Os componentes da reação e as amostras foram pipetados em uma placa de 96 *wells* e levados ao equipamento 7500 FAST REAL-TIME PCR SYSTEM da Applied Biosystems, onde as condições de termociclagem foram: após HOLD inicial de 95°C por 10 minutos, as amostras foram submetidas a um PCR de 40 ciclos. Cada ciclo de PCR composto de desnaturação por 15 segundos a 92°C e anelamento e extensão por 1 minuto a 64°C. Exceção dos primers/sondas C55146T e A2115T, nos quais o anelamento processa-se a uma temperatura de 60°C, 1 minuto.

Os resultados foram interpretados através do 7.500 Software v2.0, 4 Ink, da Applied Biosystems, conforme demonstra a figura 8.

Figura 8. Curva de amplificação do SNP C_59001773_10. Foram utilizados os fluoróforos FAM e VIC para marcar os nucleotídeos T e A, respectivamente.

4.5 Determinações bioquímicas

Foram determinadas as concentrações séricas de colesterol total (CT), bem como de suas frações HDL, LDL e VLDL, triglicérides (TG), apolipoproteínas (Apo) A1 e B e proteína C reativa (PCR), para ambos os grupos. Bilirrubina total, direta, indireta e o fibrinogênio foram mensurados apenas para os 43 pacientes. Estes exames foram realizados na rotina do Serviço de Bioquímica Clínica da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, empregando-se um analisador automático Modular

Analytix P-800 (Roche/Hitachi) e kits compatíveis (CHOL, HDL-C Plus e TG 2a geração) fornecidos pelo fabricante do equipamento.

O método empregado para as determinações de triglicérides, colesterol total, frações de HDL-colesterol e VLDL-colesterol e bilirrubina total (direta e indireta) foi o enzimático colorimétrico automatizado. Para a determinação da LDL-colesterol, o método utilizado foi o cinético automatizado. As apolipoproteínas (A1 e B) foram mensuradas por Turbidimetria. Para dosagem do fibrinogênio foi utilizado o método de Clauss modificado. Já para a Proteína C Reativa (PCR) foi empregado o ensaio imunoturbidimétrico. Os materiais analisados tiveram seus resultados expressos em mg/dL.

4.6 Atividade Enzimática da PON1

4.6.1 Determinação da atividade arilesterase (ARE) da PON1 sérica

A determinação da atividade arilesterase da PON1 foi realizada, conforme método de Eckerson (1983) modificado, cujo meio reacional tem por substrato o acetato de fenila (Sigma-Aldrich Chemical CO–St. Louis, EUA). A hidrólise enzimática do acetato de fenila libera fenol, cuja taxa de formação também foi determinada por espectrofotometria, forma mais comumente empregada para avaliar a atividade arilesterase desta enzima.

O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra avaliada. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL de soro (diluição 1:3) em 3 mL da mistura tampão/substrato [(acetato de fenila (1,0 mmol/l) com tampão Tris-HCL (20 mmol/L) contendo CaCl₂ (2,0 mmol/L), pH 8,0]. O substrato foi

adicionado ao tampão instantes antes do início da reação e a cinética aferida em cubetas de quartzo (1 cm). Para correção da hidrólise espontânea do acetato de fenila inclui-se um branco, da reação, constituído pelo tampão Tris-HCL/CaCl₂/acetato de fenila sem o soro.

A cinética da reação de formação do fenol foi monitorada com leituras da absorbância a cada 30 segundos, durante 5 minutos, em comprimento de onda de 270 nm, a 25 °C em espectrofotômetro de modelo DU-70 (Beckman Instruments Inc-Palo Alto, CA, USA). Para o cálculo da atividade considerou-se o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $1,31 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em U/mL, sendo que uma unidade da arilesterase corresponde a 1 μmol de acetato de fenila hidrolisado por minuto, por mL de soro.

✓ **Cálculo do Fator:**

$$FATOR = \frac{VTR(mL)}{\epsilon_{270} \times VA(mL) \times E(cm)}$$

$$\epsilon_{270} = 1,31 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$VTR \text{ (volume total da reação)} = 3 \text{ mL}$$

$$VA \text{ (volume da amostra)} = 0,005 \text{ mL}$$

$$E \text{ (espessura da cubeta)} = 1 \text{ cm}$$

Substituindo os valores e ajustando para as unidades internacionais temos:

$$\text{Fator} = 458$$

✓ **Cálculo da atividade:**

Atividade arilesterase = Fator $\times \Delta\text{abs}/\text{min}$ = $1310 \times \text{diluição}$, onde Δabs é igual a média da variação das absorbâncias medidas a cada 30 segundos.

4.6.2 Determinação da atividade paraoxonase da PON1 sérica

A atividade basal da PON1 sérica foi determinada conforme métodos de Senti e colaboradores (2003) e Agachan et al. (2004) modificados, empregando-se, como substrato, o paraoxon (O,O dietil – O – paranitrofenol fosfato) (Sigma-Aldrich Chemical CO – St. Louis, EUA). A hidrólise enzimática do paraoxon libera p-nitrofenol, cuja taxa de formação foi determinada por espectrofotometria.

O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra avaliada. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL (diluição 1:3) de soro, descongelado a temperatura ambiente, em 500 µL da mistura tampão/substrato (Tris-HCl 0,1M, pH 8,05, contendo CaCl₂ e paraoxon 5,5 mmol/L) e transferência de 320 µL da solução para um poço de microplaca de 96 poços (Costar, EUA).

A velocidade de formação do p-nitrofenol foi monitorada através das leituras da absorbância em 405nm, a 37 °C, durante 10 minutos, em leitor de microplacas (Microplate Reader, Benchmark, Bio-RAD, Hercules – Ca, EUA). O resultado foi expresso em U/L (onde 1U/L é definida como 1 µLmol de p-nitrofenol formada por minuto por litro de soro), empregando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenol (18,05 x 10³). As equações abaixo demonstram os cálculos do fator e da atividade da PON1 sérica.

✓ Cálculo do Fator:

$$FATOR = \frac{VTR(mL)}{\epsilon_{405} \times VA(mL) \times E(cm)}$$

$$\epsilon_{405} = 18,050 \text{ L M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{VTR (volume total da reação)} = 525 \mu\text{L}$$

$$\text{VA (volume da amostra)} = 25 \mu\text{L}$$

$$\text{E (espessura da cubeta)} = 1 \text{ cm}$$

Substituindo os valores e ajustando para as unidades internacionais

temos:

$$\text{Fator} = 1163,43 \text{ nMol mL}^{-1}$$

✓ **Cálculo da atividade:**

$$\text{Atividade paraoxonase} = \text{Fator} \times \Delta\text{abs}/\text{min} = 1163,43 \times \Delta\text{abs nMol mL}^{-1},$$

onde Δabs é igual a média da variação das absorbâncias medidas a cada 1 minuto.

4.7 Pesquisa de autoanticorpos anti-LDL oxidada

Conforme metodologia previamente descrita por Fernvik et al (2004) e Brandão et al (2010) modificado, a técnica para a detecção de anticorpos anti-LDLox foi feita mediante a análise do plasma de pacientes e de um pool de indivíduos saudáveis. Este experimento foi padronizado e realizado no laboratório do Prof. Magnus Ake Gidlund, responsável pelo laboratório de Imunofisiopatologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV (ICB-USP) da Universidade de São Paulo.

A preparação da LDL e da LDL oxidada (oxLDL) envolveu a obtenção do plasma, após ultracentrifugação (1000 g por 15 minutos a 4°C), seguido da diálise com tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4), livre de EDTA, e da incubação com sulfato de cobre (CuSO_4) (20 μM) por 18 horas à 37°C.

Empregou-se a ultracentrífuga Beckman L8 (Palo Alto, CA). Após este período a incubação foi bloqueada com EDTA 1mM.

Com a finalidade de determinar autoanticorpos contra oxLDL, placas de 96 poços (Nunc-Immuno) foram sensibilizadas com LDL oxidada (7,5 ug/mL; 50µL por poço), suspensas em tampão carbonato de sódio (0,1 mol/L; pH 9,6) e incubadas por 24 horas a 4°C. Após os ciclos de lavagens com PBS, as placas foram bloqueadas com gelatina a 3% (Gibco, EUA) e mantidas a temperatura ambiente por 2 horas.

Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS. Foram adicionadas 50µL das amostras de plasma diluídas em PBS (1:400), em triplicata, nos wells da placa. Após 2 horas de incubação a 37°C, as placas foram lavadas 4 vezes com 100µL de PBS contendo Tween 20 (0,05%) e incubadas com 50µL de conjugado por 2 horas em temperatura ambiente. Foi utilizado como conjugado, imunoglobulina anti-humana G (IgG) marcada com peroxidase (Thermo Scientific, Rockford, IL) na diluição 1:2000. Posteriormente, as placas foram submetidas a mais 4 ciclos de lavagens com PBS.

O processo de revelação se deu pela transferência de 75µL de solução contendo TMB (250µL de 3-3', 5-5' tetrametilbenzidina 6,5% em DMSO; Sigma, St Louis, MO e 10µL de H₂O₂, substrato para a enzima peroxidase, diluída em 12mL de tampão citrato 0,1; pH 5,5), durante 5 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida, após 10 minutos, com adição de 25µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (2 mol/L) (Merck, Alemanha).

Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica em 450 nm em leitor de ELISA Multiskan MCC/340 (Labsystems, Finlândia). Como as amostras não puderam ser analisadas em uma única placa, e estas podem diferir quanto à sua sensibilização foi necessária uma padronização interna. Em cada placa uma solução com tendo um padrão interno de IgG foi adicionada (densidade óptica, DO padrão). A relação entre a DO da amostra e a DO do padrão foi calculada para definir o índice da reação (IR), que expressa os resultados $(DO \text{ da amostra} - DO \text{ do branco}) / (DO \text{ do padrão} - DO \text{ do branco})$.

4.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS 10.01 para Windows e s resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) ou mediana (mínimo-máximo).

As frequências gênicas e genotípicas dos polimorfismos 192QR, 55LM, no gene da PON1 e 148AG e 311CS, no gene da PON2, foram estimadas e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) calculado através do teste de Qui-Quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher. O teste *t* de Student e o teste não-paramétrico de Mann-Whitney foram utilizados para comparar as variáveis quantitativas.

O teste de Pearson Correlation Coefficients foi utilizado para correlacionar as atividades arilesterase e paraoxonase e as demais variáveis estudadas.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para analisar relação entre as atividades arilesterase e paroxonase entre os grupos.

As comparações dos genótipos dos genes da PON1, PON2 e PON3 e variáveis foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e ANOVA.

Foram consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Características clínicas e demográficas das populações do estudo

A população do presente estudo foi composta de 43 pacientes portadores de anemia falciforme (grupo caso) e 43 indivíduos saudáveis doadores de sangue (grupo controle), que foram pareados por idade e sexo, portanto não houve diferença significativa na distribuição de participantes do sexo masculino ou feminino entre os dois grupos. No entanto, em ambos os grupos o percentual de mulheres foi superior ao percentual de homens (Teste Qui-Quadrado (χ^2) e Teste *t* de Student; $p > 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4: Dados demográficos dos grupos estudados

	Grupos		p
	Anemia Falciforme (n = 43)	Controle (n = 43)	
Gênero			
Feminino	30(69,77%)	30(69,77%)	1,0
Masculino	13(30,23%)	13(30,23%)	1,0
Idade (anos)	38,09±11,72	37,79±11,32	0,904

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. n = número de participantes.

Os resultados das determinações laboratoriais do perfil lipídico dos participantes estão apresentados na Tabela 5. As concentrações de triglicerídeos (TG) e da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos estudados. Entretanto, concentrações diminuídas de colesterol total (CT), lipoproteína

de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e apolipoproteínas (A1 e B) foram observadas nos pacientes com anemia falciforme em relação ao grupo controle (Teste *t* de Student, $p < 0,01$).

Tabela 5: Perfil lipídico do grupo de pacientes com anemia falcife indivíduos do grupo controle.

	Pacientes AF		Grupo Controle		VR
CT (mg/dL)	43	132,51±27,93 *	43	181,44±35,99	< 200 Desejável 200 a 239 Limítrofe > 240 Elevado
HDL (mg/dL)	43	36,16±11,38*	43	50,65±13,17	> 55 Sem Risco 35 a 55 Risco Moderado < 35 Risco Elevado
LDL (mg/dL)	43	71,18±23,78*	43	104,93±32,23	< 130 Sem Risco 130 a 159 Risco Moderado > 159 Risco Elevado
VLDL (mg/dL)	43	25,27±9,44	42	25,4±10,06	< 40 Sem Risco
TG (mg/dL)	43	125,81±47,14	43	129,07±65,04	< 150 Desejável 150 a 200 Limítrofe 200 a 499 Elevado > 500 Alto Risco
Apo A1 (mg/dL)	43	107,78±21,21 *	43	162,27±26,6	115 a 190 Homens 115 a 220 Mulheres
Apo B (mg/dL)	43	65,13±20,3*	43	89,03±22,32	70 a 160 Homens 60 a 150 Mulheres

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão. VR = valores de referência segundo as Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. * $p < 0,01$.

Foi feita avaliação dos dados hematológicos através da busca ativa dos prontuários médicos dos pacientes (Tabela 6).

Tabela 6: Dados hematológicos dos pacientes.

Pacientes AF		VR	
	n	Média±Desvio Padrão	
Perfil Hematológico			
Hemoglobina (g/dL)	43	8,27±1,03	12,0-16,0
Hematócrito (%)	43	23,53±3,01	35-47
Reticulócitos (%)	41	12,08±6,03	0,5-2,7
Leucócitos (mil/mm ³)	43	10,79±3,45	04-11
Perfil de Ferro			
Ferro sérico (µL/dL)	34	120,76±49,54	37-145
Ferritina sérica (ng/mL)	33	568,36±917,94	15-150
Transferrina sérica (mg/dL)	29	231,17±42,97	250-380
Capacidade total de ligação do ferro (µL/dL)	33	274,87±62,57	228-428
Saturação transferrina (%)	33	45,11±18,32	20-40
Marcador de Hemólise			
DHL (U/L)	41	1162±426,78	240-480
Bilirrubina Total(mg/dL)	43	4,23±2,58	0,20 a 1,00
Bilirrubina Indireta(mg/dL)	43	2,97±1,68	0,10 a 0,60
Bilirrubina Direta(mg/dL)	43	1,24±1,62	< 0,30
Marcador de Inflamação			
Fibrinogênio	43	350,73±108,92	150-400

VR= valores de referência

5.2 Dosagem dos níveis séricos de Proteína C Reativa (PCR)

Ao comparar os níveis de Proteína C Reativa entre indivíduos HbSS e os indivíduos saudáveis observou-se diferenças estatisticamente significativas, ($p > 0,001$) (Figura 9), onde o grupo dos pacientes apresentaram valores maiores quando comparados com o grupo dos controles (Tabela 7).

Figura 9. Níveis séricos de Proteína C reativa em indivíduos HbSS e em indivíduos saudáveis. Teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,001$.

Tabela 7: Concentração de PCR no plasma da população estudada.

	n	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
PRC	43	2,69	3,32	1,5	0,2	14,7
Controle						
PCR Caso	43	7,7	9,3	5,6	0,8	59,4

n= número de participantes; DP= Desvio Padrão.

5.3 Distribuição dos genótipos e frequência alélica dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da *PON1*, 148AG e 311SC, no gene da *PON2* e, 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT no gene da *PON3*

A partir da distribuição dos genótipos e frequência relativa dos alelos foi estimado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), para cada um dos polimorfismos nos genes da *PON1*, *PON2* e *PON3*, nos grupos caso e controle. Verificou-se que os polimorfismos, em ambos os genes, apresentavam valores em acordo com os esperados para o EHW (Teste Qui-Quadrado (χ^2)).

Em relação ao polimorfismo 192 no gene da *PON1*, o grupo de indivíduos saudáveis apresentou o genótipo 192QQ (55,8%) com mais frequência, em relação ao grupo de pacientes (23,2%). Observou-se que houve uma diferença estatística significativa em relação aos heterozigotos 192QR, os quais foram mais frequentes no grupo caso (44,2%) do que no grupo controle (30,2%), bem como em relação ao genótipo 192RR, que foi mais frequente no grupo caso (32,6%) do que no grupo controle (13,9%) (Figura 10). O alelo Q apresentou-se com maior frequência na população saudável (71%), enquanto o alelo R se destacou pela alta frequência nos portadores da doença (55%) (Figura 11). Houve diferença significativa na distribuição de genótipos e frequência de alelos entre os pacientes e indivíduos saudáveis (Teste Qui-Quadrado (χ^2), $p=0,0064$).

Figura 10. Distribuição genotípica para o polimorfismo 192QR no gene da *PON1*

Figura 11. Frequência alélica para o polimorfismo 192QR no gene da *PON1*

A distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos do polimorfismo 55LM da *PON1* foram semelhantes entre os grupos estudados. O genótipo LL e MM foram mais comuns nos indivíduos do grupo caso (48,8% e 27,9% respectivamente) do que no grupo controle (46,5% e 18,6% respectivamente). Já o grupo controle apresentou maior frequência para o genótipo LM (34,8%) comparado com o grupo caso (23,2%) (Figura 12).

Houve prevalência do alelo L em ambos os grupos (60% em pacientes e 64% em indivíduos saudáveis) (Figura 13). Não houve diferença significativa na distribuição de genótipo ($p>0,05$) e da frequência de alelos entre os pacientes e indivíduos controle (Teste Qui-Quadrado (χ^2)).

Figura 12. Distribuição genotípica para o polimorfismo 55LM no gene da *PON1*

Figura 13. Frequência alélica para o polimorfismo 55LM no gene da *PON1*

A distribuição dos genótipos dos polimorfismos 148AG e 311SC no gene da *PON2* e dos polimorfismos 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT no gene da *PON3* e a frequência relativa de alelos, não diferiram entre os

grupos estudados, conforme tabela 8 (Teste Exato de Fisher e Qui Quadrado (χ^2); $p>0,05$).

Tabela 8: Distribuição dos genótipos e frequência relativa de alelos para os polimorfismos 148AG e 311SC de *PON2* e dos 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT no gene da *PON3*, nos indivíduos dos grupos caso e controle.

PON2 148AG		Genótipos (%)			Frequência alélica	
		AA	AG	GG	A	G
Caso (n=43)		55,8	27,9	16,3	70%	30%
Controle (n=43)		69,7	25,6	4,6	83%	17%
		*p=0,1782				
PON2 311SC		Genótipos (%)			Frequência alélica	
		SS	SC	CC	S	C
Caso (n=43)		53,4	37,2	9,3	72%	28%
Controle (n=43)		53,4	27,9	18,6	67%	33%
		**p=0,3858				
PON3 10340GT		Genótipos (%)			Frequência alélica	
		GG	GT	TT	G	T
Caso (n=43)		2,3	32,5	65,1	19%	81%
Controle (n=43)		4,6	39,5	55,8	24%	76%
		*p=0,6211				
PON3 2115AT		Genótipos (%)			Frequência alélica	
		AA	AT	TT	A	T
Caso (n=43)		0	6,9	93	3%	97%
Controle (n=43)		2,3	9,3	88,3	7%	93%
		*p=0,713				

Continua

PON3 45486AC		Genótipos (%)			Frequência alélica	
		AA	AC	CC	A	C
Caso (n=43)		0	4,6	95,3	2%	98%
Controle (n=43)		0	9,3	90,6	5%	95%
						*p=0,6761

PON3 55146CT		Genótipos (%)			Frequência alélica	
		CC	CT	TT	C	T
Caso (n=43)		95,3	4,6	0	98%	2%
Controle (n=43)		88,4	11,6	0	94%	6%
						*p=0,4331

*p= teste exato de Fisher, **p= Qui Quadrado (χ^2)

5.4 Análise descritiva da atividade arilesterase (ARE) e paraoxonase (PON)

Considerando que o substrato fisiológico para a PON não é conhecido, a atividade da enzima foi determinada por espectrofotometria nas amostras de soro dos participantes, utilizando-se dois diferentes substratos: acetato de fenila (atividade arilesterase) e paroxon (atividade paraoxonase).

A atividade sérica da arilesterase (ARE) apresentou valores significativamente menores entre o grupo dos pacientes portadores de anemia falciforme (mediana de 71; média $\pm$ desvio padrão: 69,9 $\pm$ 20,3 U/mL) quando comparado ao grupo de indivíduos saudáveis (mediana de 85; média $\pm$ desvio padrão: 89,7 $\pm$ 27,3 U/mL) (Teste t Student; $p < 0,001$; Figura 14).

Figura 14. Atividade da enzima arylesterase no grupo caso (n= 43) e grupo controle (n= 43). Resultados expressos em U/mL.

Foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre a atividade arylesterase e as variáveis apolipoproteína A1 (Apo A1), Colesterol Total (CT) e lipoproteína de alta densidade (HDL) conforme descrito na figura 15. Houve uma correlação negativa e significativa entre a atividade arylesterase e leucócitos (teste de Coeficiente de Correlação de Pearson, $p<0,05$).

Figura 15. **A:** Correlação positiva entre atividade arilesterase da enzima PON1 e apolipoproteína A1. **B:** Correlação positiva entre atividade arilesterase da enzima PON1 e Colesterol total. **C:** Correlação positiva entre atividade arilesterase da enzima PON1 e HDL – colesterol. **D:** Correlação negativa entre atividade arilesterase da enzima PON1 e Leucócitos.

Em relação à atividade paraoxonase da enzima paraoxonase 1 (PON1), expressa em $\mu\text{moles de p-nitrofenol/min/mL}$ de soro, nenhuma associação estatística foi encontrada quando comparados os grupos caso (mediana de 82; média $\pm$ desvio padrão: $80,3 \pm 45,8$ U/mL) e controle (mediana de 102; média $\pm$ desvio padrão: $100,1 \pm 55,2$ U/mL) (Teste t Student; $p > 0,05$; Figura 16).

Figura 16. Atividade da enzima paraoxonase no grupo caso (n= 43) e grupo controle (n= 43). Resultados expressos em U/L.

Porém houve uma correlação positiva e significativa entre a atividade paraoxonase da enzima e a transferrina conforme demonstra a figura 17. (teste de Coeficiente de Correlação de Pearson, $p < 0,05$)

Ao relacionar as atividades da PON1 (ARE e PON) com os genótipos dos polimorfismos estudados, do grupo caso, observou-se que indivíduos apenas com genótipo QQ apresentaram diferença significativa em relação à atividade paraoxonase. O grupo QQ apresenta valores de atividade PON significativamente menor que o grupo QR ($p=0,026$) e RR ($p<0,001$) (ANOVA).

5.5 Detecção de autoanticorpos anti-LDL oxidada

Os títulos de anticorpos anti-oxLDL foram analisados em ambos os grupos. A concentração de IgG total diferiu significativamente entre os grupos (Teste t Student; $p < 0,001$), como observa-se na tabela 9 e na Figura 18.

Tabela 9: Concentração de anti- oxLDL no soro da população estudada.

	n	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
OxLDL*	42	1,74	0,74	1,62	0,61	4,5
Controle						
OxLDL*	43	2,84	1,52	2,52	0,91	10,33
Caso						

*Expressos em Densidade Óptica (D.O) de filtro de emissão $\lambda 405\text{nm}$; n= número de participantes; DP= Desvio Padrão.

Figura 18. Concentração de anti-oxLDL no soro de pacientes com AF e de indivíduos saudáveis. *Densidade óptica (D.O) $\lambda 405\text{nm}$

6.Discussão

No presente estudo foram analisadas as frequências e a distribuição dos polimorfismos nos genes da *PON1* (192QR e 55LM), *PON2* (148AG e 311SC) e *PON3* (10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT) e a influência destes sobre as atividades enzimáticas arilesterase e paraoxonase, bem como o perfil lipídico, marcadores de inflamação e níveis de autoanticorpos anti-LDL oxidada, em portadores de anemia falciforme.

A anemia falciforme e a talassemia exemplificam estados de hemólise acentuada e crônica que cursam com hiperplasia medular, principalmente à custa da hiperproliferação dos precursores eritroides na medula óssea. Este estado hiperproliferativo possivelmente causa a redução do colesterol plasmático para atender à maior demanda deste elemento para síntese de novas membranas. Além disso, o estresse oxidativo crônico, gerado pelo estado hemolítico e sobrecarga de ferro decorrente de terapia transfusional, torna a partícula de LDL mais susceptível à oxidação (Belcher et al., 1999). Outro fator que pode levar ao estado de hipocolesterolemia é a lesão hepática, a qual acarreta na redução da produção endógena de colesterol (Naoum, 2005). É conhecido ainda que, a maioria das doenças inflamatórias, associa-se com uma diminuição das apo-A1 e A2, promovida pela troca da apo-A1 pela apolipoproteína amiloide sérica A (Benditt e Eriksen, 1977; Parks e Rudel, 1985; Saile e Fruchart, 1990). Assim, o processo inflamatório pode constituir um dos principais contribuintes para a redução das concentrações de apo A1 em pacientes com anemia falciforme (Rahimi et al., 2006). Essas informações corroboram com os achados bioquímicos dos

nossos pacientes, sendo observada uma menor concentração de CT, HDL-C, LDL-C, Apo A1 e Apo B, quando comparadas as concentrações nos indivíduos saudáveis.

A hemólise crônica presente na AF causa desequilíbrio vascular, com diminuição no período de vida dos eritrócitos e refletindo na concentração de hemoglobina, contagem de reticulócitos, alterações nos níveis de bilirrubinas e enzima desidrogenase láctica (DHL). Os dados hematológicos apresentados neste estudo confirmam o estado anêmico dos pacientes, onde encontramos valores de Hemoglobina (média±DP: 8,2±1,03) abaixo dos níveis normais, assim como os valores do hematócrito (média±DP: 23,53±3,0), que é a porcentagem de massa de glóbulos vermelhos em relação ao volume de sangue. Em contra partida, encontramos um grande aumento no número de reticulócitos (média±DP: 12,08±6,03). A reticulocitose por sua vez, indica a capacidade proliferativa compensatória da medula óssea frente a uma anemia hemolítica. Nossos dados foram concordantes com a literatura (Cerqueira et al., 2010; Kupesiz et al., 2012; Akohoue, 2007)

Um marcador de hemólise considerado como de utilidade é a desidrogenase láctica, a qual apresenta níveis elevados na presença de hemólise intravascular (Kato et al., 2007). Como um terço da hemólise da anemia falciforme ocorre intravascularmente, liberando hemoglobina livre no plasma, estudos vêm demonstrando que a DHL pode ser um marcador de complicações relacionadas à hemólise nesse grupo de pacientes. Acredita-se que ocorra em pacientes com AF com níveis alterados de DHL, uma

síndrome de hemólise associada à resistência à vasodilatação dependente de NO, disfunção endotelial e vasculopatia em diversos órgãos (Kato et al.,2007). Nossos dados foram concordantes com os da literatura (média $\pm$ desvio padrão: $1162 \pm 426,78$), demonstrando que os indivíduos HbSS estão sofrendo hemólise intravascular.

Foi observada uma alta concentração de ferritina sérica em nossos pacientes (média $\pm$ DP: $568,36 \pm 917,94$). A dosagem da ferritina sérica é o parâmetro mais útil para a avaliação/monitoramento dos pacientes com sobrecarga de ferro, por ser o exame não invasivo de melhor correlação com os estoques de ferro corpóreo e por apresentar baixo custo. A ferritina é uma proteína de fase aguda, que pode estar elevada em estados inflamatórios (Giardina & Grady,1995). De acordo com Ballas (2001), pacientes com doença falciforme (DF), muitas vezes necessitam de transfusão de sangue começando na primeira infância. Esta, juntamente com a utilização de quelante de ferro pode impedir ou retardar o aparecimento de sobrecarga de ferro. Estudos sugerem uma associação entre a sobrecarga de ferro e falência de órgãos em pacientes cronicamente transfundidos. Os pacientes com anemia falciforme e sobrecarga de ferro podem, assim, estar em maior risco de desenvolver falência de órgãos em comparação com aqueles com níveis normais de ferro. A quantidade de sangue transfundido, e o estado das reservas de ferro podem ser determinados através da mensuração da ferritina sérica, ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro e percentual de saturação da transferrina. Cerca de um terço dos pacientes adultos com hemoglobina SS tinha saturação da transferrina superior a 50, no estado

estacionário, o que sugere a sobrecarga de ferro. Durante os episódios de crises dolorosas os níveis de ferritina sérica aumentaram significativamente (Ballas, 2001). Pacientes com valores baixos de ferritina sérica e desaturação da transferrina tiveram uma menor incidência de episódios dolorosos agudos e falência de órgãos, quando comparados com aqueles que tiveram a sobrecarga de ferro. A mortalidade foi significativamente maior no grupo de sobrecarga de ferro, podendo esta ser um fator predisponente da gravidade da doença (Ballas, 2001).

A doença falciforme é conhecida como uma doença inflamatória crônica. O estresse oxidativo é um potente precursor do estado inflamatório e muitos marcadores têm sido sugeridos como bons preditores de prognóstico para as doenças inflamatórias, como a PCR, DHL, ICAM, VCAM, haptoglobina, entre outros (Zulet et al., 2007). A PCR é sintetizada pelos hepatócitos sob estímulo primário da interleucina-6 (IL-6), e tem sido considerada um marcador da inflamação sistêmica, podendo estar elevada em processos inflamatórios e infecciosos (Denardi et al., 2008). Encontramos níveis elevados desta proteína nos pacientes estudados (mediana de 5,6, média±DP: 7,7±9,3). Krishnan e colaboradores (2010) encontraram altos níveis séricos de PCR em crianças falcêmicas hospitalizadas e este achado foi associado com crises de dor e eventos vaso-oclusivos.

A família das paraoxonases é constituída por três membros (PON1, PON2, PON3) que possuem homologia estrutural considerável, localizados adjacientemente no cromossomo 7. Essa família de enzimas tem sido bastante estudada por apresentar propriedades antioxidantes e por sua

atividade anti-inflamatória (Précourt et al 2011). Existem estudos que descrevem um fator genético responsável pela atividade antioxidante e ateroprotetora da PON1, todavia, se a atividade da PON1 está reduzida, consequentemente há um aumento no estresse oxidativo e um maior risco de desenvolver doença aterosclerótica. Dois polimorfismos genéticos da PON1, o 192QR e o 55LM, têm sido implicados na variabilidade da atividade enzimática da mesma (Bhattacharyya et al., 2008). Estudando os polimorfismos desta enzima nos 43 pacientes falciformes, encontramos uma maior frequência do genótipo 192RR em 14 (32,6%) desses indivíduos e outros 19 (44,2%) com o genótipo QR. O alelo Q apresentou maior frequência na população saudável (71%), enquanto o alelo R foi mais frequente alta frequência nos portadores da doença (55%). Conforme a literatura, as frequências alélicas de PON1 tem grande variedade entre as populações humanas. O polimorfismo no gene da PON1 na posição 192 (Q/R) mostra maior frequência do alelo R em populações asiáticas e africanas, principalmente na região da África Central. Por outro lado o alelo Q parece ser mais frequente na Europa e na América do Norte (Li et al., 2003; Draganov e La Du, 2004). A anemia falciforme, por sua vez, está presente, notadamente, na África tropical e em todos os países em que existe a contribuição do africano na formação étnica da população. Na Europa, está limitada à comunidade africana das antigas colônias. Sua prevalência em vários países é estimada prospectivamente pelos resultados de programas de triagem neonatal. Por causa da grande miscigenação, no Brasil a prevalência é fortemente relacionada ao percentual de afro-

descendentes (Lobo et al.,2007). Já para a distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos do polimorfismo da posição 55 (L/M) da *PON1* encontramos semelhanças entre os grupos estudados. O genótipo LL e MM foram mais comuns nos doentes (48,8% e 27,9% respectivamente) do que nos indivíduos saudáveis (46,5% e 18,6% respectivamente). Estes, por sua vez, apresentaram maior frequência para o genótipo LM (34,8%) comparado com o grupo caso (23,2%). Houve prevalência do alelo L em ambos os grupos (60% em pacientes e 64% em indivíduos saudáveis). São mais escassos os estudos sobre a distribuição dos alelos nas diversas populações, no entanto, o alelo L parece ser predominante entre chineses (96%) e japoneses (91% -94%) e também em caucasianos (67% - 74%) numa frequência um pouco menor quando comparada aos asiáticos (Draganov e La Du, 2004). No Brasil, Santos e colaboradores, num estudo realizado entre dez tribos ameríndias amazônicas em Belém, capital do estado do Pará, demonstraram que os alelos L, correspondendo a 97% (posição 55), e R (posição 192), correspondendo a 73%, seriam os mais frequentes.

Ainda são poucas as informações sobre o gene *PON2*, no entanto os polimorfismos nas posições 148 (A/G) e 311 (C/S) desse gene têm sido associados a numerosas condições fisiopatológicas como a variações no metabolismo e níveis plasmáticos de lipoproteínas e glicose (Li et al., 2003; Ng et al., 2005). Há ainda estudos que associam uma combinação entre polimorfismos do gene *PON2*, com os do gene *PON1* a uma maior

predisposição a doença coronariana (Sanghera et al., 1998; Leus et al., 2001).

A distribuição dos genótipos dos polimorfismos 148AG e 311SC no gene da *PON2* e dos polimorfismos 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT no gene da *PON3* e a frequência relativa de alelos, não diferiram entre os grupos estudados. Em relação ao gene *PON2*, encontramos, na posição 148 (A/G) maior presença do alelo A em ambos os grupos, o mesmo ocorreu na posição 311 (C/S) para o alelo S, dados estes concordantes aos já descritos na literatura (Oliveira et al., 2004; Acuña et al., 2004; Maselli, 2007; Ferreira, 2007; Silva, 2012).

A atividade enzimática da PON1 pode ser afetada por outras doenças inflamatórias, como por exemplo, colite ulcerativa, caracterizada por inflamação e estresse oxidativo, neste caso estudos demonstram que a atividade nesse grupo de pacientes estava diminuída. A confirmação foi obtida em um segundo estudo, no qual a atividade da PON1 foi mensurada no soro de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn e, também tendo sido encontrada atividade reduzida da enzima. Além disso, a partir de biópsias intestinais de doença de Crohn e doença celíaca, foi detectado nível reduzido de expressão do mRNA de PON1. Resultados semelhantes foram obtidos em pacientes com hepatite viral aguda e pacientes sépticos. Entretanto, se a regulação baixa de PON1 é uma das causas da doença ou uma consequência devido à inflamação e do estresse oxidativo ainda deve ser elucidado (Boehm et al., 2009)

Em nosso estudo foi encontrada uma menor atividade arilesterase da enzima PON1 nos pacientes falciformes (mediana de 71; média±DP: 69,9 ± 20,3 U/mL) quando comparada ao grupo de indivíduos saudáveis (mediana de 85; média±DP: 89,7 ± 27,3 U/mL). Cakmak e colaboradores (2009), encontraram uma diminuição nas atividades de PON1 e aumento do estresse oxidativo, em pacientes com beta talassemia major, aumentando a susceptibilidade à peroxidação lipídica. Novak e colaboradores (2010) também relataram uma menor atividade enzimática de PON1 (arilesterase e paraoxonase) em pacientes sépticos em estado crítico. Observaram também uma correlação com a diminuição de HDL e aumento da PCR, em comparação com indivíduos saudáveis. A diminuição da atividade da PON1, o baixo nível de HDL circulante e o aumento da PCR atraiu considerável interesse (Mackness et al., 1995) supondo que haja uma ligação entre o desenvolvimento da aterosclerose e a combinação dos altos níveis de PCR com a baixa atividade de PON1.

Em relação à atividade paraoxonase da enzima paraoxonase 1 (PON1), expressa em μ moles de p-nitrofenol/min/mL de soro, nenhuma associação estatística foi encontrada quando comparados os grupos caso (mediana de 82; média ± desvio padrão: 80,3 ± 45,8 U/mL) e controle (mediana de 102; média ± desvio padrão: 100,1 ± 55,2 U/mL). Entretanto, encontramos uma correlação positiva e significativa entre a atividade paraoxonase da enzima e a transferrina. Um estudo feito por Martinović et al (2010), mostrou também que a atividade PON foi correlacionada

positivamente com a ferritina, hemoglobina, saturação de transferrina em atletas.

A avaliação da oxidação da LDL, a partir do isolamento desta lipoproteína, vem sendo avaliada *in vivo*, em determinadas populações tais como cardiopatas, a partir da quantificação de autoanticorpos contra oxLDL e a oxLDL, por métodos imunológicos (Duarte et al., 2008). A paraoxonase consiste numa enzima com potencial antioxidante, prevenindo a oxidação da LDL por modular ou inativar o estresse oxidativo sistêmico ou localizado. (Précourt et al., 2011). Nos indivíduos portadores de AF, os níveis de autoanticorpos anti-oxLDL apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados. O grupo caso apresentou níveis elevados de autoanticorpos anti-oxLDL (média±DP: $2,84 \pm 1,52$) com valores entre 0,91 e 10,33 D.O., o que sugere a presença de estresse oxidativo ou quadro inflamatório que conduza a peroxidação da LDL nos pacientes portadores de anemia falciforme.

7.Conclusões

- A frequência relativa dos alelos dos polimorfismos 192QR, no gene da *PON1*, diferiu entre os grupos. Pacientes com anemia falciforme apresentaram maior frequência do alelo R, mais frequente em indivíduos de raça negra. Já o alelo Q foi mais frequente na população saudável avaliada;
- Para o polimorfismo na posição 55 (L/M) de *PON1*, houve frequência do alelo L em ambos os grupos, alelo este mais frequente na população em geral;
- A distribuição e frequência dos alelos dos polimorfismos 148AG e 311SC, no gene da *PON2*, e 10340GT, 2115AT, 45486AC e 55146CT da *PON3* foram semelhantes entre os grupos caso (portadores AF) e controle (indivíduos saudáveis) avaliados;
- A atividade arilesterase da enzima *PON1* apresentou-se significativamente menor no grupo de pacientes falciformes. Esta diminuição da atividade poderia ser decorrente da exposição da HDL e da paraoxonase ao maior estresse oxidativo causado pela hemólise intravascular. Poderia também ser decorrente da menor quantidade de HDL e da Apo A1 presente no soro, influenciando o ancoramento da *PON* nesta estrutura;

- Indivíduos portadores de anemia falciforme apresentaram níveis de proteína C Reativa maiores quando comparados com indivíduos saudáveis;
- A população falcêmica apresentou concentrações mais baixas de Colesterol total, HDL, LDL, Apo A1 e Apo B comparada aos controles. Estes dados poderiam estar relacionados com a hemólise que cursa com hiperplasia medular, principalmente à custa da hiperproliferação dos precursores eritroides na medula óssea. É conhecido ainda que, a maioria das doenças inflamatórias, associa-se com uma diminuição das apo-A1. Assim, o processo inflamatório, pode constituir um dos principais contribuintes para a redução das concentrações de apo A1 em pacientes com anemia falciforme.
- Altos níveis de autoanticorpos anti-LDL oxidada sugerem a presença de estresse oxidativo ou quadro inflamatório que conduza a peroxidação da LDL nos pacientes falciformes.

8. Anexos

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL **LEGAL**

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD
(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo das paraoxonases 1, 2 e 3 em pacientes portadores de anemia falciforme.

PESQUISADOR: Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 14.300

UNIDADE DO HCFMUSP: Depto de Clinica Medica HCFMUSP/ Disciplina de Hematologia e Hemoterapia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐RISCO MAIOR ☐**4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos**

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): O(A) senhor(a) está sendo convidado para participar de uma pesquisa sobre a inflamação crônica observada em portadores de uma doença chamada “Anemia Falciforme”. Caso o(a) sr(a). concorde em participar, será obtida hoje, junto com sua doação de sangue, uma amostra de sangue (15 mL) para avaliar as diferentes formas hereditárias (herdadas de pai e de mãe) de uma enzima, chamada paraoxonase, que pode possuir ação contra a inflamação. Queremos saber se existe alguma relação entre o funcionamento desta enzima e a anemia falciforme, para entendermos melhor os eventos observados nesta doença. Serão pesquisadas a atividade (funcionamento) da enzima e seus subtipos (através do estudo de DNA). Serão dosadas também algumas substâncias no sangue relacionadas com inflamação (as citocinas), assim como os lípides (“gorduras”) do sangue (colesterol e triglicérides).

2 – O sangue para estes testes será coletado só uma vez, em horário combinado com o(a) senhor(a).

3 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 1 e 2: somente os da punção venosa (picada da agulha) para a coleta do sangue. Os desconfortos que podem ocasionalmente ocorrer no local da picada são dor e mancha roxa (hematoma).

4 – Possíveis benefícios advindos da pesquisa: Não haverá benefício imediato para o(a) Sr (a), mas o estudo poderá contribuir para melhorar o conhecimento e o tratamento da doença no futuro.

5 – Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não há.

6 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são o **Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone**, a **Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro** e **Carolina Garcia de Macedo**, que podem ser encontrados na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (PAMB) – 1 andar – sala 43 – São Paulo – SP - fones: (11) 3061-5544 r.264. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio

Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição: não aplicável.

8 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros participantes da pesquisa, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles.

9 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

10 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. O risco do estudo é mínimo, sendo apenas o de uma coleta de amostra de sangue.

12 - A sua amostra de sangue coletada hoje ficará armazenada no laboratório, conforme regras de sigilo e manutenção de material biológico vigentes, e poderá vir a ser utilizada em outro estudo, somente caso o(a) senhor(a) concorde após lhe explicarmos sobre o que seria o novo projeto de pesquisa e mediante aplicação de novo termo de consentimento ao(a) senhor(a).

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Estudo das paraoxonases 1, 2 e 3 em pacientes portadores de anemia falciforme".

Eu discuti com a Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro e Carolina Garcia de Macedo sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento,

antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo 2. Genotipagem dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da PON1 e 148AG e 311SC, no gene da PON2, nos portadores de anemia falciforme (n=43)

Amostras	PON1-55 (L/M)	PON1-192 (Q/R)	PON2-148 (A/G)	PON-311 (S/C)
01	LM	QQ	GG	CS
02	MM	QQ	AA	SS
03	LL	QR	GG	CC
04	LL	RR	AA	SS
05	LM	RR	AA	SS
06	LL	QR	AA	SS
07	LL	RR	AA	SS
08	LL	QQ	AA	SS
09	LL	QR	AG	CS
10	LM	QR	AA	SS
11	LL	QR	AA	SS
12	LL	RR	GG	CC
13	LL	RR	AA	SS
14	LL	RR	AA	SS
15	LL	RR	GG	CS
16	LM	QQ	AA	SS
17	MM	QR	AA	SS
18	LL	QR	AA	SS
19	MM	RR	AA	SS
20	LL	QQ	AG	CS
21	MM	QR	AA	SS
22	LM	QQ	AG	CS
23	LM	QQ	AG	CS
24	MM	RR	AG	CS
25	LL	QR	AG	SS
26	MM	QR	AG	CS
27	LL	QQ	AG	CS
28	MM	QR	AA	SS
29	MM	QQ	AA	SS
30	MM	RR	AG	CS
31	LL	QR	AG	CS
32	MM	QQ	AA	SS
33	LL	QR	AG	CS
34	MM	QR	AA	CS
35	LM	RR	AG	CS
36	LM	RR	AA	SS
37	MM	QR	AA	SS

Amostras	PON1-55 (L/M)	PON1-192 (Q/R)	PON2-148 (A/G)	PON-311 (S/C)
38	LL	QR	AA	CC
39	LL	QR	AA	SS
40	LM	RR	AA	CC
41	LL	RR	GG	CS
42	LM	QR	GG	SS
43	LL	QR	GG	CS

Polimorfismos 192QR (QQ: homozigoto selvagem; QR: heterozigoto; RR: homozigoto mutado) e 55LM (LL: homozigoto selvagem; LM: heterozigoto; MM: homozigoto mutado) no gene da *PON1*. Polimorfismos 148AG (AA: homozigoto selvagem; AG: heterozigoto; GG: homozigoto mutado) e 311SC (SS: homozigoto selvagem; SC: heterozigoto; CC: homozigoto mutado) no gene da *PON2*.

Anexo 3. Genotipagem dos polimorfismos 45486AC, 10340GT, 2115AT e 55146 CT, no gene da *PON3*, nos portadores de anemia falciforme (n=43).

Amostras	PON3- 45486 (A/C)	PON3- 10340 (G/T)	PON3-2115 (A/T)	PON3- 55146 (C/T)
01	CC	TT	TT	CC
02	CC	TT	TT	CC
03	CC	GT	TT	CC
04	CC	TT	TT	CC
05	CC	TT	TT	CC
06	CC	TT	TT	CC
07	CC	TT	TT	CC
08	CC	TT	TT	CC
09	CC	GT	TT	CC
10	CC	TT	TT	CT
11	CC	TT	TT	CC
12	CC	GT	TT	CC
13	CC	TT	TT	CC
14	CC	TT	TT	CC
15	CC	GT	TT	CC
16	CC	TT	AT	CC
17	AC	TT	TT	CC
18	CC	TT	TT	CC
19	CC	TT	TT	CC
20	CC	GT	TT	CC
21	CC	TT	TT	CC
22	AC	GT	TT	CC

Amostras	PON3- 45486 (A/C)	PON3- 10340 (G/T)	PON3-2115 (A/T)	PON3- 55146 (C/T)
23	CC	GT	TT	CC
24	CC	TT	TT	CC
25	CC	TT	TT	CC
26	CC	GT	TT	CC
27	CC	GT	TT	CC
28	CC	TT	TT	CT
29	CC	TT	TT	CC
30	CC	TT	AT	CC
31	CC	GT	TT	CC
32	CC	TT	TT	CC
33	CC	GT	TT	CC
34	CC	TT	TT	CC
35	CC	TT	TT	CC
36	CC	TT	TT	CC
37	CC	GG	TT	CC
38	CC	GT	TT	CC
39	CC	GT	TT	CC
40	CC	TT	TT	CC
41	CC	TT	AT	CC
42	CC	TT	TT	CC
43	CC	GT	TT	CC

Polimorfismos 45486AC (AA: homozigoto selvagem; AC: heterozigoto; CC: homozigoto mutado), 10340GT (GG: homozigoto selvagem; GT: heterozigoto; TT: homozigoto mutado), 2115AT (AA: homozigoto selvagem; AT: heterozigoto; TT: homozigoto mutado) e 55146 CT (CC: homozigoto selvagem; CT: heterozigoto; TT: homozigoto mutado) no gene da *PON3*.

Anexo 4. Genotipagem dos polimorfismos 192QR e 55LM, no gene da PON1 e 148AG e 311SC, no gene da PON2, dos indivíduos saudáveis (n=43)

Amostras	PON1-55 (L/M)	PON1-192 (Q/R)	PON2-148 (A/G)	PON-311 (S/C)
Doa 01	LM	QQ	AA	CC
Doa 02	LM	QQ	AA	SS
Doa 03	LL	QR	AA	SS
Doa 04	MM	QQ	AA	SS
Doa 05	MM	RR	AA	SS
Doa 06	LL	RR	AA	SS
Doa 07	LL	QQ	GG	SS
Doa 08	LL	QQ	AA	SC
Doa 09	LL	QQ	AA	SC
Doa 10	LL	QQ	AA	SC
Doa 11	MM	QQ	AG	SC
Doa 12	LL	QQ	GG	SS
Doa 13	LM	QQ	AA	CC
Doa 14	LL	QQ	AA	CC
Doa 15	LL	QQ	AA	SC
Doa 16	LM	QQ	AG	SS
Doa 17	LL	QR	AG	SS
Doa 18	LM	QR	AG	SS
Doa 19	LL	QQ	AA	SS
Doa 20	LM	QR	AA	SS
Doa 21	LM	QQ	AA	SC
Doa 22	LL	QR	AA	SS
Doa 23	LL	RR	AA	SC
Doa 24	LL	QR	AA	CC
Doa 25	LM	QQ	AA	SS
Doa 26	LL	RR	AA	SC
Doa 27	MM	QQ	AA	SS
Doa 28	MM	QQ	AG	SC
Doa 29	LM	QQ	AA	SS
Doa 30	LM	RQ	AA	SC
Doa 31	MM	QQ	AA	SC
Doa 32	MM	QQ	AG	SC
Doa 33	LL	RR	AG	SS
Doa 34	LM	QQ	AG	SS
Doa 35	LL	RR	AA	SS
Doa 36	LL	QR	AA	SS
Doa 37	LL	RQ	AG	CC

Amostras	PON1-55 (L/M)	PON1-192 (Q/R)	PON2-148 (A/G)	PON-311 (S/C)
Doa 38	MM	QQ	AA	SS
Doa 39	LM	QR	AA	SS
Doa 40	LL	QR	AA	CC
Doa 41	LM	QQ	AG	CC
Doa 42	LM	QR	AG	CC
Doa 43	LM	QR	AA	SS

Polimorfismos 192QR (QQ: homozigoto selvagem; QR: heterozigoto; RR: homozigoto mutado) e 55LM (LL: homozigoto selvagem; LM: heterozigoto; MM: homozigoto mutado) no gene da *PON1*. Polimorfismos 148AG (AA: homozigoto selvagem; AG: heterozigoto; GG: homozigoto mutado) e 311SC (SS: homozigoto selvagem; SC: heterozigoto; CC: homozigoto mutado) no gene da *PON2*.

Anexo 5. Genotipagem dos polimorfismos 45486AC, 10340GT, 2115AT e 55146 CT, no gene da *PON3*, dos indivíduos saudáveis (n=43).

Amostras	PON3- 45486 (A/C)	PON3- 10340 (G/T)	PON3-2115 (A/T)	PON3- 55146 (C/T)
Doa 01	CC	GT	TT	CC
Doa 02	AC	TT	TT	CT
Doa 03	CC	GT	TT	CC
Doa 04	CC	TT	TT	CC
Doa 05	CC	TT	TT	CC
Doa 06	CC	TT	TT	CC
Doa 07	CC	TT	TT	CC
Doa 08	CC	TT	TT	CC
Doa 09	CC	TT	TT	CC
Doa 10	CC	GT	TT	CC
Doa 11	CC	TT	TT	CC
Doa 12	CC	GG	TT	CC
Doa 13	CC	TT	AT	CT
Doa 14	CC	GT	TT	CC
Doa 15	CC	TT	AT	CC
Doa 16	AC	TT	TT	CT
Doa 17	CC	GT	TT	CC
Doa 18	CC	TT	AT	CC
Doa 19	CC	TT	TT	CC
Doa 20	CC	GT	TT	CC
Doa 21	CC	TT	TT	CC
Doa 22	CC	GT	TT	CC
Doa 23	CC	GT	TT	CC

Amostras	PON3- 45486 (A/C)	PON3- 10340 (G/T)	PON3-2115 (A/T)	PON3- 55146 (C/T)
Doa 24	CC	GT	TT	CC
Doa 25	CC	TT	TT	CC
Doa 26	CC	GT	TT	CC
Doa 27	CC	TT	AA	CC
Doa 28	CC	GT	TT	CC
Doa 29	AC	TT	TT	CC
Doa 30	CC	TT	TT	CC
Doa 31	CC	GT	TT	CC
Doa 32	CC	GT	TT	CC
Doa 33	CC	GT	TT	CT
Doa 34	CC	TT	TT	CC
Doa 35	CC	TT	AT	CC
Doa 36	AC	GT	TT	CC
Doa 37	CC	GG	TT	CC
Doa 38	CC	TT	TT	CC
Doa 39	CC	TT	TT	CC
Doa 40	CC	TT	TT	CT
Doa 41	CC	GT	TT	CC
Doa 42	CC	GT	TT	CC
Doa 43	CC	TT	TT	CC

Polimorfismos 45486AC (AA: homozigoto selvagem; AC: heterozigoto; CC: homozigoto mutado), 10340GT (GG: homozigoto selvagem; GT: heterozigoto; TT: homozigoto mutado), 2115AT (AA: homozigoto selvagem; AT: heterozigoto; TT: homozigoto mutado) e 55146 CT (CC: homozigoto selvagem; CT: heterozigoto; TT: homozigoto mutado) no gene da *PON3*.

Anexo 6. Tabela com médias, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo das variáveis estudadas, dos portadores de anemia falciforme (n = 43)

	n	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
Apolipoproteína A1 (mg/dL)	43	107,78	± 21,21	75,5	164,2
Apolipoproteína B (mg/dL)	43	65,13	± 20,3	33,8	107,9
Colesterol Total (mg/dL)	43	132,51	± 27,93	78	197
HDL (mg/dL)	43	36,16	± 11,38	14	66
LDL (mg/dL)	43	71,18	± 23,78	29	126
VLDL (mg/dL)	43	25,27	± 9,44	11	56
Triglicérides (mg/dL)	43	125,81	± 47,14	57	278
Hemoglobina (g/dL)	43	8,27	± 1,03	6,2	10,6
Hematócrito (%)	43	23,53	± 3,02	17,6	31,25
Leucócitos (mil/mm³)	43	10,79	± 3,45	6,33	21,4
Reticulócitos (%)	41	12,08	± 6,03	4,06	35,02
Capacidade Ligação do Ferro (µL/dL)	33	274,88	± 62,58	178	489
Ferritina (ng/mL)	33	568,36	± 917,94	56	4872
Ferro (µL/dL)	34	120,76	± 49,54	41	244
Saturação Transferrina (%)	33	45,11	± 18,32	11,09	97,99
Transferrina (mg/dL)	29	231,17	± 42,97	150	335
Desidrogena láctica (U/L)	41	1162	± 426,78	589	2326
Bilirrubina Total (mg/dL)	43	4,23	± 2,58	1,13	13,8
Bilirrubina Indireta (mg/dL)	43	2,98	± 1,68	0,66	7,92
Bilirrubina Direta (mg/dL)	43	1,24	± 1,63	0,3	9,67

	N	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
Fibrinogênio (mg/dL)	43	350,72	± 108,92	178	712
Proteína C Reativa (mg/L)	43	107,78	± 21,21	0,8	59,4
Atividade Paraoxonase (U/mL)	43	80,3	± 45,8	12	184
Atividade Arilesterase (U/mL)	43	69,9	± 20,3	24,5	122
Anticorpo Anti LDL oxidada (U/mL)	43	2,84	± 1,52	0,91	10,33

Anexo 7. Tabela com médias, desvio padrão, valor mínimo e valor máximo das variáveis estudadas, dos indivíduos saudáveis (n = 43)

	n	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
Apolipoproteína A1 (mg/dL)	43	162,27	±26,6	113,3	225,7
Apolipoproteína B (mg/dL)	43	89,03	±22,32	53,8	161,5
Colesterol Total (mg/dL)	43	181,44	±35,99	104	277
HDL (mg/dL)	43	50,65	±13,17	27	82
LDL (mg/dL)	43	104,93	±32,23	44	208
VLDL (mg/dL)	42	25,4	±10,06	11	56
Triglicérides (mg/dL)	43	129,07	±65,04	56	373
Proteína C Reativa (mg/L)	43	2,69	±3,32	0,2	14,7
Atividade Paraoxonase (U/mL)	43	100,1	± 55,2	24	232
Atividade Arilesterase (U/mL)	43	89,7	± 27,3	1	161
Anticorpo Anti LDL oxidada (U/mL)	42	1,74	±0,74	0,61	4,5

Anexo 8. Tabela com resultados dos exames referentes ao perfil lipídico, hematológico e de ferro dos pacientes com anemia falciforme (n=43).

	Perfil Lipídico							Perfil Hematológico				Perfil de Ferro				
	Apo A1	Apo B	CT	HDL	LDL	VLDL	TG	Hb	Ht	Leuc	Retic	Capac Lig Fe	Ferritina	Fe	Sat Trans	Transf
1	110,1	67,5	155	39	99	17	85	9,7	28,2	6,69	11,9	283	247	108	38,16	ND*
2	75,5	81,1	123	14	67	42	212	8	23,9	21,4	27,49	489	2783	189	41,26	240
3	145,3	101	197	47	113	37	186	8,6	25,2	8,5	12,62	283	770	116	40,99	250
4	108,7	55,2	120	37	64	19	93	6,2	17,6	10,79	14,85	ND*	ND*	192	ND*	190
5	124	95,2	171	37	111	23	114	10,6	31,25	7,92	8,92	253	199	140	55,32	235
6	100,3	58,7	111	23	62	26	132	8,1	24	7,07	ND*	233	272	72	30,9	200
7	100,9	93,6	159	28	90	41	205	8,2	23,05	8,19	7,07	262	56	94	35,88	ND*
8	89,4	60	110	26	63	21	107	7,4	22,35	18,18	21,79	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
9	161	33,8	113	62	31	20	98	7,1	20,48	7,98	16,35	394	733	217	57,92	235
10	115,6	45,3	116	48	54	14	69	8,2	23,35	7,8	6,12	220	249	96	43,64	ND*
11	87,1	44,7	98	24	49	25	126	8,3	25,42	14,91	35,02	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
12	82	58,7	122	29	72	21	103	8	22,25	9,93	10,21	282	110	75	26,6	280
13	101,8	41,9	107	31	48	28	140	8,5	23,8	11,79	17,75	270	344	126	46,67	230
14	120,7	64,6	128	37	73	18	90	7,6	21,3	10,39	ND*	276	163	96	34,78	250
15	102,6	78,1	178	46	119	13	64	6,4	20,33	12,95	9,03	373	135	41	11,09	335
16	90,4	52,7	112	35	63	14	71	8,1	23,7	8,72	12,16	190	716	113	59,49	175
17	97,8	66,7	128	29	74	25	124	7,4	20,55	9,1	10,7	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
18	109,2	50,8	130	39	67	24	121	8,2	22,95	7,51	11,33	259	167	183	69,59	215
19	164,2	51,9	145	66	68	11	57	10	28,82	8,56	5,19	326	444	103	48,16	ND*
20	104,5	61,3	116	28	59	29	143	6,7	19,07	9,24	22,74	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
21	136,9	64,5	137	50	65	22	108	8,3	23,05	13,95	9,25	208	799	93	44,71	190
22	119,4	73,1	143	33	75	35	176	8,5	26,14	10,07	13,69	249	4872	244	97,99	210
23	106,9	72,7	136	35	75	26	130	8,3	22,05	15,63	14,17	319	109	129	40,44	290
24	77,2	36,3	78	26	40	12	61	8,6	23,8	15,13	9,62	337	97	84	21,96	300
25	78,4	44,6	88	26	48	14	68	9,7	26,9	7,9	7,72	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
26	150,1	56,3	166	66	78	22	111	7,5	22,61	12,85	8,18	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
27	97,3	78,6	136	28	77	31	153	8,2	22,3	9,83	8,07	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
28	100,9	54	134	47	61	26	131	7,8	21,2	13,1	15,03	256	631	222	86,63	216
29	102,6	107,9	182	38	126	18	88	9,6	27,8	10,73	9,8	232	355	111	47,84	200
30	112,8	72,6	137	36	69	32	159	7,3	20,55	8,61	13,69	275	245	142	51,82	243
31	139,5	45,1	125	58	54	13	67	9,7	26,4	6,33	5,57	224	249	131	58,49	195
32	125,3	104,5	160	30	93	37	184	8,9	25,28	11,44	11,83	289	187	136	47,06	260
33	102,5	72,6	125	36	66	23	113	7,8	20,75	10,17	10,37	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*
34	119,8	107,3	177	38	107	32	158	8,9	24,78	12,83	6,68	285	1075	69	24,21	230
35	93	42,4	92	27	29	36	180	7,4	20,51	18,71	12,72	178	228	67	37,64	150
36	91,8	43,5	101	32	47	22	122	6,9	19,13	9,57	13,27	ND*	ND*	ND*	41,32	210
37	107,8	66,7	132	28	48	56	278	7,3	19,63	11,2	14,88	242	617	100	ND*	ND*

Perfil Lipídico								Perfil Hematológico				Perfil de Ferro				
	Apo A1	Apo B	CT	HDL	LDL	VLDL	TG	Hb	Ht	Leuc	Retic	Capac Lig Fe	Ferritina	Fe	Sat Trans	Transf
38	96,3	95	180	37	120	23	114	9,9	27,02	7,37	10,66	272	131	159	60,29	240
39	93	46,5	99	27	53	19	93	8,7	24,55	12,05	8,41	200	709	86	43,49	175
40	114,6	91,4	166	37	99	30	149	9,9	27,4	14,3	7,94	261	454	77	29,5	ND*
41	94,7	47,3	114	34	56	24	122	9,2	27,13	8,15	4,06	340	59	56	16,47	310
42	85,1	55,5	123	32	69	27	110	8,8	24,9	9,89	7,3	292	119	96	32,88	250
43	97,7	59,5	128	29	60	39	195	7,3	20,13	6,59	11,32	219	432	143	65,3	200

Apoa A1: Apolipoproteína A1; Apo B: Apolipoproteína B; CT: Colesterol Total; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; VLDL: Lipoproteína de Muita Baixa Densidade; TG: Triglicérides; Hb: Hemoglobina; Ht: Hematócrito; Leuc: Leucócitos; Retic: Reticulócitos; Capac Lig Fe: Capacidade total de ligação do ferro; Fe: Ferro; Sat Trans: Saturação da transferrina; Trans: Transferrina; ND*: Não Definido.

Anexo 9. Tabela com resultados referentes a marcadores hemolíticos, marcadores inflamatórios, atividade enzimática e marcador de estresse oxidativo dos pacientes com anemia falciforme (n=43).

Marcadores Hemolíticos					Marcadores Inflamatórios		Atividade PON1		Marcador de Estresse Oxidativo
DHL	BT	BI	BD		Fib	PCR	Ativ Aril	Ativ Pon	Anticorpo Anti LDL oxidada
1	626	2,81	2,1	0,69	229	3,02	77	31	1,66
2	1131	12,98	3,3	9,67	571	59,4	48	14	4,19
3	589	1,94	1,3	0,67	456	4,53	113,5	122	1,57
4	1132	3,65	2,9	0,78	455	5,8	76,5	114	2,51
5	982	1,72	1,1	0,59	454	7,9	79	116	2,42
6	1588	2,31	1,6	0,67	229	0,8	64	49	1,98
7	1045	3,24	2,6	0,61	327	0,8	122	180	2,12
8	2097	5,61	3,7	1,49	240	15,3	38,5	15	2,29
9	1202	4,85	3,3	1,59	238	1,3	79,5	82	4,12
10	729	4,24	1,9	2,3	300	6,2	42,5	52	4,2
11	1179	3,54	3,2	0,3	302	11,7	59	60	2,55
12	1824	4,32	3,3	1,06	364	6	65	109	4,17
13	1273	5,84	5,2	0,69	428	9,3	89	138	2,94
14	1148	5,48	4,3	1,19	409	10,4	87	152	4,84
15	812	4,63	1,4	3,2	374	20,1	97	184	2,99
16	890	2,27	1,6	0,72	257	3,8	59,5	23	4,46
17	1632	7,96	7,2	0,75	437	2,1	85	104	0,91
18	767	1,88	1,1	0,8	324	1,1	85,5	114	3,28
19	731	3,91	3	0,88	264	0,9	87,5	180	2,99
20	1162	3,47	2,7	0,76	265	8,6	80	96	1,23

Marcadores Hemolíticos					Marcadores Inflamatórios		Atividade PON1		Marcador de Estresse Oxidativo
DHL	BT	BI	BD		Fib	PCR	Ativ Aril	Ativ Pon	Anticorpo Anti LDL oxidada
21	718	3,27	2,5	0,77	194	5,3	82	98	2,29
22	978	4,9	2,1	2,85	178	3	75	82	2,27
23	1084	4,75	3,6	1,18	393	2,4	60	71	2,14
24	1550	2,74	2,3	0,42	213	1,5	60,5	107	2,35
25	ND*	3,39	2,9	0,53	300	3,5	24,5	110	1,99
26	1268	3,07	2,3	0,77	307	2,6	88,5	81	1,19
27	ND*	4,96	3,9	1,06	314	8,9	71	12	4,08
28	1108	13,8	7,9	5,88	446	13,5	68	75	2,9
29	949	3,78	2,8	0,96	417	5,6	45	21	3,01
30	1673	5,78	5,1	0,67	210	10,6	64	95	2,61
31	678	2,13	1,4	0,7	413	6,4	80,5	71	3,97
32	864	2,05	1,3	0,75	428	9,3	68	23	1,81
33	2326	5,38	4,8	0,57	298	0,8	67	87	1,63
34	719	1,13	0,7	0,47	500	15,5	62,5	66	2,3
35	2274	4,86	3,7	1,14	364	7,8	57,5	24	3,08
36	1302	4,09	2,8	1,32	276	5,2	26,5	35	3,09
37	1416	5,1	4,4	0,73	510	10,1	66,5	60	10,33
38	945	7,59	7	0,59	351	5,5	81	47	2,52
39	1108	4,56	4	0,52	379	10,7	72	92	1,75
40	743	1,9	1,4	0,51	712	4,4	30	23	2,03
41	1016	1,81	1,2	0,57	333	3,7	59	92	2,63
42	1097	1,99	1,4	0,6	306	2,6	84,5	96	3,34
43	1275	2,11	1,7	0,42	316	13,5	76	50	1,2

DHL: Desidrogenase Láctica; BT: Bilirrubina Total; BI: Bilirrubina Indireta; BD: Bilirrubina Direta; Fib: Fibrinogênio; PCR: Proteína C Reativa; Ativ Aril: Atividade Arilesterase; Ativ Pon: Atividade Paraoxoanase; ND*: Não Disponível

Anexo 10. Tabela com resultados dos exames referentes ao perfil lipídico, ao marcador inflamatório, atividade enzimática e marcador de estresse oxidativo dos indivíduos saudáveis (n=43).

	Perfil Lipídico							Marcador Inflamatório	Atividade PON1		Marcador de Estresse Oxidativo
	Apo A1	Apo B	CT	HDL	LDL	VLDL	TG	PCR	Ativ Aril	Ativ Pon	Anticorpo Anti LDL oxidada
Doa 1	177,3	134,9	258	55	156	47	234	2,3	69	88	1,92
Doa 2	206,3	117,6	229	65	149	15	75	0,6	69	42	2,1
Doa 3	159,8	57,7	142	55	70	17	85	0,6	137	111	1,76
Doa 4	141,9	90,4	161	38	103	20	102	0,2	66	29	1,55
Doa 5	141,9	113,4	199	36	128	35	176	3,3	78	128	1,63
Doa 6	142,2	76	153	42	94	17	85	0,4	62	184	2,31
Doa 7	122,4	56,7	104	30	55	19	93	4,8	76	113	2,9
Doa 8	224,7	88,9	206	82	110	14	69	0,9	66	96	1,37
Doa 9	146,9	60,9	124	40	67	17	83	1,7	105	42	3,01
Doa 10	135,9	84,1	162	37	93	32	158	0,4	120	53	1,61
Doa 11	141,3	105,6	198	42	131	25	124	0,6	67	32	1,58
Doa 12	202,2	96,1	202	69	119	14	71	0,3	123	56	1,14
Doa 13	143,8	68,2	137	46	74	17	84	5,8	85	91	4,5
Doa 14	193,2	87,4	193	69	101	23	117	5	97	40	1,09
Doa 15	144,9	80,4	156	42	95	19	93	2,8	78	102	0,61
Doa 16	166,7	103,6	226	51	135	40	198	1,5	107	169	2,03
Doa 17	159,4	83,8	158	48	94	16	78	14,2	129	118	ND*
Doa 18	156,2	122,7	218	44	150	24	122	0,4	105	104	1,75
Doa 19	162,7	75	152	40	85	27	137	0,4	85	69	0,95
Doa 20	147,6	57,6	125	43	54	28	139	2,2	78	129	1,41
Doa 21	154,9	91,1	186	53	121	12	59	3,1	104	124	2,91
Doa 22	186,3	98,4	197	56	118	23	117	8,1	127	184	2,99
Doa 23	142,2	161,5	277	44	208	25	124	2,3	62	26	1,26
Doa 24	168,7	63,3	161	47	75	39	195	2,7	161	76	1,42
Doa 25	114,7	112,7	183	27	115	41	206	2,6	76	175	1,93
Doa 26	155,5	74,8	160	60	86	14	71	0,5	70	116	1,62
Doa 27	167,1	88,4	172	57	95	20	99	0,3	1	48	0,97
Doa 28	113,3	61,6	111	40	60	11	56	0,5	91	85	1,79
Doa 29	141,8	106,2	203	48	134	21	103	4,3	77	31	1,33
Doa 30	176,7	112,6	197	45	96	56	278	1,6	84	103	1,29
Doa 31	184,5	84,9	181	50	94	37	187	14,7	51	33	1,72
Doa 32	185	85,3	190	70	102	18	91	5,8	101	151	2,12
Doa 33	151,7	53,8	155	36	44	ND*	373	0,8	105	201	2,21
Doa 34	196,6	103	232	58	145	29	145	1,3	78	48	1,47

Perfil Lipídico								Marcador Inflamatório	Atividade PON1		Marcador de Estresse Oxidativo
	Apo A1	Apo B	CT	HDL	LDL	VLDL	TG	PCR	Ativ Aril	Ativ Pon	Anticorpo Anti LDL oxidada
Doa 35	184,7	90,8	209	72	124	13	65	0,9	112	232	0,69
Doa 36	201,8	74,3	181	70	88	23	113	2,9	99	185	0,77
Doa 37	144,9	74,2	168	46	81	41	204	0,3	126	159	2,11
Doa 38	150,1	99	199	41	123	35	174	4,1	75	24	2,03
Doa 39	140,6	87,6	175	34	104	37	184	1,1	93	95	1,25
Doa 40	165,6	103,2	208	56	135	17	87	0,4	87	118	0,91
Doa 41	161,1	85,7	190	57	114	19	95	1	112	37	1,37
Doa 42	225,7	68,9	175	81	67	27	137	7,5	84	156	1,62
Doa 43	146,9	86,3	189	56	120	13	64	0,4	80	103	2,25

Apoa A1: Apolipoproteína A1; Apo B: Apolipoproteína B; CT: Colesterol Total; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; VLDL: Lipoproteína de Muita Baixa Densidade; TG: Triglicérides; PCR: Proteína C Reativa; Ativ Aril: Atividade Arilesterase; Ativ Pon: Atividade Paraoxoanase; ND*: Não Disponível

8. Referências

Acuña M, Eaton L, Cifuentes L. Genetics variants of paraoxonases (PON1 and PON2) in the Chilean population. *Hum Biol.* 2004; 76 (2): 299-305.

Agachan B, Yilmaz H, Karaali Z, Isbir T. Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct.* 2004;22(3):163-8.

Akohoue SA, Shankar S, Milne GL, Morrow J, Chen KY, Ajayi WU, Buchowski MS. Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. *Pediatr Res.* 2007;61(2):233-8.

Aldridge WN. Serum esterases 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J.* 1953; 53:110-7.

Aliyu ZY, Kato GT, Taylor IV J, Babadoko A, Mamman AI, Gordeuk VR, Gladwin MT. Sickle cell disease and pulmonary hypertension in África: a global perspective and review of epidemiology, pathophysiology, and management. *Am J Hematol.* 2008; 83: 63-70.

Allebrandt KV, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia, EA. Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro and Afro-brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 180:151-6.

Aslan M, Freeman BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med.* 2007; 1;43(11):1469-83.

Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of High-Density Lipoproteins. *Annu Rev Med.* 2003; 54:321-4.

Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahamood S, Milo S, Hoffman A, Billicke, S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonase (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation.* 2000; 30;101(21):2510-7.

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest*. 1998 Apr 15;101(8):1581-90.

Aviram M, Kaplan M, Rosenblat M, Fuhrman, B. Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development. *Handb Exp Pharmacol*. 2005; 170: 263-300.

Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37:1304–16.

Ballas SK. Iron overload is a determinant of morbidity and mortality in adult patients with sickle cell disease. *Semin Hematol*. 2001 Jan;38:30-6.

Bassam BJ, Caetano-Annoles G, Gresshof PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1991; 196:80-3.

Beer S, Moren X, Ruiz J, James RW. Postprandial modulation of serum paraoxonase activity and concentration in diabetic and non-diabetic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc*. 2006; 16:457-65.

Belcher JD, Marker PH, Geiger P, Girotti AW, Steinberg MH, Hebbel RP, Vercellotti GM. Low-density lipoprotein susceptibility to oxidation and cytotoxicity to endothelium in sickle cell anemia. *J Lab Clin Med*. 1999 Jun;133(6):605-12.

Benditt EP, Eriksen N. Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(9):4025-8.

Bhattacharyya T, Nicholls SJ, Topol EJ, Zhang R, Yang X, Schmitt D, Fu X, Shao M, Brennan DM, Ellis SG, Brennan ML, ALLAYEE H, Lusis AJ, Hazen SL. Relationship of Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polymorphisms and Functional Activity With Systemic Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *JAMA*. 2008; 299(11):1265-1276.

Boehm D, Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Matusiewicz M, Berdowska I, Zielinski B, Paradowski L, Gamian A. Paraoxonase-1 status in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Jan;15(1):93-9.

Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis*. 1998; 139: 131–6.

Brandão SA, Izar MC, Fischer SM, Santos AO, Monteiro CM, Póvoa RM, Helfenstein T, Carvalho AC, Monteiro AM, Ramos E, Gidlund M, Figueiredo Neto AM, Fonseca FA. Early increase in autoantibodies against human oxidized low-density lipoprotein in hypertensive patients after blood pressure control. *Am J Hypertens*. 2010; 23(2): 208-14.

Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*. 2001; 68: 1428-36.

Buchanan GR, Debaun MR, Quinn CT, Steinberg MH. Sickle Cell Disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004; 35-47.

Bunn HF. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *N Engl J Med*. 1997;337(11):762-9.

Bursaux E, Poyart C. Structural and functional alterations of the erythrocyte membrane in sickle cell anemia. *Bull Eur Physiopathol Respir*. 1983; 19(4):345-50.

Cakmak A, Soker M, Koc A, Erel O. Paraoxonase and arylesterase activity with oxidative status in children with thalassemia major. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009;31:583–587.

Calle R, McCarthy MI, Banerjee P, Zeggini E, Cull CA, Thorne KI, Wiltshire S, Terra S, Meyer D, Richmond J, Mancuso J, Milos P, Fryburg D, Holman RR. Paraoxonase 2 (PON2) polymorphisms and development of renal dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2006; 49: 2892-99.

Campo S, Sardo AM, Campo GM, Avenoso A, Castaldo M, D'Ascola A, Giunta E, Calatroni A, Saitta A. Identification of paraoxonase 3 (PON3) missense mutations in a population of southern Italy. *Mutat Res*. 2004; 26; 546 (1-2): 75-80.

Camuzcuoglu H, Arioz DT, Toy H, Kurt S, Celik H, Erel O. Serum paraoxonase and arylesterase activities with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009; 112: 481-5.

Cançado RD, Jesus JA. Sickle cell disease in Brazil. *Rev bras hematol hemoter*. 2007;29(3):203-6.

Castro O, Branbilla DJ, Thorington B, Reindof CA, Scott RB, Gilette P et al. The acute syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The cooperative study of sickle cell disease. *Blood*. 1994; 643-9.

Cataño HC, Cueva JL, Cardenas AM, Izaguirre V, Zavaleta AI, Carranza E, Hernández AF. Distribution of Paraoxonase-1 gene polymorphisms and Enzyme activity in a peruvian population. *Environ Mol Mutagen*. 2006; 47: 699-706.

Cerqueira BAV, Boas WV, Zanette AAD, Reis MG, Gonçalves MS. Associação de marcadores laboratoriais ao perfil clínico em pacientes com anemia falciforme de Salvador – Bahia. *Gazeta Médica da Bahia*. 2010; 80:3: 24-28.

Cesquini M, Torsoni MA, Stoppa GR, Ogo SH. Ok t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed Pharmacother*. 2003; 57(3-4):124-9.

Charache S, Dover GJ, Moyer MA, Moore JW. Hidroxyurea-induced augmentation of fetal hemoglobin production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1987:109-16.

Charache S, Terrin ML, Moore MD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR. Effects of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1995;332:1317-22.

Chiang, E.Y.; Frenette, P.S. Sickle cell vaso-occlusion. *Hematology/Oncology Clinics*. 2005; 19: 771-784.

Correia JD e Perry IDS. Modulação dietética da atividade da paraoxonase: revisão de estudos em humanos. *Rev HCPA*. 2010; 30(3):271-278.

Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomics of the paraoxonase (PON 1) polymorphisms: Effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease and drug metabolism. *Annu Rev Med*. 2003; 54: 371-92.

Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochem Pharmacol*. 2011; 81(3): 337-44.

Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol*. 2005; 69:541-50.

Creary M, Williamson D, Kulkarni R. Sickle cell disease: current activities, public health implications, and future directions. *J Womens Health (Larchmt)*. 2007;16:575-82.

Dailly E, Urien S, Barré J, Reinert P, Tillement JP. Role of bilirubin in the regulation of the total peroxyl radical trapping antioxidant activity of plasma in sickle cell disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 20;248(2):303-6.

Dasgupta S, Demirci FY, Dressen AS, Kao AH, Rhew EY, Ramsey-Goldman R, Manzi S, Kammerer CM, Kamboh MI. Association analysis of PON2 genetic variants with serum paraoxonase activity and systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet.* 2011; 12:7.

Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet M, James RW. Paraoxonase 1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: A predominant role of polymorphic position-107, implicating the sp1 transcription factor. *Biochem J.* 2003; 372: 643-9.

Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond).* 2004 Nov;107(5):435-47.

Denardi CAS, Filho AC, Chagas ACP. C-Reactive Protein: an update. *Rev SOCERJ.* 2008;21(5):329-334.

Derebail VK, Nachman PH, Key NS, et al. High prevalence of sickle cell trait in african americans with ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21(3):413– 417.

Di Nuzzo DV, Fonseca SF. Sickle cell disease and infection. *J Pediatr.* 2004; 80:347-54.

Dias-Da-Motta P, Arruda VR, Muscará MN, Saad ST, De Nucci G, Costa FF, Condino-Neto A. The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 1996 May;93(2):333-40.

Djoumessi S. Serum lipids and lipoproteins during malaria infection. *Pathol Biol (Paris).* 1989; 37(8):909-11.

Djoumessi S, Zekeng L, Lando G, Zeukeng D. Serum lipids and atherogenic risk in sickle-cell trait carriers. *Ann Biol Clin (Paris).* 1994; 52(9):663-5.

Dover GJ, Humphries RK, Moore JG, et al. Hidroxyurea induction of hemoglobin F production in sickle cell disease: relationship between cytotoxicity and F cell production. *Blood.* 1986; v.67, 735-38,.

Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem.* 2000; 275 (43): 33435-42.

Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2004; 369: (1)78-88.

Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, et al. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res.* 2005; 46:1239–47.

Duarte M, Moresco RN, de Bem AF. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. *RBAC.* 2008; 40(2):101-6.

Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:473-80.

Eaton WA, Hofrichter J. Sick cell hemoglobin polymerization. *Adv Protein Chem.* 1990;40:263-9.

Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN. The Human Serum Paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Human Genet.* 1983; 35:1126-38.

El-Hazmi MA, Jabbar FA, Warsy AS. Cholesterol and triglyceride level in patients with sickle cell anaemia. *Scand J Clin Lab Invest.* 1987 ; 47(4):351-4.

Elkiran ET, Mar N, Aygen B, Gursu F, Karaoglu A, Koca S. Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population. *BMC Cancer.* 2007; 7:48.

Eng CS, Mohamed Ali S, Eric YPH, Gan L, Bing OY, Seng CK. Distribution of polymorphisms-PON1Q192R and PON1L55M among Chinese, Malay and Indian males in Singapore and possible susceptibility to organophosphate exposure. *Neurotoxicol.* 2009; 30: 214-9.

Eom SY, Kim YS, Lee CJ, Lee CH, Kim YD, Kim H. Effects of intronic and exonic polymorphisms of paraoxonase 1 (PON1) gene on serum PON1 activity in a Korean population. *J Korean Med Sci.* 2011; 26(6): 720-5.

Erasmus RT, Olukoga AO, Ojuawo O. Plasma lipids and lipoproteins in Nigerian children with sickle cell anemia. *Ann Trop Paediatr.* 1990; 10(4):421-3.

Eridani S, Mosca A. HbF induction and genetic engineering in sickle cell disease. *Journal of Blood Medicine.* 2011;2 23–30

Faggioni T. O efeito do hábito de fumar sobre a atividade da enzima paraoxonase em uma população humana [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, 2003.

Ferreira PRS. Frequência das mutações Gln192Arg e Leu55Met no gene da paraoxonase 1 e das mutações Ser311Cis e A148G no gene da paraoxonase 2 em brasileiros de diferentes origens étnicas [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

Ferster A, Tahriri P, Vermeylen C, Sturbois G, Corazza F, Fondu P, Devalck C, Dresse MF, Feremans W, Hunninck K, Toppet M, Philippet P, Van Geet C, Sariban E. Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. *Blood*. 2001;97(11):3628-32.

Fernvik EC, Ketelhut DF, Russo M, Gidlund M. The autoantibodies repertoire against copper or macrophage modified LDL differ in normolipidemic and hypercholesterolemic patient. *J Clin Immunol*. 2004; 24(2):170-6.

Flekac M, Skrha J, Zídková K, Lacinová Z, Hilgertová J. Paraoxonase 1 gene polymorphisms and enzyme activities in diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2008; 57: 717-26.

Fulbert JC, Cals MJ. Free radicals in clinical biology. Origin, pathogenic effect and defense mechanisms. *Pathol Biol*. 1992; 40(1):66-77.

Gaidukov L, Rosenblat M, Aviram M, Tawfik DS. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2006; 47(11): 2492-502.9-56.

Gaidukov L., Tawfik DS. High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with apoA-I. *Biochemistry*. 2005; 44: 11843-54.

Gamboa R, Zamora J, Rodríguez-Pérez JM, Posadas-Romero C, Vargas-Alárcon G. Distribution of paraoxonase PON1 gene polymorphisms in Mexican Populations. Its role in the lipid profile. *Exp Mol Pathol*. 2006; 80: 85-90.

Giardina PJ, Grady RW. Chelation therapy in beta-thalassemia: the benefits and limitations of desferrioxamine. *Semin Hematol*. 1995;32(4):304-12.

Gladwin MT, Crawford JH, Patel. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:707-17.

Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Catelli WP, Knoke JD, Jacobs DR Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA. High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation*. 1989; 79(1), p. 8-15.

Goswami B, Tayal D, Gupta N, Mallika V. Paraoxonase: A multifaceted biomolecule. *Clin Chim Act*. 2009; 410:1-12.

Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary disease. *Indian J Med Res*. 2009; 130: 361-8.

Gupta N, Singh S, Maturu VN, Sharma YP, Gill KD. Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms, haplotypes and activity in predicting cad risk in North-West Indian Punjabis. *PLoS One*. 2011; 6(5): e17805.

Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, Mccarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; 11(5):412-9.

Hebbel RP. Beyond hemoglobin polimerization the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. *Blood*. 1991;77: 214-37.

Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, Hanley AJ, Harris SB, Tsui LC, Zinman B. Paraoxonase-2 gene (PON2) G148 variant associated with elevated fasting plasma glucose in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(10):3373-7.

Hegele RA. Paraoxonase genes and disease. *Ann Med*. 1999; 31: 217– 224.

Hernandez AF, Mackness B, Rodrigo L, López O, Pla A, Gil F, Durrington PN, Pena G, Parron T, Serrano JL, Mackness MI. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum Exp Toxicol*. 2003; 22: 565-74.

Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, et al. Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications*. 2006; 20:322–8.

Holland N, Furlong C, Bastaki M, Ritcher R, Bradman A, Huen K, Beckman K, Eskenazi B. Paraoxonase polymorphisms, haplotypes , and enzyme activity in Latino mothers and newborns. *Environ Health Perspect*. 2006; 114: 985-91.

Horiuchi K, Ballas SK, Asakura T. The effect of deoxygenation rate on the formation of irreversibly sickled cells. *Blood*. 1988;71:46-51.

Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Altenhofer S, Kruger M, Li H, Förstermann U. Protective effect of paraoxonase-2 against endoplasmatic reticulum stress-induced apoptosis is lost upon disturbance of calcium homoeostasis. *Biochem J*. 2008; 416: 395-405.

Humbert R, Adler DA, Disteché CM, et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet.* 1993;3:73–6.

Hussein YM, Gharib AF, Etewa RL, Elsayy WH. Association of L55M and Q192R polymorphisms in paraoxonase 1 (PON1) gene with breast cancer risk and their clinical significance. *Mol Cell Biochem.* 2011; 351:117-23.

Iborra RT. Treinamento físico aeróbio aumenta a capacidade antioxidante das HDL e reduz o estresse oxidativo plasmático no diabetes melito tipo 2. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

Ito T, Yasue H, Yoshimura M, et al. Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm. *Hum Genet.* 2002; 110:89–94.

Janka, Z.; Juhasz, A.; Rimanoczy, A. A.; Boda, K.; Marki-Zay, J.; Kalman, J. Codon 311 (Cys>Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol. Psychiatry* 2002; 7: 110– 112.

Jison ML, Munson PJ, Barb JJ, Suffredini AF, Talwar S, Logun C, Raghavachari N, Beigel JH, Shelhamer JH, Danner RL, Gladwin MT. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood.* 2004;104:270–280.

Johnson F, Look A, Gockerman J. et al. Bone marrow transplantation in a patient with sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 1984; 311, 780-783.

Kao Y, Donaghue KC, Chan A, Bennetts TH, Knight J, Silink M, Paraoxonase gene cluster is a genetic marker for early microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2002; 19(3): 212-5.

Kato GJ, Gladwin MT, Steinberg MH. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Rev.* 2007 Jan;21(1):37-47

Key NS, Derebail VK. Sickle-Cell Trait: Novel Clinical Significance Hematology *Am Soc Hematol Educ Program.* 2010:418-22.

Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry.* 2005; 44:6371–82.

Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem*. 2006; 281: 764.

Kordi-Tamandani DM, Hashemi M, Sharifi N, Kaykhaei MA, Torkamanzehi A. Association between paraoxonase-1 gene polymorphism and risk of metabolic syndrome. *Mol Biol Rep*. 2011; 38: 1-7.

Kreuels B, Kreuzberg C, Kobbe R, Ayim-Akonor M, Apiah-Thompson P, Thompson B, Ehmen C, Adjei S, Langefeld I, Adjei O, May J. Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. *Blood*. 2010;115:4551-8.

Krishnan S, Setty Y, Betal SG, Vijender V, Rao K, Dampier C, Stuart M. Increased levels of the inflammatory biomarker C-reactive protein at baseline are associated with childhood sickle cell vasocclusive crises. *Br J Haematol*. 2010 Mar;148(5):797-804.

Kucukali CI, Aydin M, Ozkok E, Orhan N, Cakir U, Kilic G, Ozbek Z, Ince N, Kara I. Paraoxonase-1 55/192 genotypes in schizophrenic patients and their relatives in Turkish population. *Psychiatr Genet*. 2008; 18(6):289–94

Kupesiz A, Celmeli G, Dogan S , Antmen B, Aslan M. The effect of hemolysis on plasma oxidation and nitration in patients with sickle cell disease. *Free Radical Research*. 2012; 46(7): 883–890.

La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physiological role (s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact*. 1999; 14: 119-20:379-88.

La Du BN. Future studies of low-activity PON1 phenotype subjects may reveal how PON1 protects against cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1317-8.

La Du BN. Structural and functional diversity of paraoxonases. *Nat Med*. 1996; 2:1186–7.

Labie D, Elion J. Molecular and cellular pathophysiology of sickle cell anemia. *Pathol Biol (Paris)*. 1999;47(1):7-12.

Lawlor DA, Day INM, Gaunt TR, Hinks LJ, Timpson N, Ebrahim S, Davey SG. The association of the paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism with depression in older women: findings from the British Women's Heart and Health Study. *J Epidemiol Community Health*. 2007; 61: 85–7

Lescai F, Marchegiani F, Franceschi C. PON1 is a longevity gene: results of a meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2009; 8(4): 277-84

Leus FR, Zwart M, Kastelein JJ, Voorbij HA. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis.* 2001; Feb 15;154(3):641-9.

Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:516–21.

Levy E, Trudel K, Bendayan M, Seidman E, Delvin E, Elchebly M, et al. Biological role, protein expression, subcellular localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293:G1252-61.

Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med.* 2003; 81(12):766-79.

Li WF, Costa LG, Richter RJ, Hagen T, Shin D, Tward A, Lusis AJ, Furlong CE. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics.* 2000; 10, 767-779.

Lima ES, Couto RD. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(3): 169-178.

Lobo C, Neves V, Regina M, Silva MG. Crises dolorosas na doença falciforme. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2007;29(3):247-258.

Lu H, Zhu J, Zang Y, Ze Y, Qin J. Cloning, purification, and refolding of human paraoxonase-3 expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *Prot Exper Purif.* 2006; 46: 92-9.

Mackness MI. A-esterases. Enzymes looking for a role? *Biochem. Pharmacol.* 1989; 38 (3): 385-90.

Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 1991;29;286(1-2):152-4.

Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 1993; 104(1-2):129-35.

Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness M. Paraonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 1451–7.

Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation.* 2003; 107(22):2775-9.

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraonase. *Gen Pharmacol.* 1998; 31(3):329-36

Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. The paraonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13: 357–62.

Mackness B, Mackness MI, Durrington PN, Arrol S, Evans AE, McMaster D, Ferrieres J, Ruidavets JB, Williams NR, Howard AN. Paraonase activity in two healthy populations with differing rates of coronary heart disease. *Eur J Clin Invest.* 2000; 30(1):4-10.

Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. *Atherosclerosis.* 1995; 115, 243-253. ok

Mackness MI, Mackness B. Paraonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radical Biol Med.* 2004; 37(9): 1317-23.

Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Coneelly PW, Hegele RA. Paraonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 1996; 7 (2): 69-76.

Madigan C, Malik P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: sickle cell disease. *Expert Rev Mol Med.* 2006;8:1-23.

Marchegiani F, Marra M, Olivieri F, Cardelli M, James RW, Boemi M, Franceschi C. Paraonase 1: genetics and activities during aging. *Rejuvenation Res.* 2008; 11(1): 113–27.

Marsillach J, Camps J, Beltran-Debón R, Rull A, Aragones G, Maestre-Matínez C, Sabench F, Mackness B, Mackness M. Immunohistochemical analysis of paraonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 146–57.

Martinović J, Kotur-Stevuljević J, Dopsaj V, Dopsaj M, Stefanović A, Kasum G. Paraonase activity in athletes with depleted iron stores and iron-deficient erythropoiesis. *Clin Biochem.* 2010 Oct;43(15):1225-9.

Maselli LMF. Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e avaliação do potencial de peroxidação lipídica [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem.* 1946; 164:271-89.

McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? *Curr Opin Hematol.* 2011;18:158–165.

Mendonça AC, Garcia JL, Almeida CM, Megid TBC, Júnior AF. Far beyond "neonatal screening". *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31(2):88-93.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1998; 16(3):1215.

Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). 2001; 142.

Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Mayer M, Huizenga JJ, Tsui LC, Prochazka M. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gen.* 1998; 213: 149–57.

Mohamed Ali S, Chia SE. Interethnic variability of plasma paraoxonase (PON1) activity towards organophosphates and PON1 polymorphisms among asian populations – a short review. *Ind Health.* 2008; 46(4): 309-17.

Monnet D, Kané F, Konan-Waidhet D, Diafouka F, Sangaré A, Yapo AE. Lipid, apolipoprotein AI and B levels in Ivorian patients with sickle cell anaemia. *Ann Biol Clin (Paris).* 1996;54(7):285-8.

Morris CR. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008; 177-85.

Motti C, Dessi M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, Bernardini S, Fucci G, Federici G, Cortese C. A multiplex PCR-based assay for the detection of paraxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis.* 2001;158:35-40.

Murao M, Ferraz MHC. Sickle cell trait – heterozygous for the hemoglobin S. *Rev bras hematol hemoter.* 2007; 29(3):223-225.

Naoum FA. Alterations of the lipid profile in anemia. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2005; 27(3):223-226.

Naoum PC. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. *Bol Soc Bras Hematol Hemot.* 1996; 18:75-81.

Naoum PC. Erythrocytes and environmental interferences on sickle cell anaemia. *Rev bras hematol hemoter.* 2000;22(1):05-22.

Naoum PC, Souza PC. Avaliação dos produtos da degradação oxidativa da Hb S nos genótipos SS, SF (S/β0 talassemia) e AS, em comparação com hemoglobinas normais *J Bras Patol Med Lab.* 2004; 40(4) • ;249-59.

National Institutes of Health – National Heart, Lung and Blood Institute. Sickle Cell Research for Treatment and Cure. *NIH Publication.* 2002; 2-5214.

Neto GM, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J. Brás. Patol. Medic. Labor.* 2003;39(1),p.51-56.

Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38: 153–63. ok

Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 2001; 276: 44444–9.

Novak F, Vavrova L, Kodydkova J, Novak F Sr, Hynkova M, Zak A, Novakova O. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin Exp Med.* 2010 Mar;10(1):21-5.

Okpala I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13(1):40-4.

Oliveira SA, Mansur AP, Ribeiro CC, Ramires JAF, Annichino-Bizzacchi JM. PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2004; 94 (1): 73-7.

Ozturk O, Kagnici OF, Ozturk T, Durak H, Tuzuner BM, Kisakesen HI, Çakalir C, Isbir T. 192R allele of paraoxonase 1 (PON1) gene as a new marker for susceptibility to bladder Cancer. *Anticancer Res.* 2009; 29: 4041-6.

Parks JS, Rudel LL. Alteration of high density lipoprotein subfraction distribution with induction of serum amyloid A protein (SAA) in the nonhuman primate. *J Lipid Res.* 1985 Jan; 26(1):82-91.

Parra S, Marsillach J, Aragonès G, Rull A, Beltrán-Debón R, Alonso-Villaverde C, Joven J, Camps J. Methodological constraints in interpreting serum paraoxonase-1 activity measurements: an example from a study in HIV-infected patients. *Lipids Health Dis.* 2010; 25(9):32.

Pauling I, Itano HA, Singer SL, Wells IC. Sickle-cell anemia, a molecular disease. *Science.* 1949; 110:543-8.

Pearson HA. Neonatal testing for sickle cell diseases: a historical and personal review. *Pediatrics*, 1989; 815-818.

Pérez-Herrera N, May CP, Hernández IO, Castro JM, Rojas EG, Borja VHA, Castillo TB, Quintanilla BV. Pon1 Q192R polymorphism is associated with lipid profile in mexican men with Mayan ascendancy. *Exp Toxicol Pathol.* 2008; 85: 129-34.

Phuntuwate W, Suthisisang C, Koanantakul B, Mackness MI, Mackness B. Paraoxonase 1 status in the Thai population. *J Hum Genet.* 2005: 50-293-300.

Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, Baumgartner RN, Neuhouser ML, Wener MH, Baumgartner KB, Gilliland FD, Sorensen BE, McTiernan A, Ulrich CM. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 2009 Jul 20;27(21):3437-44.

Platt OS. Pathology of membrane proteins in sickle erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 565:83-5.

Prakash M, Shetty JK, Tripathy S, Verma M, Vasudev S, Bhandary PV. Serum paraoxonase in alcohol abusers associated with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta.* 2007; 378: 232–4.

Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E. The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis.* 2011; 214: 20-36.

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996; 33: 498– 507.

Rahimi Z, Merat A, Haghshenass M, Madani H, Rezaei M, Nagel RL. Plasma lipids in Iranians with sickle cell disease: hypocholesterolemia in sickle cell anemia and increase of HDL-cholesterol in sickle cell trait. *Clin Chim Acta.* 2006 ;365(1-2):217-20.

Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, VandeBerg JL, Almasy L, Blangero J, MacCluer JW, Mahaney MC. Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Hereditary*. 2009; 102: 147-52.

Rajković MG, Barišić K, Juretić D, Grubišić TŽ, Flegar-Meštrić Z, Rumora L. Polymorphisms of pon1 and pon2 genes in hemodialyzed patients. *Clin Biochem*. 2011; 44(12): 964-8.

Ramalho AS, Magna LA, Paiva-e-Silva RB. A portaria n.o 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. *Rev. Brás. Hematol. Hemoter*. 2002; São José do Rio Preto, 24(4);1-7.

Ramalho AS, Magna LA, Paiva-e-Silva RB. Government Directive MS # 822/01: unique aspects of hemoglobinopathies for public health in Brazil. *Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro*. 2003; 19(4):1195-9.

Reddy ST, Devarajana A, Bourquarda N, Shiha D, Fogelman AM. Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis? *Curr Opin Lipidol*. 2008; 19:405–8.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman M. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 542–7.

Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010; 376: 2018–31.

Rice-Evans C, Omorphos SC, Baysal E. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochem J*. 1986 Jul 1; 237(1):265-9.

Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 235(1): 1-9.

Rios DLS, D'onofrio O, Cerqueira CCS, Bonfim-Silva R, Carvalho HG, Santos-Filho A, Galvão-Castro B. Paraoxonase 1 gene polymorphisms in angiographically assessed coronary artery disease: evidence for gender interaction among Brazilians. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45(7): 874–8.

Rojas-García AE, Solís-Heredia MJ, Piña-Guzmán B, Veja L, Lopez-Carrillo L, Quintanilla-Veja B. Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol Appl Pharm*. 2005; 205:282-9.

Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(3):468-74.

Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2006; 281:7657–65.

Rosenblat M, Volkova N, Ward J, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) inhibits monocyte-to-macrophage differentiation. *Atherosclerosis.* 2011; 219(1): 49-56.

Rothem L, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmatic reticulum. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43: 1239-47.

Saile R, Fruchart JC. Serum amyloid A apolipoprotein (apo SAA). Implications in inflammation and in lipoprotein modifications. *Ann Biol Clin (Paris).* 1990; 48(2):77-85.

Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kambob MI. DNA Polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 36–44.

Sanghera DK, Manzi S, Minster RL, Shaw P, Kao A, Bontempo F, Kamboh MI. Genetic variation in the paraoxonase-3 (PON3) gene is associated with serum PON1 activity. *Ann Hum Genet.* 2008;72(1): 72-81.

Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Saha N, Kamboh I. Genetic polymorphisms of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997; v. 17, 1067-1073.

Santos NPC, Ribeiro-dos-Santos AKC, Santos SEB. Frequency of the Q192R and L55M polymorphisms of the human serum paraoxonase gene (PON1) in ten Amazonian Ameridian tribes. *Genet Mol Biol.* 2005; 28(1): 36-9.

Scacchi R, Corbo RM, Rickards O, De Stefano GF. New data on the world distribution of paraoxonase (PON1 Gln192→Arg) gene frequencies. *Human Biol.* 2003; 75(3): 365-73.

Schnog JB, Duits AJ, Muskiet FA, ten Cate H, Rojer RA, Brandjes DP. Sick cell disease: a general overview. *Neth J Med.* 2004; 62(10):364-74.

Searjeant GR. The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2001;112:1-3.

Senti M, Tomas M, Elosual R, Sala J, Marrugat J, Covas MI, Fitó M. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. *Eur J Intern Med.* 2003; 14(3):178-84.

Sepahvand F, Rahimi-Moghaddam P, Shafiei M, Ghaffari SM, Rostam-Shirazi M, Mahmoudian M. Frequency of paraoxonase 192/55 polymorphism in an Iranian population. *J Toxicol Env Heal A.* 2007; 70: 1129-2007.

Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol.* 2004; 39: 59–66.

Shih DM, Xia YR, Yu JM, Lysis AJ. Temporal and tissue-specific patterns of PON3 expression in mouse: in situ hybridization analysis. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 660: 73–87.

Shin,BS. Paraoxonase gene polymorphism in south-western korean population. *J Korean Med Sci.* 2009; 24: 561-6.

Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Ichhpujani RL, Rai A. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 252(2):130-7.

Siqueira FAM, Fett-Conte AC, Borin LNB, Bonini-Domingos CR. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do hospital de base de São José do Rio Preto-SP. *Rev Bras. Hemato Hemoter.* 2002; 24(4), ;1-6.

Solovey AA, Solovey AN, Harkness J, Hebbel R. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood.* 2001; 97(7):1937-41.

Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2214– 25

Steinberg MH. Pathophysiology of sickle cell disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1998; 11(1):163-84.

Steinberg MH.. Sick cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *TheScientificWorldJOURNAL*. 2008; 8, 1295–1324.

Stoltz DA, Ozer EA, Ng CJ, Yu JM, Reddy ST, Lusi AJ, Bouguard N, Parsek MR, Zabner J, Shih DM. Paraoxonase-2 deficiency enhances *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in murine tracheal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292: L852-60.

Stoltz DA, Ozer EA, Recker TJ, Estin M, Yang X, Shih DM, Lusi AJ, Zabner J: A common mutation in paraoxonase-2 results in impaired lactonase activity. *J Biol Chem*. 2009; 284: 35564-71.

Stuart MJ, Nagel RL. Sick cell disease. *Lancet*. 2004;364:1343-60.

Sumegova K, Blazicek P, Fuhrman B, Waczulikova I, Durackova Z. Paraoxonase 1 (PON1) and its relationship to lipid variables, age and gender in healthy volunteers. *Biol*. 2006; 61(6): 699-704.

Stevens VL, Rodriguez C, Pavluck AL, Thun MJ, Calle EE. Association of polymorphisms in the paraoxonase 1 gene with breast cancer incidence in the cps-ii nutrition cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(6).

Taskiran P, Cam SF, Sekuri C, Tuzun N, Alioglu E, Altintas N, Berdeli A. The relationship between paraoxonase gene Leu-Met (55) and Gln-Arg (192) polymorphisms and coronary artery disease. *Arch Turk Soc Cardiol*. 2009; 37(7): 473-8.

Thompson e Thompson. Genética Médica. 6ª edição. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2002.

Tsakaris S, Karika GA, Parthimos T, Taskaris T, Akogiannis C, Schulpis KH. Alpha-tocopherol supplementation prevents the exercise-induced reduction of serum paraoxonase 1/arylesterase activities in healthy individuals. *Eur J Clin Nutr*. 2009; 63: 215–21.

Vaisi-Raygani A, Ghaneialvar H, Rahimi Z, Tavilani H, Pourmotabbed T, Shakiba E, Vaisi-Raygani A, Kiani A, Aminian M, Alibakhshi R, Bartels C. Paraoxonase Arg 192 allele is an independent risk factor for three-vessel stenosis of coronary artery disease. *Mol Biol Rep*. 2011; 1-8.

Van Himbergen TM, Van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med*. 2006; 4(2):34-8.

Van Lenten, B. J., Reddy, S. T., Navab, M. and Fogelman, A. M. Understanding Changes in High Density Lipoproteins During the Acute Phase Response. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, 26, 1687–1688.

Wagener FADTG, Abraham NG, Kooyk YV, Witte T, Figdor CG. Heme induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2001; 22:52-54.

Wang XY, Xue YM, Wen SJ, Zhang NL, Ji Z, Pan SY. The association of paraoxonase 2 gene C311S variant with ischemic stroke in Chinese type 2 diabetes mellitus patients. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2003; 20(3): 215-9.

Watanabe AM. Prevalência da anemia falciforme no estado do Paraná [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007.

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* 1995; 96; 2882-289.

Williams TN, Mwangi TW, Wambua S, Alexander ND, Kortok M, Snow RW, Marsh K. Sickle cell trait and the risk of Plasmodium falciparum malaria and other childhood diseases. *J Infect Dis.* 2005; 192(1):178-86.

Winterbourn CC. Oxidative denaturation in congenital hemolytic anemias: the unstable hemoglobins. *Semin Hematol.* 1990 Jan; 27(1):41-50

Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Amort J, Pautz A, Li H, Förstermann U, Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis.* 2011; (2):112.

Wood KC, Grander DN. Sickle cell disease: Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol.* 2007;34(9):926-32.

Yamada, Y.; Ando, F.; Niino, N.; Miki, T.; Shimokata, H. Association of polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese. *J. Hum. Genet* 2003; 48:469–475.

Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu β s - cluster haplotype predominates among brazilian blacks. *American Journal of Physical Anthropology.* 1992; 88: 295-298.

Zago MA, Pinto ACS. The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan disfunction. *Rev bras hematol hemoter.* 2007;29(3):207-14

Zhang Y, Zheng F, Du H, Krepinsky JC, Segbo JÁ, Zhou X. Detecting the polymorphisms of paraoxonase (PON) cluster in Chinese Han population based on a rapid method. *Clin Chim Acta.* 2006; 365 (1-2): 98-103.

Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2004;49:474–81.

Zulet MA, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez JA. Biomarcadores del estado inflamatorio: Nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. *Nutr Hosp* 22(5): 511-27, 2007.