



ARTIGO ORIGINAL

## Erythrocyte oxidative stress markers in children with sickle cell disease<sup>☆</sup>



Priscila Bacarin Hermann<sup>a,\*</sup>, Mara Albonei Dudeque Pianovski<sup>b</sup>,  
Railson Henneberg<sup>a</sup>, Aguinaldo José Nascimento<sup>a</sup> e Maria Suely Soares Leonart<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Análise Clínica, Laboratório Clínico, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Hematologia e Oncologia Pediátrica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil

Recebido em 6 de julho de 2015; aceito em 16 de outubro de 2015

### KEYWORDS

Oxidative stress;  
Sickle cell disease;  
Children

### Abstract

**Objective:** To determine eight parameters of oxidative stress markers in erythrocytes from children with sickle cell disease and compare with the same parameters in erythrocytes from healthy children, since oxidative stress plays an important role in the pathophysiology of sickle cell disease and because this disease is a serious public health problem in many countries.

**Methods:** Blood samples were obtained from 45 children with sickle cell disease (21 males and 24 females with a mean age of 9 years; range: 3–13 years) and 280 blood samples were obtained from children without hemoglobinopathies (137 males and 143 females with a mean age of 10 years; range: 8–11 years), as a control group. All blood samples were analyzed for methemoglobin, reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substances, percentage of hemolysis, reactive oxygen species, and activity of the enzymes glucose 6-phosphate dehydrogenase, superoxide dismutase, and catalase. Data were analyzed using Student's *t*-test and were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. A *p*-value of  $<0.05$  was considered significant.

**Results:** Significant differences were observed between children with sickle cell disease and the control group for the parameters methemoglobin, thiobarbituric acid reactive substances, hemolysis, glucose 6-phosphate dehydrogenase activity, and reactive oxygen species, with higher levels in the patients than in the controls.

**Conclusions:** Oxidative stress parameters in children's erythrocytes were determined using simple laboratory methods with small volumes of blood; these biomarkers can be useful to evaluate disease progression and outcomes in patients.

© 2016 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

DOI se refere ao artigo:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.10.004>

<sup>☆</sup> Como citar este artigo: Hermann PB, Pianovski MA, Henneberg R, Nascimento AJ, Leonart MS. Erythrocyte oxidative stress markers in children with sickle cell disease. J Pediatr (Rio J). 2016;92:394–9.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [prihermann@hotmail.com](mailto:prihermann@hotmail.com) (P.B. Hermann).

**PALAVRAS-CHAVE**

Estresse oxidativo;  
Doença falciforme;  
Crianças

**Marcadores de estresse oxidativo em eritrócitos de crianças com doença falciforme****Resumo**

**Objetivo:** Determinar parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos de crianças com doença falciforme e compará-los com os mesmos parâmetros em eritrócitos de crianças saudáveis, pois o estresse oxidativo desempenha um importante papel na fisiopatologia da doença falciforme, considerada um sério problema de saúde pública em muitos países.

**Métodos:** Foram obtidas amostras de sangue de 45 crianças com doença falciforme (21 meninos e 24 meninas com média de 9 anos, variação de 3 a 13) e 280 amostras de sangue de crianças sem hemoglobinopatias (137 meninos e 143 meninas com média de 10 anos, variação de 8 a 11), como grupo controle. Em todas as amostras foram determinados meta-hemoglobina, glutatona reduzida, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, porcentagem de hemólise, espécies reativas de oxigênio e atividade das enzimas glucose6-fosfato desidrogenase, superóxido dismutase e catalase. Os dados foram analisados com o teste *t* de Student e foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

**Resultados:** Foram observadas diferenças significativas entre as crianças com doença falciforme e o grupo controle para os parâmetros meta-hemoglobina, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, porcentagem de hemólise, espécies reativas de oxigênio e atividade da enzima glucose6-fosfato desidrogenase, com níveis aumentados nos pacientes.

**Conclusões:** Foi possível determinar parâmetros de estresse oxidativo em eritrócitos de crianças, com técnicas laboratoriais simples e pequenos volumes de sangue. Esses biomarcadores podem ser úteis na avaliação da progressão e dos resultados de tratamentos da doença.

© 2016 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Introdução**

A doença falciforme é uma das doenças hematológicas mais comuns do mundo e é um problema de saúde pública grave em muitos países, incluindo o Brasil.<sup>1</sup> Há mais de 2 milhões de brasileiros portadores do gene da doença falciforme e estima-se que essa doença tenha uma incidência de um em cada 1.000 nascidos vivos. Em 2001, um decreto do Ministério da Saúde incluiu triagem de hemoglobinopatias nos programas de triagem preexistentes.<sup>2</sup>

A doença falciforme foi caracterizada como uma doença multissistêmica associada a episódios de doença aguda e dano progressivo em órgãos, que começa na infância e é responsável principalmente por uma expectativa de vida reduzida nos pacientes afetados.<sup>3</sup> As taxas de morbidez e mortalidade ainda são altas em pacientes com a doença falciforme. No Brasil, até 25% das crianças afetadas faleceram durante seus primeiros 5 anos de vida, porém o diagnóstico precoce e o tratamento podem reduzir essas taxas e melhorar sua qualidade de vida.<sup>4</sup>

A hemoglobina falciforme resulta de uma substituição de ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia  $\beta$  globina.<sup>5</sup> A variação ostensivamente mínima é a origem da hemoglobina S e é responsável pelas alterações significativas na estabilidade e na solubilidade da molécula.<sup>6</sup> A tendência de a hemoglobina S desoxigenada se submeter a polimerização está na base de inúmeras expressões das síndromes falciformes com hemólise intravascular.<sup>7</sup> A hemoglobina plasmática livre pode iniciar a peroxidação lipídica e o heme, que prontamente se dissocia da meta-hemoglobina, pode contribuir significativamente para o estresse oxidativo,<sup>8</sup> que pode desempenhar um papel significativo na fisiopatologia da disfunção microvascular relacionada à doença falciforme, na vaso-oclusão e no desenvolvimento

de lesões nos órgãos.<sup>9</sup> Os biomarcadores do estresse oxidativo podem, portanto, ser potencialmente úteis, tanto para identificar pacientes com alto risco de dano oxidativo quanto para avaliar os efeitos de terapias antioxidantes.<sup>10</sup>

O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros do estresse oxidativo em eritrócitos de crianças com doença falciforme, incluindo percentuais de hemólise, meta-hemoglobina, glutatona reduzida, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase, espécies reativas de oxigênio e as enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase.

**Métodos****Substâncias químicas**

Ácido metafosfórico, 2-mercaptoetanol, pirogalol, hidrocloreto de 2,2-azobis (2-amidinopropano) (AAPH), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Fosfatos de sódio e de potássio, saponina, ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico foram fornecidos pela Vetec Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Citrato de sódio, tris (hidroximetil) aminometano e metanol foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A atividade da G6PD foi determinada com o PD410 dos Laboratórios Randox (Antrim, Reino Unido). Todos os solventes orgânicos eram de alta qualidade e passaram por dupla destilação e todas as outras substâncias químicas eram de grau analítico.

**Amostras de sangue**

Foram obtidas amostras de sangue de 45 crianças diagnosticadas com doença falciforme (21 meninos e 24 meninas com

média de 9 anos; faixa: 3-13) no Departamento de Hematopediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Um grupo de controle consistia em 280 crianças sem hemoglobinopatias (137 meninos e 143 meninas com média de 10 anos; faixa: 8-11), participantes do projeto de extensão universitário intitulado "Incidência de anemias e parasitoses em crianças com idade escolar nas escolas municipais da região metropolitana de Curitiba – Paraná – Brasil", da UFPR. O uso de seres humanos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR. Foi obtido o consentimento informado dos pais ou responsáveis de todas as crianças. As crianças com qualquer alteração hematológica foram excluídas.

Foi coletada uma amostra de sangue venoso de 5 mL de cada paciente em tubos revestidos de K3-EDTA. Foram separadas alíquotas (200 µL) de sangue total para determinação da atividade da G6-PD. Então, as amostras foram centrifugadas a 3.000 g por 10 minutos. O plasma e a camada leucoplaquetária (*buffy coat*) foram removidos por aspiração e os eritrócitos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) (NaCl, 150 mmol/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,9 mmol/L; e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8,1 mmol/L) três vezes. Por fim, os glóbulos vermelhos foram suspensos em solução PBS e água para obter suspensões com hematócritos de 10% e 40% para a solução PBS e 40% para a solução de água. A concentração de hemoglobina foi medida em todas as suspensões. Nem todas as análises foram medidas em cada amostra devido aos volumes limitados disponíveis.

### Parâmetros hematológicos

O hemograma completo foi determinado com o contador eletrônico de células Pentra 80 (Horiba Medical, Japão).

### Concentração de meta-hemoglobina

A concentração de meta-hemoglobina foi determinada de acordo com um método com base em Naoum et al.<sup>11</sup> adaptado a pequenos volumes. As alíquotas (100 µL) de suspensões de eritrócitos a 10% foram hemolizadas com 100 µL de saponina a 1% e estabilizadas em 1.000 µL de 60 mmol/L de tampão de fosfato; então, a absorbância foi determinada a 630 nm (para metemoglobina) e 540 nm (para oxi-hemoglobina). A concentração de metemoglobina foi expressa em termos percentuais em relação à concentração de hemoglobina.

### Determinação da glutatona reduzida

A concentração de glutatona reduzida (GSH) foi determinada por um método anteriormente descrito por Beutler,<sup>12</sup> ao avaliar a redução do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) por compostos de sulfidril a partir da formação de um produto aniônico de coloração amarela cuja absorbância foi medida em 412 nm. Foram usadas alíquotas de 50 µL de suspensão de células vermelhas a 40% no PBS. A concentração de GSH foi expressa em µmol/gHb.

### Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica de membranas de células vermelhas foi avaliada com base em Cesquini et al.<sup>13</sup> Foram adicionadas alíquotas (600 µL) de uma suspensão de glóbulos vermelhos a 10% a 250 µL de ácido tricloroacético a 25% e 600 µL de ácido tiobarbitúrico a 1%, fervidas por 15 minutos a 100 °C e resfriadas por 5 minutos a 0 °C. Então, a absorbância das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas foi lida a 532 nm com o uso de  $\epsilon = 156/(\text{mmole} \cdot \text{cm})$  e as concentrações foram expressas em nmol/gHb.

### Medição da hemólise

A hemólise da hemácia foi feita conforme descrito por Banerjee et al.,<sup>14</sup> adaptada a microplacas por meio da mistura de uma suspensão de glóbulos vermelhos a 10% com PBS com quantidades variáveis de soluções de AAPH (obtiveram-se as concentrações finais de 50, 100 e 150 mmol/L). A mistura da reação foi incubada por 3 horas a 37 °C, com agitação. A extensão da hemólise foi determinada por espectrofotometria por meio da medição da absorbância do hemolisado a 540 nm em um leitor de microplacas (Thermo Scientific, Thermo Plate, EUA). Glóbulos vermelhos em uma solução de 200 mmol/L de AAPH foram o controle de 100% de hemólise.

### Atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD)

Alíquotas (200 µL) de sangue total antes do isolamento de eritrócitos foram lavadas com PBS de 2 mL três vezes. A atividade da G6-PD foi determinada com o analisador automático Cobas Mira (Roche, Mannheim, Alemanha) com o kit comercial PD410 (Randox, Antrim, Reino Unido) conforme descrito no manual do fabricante.

### Atividade da superóxido dismutase

A atividade enzimática teve como base um método adaptado a partir da auto-oxidação de pirogalol de Beutler.<sup>12</sup> Alíquotas de 200 µL de glóbulos vermelhos embaladas foram hemolisadas com 300 µL de água deionizada fria e foi preparado um extrato de clorofórmio e etanol. A mistura foi centrifugada a 2300 g por 10 min. Quantidades variáveis do extrato sobrenadante límpido (0, 20, 40, 60, 80, 100 e 300 µL) foram adicionadas a uma solução de tris-hidrocloreto (tris-HCl) e água. Após 10 min, 20 µL de uma solução de pirogalol a 1 mmol/L foram adicionados a cada tubo e a absorbância foi aferida a 412 nm em uma microplaca. A quantidade de extrato necessária para inibir a auto-oxidação do pirogalol em 50% é usada para determinar o nível de atividade enzimática.

### Atividade da catalase

A atividade enzimática foi determinada por meio de um método adaptado de Beutler,<sup>12</sup> a partir da medida da taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase por espectrofotometria a 240 nm. Alíquotas de 50 µL de uma

**Tabela 1** Valores hematológicos em crianças saudáveis (grupo de controle) e em pacientes com doença falciforme

	Grupo de controle n = 280	CV	Pacientes n = 45	CV	p
GV ( $10^6/\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup>	4,8 ± 0,3	7,0	3,2 ± 0,9	29,2	< 0,001
Hemoglobina (g/dL) <sup>a</sup>	13,5 ± 0,9	6,6	8,9 ± 1,9	21,5	< 0,001
Hematócrito (%) <sup>a</sup>	39,4 ± 2,7	6,7	26,7 ± 5,6	20,9	< 0,001
VCM (fl) <sup>a</sup>	82,3 ± 3,9	4,8	86,3 ± 11,8	13,7	< 0,05
HCM (pg)	28,2 ± 1,6	5,5	28,9 ± 4,64	16,1	> 0,05
CHCM (g/dL) <sup>a</sup>	34,3 ± 1,2	3,6	33,5 ± 2,1	6,2	< 0,01
GB ( $10^3/\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup>	6,6 ± 1,4	21,2	13,8 ± 6,1	44,3	< 0,001
PLA ( $10^3/\text{mm}^3$ ) <sup>a</sup>	292,4 ± 58,3	19,9	458,5 ± 199,0	43,4	< 0,001

GV, glóbulos vermelhos; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média; GB, glóbulos brancos; PLA, plaquetas; CV, coeficiente de variação de Pearson (%). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa (teste t de Student).

suspensão de glóbulos vermelhos a 40% foram adicionadas a 450 µL de uma solução hemolisante de β-mercaptoetanol (0,7 mmol/L) e EDTA (0,27 mol/L). Essa solução foi diluída em PBS na proporção 1:100 e 10 µL da solução final foram adicionados a 990 µL da solução de peróxido de hidrogênio. A diminuição da absorvância do sistema foi aferida por 10 min.

### Espécies reativas de oxigênio intracelular

Espécies reativas de oxigênio foram determinadas de acordo com um método com base em López-Revuelta et al.,<sup>15</sup> adaptado a pequenos volumes de amostras de sangue em microplacas. Eritrócitos (995 µL de uma suspensão de PBS a 10% v/v) foram incubados com 5 µL de diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFDA, 10 mol/L) a 37 °C por 30 minutos. Essa suspensão foi diluída em 9,0 mL de PBS e 37,5 µL dessa solução foram, então, adicionados a 112,5 µL de PBS em placas de 96 poços. As espécies reativas de oxigênio foram determinadas por meio de um fluorímetro GloMax®-Multi Microplate Multimode Reader (Promega Corporation, EUA). Nessas condições, o DCFDA foi hidrolisado a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>), que, então, foi disponibilizado para oxidação pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) para produzir 2,7-diclorofluoresceína (DCF). A fluorescência foi determinada a 530 nm após excitação a 495 nm. A formação de espécies reativas de oxigênio foi expressa como unidades de fluorescência (UF)/gHb.

### Análise estatística

Foi feita com o *software* Statistica 8.0 (StatSoft, EUA). Não foi identificado valor atípico. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar a normalidade e todos os parâmetros foram distribuídos normalmente. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e comparados entre grupos que usam o teste t de Student; um valor de p < 0,05 foi considerado significativo.

### Resultados

Os dados provenientes de hemogramas de crianças saudáveis e pacientes com doença falciforme estão ilustrados na

tabela 1. Foram observadas as diferenças estatisticamente significativas para todos os parâmetros, exceto para a hemoglobina corpuscular média (HCM) (p < 0,05).

Os dados provenientes de parâmetros de estresse oxidativo estão ilustrados na tabela 2, que compara os pacientes com doença falciforme e crianças saudáveis. Foram observadas as diferenças estatisticamente significativas para meta-hemoglobina, TBARS, percentual de hemólise, atividade da G6-PD e espécies reativas de oxigênio (p < 0,05).

### Discussão

Os eritrócitos normais sofrem estresse oxidativo devido à produção de espécies reativas de oxigênio que resultam do metabolismo de oxigênio. Contudo, isso é restaurado de forma eficiente pelos sistemas antioxidantes altamente poderosos da célula, sem qualquer efeito problemático. O estresse oxidativo ocorre como resultado de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes.<sup>16</sup>

Na doença falciforme, o estresse oxidativo poderá ser resultado de níveis elevados de meta-hemoglobina S, que é menos estável do que a meta-hemoglobina A e leva à hemólise intravascular,<sup>17</sup> à lesão de isquemia-reperusão, à inflamação crônica e a uma maior auto-oxidação da hemoglobina falciforme.<sup>18,19</sup> Muitos antioxidantes potenciais são de interesse com relação à doença falciforme<sup>20</sup> e vários estudos demonstraram aumentos significativos em marcadores de estresse e comportamentos diferentes em sistemas de defesa antioxidante em pacientes com doença falciforme quando comparados com indivíduos saudáveis.<sup>21</sup>

Nossos resultados para as amostras de sangue confirmam várias características da doença falciforme já conhecidas, como a anemia hemolítica,<sup>21</sup> comprovada por baixos níveis de hemoglobina,<sup>7</sup> e o aumento nos níveis dos glóbulos brancos e das plaquetas.<sup>6</sup>

Conforme demonstrado anteriormente,<sup>8</sup> os níveis de meta-hemoglobina aumentam em indivíduos com a doença falciforme. Existe uma transferência de elétrons na interação de ligação entre o heme e o oxigênio (O<sub>2</sub>) na hemoglobina oxigenada. Quando a hemoglobina está desoxigenada, o ferro heme normalmente continua no estado ferroso.<sup>20</sup> Nessa troca, quando ocorre a auto-oxidação da hemoglobina, as alterações resultam em meta-hemoglobina,

**Tabela 2** Parâmetros de estresse oxidativo em crianças normais (grupo de controle) e em pacientes com doença falciforme

	Grupo de controle n = 100	Pacientes n = 45	p
METHb (%) <sup>a</sup>	2,2 ± 0,4	4,5 ± 1,1	< 0,001
GSH (μmol/gHb)	6,4 ± 1,4	6,6 ± 2,3	> 0,05
TBARS (nmol/gHb) <sup>a</sup>	24,6 ± 5,8	41,5 ± 20,1	< 0,001
HEMO 0 <sup>a,b</sup>	1,1 ± 0,4	4,7 ± 1,7	< 0,001
HEMO 50 <sup>a,b</sup>	25,0 ± 7,9	49,2 ± 19,4	< 0,001
HEMO 100 <sup>a,b</sup>	55,5 ± 10,2	80,7 ± 13,6	< 0,001
HEMO 150 <sup>a,b</sup>	80,1 ± 7,5	92,6 ± 5,1	< 0,001
G6-PD (U/gHb) <sup>a</sup>	6,2 ± 1,1	13,2 ± 3,3	< 0,001
SOD (U/gHb)	1,846,1 ± 457,2	1,832,4 ± 647,1	> 0,05
CAT (U/gHb)	2,6 10 <sup>5</sup> ± 6,6 10 <sup>4</sup>	2,9 10 <sup>5</sup> ± 8,5 10 <sup>4</sup>	> 0,05
ERO (UF/gHb) <sup>a</sup>	1.468,0 ± 296,2	2.427,5 ± 1110,3	< 0,001

METHb, meta-hemoglobina; GSH, glutathiona reduzida; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; HEMO, hemólise; G6-PD, glucose 6-fosfato desidrogenase; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; ERO, espécies reativas de oxigênio. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa (teste *t* de Student).

<sup>b</sup> Percentuais de hemólise com acréscimo de 0-150 mmol/L de soluções de AAPH.

com o ferro heme no estado férrico.<sup>8</sup> As alterações na função ou na estrutura dos eritrócitos podem levar a um fluxo maior de meta-hemoglobina, que pode levar ao estresse oxidativo.<sup>15</sup>

O aumento do estresse oxidativo intra e extraeritrocitário induz a peroxidação lipídica e a instabilidade da membrana.<sup>14</sup> As TBARS são um dos biomarcadores existentes e essa avaliação é uma quantificação indireta dos processos de peroxidação lipídica, o que faz disso um bom indicador de estímulos pró-oxidantes. De acordo com os resultados registrados anteriormente,<sup>19,20,22</sup> observamos níveis significativamente mais elevados de TBARS em pacientes com a doença falciforme do que nos controles.

Os eritrócitos falciformes rígidos e deformados têm uma vida útil reduzida e são submetidos a hemólise tanto intravascular quanto extravascular.<sup>23</sup> Observamos percentuais mais elevados de hemólise em eritrócitos de crianças com a doença falciforme do que no grupo de controle, tanto em suspensões de base de eritrócitos quanto em suspensões incubadas com um agente oxidante.

A G6-PD é uma enzima importante relacionada à defesa antioxidante em eritrócitos.<sup>20</sup> Observamos uma atividade mais elevada dessa enzima em pacientes com a doença falciforme do que no grupo de controle. Foi registrado anteriormente que os eritrócitos de pacientes com a doença falciforme apresentam um percentual cada vez maior de reticulócitos, ao passo que a atividade da G6-PD nos reticulócitos é normal, mas cai exponencialmente conforme as células vermelhas envelhecem.<sup>24</sup>

As células falciformes geram espontaneamente cerca de duas vezes mais espécies reativas de oxigênio do que os glóbulos vermelhos normais.<sup>25</sup> Em conformidade com os achados de George et al.,<sup>26</sup> também demonstramos níveis elevados de espécies reativas de oxigênio em eritrócitos falciformes.

A glutathiona reduzida (GSH) está presente em altas concentrações em eritrócitos e atua sozinha ou por meio da glutathiona peroxidase como principal fonte redutora para manter a integridade da célula.<sup>17</sup> As medições de GSH e de sua forma oxidada glutathiona dissulfeto (GSSG)

foram consideradas indicadores úteis de estresse oxidativo *in vivo*.<sup>27</sup> A maior parte dos estudos em adultos com doença falciforme relatou alguns déficits na síntese endógena de GSH, provavelmente devido a seu consumo por meio do aumento na produção de oxidantes.<sup>26,28</sup> Embora Rusanova et al.<sup>22</sup> tenham apresentado altos níveis de GSH em pacientes pediátricos com doença falciforme, no presente estudo não encontramos diferença nos níveis de GSH entre crianças com doença falciforme e o grupo de controle.

A superóxido dismutase pode converter o superóxido em peróxido de hidrogênio e a catalase pode remover o peróxido de hidrogênio excedente.<sup>16</sup> Segundo Silva et al.,<sup>20</sup> o aumento na geração de pró-oxidantes em doença falciforme resulta em uma deficiência de antioxidantes. Contudo, existem algumas discrepâncias entre estudos sobre superóxido dismutase e níveis de catalase nessa doença, alguns estudos observam o aumento da atividade e outros observam a diminuição dos níveis.<sup>29</sup> Um aumento na atividade dessas enzimas possivelmente constitui um mecanismo de defesa em resposta ao aumento do estresse oxidativo<sup>19</sup> ou pode ser consequência de um aumento no conteúdo de reticulócitos em amostras de sangue de pacientes com doença falciforme. Contudo, uma diminuição nos níveis das enzimas estava relacionada à gravidade da doença nos pacientes.<sup>20,22</sup> Esses achados aparentemente contraditórios podem dever-se às diferenças na extensão do estresse oxidativo, da gravidade da doença, do polimorfismo enzimático e do cofator enzimático.<sup>29</sup> Nossos resultados não mostraram diferença entre as atividades dessas enzimas em crianças com doença falciforme e em crianças saudáveis, de acordo com Cho et al.,<sup>30</sup> com relação à catalase. Esses resultados podem dever-se à grande variabilidade individual encontrada nos pacientes.

Em vista de evidências que sugerem que um excesso de estresse oxidativo tem implicações na fisiopatologia da doença falciforme, a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo nesses pacientes poderá fornecer informações úteis sobre o uso de medicações atuais e poderá levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.<sup>10,19,20</sup> O monitoramento do estresse oxidativo

envolve a observação de diferentes parâmetros associados a biomarcadores pró-oxidantes e antioxidantes.<sup>27</sup> Contudo, o uso de um biomarcador isolado e a medição de antioxidantes individuais provavelmente não são índices úteis de estado oxidativo. O equilíbrio oxidante-antioxidante envolve reações bioquímicas que exigem a avaliação de muitos resultados.<sup>26</sup>

Este estudo avaliou oito marcadores de estresse oxidativo, incluindo parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes. Os resultados indicam a presença de um estado hiperoxidativo em crianças com doença falciforme, que pode ser observado por seus níveis elevados de metemoglobina, TBARS, hemólise, espécies reativas de oxigênio e atividade da G6PD. Foram usadas técnicas simples para determinar esses parâmetros com pequenos volumes de sangue. Os parâmetros que apareceram alterados em crianças com doença falciforme podem ser úteis em avaliações de progressão da doença e tratamentos.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

- Felix AA, Souza HM, Ribeiro SB. Epidemiologic and social aspects of sickle cell disease. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32:203–8.
- Ramalho AS, Magna LA, de Paiva-e-Silva RB. Government Directive MS # 822/01: unique aspects of hemoglobinopathies for public health in Brazil. *Cad Saúde Pública.* 2003;19:1195–9.
- Thompson BW, Miller ST, Rogers ZR, Rees RC, Ware RE, Waclawiw MA, et al. The pediatric hydroxyurea phase III clinical trial (BABY HUG): challenges of study design. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;54:250–5.
- Sabarense AP, Lima GO, Silva LM, Viana MB. Characterization of mortality in children with sickle cell disease diagnosed through the Newborn Screening Program. *J Pediatr (Rio J).* 2015;91:242–7.
- Aslan M, Freeman BA. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radic Biol Med.* 2007;43:1469–83.
- Wang WC. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, editors. *Wintrob's clinical hematology.* 11 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 1999. p. 1293–311.
- Steinberg MH. Management of sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1999;340:1021–30.
- Hanson MS, Pikhova B, Keszler A, Diers AR, Wang X, Gladwin MT, et al. Methaemalbumin formation in sickle cell disease: effect on oxidative protein modification and HO-1 induction. *Br J Haematol.* 2011;154:502–11.
- Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood.* 2008;111:402–10.
- Rees DC, Gibson JS. Biomarkers in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2012;156:433–45.
- Naoum PC, Radispiel J, Moraes MS. Spectrometric measurement of methemoglobin without interference of chemical or enzymatic reagents. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004;26:19–22.
- Beutler E. *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods.* 3 ed. New York: Grune & Stratton; 1984.
- Cesquini M, Torsoni MA, Stoppa GR, Ogo SH. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed Pharmacother.* 2003;57:124–9.
- Banerjee A, Kunwar A, Mishra B, Priyadarsini KI. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chem Biol Interact.* 2008;174:134–9.
- López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. *Chem Biol Interact.* 2006;161:79–91.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci.* 1999;77:658–66.
- van Zwieten R, Verhoeven AJ, Roos D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Radic Biol Med.* 2014;67:377–86.
- Dasgupta T, Fabry ME, Kaul DK. Antisickling property of fetal hemoglobin enhances nitric oxide bioavailability and ameliorates organ oxidative stress in transgenic-knockout sickle mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298:R394–402.
- Gizi A, Papassotiriou I, Apostolou F, Lazaropoulou C, Papastamataki M, Kanavaki I, et al. Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: the glutathione system and the oxidant-antioxidant status. *Blood Cells Mol Dis.* 2011;46:220–5.
- Silva DG, Belini Junior E, de Almeida EA, Bonini-Domingos CR. Oxidative stress in sickle cell disease: an overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1101–9.
- Belini Junior E, da Silva DG, Torres LDS, de Almeida EA, Cancado RD, Chiatone C, et al. Oxidative stress and antioxidant capacity in sickle cell anaemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. *Ann Hematol.* 2012;91:479–89.
- Rusanova I, Escames G, Cossio G, de Borace RG, Moreno B, Chahboune M, et al. Oxidative stress status, clinical outcome, and  $\beta$ -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. *Eur J Haematol.* 2010;85:529–37.
- Banerjee T, Kuypers FA. Reactive oxygen species and phosphatidylserine externalization in murine sickle red cells. *Br J Haematol.* 2004;124:391–402.
- McGann PT, Ware RE. Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? *Curr Opin Hematol.* 2011;18:158–65.
- Glader B. Hereditary hemolytic anemias due to enzyme disorders. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, editors. *Wintrob's clinical hematology.* 11 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 1999. p. 1115–40.
- George A, Pushkaran S, Konstantinidis DG, Koochaki S, Malik P, Mohandas N, et al. Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood.* 2013;121:2099–107.
- Magalhães SM. Oxidative status in sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011;33:177–8.
- Fatima M, Kesharwani RK, Misra K, Rizvi SI. Protective effect of the flavin on erythrocytes subjected to *in vitro* oxidative stress. *Biochem Res Int.* 2013;2013:649759.
- Daak AA, Ghebremeskel K, Mariniello K, Attallah B, Clough P, Elbashir MI. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid supplementation does not exacerbate oxidative stress or intravascular haemolysis in homozygous sickle cell patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2013;89:305–11.
- Cho CS, Kato GJ, Yang SH, Bae SW, Lee JS, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13:1–11.