

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO RS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Efeito do ácido lipóico sobre parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos traço falciformes ou pacientes falciformes

Dissertação de Mestrado

Vanessa D. M. Brandão

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Biotecnologia no Estado do Rio Grande do Sul

Efeito do ácido lipóico sobre parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos traço falciformes ou pacientes falciformes

Vanessa Duarte Martins Brandão

Orientadora: Prof. Dra. Mara da Silveira Benfato

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Porto Alegre, fevereiro de 2008

Este trabalho foi realizado no laboratório de Estresse Oxidativo no Departamento de Biofísica da UFRGS e no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com apoio do Banco de Alimentos do RS, CAPES-MEC, FAPERGS, PROPESQ e do Ministério da Saúde, Brasil.

AGRADECIMENTOS

Sou grata primeiramente e acima de tudo ao Pai Celestial, pela saúde, por ter conseguido concluir este trabalho, por sempre ouvir minhas orações e pelo consolo nas horas difíceis.

Quero agradecer muito à minha orientadora, professora Dra. Mara S. Benfato, pela confiança e pelos ensinamentos desde a IC.

Agradeço à minha comissão de acompanhamento no mestrado, professor Dr. Guido Lenz e professora Dra. Célia Carlini, pela disponibilidade, atenção, carinho e dedicação.

Às professoras colaboradoras do projeto, Dra. Simone M. Castro (Faculdade de Farmácia – UFRGS) pela ajuda e disponibilidade e Dra. Sídia M. Callegari-Jacques pelos ensinamentos e apoio na análise estatística dos dados.

À professora Dra. Maria do Carmo, do Instituto de Química (UFRGS) pelo uso de equipamentos e reagentes. Obrigada pelos ensinamentos e paciência no uso do HPLC.

À farmacêutica bioquímica Ana Lúcia do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFRGS, por ter permitido a realização das coletas dos pacientes em seu laboratório. Muito obrigada!

À Ana Paula Santin do Laboratório de Hematologia da UFRGS, pela dedicação na hora das coletas e processamento das amostras.

A todos os amigos do Laboratório de Estresse Oxidativo, em especial à Vanusa Manfredini, Aline C. Baccin, Luisa Lazzaretti e Cristini Klein. Os dias no laboratório eram muito melhores quando vocês estavam lá para animar o ambiente!

À Carem Fortunato, presidente do CAPAF/RS, que nunca mediu esforços na captação de voluntários para a pesquisa. Obrigada, você é um exemplo de vida!

A todos os voluntários que participaram da pesquisa, e levaram a sério este trabalho, pela disposição em ajudar e pelo interesse na causa da anemia falciforme.

À Sílvia e ao Luciano da Secretaria do PPGBCM, pela atenção, pelo apoio e sorrisos diários.

À Rosane, pela amizade e pela disposição em ajudar sempre .

Aos demais colegas, professores e funcionários do Departamento de Biofísica,

Ao meu marido, Elton, pela paciência nos momentos de dificuldades no andamento do trabalho, pelo seu amor e carinho!

A toda minha família pela paciência e compreensão, carinho, incentivo e apoio. Muito obrigada!

Ao Banco de Alimentos que forneceu as cestas básicas aos pacientes falciformes e às suas famílias. Parabéns pelo trabalho que realizam e obrigada por acolherem o CAPAF.

Aos órgãos financiadores da pesquisa: CAPES, FAPERGS, PROPESQ-UFRGS e Ministério da Saúde/Brasil.

RESUMO

Título: Efeito do ácido lipóico sobre parâmetros de estresse oxidativo e indivíduos traço falciforme ou pacientes falciforme

A anemia falciforme (AF) é causada por uma mutação (Glu6Val) no gene que codifica a β -globina gerando a hemoglobina S (HbS). A HbS tem a tendência a se polimerizar quando desoxigenada. Isto resulta em graves manifestações clínicas para o indivíduo homocigoto (HbSS). O traço falciforme (HbAS), geralmente assintomático, também pode apresentar dano orgânico decorrente da doença.

Acredita-se que, os eritrócitos falcizados estejam sob constante estresse oxidativo e, assim, liberem produtos de degradação da HbS, que atacam a membrana eritrocitária e catalisam a destruição de hidroperóxidos lipídicos com a formação de radicais alcoxil e peroxil. O ácido alfa-lipóico (AL) um potente antioxidante via seqüestro de espécies reativas de oxigênio, interações redox com outros antioxidantes e inibição da lipoperoxidação. O objetivo deste trabalho é testar o uso do ácido lipóico como um agente antioxidante no tratamento da AF. Sessenta indivíduos foram selecionados sendo, 20 normais (HbAA), 20 traço falciformes (HbAS) e 20 falciformes (HbSS). Metade dos indivíduos foi tratada com 200mg/dia de AL e o restante com placebo. As amostras de sangue foram coletadas antes e após 3 meses de suplementação. Para padronizar a qualidade da alimentação entre os grupos durante a suplementação, cada paciente recebeu mensalmente uma cesta básica adequada às suas necessidades e à de seus familiares. As atividades de catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase (CAT, SOD e GPx) foram analisadas como medida de defesa antioxidante enzimática. O dano oxidativo em proteínas e lipídios foi avaliado pelas técnicas de carbonil e malondialdeído (MDA), respectivamente. A capacidade antioxidante total foi avaliada em plasma como medida adicional de defesa antioxidante. Os resultados mostraram aumento significativo na atividade de CAT nos indivíduos AS após o tratamento com AL ($p=0,007$). Todos os grupos apresentaram redução significativa na atividade de GPx após o tratamento ($p \leq 0,05$), e os resultados da SOD não foram significativos. Os níveis de MDA e de carbonil em plasma tiveram redução no grupo normal tratado com AL ($p= 0,015$ e $0,019$, respectivamente). Este mesmo grupo mostrou também diminuição da capacidade antioxidante total ($p= 0,005$). Estes resultados indicam uma ação benéfica do AL nos indivíduos normais. Entretanto, a dose de AL utilizada neste estudo não mostrou ação sobre as defesas antioxidantes ou redução nos níveis de dano oxidativo na anemia falciforme. É possível que uma dose maior produzisse um efeito benéfico não só sobre parâmetros de estresse oxidativo, mas também sobre outros aspectos envolvidos na fisiopatologia desta doença.

Palavras-Chave: anemia falciforme, estresse oxidativo, ácido lipóico

ABSTRACT

Title: Alpha lipoic acid effect on oxidative stress parameters in sickle cell trait subjects and sickle cell patients

Sickle cell disease (SCD) is caused by a mutation (Glu6Val) in the gene that encodes β -globin. The sickle hemoglobin molecule (HbS) has the tendency to polymerize when deoxygenated. This results in serious clinical manifestations for homozygous SCD patient. SCD trait (HbAS) patients usually do not exhibit any symptoms although organic damage related to the disease sometimes are present. Oxidative stress plays a significant role in the disorder's pathophysiology. Several characteristic symptoms can result from oxidative stress not only in erythrocytes but also in leucocytes and endothelial cells. Alpha-lipoic acid (ALA) is a potent antioxidant, free radicals scavenger and transition metal ions chelator. It can also recycle glutathione (GSH) and inhibit lipid peroxidation. ALA actuates in both hydrophilic phase and hydrophobic membrane portion. The objective of this study was to test ALA as an antioxidant in the SCD treatment. Sixty subjects were selected and divided in groups according to hemoglobin profile: AA (normal), AS (SC trait) and SS (SCD patient). Patients were randomized into a placebo-controlled trial and treated with either ALA (200mg) or vehicle. Blood samples were collected before the start of supplementation and after 3 months of treatment. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities were evaluated in erythrocytes. To determinate lipid damage levels, malondialdehyde (MDA) was measured by HPLC in serum and the protein damage levels were quantified in plasma by carbonyl assay. Total antioxidant status (TAS) was evaluated as non-enzymatic antioxidant defense measurement in plasma. The results show a significative increase in CAT activity ($p= 0,007$) in the AS group with ALA treatment. GPx activity was decreased in all groups ($p\leq 0,05$). SOD activity was not different in any group. After ALA treatment, AA group shows significant decrease in MDA and carbonyl levels ($p= 0,015$ e $0,019$, respectively). Interestingly, TAS was decreased in this same group ($p= 0,005$). These findings demonstrate the ALA capacity to prevent membrane lipid damage in normal individuals. However, this dose was not effective to reduce damage in SCD patients or SC trait. It is possible that a higher dose could protect these patients. Thus, more studies are necessary to elucidate the ALA antioxidant effects in SCD.

Key words: sickle cell disease, oxidative stress, lipoic acid

ABREVIATURAS

AF	anemia falciforme
AL	ácido α -lipóico
AVC	acidente vascular cerebral
CAT	catalase
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxiribonucléico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DNMT	DNA metiltransferase
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
DHLA	ácido dehidrolipóico
DTNB	ácido 5,5`-bisditio-2-nitrobenzóico
EP	erro padrão
ERO	espécies reativas de oxigênio
FS	fosfatidilserina
GEB	gasto energético basal
GET	gasto energético total
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona redizida
GSSG	glutaciona oxidada
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
Hb	hemoglobina
HbF	hemoglobina fetal
HMG-CoA	hidroxi-metil-glutaril CoA redutase
HU	hidroxiuréia
i.v.	intravenosa
IMC	índice de massa corporal
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol

4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
log	logaritmo
MDA	malondialdeído
MO	medula óssea
NOS	óxido nítrico sintetase
OH [•]	radical hidroxila
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
OXI-Hb	hemoglobina oxigenada
PCR	reação da polimerase em cadeia
pI	ponto isoelétrico
PLA	placebo
RL	radical livre
RO [•]	radical alcoxil
RO ₂ [•]	radical peroxil
ROOH	alquilhidroperóxido
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
STA	síndrome torácica aguda
TCA	ácido tricloroacético
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
VO	via oral

SUMÁRIO

CONTEÚDO	Pág.
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 A Hemoglobina (Hb)	12
1.1.1 Estrutura e função da Hb	12
1.1.2 Ontogenia	14
1.2 Hemoglobinopatias	16
1.3 A Anemia Falciforme	17
1.3.1 Epidemiologia	17
1.3.2 Hetero e homozigose na Doença Falciforme	18
1.3.2.1 Paciente Falciforme (HbSS)	18
1.3.2.2 Traço Falciforme (HbAS)	18
1.3.3 Alterações Físico-químicas na Anemia Falciforme	19
1.3.3.1 Alteração molecular da HbS	19
1.3.3.2 Alteração celular dos eritrócitos com HbS	21
1.4 Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme	23
1.4.1 Infecção	23
1.4.2 Crises de Seqüestro Esplênico	23
1.4.3 Crises Aplásicas	24
1.4.4 Síndrome Torácica Aguda (STA)	24
1.4.5 Crises Álgidas	24
1.4.6 Alterações renais	25
1.4.7 Alterações Cardíacas	25
1.4.8 Alterações Ósteoarticulares	26
1.4.8.1 Dactilite (Síndrome Mão-Pé)	26
1.4.8.2 Necrose Isquêmica da cabeça do Fêmur	26
1.4.9 Alterações Neurológicas	27
1.4.10 Alterações Oculares	28
1.4.11 Úlceras de Membros Inferiores	28
1.4.12 Priaprismo	29
1.5 Medidas Gerais para Tratamento da Anemia Falciforme	29
1.6 Estresse Oxidativo	31
1.6.1 Oxidação de eritrócitos	33
1.6.2 Defesas antioxidantes nos eritrócitos	34
1.6.3 Processo oxidativo na Anemia Falciforme	36
1.7 Dietoterapia na Anemia Falciforme	37
1.7.1 Crescimento e Desenvolvimento	39
1.7.2 Estresse Oxidativo, Nutrição e Anemia Falciforme	41
1.8 O Ácido Alfa-Lipóico	42
2. OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo Geral	45
2.2 Objetivos Específicos	45
3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS	46
3.1 Artigo Científico	47

3.2 Material e Métodos Suplementares	75
3.2.1 Amostras Clínicas	75
3.2.2 Índices Hematimétricos	75
3.2.3 Transferrina	76
3.2.4 Ferritina	76
3.2.5 Descarte de reagentes	76
3.3 Resultados Suplementares	77
3.3.1 Níveis de Vitamina C em Soro	77
3.3.2 Tabela de Frequência de Consumo Alimentar	79
4. DISCUSSÃO	80
5. PERSPECTIVAS DO ESTUDO	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO 1 Termo de Consentimento	100
ANEXO 2 Questionário Nutricional	102
ANEXO 3 <i>Curriculum Vitae</i>	105

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Hemoglobina

1.1.1 Estrutura e função

A hemoglobina apresenta estrutura globular e quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas – que variam muito geneticamente – e um grupo prostético (o grupo heme), formado por quatro núcleos pirrólicos, que estão unidos entre si por radicais metanílicos ($-\text{CH}=\text{}$), contendo ferro (Figura 1) (PERUTZ *et al.*, 1960; STEINBERG & BRUGNARA, 2003). As cadeias globínicas têm sido agrupadas conforme suas similaridades genéticas e estruturais considerando-se à síntese multigênica específica para cadeias do tipo alfa (α) e beta (β) (WAGENER *et al.*, 2001; OKPALA, 2004). Os diferentes tipos de cadeia são

designados por α (alfa), β (beta), γ (gama), δ (delta), ϵ (épsilon) e ζ (zeta). Os genes que codificam as cadeias globínicas do tipo alfa (ζ , α_1 e α_2) estão localizados no braço curto do cromossomo 16 e, os que codificam as cadeias do tipo beta (ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β), no cromossomo 11 (FRENETTE *et al.*, 2007).

Presente no interior dos eritrócitos dos mamíferos, a hemoglobina tem como principal função o transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões até os tecidos. Esse transporte está baseado na capacidade dos seus átomos de ferro combinarem-se reversivelmente com o oxigênio molecular e no movimento de suas subunidades (NAOUM, 1996; WAGENER *et al.*, 2001; STEINBERG & BRUGNARA, 2003; OKPALA, 2004). Mudanças conformacionais na molécula de Hb regulam sua interação com o oxigênio, hidrogênio, dióxido de carbono (CO_2) e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Desse modo, quando a Hb está desoxigenada, íons hidrogênio determinam a formação de pontes de sais entre as diferentes cadeias e a ligação do CO_2 e 2,3-DPG às cadeias beta. Com a oxigenação da hemácia, estas pontes de sais se rompem e as cadeias beta expõem o CO_2 e 2,3-DPG, aumentando a afinidade da Hb pelo oxigênio, de modo a criar uma curva sigmóide de dissociação do oxigênio. Alterações genéticas que ocorrem na molécula de Hb, como a substituição de aminoácidos nas cadeias da globina, podem alterar a afinidade da Hb pelo oxigênio, deixando a molécula de Hb instável e sujeita à desnaturação (NAOUM, 1996).

A estabilidade da hemoglobina é dependente do arranjo estrutural que ocorre entre as duas globinas do tipo alfa com as duas do tipo beta. A conformação globular da molécula de Hb se deve à extensa disposição helicoidal das globinas que representa 75% do total de sua estrutura. Estudos utilizando a técnica de

cristalografia de raios X estabeleceram que cada globina tem duas regiões bem específicas denominadas de superfícies externa e interna (MUIRHEAD *et al.*, 1967). A superfície externa é composta por aminoácidos polares e hidrofílicos que entram em contato com o meio aquoso circulante. A superfície interna é constituída por aminoácidos não-polares e hidrofóbicos, que rejeitam a presença da água e, estruturalmente, representa as regiões dobradas da molécula, e também estabelece a proteção do grupo heme por meio da formação de uma bolsa totalmente impermeável à água formada por aminoácidos apolares (PERUTZ, 1972; PERUTZ *et al.*, 1999; GIBSON & ELLORY, 2002; CESQUINI *et al.*, 2003).

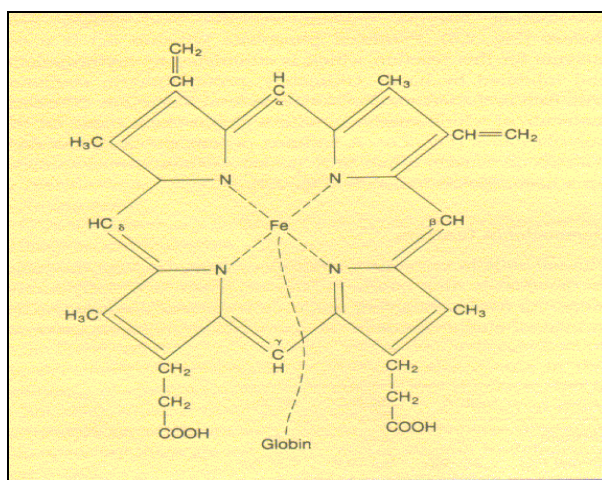


Figura 1. Estrutura do heme (Reproduzido de KUMAR & BANDYOPADHYAY, 2005).

1.1.2 Ontogenia

Em humanos, dois clusters de genes direcionam a síntese de hemoglobina: o locus α , que contém o gene embriônico ξ e dois genes adultos α_1 e α_2 ; e o locus β , que possui os genes ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ e β . Duas alterações ocorrem nos genes que codificam a α - e β -globina durante o desenvolvimento: a troca da hemoglobina embriônica pela fetal que coincide com a transição da hematopoiese embriônica (yolk sac) para a definitiva (hepática); e a mudança da hemoglobina fetal para a adulta que ocorre no período perinatal. As mudanças de expressão do gene da ϵ - pela γ -globina e da γ - para β -globina são controlados exclusivamente em nível transcricional. A troca da ξ - pela α -globina é controlada predominantemente em nível transcricional, embora mecanismos pós-transcricionais também estejam envolvidos (STAMATOYANNOPOULOS, 2005).

O primeiro tetrâmero hemoglobínico, predominante nas quatro semanas iniciais do período embrionário, é composto por pares de dímeros de cadeias zeta e épsilon ($\xi_2\epsilon_2$) que formam a Hb Gower-1. Outras duas hemoglobinas embrionárias, presentes até a 12^o semana, são compostas por dois pares de zeta e gama ($\xi_2\gamma_2$) e alfa e épsilon ($\alpha_2\epsilon_2$), que constituem as hemoglobinas Portland e Gower-2, respectivamente. Ao término desse período não ocorre mais síntese das hemoglobinas embrionárias, predominando nessa fase a hemoglobina fetal ($\alpha_2\gamma_2$), cuja produção tem início na quarta semana de gestação com aumento do seu nível quantitativo progressivo ao desenvolvimento fetal. A hemoglobina A, composta por dímeros de cadeias alfa e beta ($\alpha_2\beta_2$) é sintetizada a partir da 10^o semana e se mantém em concentrações próximas a 10% até o nascimento. A partir deste, passa a

aumentar até que, no sexto mês de vida pós-natal, constitui aproximadamente 96 - 97% do conteúdo total de hemoglobina do indivíduo. A hemoglobina A₂, por sua vez, formada por cadeias alfa e delta ($\alpha_2\delta_2$), começa a ser sintetizada na 25^a semana em concentrações reduzidas que permanecem até o nascimento, aumentando lentamente até se estabilizarem no sexto mês de vida quando atinge 2 a 3%, que corresponde ao conteúdo hemoglobínico de A₂ do adulto (STEINBERG, 1994; NAOUM, 1996; EATON, 2003).

1.2 Hemoglobinopatias

Anormalidades genéticas podem dar origem a variantes estruturais de hemoglobina, sendo que atualmente mais de 900 variantes foram descritas (VERNON, 2004). As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações na porção globínica da molécula de hemoglobina, com distribuição mundial elevada. Estas alterações podem ser classificadas como estrutural e de síntese (PERUTZ & MITCHINSON, 1950). As alterações estruturais incluem a substituição, deleção e inserção de um ou mais aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias globínicas diferentes causando a formação de uma hemoglobina anormal. As alterações de síntese, as chamadas talassemias, caracterizam-se pela síntese reduzida ou nula de um ou mais tipos de cadeias globínicas (BUNN, 1997). Ambas as modificações resultam na formação de moléculas de hemoglobinas com característica bioquímicas alteradas em relação às hemoglobinas normais e, portanto, são denominadas de **hemoglobinas variantes** (POWARS, 1991; STEINBERG, 1994). A hemoglobina variante de maior frequência mundial é a Hb S ($\alpha_2\beta_2^S$), causada por uma mutação no gene beta da globina, produzindo uma alteração estrutural na molécula. No gene da globina beta S (β^S), há a substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG, resultando na substituição do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição número seis da globina beta. Essa troca dos aminoácidos que resulta na HbS altera estruturalmente a molécula e, sob determinadas condições, ocorre a polimerização trazendo graves

conseqüências ao indivíduo portador de anemia falciforme (AF) sintomático (WAGENER *et al.*, 2001).

1.3 A Anemia Falciforme

1.3.1 Epidemiologia

Estimativas sugerem que 250.000 crianças com AF nascem a cada ano no mundo, sendo 100.000 delas somente na Nigéria (SERJEANT, 1997).

O gene β^s é amplamente encontrado na África, Oriente Médio, países do Mediterrâneo, e Índia, e tem sido disseminado, através dos movimentos da população, para o Caribe, América do Norte, e norte da Europa. A freqüência dos portadores de β^s é de até 1 para cada 4 africanos ocidentais e de 1 para cada 10 afro-caribenhos, tendo alcançado alta incidência nestas populações devido ao fato da condição de portador conferir proteção contra a malária (DAVIES, 1997).

No Brasil, dados do teste do pezinho mostram que nascem cerca de 3500 crianças, por ano, com doença falciforme e 200.000 com o traço falciforme (heterozigoto) entre os recém-nascidos vivos. Esses números se configuram como questão de saúde pública. Na Bahia, onde a prevalência é maior, a cada 650 recém-nascidos vivos, um apresenta anemia falciforme e, a cada 17 recém-nascidos vivos, um é portador de traço falciforme (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

1.3.2 Hetero e Homozigose na Doença Falciforme

1.3.2.1 Paciente falciforme (HbSS)

Doença falciforme é um termo genético usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio de HbS. Essas alterações incluem a anemia falciforme (AF), que é a forma homozigota da HbS (*Hb SS*) (OKPALA *et al.*, 2002). A AF também pode ser denominada siclemia ou drepanocitose.

Os pacientes falciformes apresentam crises vaso-oclusivas devido à polimerização da HbS em condições de baixa concentração de oxigênio. A polimerização da HbS causa alterações no formato e na deformabilidade do eritrócito que podem levar a hemólise, inflamação, adesão celular e dano orgânico. Além disso, sofrem freqüentemente de dor causada pela vaso-oclusão aguda (MACK & KATO, 2006).

1.3.2.2 Traço falciforme (HbAS)

A heterozigose para hemoglobina S define uma situação relativamente comum, clinicamente benigna, em que o indivíduo apresenta as hemoglobinas A e S (indivíduo AS, heterozigoto) (NAOUM, 1996).

O traço falciforme, portanto, caracteriza o portador assintomático, clinicamente normal (TAYLOR *et al.*, 2006). Este não padece da doença e não apresenta alterações hematológicas. Os processos vaso-oclusivos sob condições fisiológicas

normais inexistem, suas hemácias têm meia-vida fisiológica normal e a falcização *in vivo* só ocorre nos casos dos indivíduos portadores serem submetidos a: anestesia geral, infecções, vôo em avião não-pressurizado, exposição à regiões de grande altitude e excesso de esforço físico (STEINBERG, 1996).

1.3.3 Alterações Físico-químicas na Anemia Falciforme

1.3.3.1 Alteração molecular da HbS

Doença falciforme é um termo genético usado para determinar um grupo de alterações genéticas caracterizadas pelo predomínio de HbS. Essas alterações incluem a anemia falciforme (AF), que é a forma homozigota da HbS (*Hb SS*) (OKPALA *et al.*, 2002).

A anemia falciforme, doença genética que levou ao conceito de “doença molecular” (PAULING *et al.*, 1949), é caracterizada por anemia hemolítica crônica e fenômenos vasoclusivos que levam a crises dolorosas agudas e à lesão tecidual e orgânica crônica e progressiva.

É causada pela substituição de adenina por timina (GAG->GTG), codificando valina ao invés de ácido glutâmico, na posição 6 da cadeia da β - globina. A troca de um único aminoácido na composição da cadeia beta globínica ocasiona o surgimento de uma estrutura hemoglobínica *nova*, denominada hemoglobina S (HbS). A HbS (α_2/β^S_2) possui propriedades físico-químicas bastante diferentes da hemoglobina normal devido à perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina (por causa da

perda do ácido glutâmico). Exibe ainda diferente estabilidade e solubilidade, demonstrando uma forte tendência à formação de polímeros quando na sua forma desoxiemoglobina (BUNN & FORGET, 1986)

A HbS no estado de baixa tensão do oxigênio sofre uma modificação na sua conformação molecular devido à presença do aminoácido valina, que interage com o receptor fenilalanina (β -85) e leucina (β -88) na molécula adjacente de HbS (BALLAS & MOHANDAS, 1996). Esta interação de natureza hidrofóbica desencadeia a formação de polímeros (Figura 2), compostos por fibras de desoxiemoglobinas, enoveladas entre si, num processo denominado nucleação. O processo progride com o alongamento e alinhamento de mais fibras de HbS, criando uma estrutura multipolimérica, na forma de um eixo axial no interior da célula que modifica o eritrócito conferindo-lhe o formato de foice (BUNN, 1997).

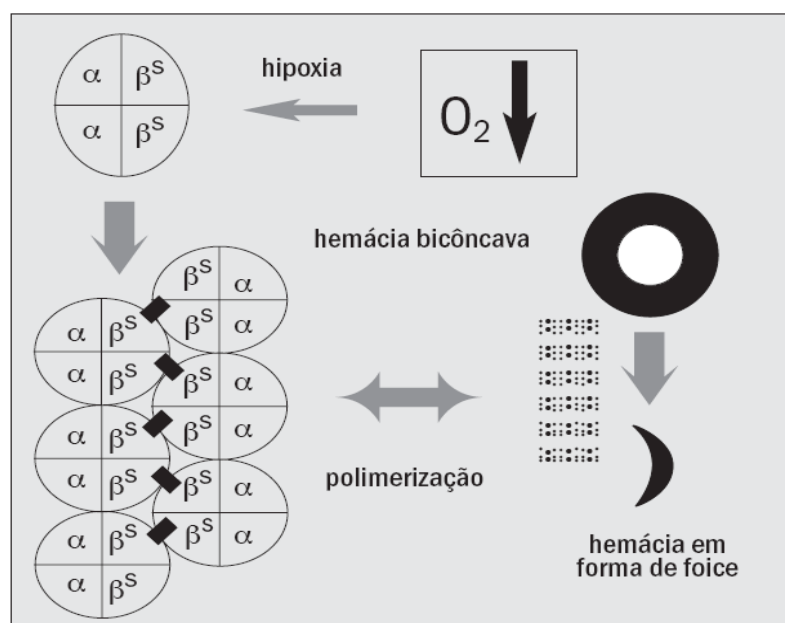


Figura 2: Representação esquemática do processo de indução à falcização das hemácias pela polimerização da desoxiemoglobina diante da baixa concentração de oxigênio (reproduzido de NETO & PITOMBEIRA, 2003)

1.3.3.2 Alteração celular dos eritrócitos com HbS

Os polímeros de HbS têm impacto direto sobre a membrana plasmática dos eritrócitos falciformes ocasionando a exposição extracelular dos epitopos de proteínas e glicolipídeos que normalmente se encontram no interior da célula. Este processo deforma o eritrócito, fazendo com que a célula perca seu formato discóide e sua maleabilidade, tornando-se alongada e rígida com filamentos na sua extremidade (Figura 3) (DEAN & SCHECHTER, 1978).

Uma das conseqüências da polimerização da HbS é a desidratação celular devida às perdas de íons potássio (K^+) e de água. Os principais mecanismos destas perdas ocorrem pela ativação excessiva do canal de transporte de íons potássio e cloro (K^+/Cl^-) estimulados pela acidificação, pelo edema celular e pelo canal de Gardos, devido ao aumento da concentração intracelular dos íons cálcio (Ca^{+2}) (BALLAS & MOHANDAS, 1996).

Hemácias SS têm grandes quantidades de Ca^{+2} , compartimentalizadas em vesículas intracelulares (HEBBEL, 1991), com concentrações estáveis normais no citosol. Porém, quando a membrana é distorcida, pelo processo de afoçamento, há um aumento transitório no Ca^{+2} citosólico. Este aumento é suficiente para acionar os canais de potássio Ca^{+2} -dependentes (canais de Gardos), fornecendo assim uma nova passagem para a perda de potássio e de água levando à desidratação celular (BUNN, 1997).

Além disso, o influxo de Ca extracelular ativa a flipase - uma amino-fosfolipídeo translocase ATP-dependente - e isto altera as posições dos fosfolipídeos

da membrana resultando na exposição da fosfatidilserina (FS). Esta exposição anormal da FS funciona como um sinal para reconhecimento e remoção das células durante a apoptose e como sítio de reconhecimento para complexos enzimáticos envolvidos em rotas de coagulação (ATAGA & KEY, 2007).

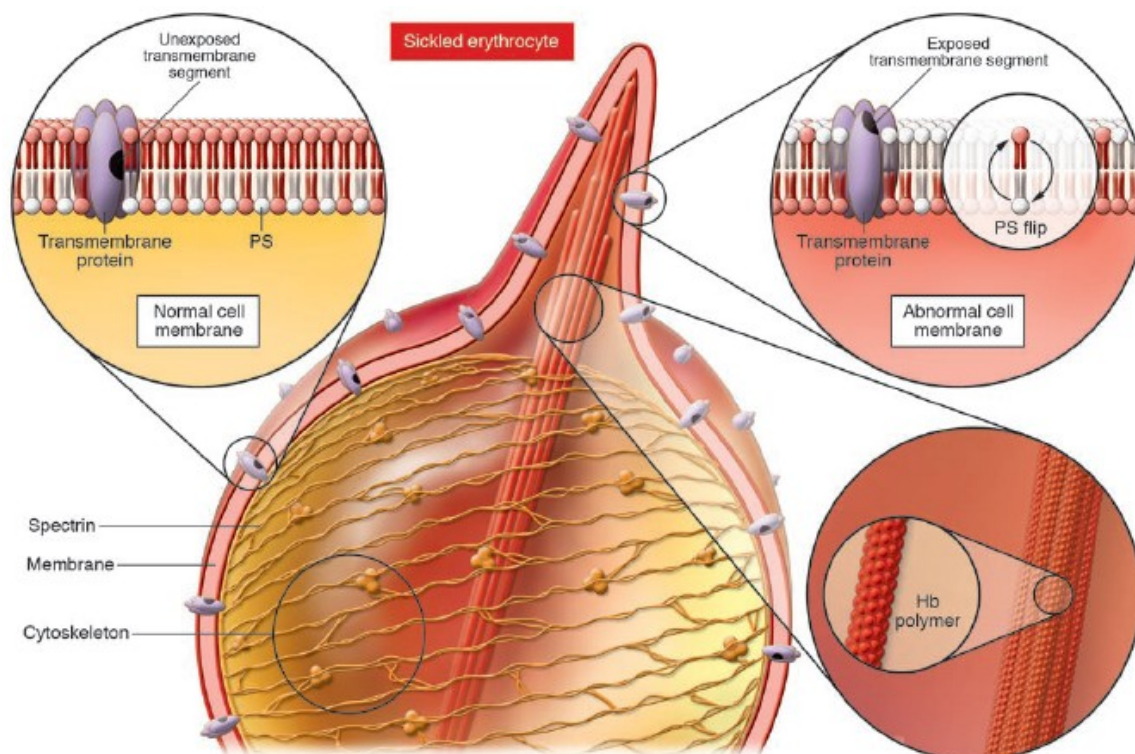


Figura 3: Alterações da membrana dos eritrócitos causada pela polimerização da HbS. A desoxigenação da HbS induz uma mudança na conformação em que a cadeia mutante β se liga aos sítios hidrofóbicos complementares resultantes da substituição pela valina levando a formação dos polímeros de Hb (polímero de Hb; em destaque no canto inferior direito). Os polímeros de Hb rompem o citoesqueleto do eritrócito e formam protrusões dando ao eritrócito a forma característica de foice. A interrupção da ligação entre a membrana plasmática e o citoesqueleto protéico resulta em exposição dos epitopos de proteínas transmembrana e troca de lipídios, especialmente da fosfatidilserina, entre o meio intracelular e seu exterior (em destaque no canto superior direito). A exposição dos glicolipídios negativamente carregados contribui para o estado pro - inflamatório e pro - trombótico dos pacientes falciformes (reproduzido de FRENETTE E ATWEH, 2007).

1.4 Manifestações Clínicas da Anemia Falciforme

1.4.1 Infecção

Pacientes falciformes apresentam risco aumentado para infecção devido a anormalidades em seu sistema de defesa (SIDDIQUI & AHMED, 2003). Eles estão sujeitos a complicações como septicemia por *S. pneumoniae*, cuja incidência está bastante aumentada em relação à população normal e que apresenta curso clínico fulminante e freqüentemente fatal (KIZITO *et al.*, 2007).

As infecções podem ser minimizadas por programas de imunização combinada com uso de antibiótico profilático. O tratamento profilático com penicilina tem reduzido significativamente a mortalidade em crianças menores de dois anos (FALLETTA *et al.*, 1995; CLASTER & VICHINSKY, 2003).

1.4.2 Crises de seqüestro esplênico

Durante esta crise ocorre um aumento rápido do baço devido à captura de eritrócitos da circulação sangüínea com conseqüente diminuição nos níveis de hemoglobina em pelo menos 2 g/dl em relação ao nível basal do paciente e evidências de resposta medular compensatória (reticulocitose persistente ou eritroblastose) (AL-RIMAWI *et al.*, 2006). A etiologia ainda é desconhecida, porém o quadro de infecção viral aparece precedendo alguns episódios (WARE & FILSTON, 1992; GLADER, 1994). O óbito pode ocorrer subitamente, em algumas horas. O tratamento, que deve ser imediato, inclui suporte volumétrico e transfusões sangüíneas até atingir nível de hemoglobina entre 9 e 10 g/dl. (ANVISA, 2001).

1.4.3 Crises aplásicas

A aplasia medular eritrocítica (crise aplásica) consiste em parada transitória da eritropoese, caracterizada por quedas abruptas dos níveis de hemoglobina, contagem de reticulócitos e precursores eritróides da medula óssea (BEUTLER, 1995). A principal causa das crises aplásicas é a infecção pelo *Parvovirus* B19, que acomete principalmente crianças na faixa etária de 4 a 10 anos (KOSHY & DORN, 1996).

1.4.4 Síndrome torácica aguda (STA)

A STA é a segunda causa mais comum de hospitalização de pacientes com AF e é responsável por 25% das mortes nesta patologia. As causas habituais de STA podem incluir vaso-oclusão, infecção e embolia pulmonar gordurosa da medula óssea infartada (SIDDIQUI & AHMED, 2003). O tratamento ideal ainda não está bem estabelecido pois sabe-se muito pouco a respeito das causas da STA. Estudos têm indicado tanto causas infecciosas quanto não-infecciosas, contudo sua frequência e curso clínico são desconhecidos. Além disso, o número de pacientes incluídos nestes estudos é muito pequeno e os resultados ainda não são suficientes para a definição de uma terapia apropriada (VICHINSKY *et al.*, 2000).

1.4.5 Crises álgidas

A forma mais comum de crise álgida ocorre durante o processo vaso-oclusivo, que pode ocorrer a partir dos seis meses e é muito comum durante toda a vida do paciente falciforme. Pode surgir como resultado de hipóxia, desidratação ou resfriamento da pele (POWARS, 1990). O tratamento é de suporte e pode incluir:

hidratação, analgesia e uso de antibióticos (MITCHELL, 2007). As metas são aliviar a dor e tratar os problemas desencadeantes, principalmente infecção, hipóxia, acidose e desidratação. Os pacientes em dor devem sempre ser avaliados para possível processo infeccioso, a febre não deve ser simplesmente assumida como parte do episódio vaso-oclusivo (ANVISA, 2001).

1.4.6 Alterações renais

Anemia crônica e crises vaso-oclusivas freqüentes na medula renal são fatores determinantes das alterações renais observadas nas doenças falciformes. Estas alterações são estruturais e funcionais.

As alterações estruturais podem ser glomerulares e medulares. As alterações medulares são muito freqüentes porque a medula renal apresenta condições ideais para falcização como pH e pO₂ reduzidos e hipertonicidade (DE JONG, 1978; POWARS *et al.*, 1991; FALK & JENNETTE, 1994).

As alterações funcionais incluem disfunções hemodinâmicas, hipostenúria, proteinúria, e alteração da síntese dos hormônios renais (eritropoetina, renina e prostaglandina) (POWARS *et al.*, 1991; FALK & JENNETTE, 1994).

1.4.7 Alterações cardíacas

Como em outras anemias crônicas, ocorre na AF um aumento acentuado do débito cardíaco relacionado, primariamente, a hipóxia tissular resultante da capacidade de transporte de oxigênio reduzida vinculada à queda da quantidade de hemoglobina (FALK & HOOD, 1982).

Além disso, os pacientes com AF politransfundidos podem apresentar depósitos de ferro nas fibras musculares cardíacas com conseqüente fibrose e insuficiência cardíaca (GAFFNEY *et al.*, 1988).

1.4.8 Alterações osteoarticulares

As lesões ósseas e articulares são complicações freqüentes das doenças falciformes. Elas são decorrentes da falcização com isquemia e infarto da medula óssea (MO) e das estruturas ósseas adjacentes (BAUM *et al.*, 1987; PLATT *et al.*, 1991).

1.4.8.1 Dactilite (Síndrome mão-pé)

Consiste em edema doloroso que pode acometer um segmento de um dedo até as quatro extremidades. Predomina entre seis meses e dois anos, tornando-se progressivamente menos freqüente após os cinco anos, quando a MO ativa desaparece dos pequenos ossos periféricos. Pode ser precipitado pelos fatores desencadeantes da crise dolorosa, visto tratar-se de crise vaso-oclusiva (WATSON *et al.*, 1963).

1.4.8.2 Necrose isquêmica da cabeça do fêmur

A Necrose isquêmica das epífises dos ossos é comum na anemia falciforme e é freqüentemente vista no fêmur. É caracterizada geralmente por dor nas juntas e limitação dos movimentos (EJINDU *et al.*, 2007). Aproximadamente 50% dos

pacientes desenvolvem necrose avascular por volta dos 35 anos (STYLES & VICHINSKY, 1996).

O tratamento efetivo baseia-se no diagnóstico precoce, antes da instalação da lesão articular. Nestes estados, evitar o suporte de peso pode permitir a cicatrização com preservação da forma da cabeça femoral. Nos estados mais avançados, quando existem dor e limitação de movimentos, o tratamento é sintomático. Nos casos de sintomas persistentes e intensos, o tratamento é a colocação de prótese de quadril (CLARKE *et al*, 1989).

1.4.9 Alterações neurológicas

Enquanto os episódios de dor ocorrem devido a vaso-oclusão dos vasos sangüíneos em qualquer parte do corpo, o acidente vascular cerebral (AVC) resulta de vaso-oclusão dentro do sistema nervoso central (SNC). Disfunções cerebrais ocorrem quando o suprimento de oxigênio do SNC decai abaixo do nível crítico baseado nas necessidades destes tecidos (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2002). Em crianças, o AVC é geralmente de natureza isquêmica, enquanto adultos com AF tendem a apresentar mais freqüentemente AVC hemorrágico (BROWN *et al.*, 1993; BONNER *et al.*, 1999; ROUTHIEAUX *et al.*, 2005). Mesmo crianças com AF que não apresentam nenhum sinal clínico evidente de AVC podem apresentar déficit de memória e de atenção, dificuldades de raciocínio matemático assim como de noção espacial e na habilidade motora devido ao dano vaso-oclusivo no SNC (BONNER *et al.*, 1999; ROUTHIEAUX, 2005).

1.4.10 Alterações oculares

O evento inicial da retinopatia na AF é a oclusão vascular, que ocorre, mais freqüentemente, na retina periférica. As oclusões também podem ocorrer nos capilares e vênulas, embora a oclusão das últimas seja menos comum. Esses eventos podem afetar o leito vascular dos olhos, geralmente com conseqüências irreversíveis. O tratamento consiste em hiperoxigenação e rápida redução da pressão intra-ocular, utilizando técnicas cirúrgicas e medicamentosas (GOLDBERG, 1971).

1.4.11 Úlcera de membros inferiores

Úlceras de membros inferiores estão entre as mais evidentes manifestações cutâneas da AF. Clinicamente há grande variabilidade no tamanho das lesões que podem, ainda, ser extremamente dolorosas. Quase sempre se desenvolvem nos tornozelos, acima dos maléolos laterais e mediais; mais raramente surgem na região pré-tibial e dorso do pé. O início pode ser espontâneo, ou subseqüente a trauma, por vezes leve como a picada de um inseto (ECKMAN, 1996).

A fisiopatologia dessas úlceras envolve etiologia multifatorial, mas a hipóxia tissular pode ser entendida como o fator principal e conseqüência, por sua vez, da deficiente deformabilidade das hemácias, de alterações no endotélio vascular, alteração na viscosidade sanguínea, ativação da coagulação, alteração no tono vascular e até mesmo a presença de imunocomplexos circulantes (ECKMAN, 1996).

1.4.12 Priapismo

O priapismo, que se refere à ocorrência de ereção dolorosa não desejada, afeta quase dois terços dos indivíduos do sexo masculino com anemia falciforme. (MANTADAKIS *et al.*, 1999; ADDIS *et al.*, 2007). Recorrência de episódios e impotência estão presentes em 50% dos adultos afetados (ANVISA, 2001). O mecanismo exato do priapismo na AF ainda necessita ser elucidado. A falha na detumescência pode ser devida a numerosos fatores: vasooclusão no fluxo de saída do sangue, liberação excessiva de neurotransmissores, prolongado relaxamento do músculo liso ou ainda uma combinação destes episódios (POWARS & JOHNSON, 1996).

1.5 Medidas Gerais para Tratamento na Anemia Falciforme

As medidas gerais de tratamento da AF incluem: boa nutrição; profilaxia, diagnóstico e terapêutica precoces de infecção; manutenção de boa hidratação e proteção contra condições climáticas adversas. Além disso, acompanhamento ambulatorial duas a quatro vezes ao ano e educação da família e paciente sobre a doença são auxiliares na obtenção de bem-estar social e mental (JACOB *et al.*, 2006).

Os avanços na prevenção de infecções e crises de falcização têm proporcionado uma maior sobrevivência aos pacientes, de modo que, em longo prazo, a manutenção da boa qualidade de vida é essencial para os indivíduos com doenças falciformes e deve ser objetivo dos profissionais que tratam destes pacientes.

Penicilina profilática previne 80% das septicemias por *S. pneumoniae* (Pneumococo) em crianças com AF até 3 anos de idade. O impacto da profilaxia é enorme e deve ser iniciado aos 3 meses de idade para todas as crianças com doenças falciformes. A terapêutica deve continuar até 5 anos de idade (GASTON *et al.*, 1986).

Além do tratamento convencional, comum à grande maioria dos pacientes, duas formas de terapia podem ser utilizadas alternativamente: o transplante de medula óssea e a administração oral de hidroxiuréia (HU), um agente indutor da síntese de HbF. A experiência com o uso de HU, contudo, é muito maior do que com o transplante de medula óssea. Ambos podem ser indicados em grupos selecionados de pacientes (STEINBERG & BRUGNARA, 2003; RICHARD *et al.*, 2005).

Vários estudos em adultos vêm demonstrando a eficácia do uso da HU (BANDEIRA *et al.*, 2002), único agente específico disponível para tratar as complicações da AF, cujo principal efeito é a elevação dos níveis de HbF em pacientes portadores de síndromes falcêmicas (BANDEIRA *et al.*, 2002; STEINBERG, 2005). Estudos recentes têm demonstrado que a HU pode, também, reduzir a contagem de granulócitos, monócitos e plaquetas, e ainda reduzir a expressão de moléculas de adesão na superfície dos eritrócitos. Essas células, quando elevadas, são um fator de risco para a oclusão vascular, pois permitem interações adesivas entre células falciformes, células endoteliais e leucócitos, e estimulam plaquetas a liberar citocinas que contribuem para a adesão (STEINBERG, 1999; HILLERY *et al.*, 2000; HALSEY *et al.*, 2003; COVAS *et al.*, 2004).

Os resultados com a HU são muito animadores tanto em adultos quanto em crianças. Contudo, a despeito de vários relatos de benefícios obtidos por este agente terapêutico, há registro de que pelo menos 25% dos pacientes (LAVELLE, 2004),

tratados com HU, têm demonstrado falha no aumento da concentração da HbF, tornando assim necessária a utilização de outras drogas nesses pacientes refratários à HU. Deste modo, agentes como butiratos e derivados, ou ácidos orgânicos de cadeia curta como ácido valpróico (KING, 2004), bem como inibidor de DNA metiltransferase (DNMT) (LAVELLE, 2004; PACE & ZEIN, 2006), que também induzem ao aumento da HbF, encontram-se em estudos para eventual uso nestes pacientes.

1.6 Estresse Oxidativo

A redução do oxigênio (O_2) à água fornece a energia que permite a impressionante complexidade dos organismos superiores. Entretanto, este processo gera subprodutos altamente reativos, os quais podem ocasionar dano a proteínas, lipídios e ao DNA. Estes subprodutos são as espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O termo ERO compreende radicais livres e outros compostos não radicalares.

Radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O termo ERO inclui não somente radicais de Oxigênio (como $O_2^{\cdot-}$ radical superóxido, OH^{\cdot} radical hidroxil, RO_2^{\cdot} , radical peroxil, RO^{\cdot} radical alcóxil) mas também abrange derivados de O_2 que podem atuar como oxidantes ou redutores (H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; HOCl, ácido hipocloroso, e O_3 , ozônio) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As ERO são produzidas normalmente durante o

metabolismo celular, onde estão envolvidas em reações de transferência de elétrons. Na respiração, a maior parte do oxigênio consumido é reduzido à água na mitocôndria, durante a passagem pela cadeia respiratória, possibilitando a síntese do ATP pela fosforilação oxidativa. No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A partir deste, uma série de reações ocorre, gerando compostos como H_2O_2 e o radical hidroxila OH^{\bullet} , o mais reativo e danoso dos radicais formados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Para proteger o organismo do ataque destas ERO existe uma série de sistemas de defesa antioxidante, como enzimas específicas que inativam algumas das ERO como a catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), enzimas que controlam a disponibilidade de metais na célula, além de captadores não protéicos de radicais. Em paralelo, os organismos desenvolveram sistemas de regeneração e reparação de macromoléculas danificadas, especialmente o DNA, a fim de corrigir possíveis falhas ou sobrecargas nos mecanismos de defesa (THOMAS *et al.*, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Quando ocorre um aumento das ERO e/ou uma diminuição da capacidade antioxidante, as ERO são capazes de lesar componentes celulares direta ou indiretamente, modificando sua estrutura e/ou função e gerando o **estresse oxidativo**. Inúmeros estudos têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio participam da patofisiologia de várias doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes, esclerose múltipla, cirrose hepática e alguns tipos de câncer (Halliwell & Gutteridge, 2007).

1.6.1 Oxidação em Eritrócitos

As ERO podem causar profundas lesões em eritrócitos, diminuindo seu período de vida útil, em especial nos pacientes com anemia falciforme e talassemias (WINTERBOUM, 1990; NASSERULLAH *et al.*, 2003).

A suscetibilidade da hemoglobina oxigenada (Oxi-Hb) em se auto-oxidar está relacionada à capacidade de um elétron do ferro ligado ao grupo heme tornar-se desemparelhado. A molécula da hemoglobina, em especial a região não polar que contém o grupo heme, necessita que o ferro esteja no estado ferroso (Fe^{2+}) para que o mesmo exerça o transporte reversível do oxigênio. Qualquer modificação neste complexo químico que protege o grupo heme pode permitir o acesso de pequenos íons ou moléculas de água, com deslocamento de elétrons do grupo heme e, conseqüentemente, dar origem à formação de radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), desencadeando o processo de oxidação da hemoglobina (NAOUM, 1996; WAGENER *et al.*, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

No curso normal dos eventos biológicos que acontecem dentro do eritrócito, ocorre um discreto grau de autooxidação espontânea da hemoglobina (DAS & ESSMAN, 1990; WINTERBOUM, 1990). Esse processo é normalmente neutralizado pelas defesas antioxidantes da célula. Qualquer situação patológica que estimule o processo oxidativo da hemoglobina, ou que desequilibre as defesas antioxidantes, aumentará a produção de radicais livres no eritrócito (WINTERBOURN, 1990). Entre estas situações, destaca-se a anemia falciforme, cuja suscetibilidade oxidativa se

localiza nos hidroperóxidos da membrana das células falciformes (WAUGH *et al.*, 1987; WAGENER *et al.*, 2001).

1.6.2 Defesas antioxidantes nos eritrócitos

Os eritrócitos são células que possuem sistemas enzimáticos bastante específicos, capazes de diminuir e neutralizar a reatividade dos radicais livres. Alguns sistemas estão localizados na membrana celular e no citoplasma eritrocitário, e também extracelularmente. Na autoxidação da hemoglobina, a enzima metahemoglobina redutase dependente de NADH reconverte a metahemoglobina para deoxihemoglobina; esta por sua vez retorna ao estado inicial de oxihemoglobina. O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) formado no desencadeamento da oxidação da hemoglobina para metahemoglobina sofre ação enzimática da superóxido dismutase (SOD) dismutando-a em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que possui reatividade limitada (NAOUM, 1996). A redução do H_2O_2 à água (H_2O) é realizada por um ciclo contínuo mediado pela catalase e glutathione peroxidase. A manutenção dos níveis elevados da glutathione peroxidase (GPx) é essencial para proteger e manter no estado reduzido os grupos constituídos por compostos organosulfurados (grupo thiol) das enzimas celulares, bem como das proteínas intermembrana e do citoesqueleto (Figura 4). Além disso, a atividade de GPx é dependente da glutathione reduzida. A enzima glutathione redutase (GR) dependente de NADPH reconverte continuamente a glutathione oxidada (GSSG) para o estado reduzido. Cabe destacar que a glutathione reduzida além de ser um substrato para a

GPx, também é o principal composto antioxidante intracelular. A catalase, por sua vez, tem atuação importante, pois decompõe H_2O_2 em H_2O . O tocoferol (vitamina E) é um dos mais importantes antioxidantes localizados na membrana eritrocitária, com a função de interromper o processo oxidativo e evitar a propagação da geração de radicais livres (DAILLY *et al.*, 1998). Extracelularmente, o ácido ascórbico destaca-se entre os mais eficientes mecanismos biológicos com capacidade redutora, atuando sinergisticamente com o tocoferol, transferrina e ceruloplasmina. As defesas antioxidantes dos eritrócitos estão, portanto, relacionadas com o potencial oxidativo que atinge a célula e, normalmente, suas ações consistem em neutralizar a geração de radicais livres e restaurar as lesões de causa química (NAOUM, 1996; HALLWELL & GUTTERIDGE, 2007). O radical superóxido gerado no processo de transformação da oxihemoglobina para metahemoglobina, ao se ligar com Fe^{3+} proveniente da depleção do grupo heme promove uma reação com a liberação de Fe^{2+} . Este, por sua vez, ao se combinar com H_2O_2 desencadeia a Reação de Fenton, com a liberação do danoso radical hidroxila (OH^*) (DE FREITAS & MENEHINI, 2001; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Por esta razão, as células mantêm um rígido controle da homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado e a maioria destes está de alguma forma complexado a enzimas e proteínas, onde são armazenados, ou fazem parte da estrutura funcional das mesmas (THOMAS *et al.*, 1998). Nesse processo, o Fe^{3+} participa de contínuas reações com o radical superóxido, causando estresse oxidativo e contribuindo para aumentar a rigidez da membrana eritrocitária, cujo potencial antioxidante depende principalmente da vitamina E e beta-caroteno (SHINAR *et al.*, 1987; NAOUM, 1996; HALLWELL &

GUTTERIDGE, 2007).

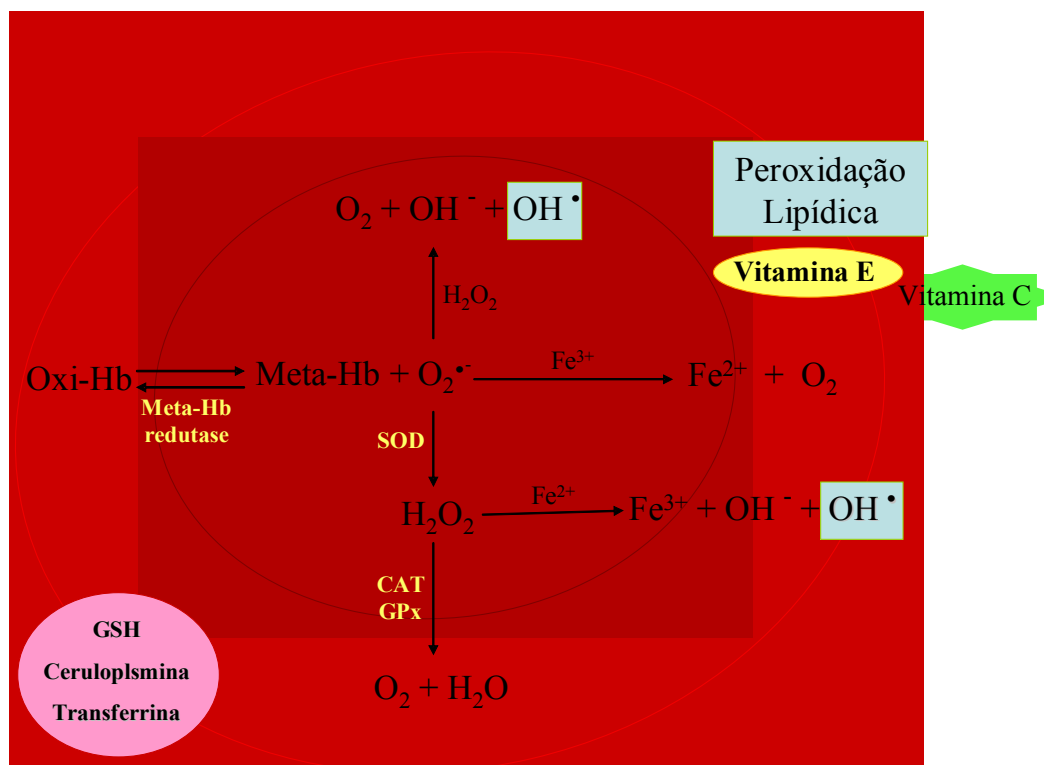


Figura 4: Processo oxidativo nos eritrócitos e suas principais defesas antioxidantes.

1.6.3 Processo oxidativo na Anemia Falciforme

Acredita-se que os eritrócitos falcizados estejam sob constante estresse oxidativo e, assim, liberem produtos de degradação da HbS (complexos de Fe^{2+} e Fe^{3+}), que atacam a membrana eritrocitária e catalisam a destruição de hidroperóxidos lipídicos com a formação de radicais alcoxil e peroxil (BECKER *et al.*, 2004). A geração destes radicais amplia as lesões devido aos processos contínuos de novos ciclos de peroxidação lipídica, resultando na liberação de alcanos como o

malondialdeído (MDA) e alquenos como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) (DAILLY *et al.*, 1998; CESQUINI *et al.*, 2003).

O estresse oxidativo nos eritrócitos irreversivelmente falcizados se deve a vários fatores, tais como: produtos endógenos da peroxidação lipídica da própria membrana do eritrócito, a exposição a oxidações exógenas e, possivelmente, à falha dos mecanismos antioxidantes. Portanto, as lesões causadas pela geração de radicais livres na anemia falciforme dependem da proporção das células falciformes irreversíveis. Dados da literatura indicam que, quando esta proporção se situa entre 5 e 25% do total de eritrócitos, o nível de produtos oxidativos gerados da membrana (dano em lipídios) do eritrócito está aumentado, resultando em profundas modificações. Quando a proporção das células falciformes irreversíveis é menor que 5%, o estresse oxidativo é baixo com poucas conseqüências lesivas aos eritrócitos com HbS (FRANCK *et al.*, 1985; DAS & ESSMAN, 1990).

Além disso, a liberação de ferro dos eritrócitos lisados causa estresse oxidativo que pode induzir liberação de fatores de transcrição sensíveis ao estado redox como, por exemplo, NF- κ B. Estes fatores de transcrição, por outro lado, induzem a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 e o recrutamento de leucócitos aderentes ao endotélio (BELCHER *et al.*, 2006).

1.7 Dietoterapia na Anemia Falciforme

A AF é uma doença que pode ser complicada por deficiências nutricionais e deve, portanto, sofrer intervenção dietoterápica não só como forma de tratamento,

mas para o próprio bem-estar e melhoria da qualidade de vida (OMS, 1972). As orientações nutricionais para pacientes falciformes podem incluir:

- Ingestão hídrica adequada: a desidratação pode causar crises de dor devido ao aumento da viscosidade sangüínea que leva à vaso-oclusão e hemólise. Por isso, é muito importante a ingestão de líquidos ao longo do dia, principalmente água. A recomendação é de, no mínimo, 2L por dia, contudo esta quantidade deve ser aumentada em caso de calor excessivo, atividade física ou febre (ANVISA, 2001).
- Suplementação com ácido fólico: o folato participa do metabolismo de purinas e pirimidinas para a síntese de DNA e RNA sendo, assim, muito importante na formação das hemácias (ANVISA, 2001).
- Baixa ingestão de alimentos ricos em Ferro: A sobrecarga de ferro é muito comum em pacientes falciformes devido, principalmente, à hemólise e transfusões freqüentes. Para que uma dieta seja pobre em ferro absorvível, devem-se enfatizar proteínas vegetais. Contudo, não há necessidade de se abolir as proteínas animais da dieta, pois estas são boas fontes de cobre, zinco e aminoácidos essenciais. Devem ser excluídos alimentos ricos em ferro como fígado, fórmulas e fortificados. Devem-se, também, evitar substâncias como o álcool e suplementos de ácido ascórbico, que aumentam a absorção de ferro e a liberação de radicais livres deste. É importante lembrar, entretanto, que a deficiência de ferro pode estar presente em alguns pacientes com AF devido a flebotomias repetidas, hematúria secundária a necrose papilar renal ou outros fatores (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2002).

- Ingestão adequada de vitaminas e minerais: os pacientes devem ser orientados quanto à importância de ingerir alimentos com alto teor e vitaminas A, C e E - que são compostos com ação antioxidante- e minerais como zinco e cobre (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2002). O zinco, por exemplo, pode aumentar a afinidade pelo oxigênio nos eritrócitos normais e falciformes e sua suplementação tem sido estudada como forma de tratamento na AF (LEONARD *et al.*, 1998).

1.7.1 Crescimento e Desenvolvimento

É indiscutível o impacto da doença falciforme no crescimento e desenvolvimento da criança e do adolescente. As anormalidades incluem déficits precoces no peso e estatura (significativos já no primeiro ano de vida), atraso na maturação sexual e prejuízo no desempenho escolar. A etiologia destas alterações envolve vários fatores como função endócrina, nutrição, taxa metabólica basal e níveis de hemoglobina fetal (ANVISA, 2001).

Este déficit de crescimento e desenvolvimento pode ser atribuído ao padrão de gasto energético destes pacientes. Recentes estudos sugerem que o gasto energético diário total pode não ser afetado na AF, talvez devido à conservação de energia resultante da redução na atividade física voluntária. Contudo, o gasto energético basal (GEB) é elevado em pacientes falciformes quando comparados a crianças, adolescentes e adultos normais, possivelmente devido ao elevado *turnover* protéico, à anemia crônica, ao débito cardíaco aumentado e a uma resposta inflamatória decorrente da doença. O GEB corresponde a, aproximadamente, 70%

do gasto energético total (GET) de um indivíduo. Assim, um aumento no GEB pode contribuir para a etiologia do déficit de crescimento observado em crianças com AF (FUNG *et al.*, 2001).

A demanda metabólica, pelo aumento da taxa de eritropoese e do trabalho cardíaco devido à anemia crônica, aumenta as necessidades de proteína, energia e minerais. Durante os períodos de crises agudas, há um discreto aumento do GEB, já modestamente elevado devido à AF. Sobretudo, a ingestão dietética geralmente é comprometida durante estas crises devido à anorexia e/ou náusea secundárias à febre, dor e à medicação (FUNG *et al.*, 2001). Além disso, mesmo nos períodos sem crises ou complicações (Steady-state), a hemólise crônica contínua bem como a vaso-oclusão subclínica resultam em alteração de provas de fase aguda, aumento no metabolismo protéico e balanço nitrogenado negativo. Tudo isso faz com que a taxa metabólica basal do paciente com anemia falciforme seja 20% maior que na população normal. Portanto, mesmo com uma ingestão alimentar adequada, quando comparada com controles normais, o paciente falciforme é considerado relativamente subnutrido (ANVISA, 2001).

O peso de nascimento das crianças com anemia falciforme é normal. As diferenças antropométricas surgem com o avançar da idade, manifestando-se já no final do primeiro ano de vida (GEE *et al.*, 1994). O peso médio das crianças e adultos com anemia falciforme é abaixo do normal, mostrando-se mais alterado quando comparado à altura. Em relação aos controles normais, as crianças e adolescentes com doença falciforme apresentam menor estatura. Esta diferença é marcante na adolescência já que o estirão de crescimento ocorre aproximadamente dois anos e meio mais tarde. Contudo, a altura final na idade adulta não é prejudicada uma vez

que o fechamento epifisário (de acordo com os níveis de HbF) também é mais tardio, permitindo a recuperação (ANVISA, 2001).

É importante salientar que uma ingestão calórico-protéica adequada associada ao tratamento precoce durante a infância pode prevenir déficits de crescimento e prevenir algumas complicações clínicas melhorando o curso da doença (FUNG *et al.*, 2001).

1.7.2 Estresse Oxidativo, Nutrição e Anemia Falciforme

Em relação ao estresse oxidativo e alimentação há o fato de que existem nutrientes com atividade antioxidante, importantes para a defesa do organismo contra os danos oxidativos. Os antioxidantes derivados da dieta como a vitamina E, C e A e a glutathione desempenham um papel importante na prevenção de doenças como Alzheimer, arteriosclerose, câncer, entre outras (ABDALLA, 2006).

Pacientes com AF estão sujeitos ao estresse oxidativo (HEBBEL *et al.*, 1982; RICE-EVANS *et al.*, 1986), particularmente durante as crises vaso-oclusivas e dolorosas (HEBBEL *et al.*, 1982; KLINGS & FARBER, 2001). Diversos aspectos clínicos da AF provavelmente resultam do estresse oxidativo nos eritrócitos, leucócitos e células endoteliais (REPKA & HEBBEL, 1991; DHALLA *et al.*, 2000; KLINGS & FARBER, 2001) e da ativação plaquetária (TOMER *et al.*, 2001; ATAGA & ORRINGER, 2003).

Estudos têm reportado significativa redução dos níveis de vitaminas C e E em plasma e soro de pacientes falciformes (CHIU *et al.*, 1979; NATTA *et al.*, 1979; JAIN *et al.*, 1985; TANGNEY *et al.*, 1989). Baixas concentrações destes compostos com

ação antioxidante contribuem para aumentar os níveis de peroxidação lipídica na membrana dos eritrócitos falciformes (GEE *et al.*, 1994).

Estudos têm demonstrado que algumas alterações resultantes do estresse oxidativo na AF podem ser reduzidas pelo tratamento com suplementos antioxidantes. Amer *et al.*, avaliando o tratamento com *N*- acetil *L*- cisteína *in vitro*, verificaram uma inibição significativa da formação de células falcizadas e a elevação dos níveis de glutathione (GSH) intracelular (AMER *et al.*, 2005). Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou *in vitro* o efeito antioxidante, em eritrócitos de pacientes falciformes, das vitaminas C e E. O tratamento de pacientes falciformes com ácido ascórbico também mostrou efeito protetor contra a hemólise induzida por peróxido de hidrogênio *in vitro* (LACHANT & TANAKA, 1986). Embora a maioria dos dados seja proveniente de estudos *in vitro*, os resultados são positivos e indicam uma linha de pesquisa promissora no tratamento da AF.

1.8 O Ácido Alfa-Lipóico

O ácido α -Lipóico (AL) é um ácido graxo de 8 carbonos contendo um anel tiolano com uma ponte dissulfeto entre os carbonos 6 e 8 (figura 5). Em sua forma lipoamida, ele funciona como um cofator para o complexo multienzimático que catalisa a descarboxilação oxidativa de α -cetoácidos como o piruvato, α -cetoglutarato e α -cetoácidos de cadeia ramificada na mitocôndria. É sintetizado por animais e humanos, contudo, a rota enzimática completa responsável pela síntese *de novo* ainda não foi elucidada (PACKER *et al.*, 1995).

Ácidos octanóicos monosulfurados são substrato para a síntese *in vivo* do AL. Sintetizado no organismo humano em quantidades muito pequenas, o AL é covalentemente ligado à subunidade E2 de 4 diferentes complexos de α -cetoácido desidrogenase na mitocôndria (LEXIS *et al.*, 2006).

Embora exista uma quantidade muito pequena de AL livre no organismo humano sem suplementação, o AL livre tem a habilidade de capturar radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil e peroxinitrito. Além disso, ele pode reciclar a GSH, o α -tocoferol e o ácido ascórbico (WOLLIN & JONES 2003). *In vitro*, AL diminuiu a susceptibilidade plasmática à oxidação (MARANGON *et al.*, 1999), protegeu eritrócitos humanos contra hemólise induzida por radicais peroxil (CONSTANTINESCU *et al.*, 1994), e aumentou a síntese de GSH em eritrócitos humanos isolados (HAN *et al.*, 1997).

A capacidade antioxidante do AL está localizada no grupamento tiol, que reage diretamente com os radicais oxidantes. É considerado um importante antioxidante que pode ser de valor terapêutico em patologias relacionadas à superprodução de radicais livres (PEREZ & CASTANEDA, 2006).

Nutricionalmente, o AL é encontrado no germe de trigo, no levedo de cerveja e na carne vermelha. Contudo, a dieta dos mamíferos não provê quantidades suficientes de AL para uma significativa ação antioxidante (MORIKAWA *et al.*, 2001).

O AL apresenta uma alta tolerância à suplementação bem documentada em muitos estudos *in vitro*, com modelos animais e em humanos (HERMANN *et al.*, 1996; BIEWENGA *et al.*, 1997; TEICHERT *et al.*, 1998; MARANGON *et al.*, 1999;

RELJANOVIC *et al.*, 1999; RUHNAU *et al.*, 1999; ZIEGLER *et al.*, 1999; EVANS & GOLDFINE, 2000).

Cremer *et al.* avaliou a toxicidade e carcinogenicidade do AL em ratos suplementados durante 2 anos com doses de 20 a 180 mg/Kg/dia. Mesmo no grupo que ingeriu 180mg/Kg, o AL não apresentou potencial carcinogênico ou toxicidade a algum dos órgãos avaliados, entre eles: coração, fígado, baço, rins, tireóide e cérebro (CREMER *et al.*, 2006).

Mais de 93% de uma dose de AL, administrada oralmente, é absorvida pelo epitélio intestinal; contudo, apenas 20-30% escapa da metabolização hepática. Após a absorção, o AL é reduzido intracelularmente para formar a ácido dihidrolipóico (DHLLA) (Figura 5) que pode subseqüentemente sofrer S-metilação. AL e DHLLA também estão sujeitos à β -oxidação. AL é excretado pela urina na forma de metabólitos como o 4,6-bismetilmercapto-hexanóico que é o composto predominante. Em ratos, a excreção urinária é responsável por aproximadamente 80% da eliminação do AL (CREMER *et al.*, 2006).

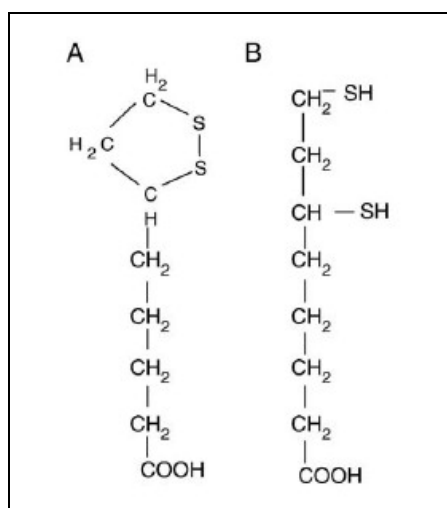


Figura 5: Estrutura química do ácido lipóico (A) e do ácido dihidrolipóico (B). (Reproduzido de PEREZ & CASTANEDA, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil nutricional de pacientes que apresentam anemia falciforme ou traço falciforme e testar o uso do ácido α -lipóico como um agente antioxidante no tratamento desta patologia associado, ou não, a uma alimentação saudável.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar avaliação nutricional dos pacientes por meio de inquérito alimentar recordatório e antropometria.
- Avaliar o efeito do tratamento com AL antes e após 3 meses de suplementação oral:
 - ♦ Determinar índices hematimétricos (eritrograma, leucograma e contagem de plaquetas).
 - ♦ Medir a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos.
 - ♦ Determinar o dano oxidativo em proteínas plasmáticas e em lipídios de membrana;
 - ♦ Determinar os níveis de vitamina C, ferritina e transferrina no soro dos pacientes;

3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 Artigo Científico

Artigo científico submetido à revista *American Journal of Clinical Nutrition* em Janeiro de 2008. Segue abaixo a correspondência de confirmação de submissão do artigo:

TO: MARA S. BENFATO,
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
RE: Submission of MS #25855 Version 1

Dear Dr. BENFATO,

You have successfully submitted your above-referenced manuscript to The American Journal of Clinical Nutrition. Please make note of your manuscript number (25855 Version 1) for your records.

You can log on to the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript(s). The web address is <http://www.rapidreview.com/ASCN2/CALogon.jsp> and your username is mara.benfato. If you need your password, click "Can't remember your password?" on the logon screen and follow the directions.

Thank you for your submission.

Sincerely,
Dennis M. Bier, M.D.
Editor-in-Chief

Editorial Office
The American Journal of Clinical Nutrition
USDA/ARS Children's Nutrition Research Center
Department of Pediatrics
Baylor College of Medicine
1100 Bates Street
Houston, TX 77030-2600
phone (713) 798-7022
fax (713) 798-7046
email: dbier@nutrition.org

For questions about manuscript submission and status:
Phone: (530) 752-8363
Fax: (530) 752-8371
E-mail: ajcnssubmit@nutrition.org

Lipoic acid effect upon oxidative stress parameters in sickle cell trait subjects and sickle cell patients

Vanessa D. M. Brandão, Vanusa Manfredini, Luísa L. Lazzaretti, Ana P. Santin, Simone S. Castro, Maria C. R. Peralba, Mara S. Benfato.

Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Porto Alegre, Brazil (VDMB, VM, LLL, MSB).

Laboratório de Hematologia, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, Brazil (APS, SSC).

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (VDMB, VM).

Departamento de Química Inorgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil (MCRP).

Address correspondence to:

Dr. Mara Silveira Benfato

Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Bento Gonçalves 9500 prédio 43431, Porto Alegre, RS, Brasil, 91501-970.

Tel: (55-51) 33087603 / Fax: (55-51) 33087003

E-mail: mara.benfato@ufrgs.br

Supported by: CAPES-MEC, Fapergs, Banco de Alimentos / RS,

Running Head: Lipoic acid, nutrition and sickle cell disease

ABSTRACT

Background: Increasing evidence has indicated that oxidative stress plays a crucial role in the sickle cell disease pathophysiology. Alpha-lipoic acid (ALA) is a potent antioxidant employed in the treatment of several diseases.

Objective: The objective of this study was to test the ALA effect as an antioxidant in the SCD treatment.

Design: Sixty subjects were selected and divided in groups according to hemoglobin profile: AA (normal), AS (SCD trait) and SS (SCD patient). Patients were randomized into a placebo-controlled trial and treated with either ALA (200mg) or vehicle. Blood samples were collected before supplementation and after 3 months of treatment. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) activities and total antioxidant status (TAS) were evaluated in erythrocytes as measure of antioxidant defense. To determinate lipid damage levels, malondialdehyde (MDA) was measured by HPLC and protein damage levels were quantified in plasma by carbonyl assay.

Results: The results showed a significant increase in CAT activity in the AS group with ALA treatment and GPx activity presented significant decrease in all groups. SOD activity was not different in any group. Data of MDA and carbonyl levels showed significant reduction ($p < 0.05$) in AA group with ALA treatment. Interestingly, TAS was decreased in the same group.

Conclusion: ALA treatment protected AA individuals of oxidative damage in cellular lipids and plasmatic proteins. However, in SCD subjects, the dose applied

was not effective to prevent oxidative damage and more studies are necessary to evaluate the ALA antioxidant effect in this disease.

Key words: Sickle cell disease, Oxidative Stress, Alpha-lipoic acid, Antioxidant defenses, Oxidative damage, Nutritional supplementation.

INTRODUCTION

Sickle cell disease (SCD) is a chronic hemolytic anemia caused by a mutation (Glu6Val) in the gene that encodes β -globin. The sickle hemoglobin molecule (HbS) has the tendency to polymerize when deoxygenated and this result in serious clinical manifestations in homozygous SCD patients. SCD trait (HbAS) usually doesn't exhibit any symptoms although there may be organic damage related to the disease (1,2). Increasing evidence has indicated that reactive oxygen species (ROS) play a crucial role in the SCD pathophysiology. Several characteristic SCD symptoms can result from oxidative stress not only in erythrocytes but also in leucocytes, platelets and endothelial cells (3- 5). The concept that sickle cell disease (SCD) is a state of inflammation has been substantiated by the reports of endothelial injury / activation and excessive generation of ROS in this disease, and enhanced leukocyte-endothelium interactions (6, 7, 8, 9). The oxidative stress in SCD is likely the result of intravascular sickling and transient vaso-occlusive events (10).

While continuously subjected to oxidative stress in the cellular environment, the red blood cells possess various antioxidant systems for its protection. The major defense systems include those that scavenge free radicals - such as glutathione, vitamin C and vitamin E - and the enzymatic defenses such as superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase (11, 12). Even so, the ROS may cause deep lesions in erythrocytes, decreasing their period of life, particularly in patients with sickle cell anemia and thalassemias. These lesions include damage to biological macromolecules such as proteins, lipids and DNA (13 - 15).

Studies have demonstrated that antioxidants can protect red blood cell membrane from oxidative injury (5, 16). Although very little free α -lipoic acid is thought to occur in non supplemented conditions, free α -lipoic acid has the ability to scavenge superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and peroxynitrite, and can also recycle glutathione (GSH), α -tocopherol, and ascorbic acid. ALA can actuate both in the hydrophilic phase and in the hydrophobic membrane portion. (17, 18) *In vitro*, α -lipoic acid decreased plasma susceptibility to oxidation (19), was protective against haemolysis of human erythrocytes induced by peroxy radicals, and increased GSH synthesis in isolated human erythrocytes (20, 21). Thus, the objective of this study was to test the ALA effect as an antioxidant in the SCD treatment.

SUBJECTS AND METHODS

Materials

All reagents were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), unless otherwise stated. ALA was purchased from Dose Certa Ltda. (POA, RS, Brazil) in capsules containing 200 mg of the reagent.

Subjects

Sixty subjects were selected and divided in groups according to hemoglobin profile: AA (normal), AS (SCD trait subject) and SS (SCD patient). They were classified in the groups by ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC) of the blood samples (22), polymerase chain reaction amplification (PCR) for the determination of the β -like globin gene (23) and family history studies. No one patient was detectably deficient in red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). Only patients who had not been transfused or had no hemolytic crisis for at least 3 months prior to the study and that were not in treatment with desferral (iron chelator) were enrolled in the study. The AA and AS subjects were healthy and not anemic, they had no underlying medical problems and did not take vitamin or mineral supplements. Healthy controls and sickle cell trait subjects were selected in the Centro de Apoio ao Portador de Anemia Falciforme (CAPAF/RS) from the same SCA patient families to reduce genetic and nutritional variability.

Nutritional Assessment

The nutritional status was evaluated by the weight and height measurements to body mass index (BMI) calculation. The cutoff points proposed by the World Health Organizations for BMI were used to classify the subject nutritional status (24).

Diet Standardization

In order to improve daily dietary intakes of energy and to standardize the food consumption subjects received monthly non perishable foods to prepare the family meals. The families had, on average, 5 to 6 members. The list of foods provided to the subjects during the time of the study and the estimated quantities for families are presented in **Table 1**.

Table 1: Food items provided to the subjects during the time of the study and the estimated quantities per families.

Food name	Quantity per family
Rice (Kg)	5
Beans (Kg)	6
Wheat flour (Kg)	4
Maize flour (Kg)	2
Sugar (Kg)	4
Milk powder (Kg)	10
Soy oil (L)	2
Sweet cookie (Kg)	1
Saltish biscuit (Kg)	1
Macaroni (Kg)	2
Soy juice (L)	4

ALA Supplementation

Patients were randomized into a placebo-controlled trial and treated with either ALA (200mg) or vehicle. Blood samples were collected before the beginning of supplementation and after 3 months of treatment. An accompaniment and nutritional support was carried through monthly to verify if the supplement was being ingested in accordance with the instructions and to ask about adverse effects.

Red blood cell separation

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of *Rio Grande do Sul* (Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) and all participants gave written informed consents. For the children subjects, the agreement was signed by their parent or legal guardian.

Blood was collected by vein puncture using an acid-citrate-dextrose vacutainer. The vacuum in the vacutainer was immediately broken after collection because sickle cells would sickle in the collection tubes. Plasma, platelets and the buffy coat were removed by consecutive centrifugations and washing in cold NaCl (0.9% w/v). The resulting red blood cells (RBC) were suspended in PBS (50 mM NaCl, 0.1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4). Hemolysates were obtained by lysing RBC with ethanol 2% (ratio 1:10) followed by centrifugation to obtain crude extracts for enzyme activities measurements. Plasma was used for protein carbonyl groups determination and serum was used for MDA determination.

Enzyme Activities

Catalase (CAT) activity was determined spectrophotometrically by monitoring the disappearance of H_2O_2 at 240 nm (25). Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by monitoring NADPH consumption rate at 340 nm (26). Superoxide dismutase (SOD) activity was determined using RANDOX[®] kit that employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals which react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) to form a red formazan dye. The SOD activity is then measured by the degree of inhibition of this reaction at 505 nm.

Total Antioxidant Status

The quantitative determination of the total antioxidant status (TAS) in serum was done using the RANDOX[®] kit at 600 nm. Briefly, ABTS[®] (2,2'-Azino diethylbenzothiazoline sulfonic acid) is incubated with a peroxidase and H_2O_2 to generate the cation $\text{ABTS}^{\text{®}*+}$, a relatively stable blue compound. The antioxidants present in the sample inhibit this reaction producing a decrease in the color intensity which is proportional to the total antioxidant concentration.

Carbonyl Assay

Triplicate aliquots of plasma (0.8 mL) were added with 0.2 mL of 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged and 1 mL of either 2M HCl or 10mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2M HCl were added to the precipitates and incubated at 37°C for 90 min. Dinitrophenylhydrazine excess was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1 (v/v). The protein was then dissolved by addition of 6M of guanidine hydrochloride. Quantification was performed using a spectrophotometer at 370 nm. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone ($21,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Values of carbonyl content for crude extracts are given in nmol/g hemoglobin (27).

Malondialdehyde (MDA) determination

MDA was measured by HPLC by the method described by Mustafa Karatepe (28). 25 mL of 0.1M perchloric acid and 55 mL of distilled water were added to a 20 mL aliquot portion of human serum. Addition of acid was necessary to precipitate proteins and release the malondialdehyde bound to the amino groups of proteins and other amino compounds. The samples were then centrifuged at 4,500 rpm for 5 min and used for HPLC analysis. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol, the flow rate was 1.2 mL/min and the chromatograms were monitored at 250 nm.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS software (version 13.0 for Windows). Results were expressed as means \pm SEM, and they were analyzed by the paired Student's *t* test. The results were transformed using log to carbonyl, CAT and SOD. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Blood characteristics and Nutritional assessment

Blood samples were analysed to assess erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, reticulocytes, ferritin and transferrin values determination before and after treatment (**Table 2**). As expected, SCD patients presented erythrocytes, haemoglobin, hematocrit and transferrin values below the normal physiologic levels, while reticulocytes and ferritin were above the normal physiologic levels.

Data of anthropometric assessment and clinical characteristics of the subjects are shown in **Table 3**. Age and height values were not different among the studied groups. Weight and BMI values were also not different among groups before the treatment. However, after the ALA supplementation, SS group exhibited significant increase in the average weight and, consequently, in BMI.

Table 2: Blood characteristics of normal subjects (AA), sickle cell trait subjects (AS)

and sickle cell patients (SS) before and after treatment.

Groups	Erythrocytes	Hemoglobin	Hematocrit	Reticulocytes	Ferritin	Transferrin
Characteristic	AA pla (million/mm ³)	AA ala (g/dL)	AS pla (%)	AS ala (%)	SS pla (mg/L)	SS ala (mg/dL)
Age (y)	23.3 ± 11	23.5 ± 11	29.7 ± 10.8	31.3 ± 15.4	17.0 ± 11.0	17.7 ± 9.6
n	10	10	10	10	10	10
Gender (M/F)	3/7	4/6	2/8	2/8	5/5	6/4
Before treatment						
AA pla	4.7 ± 0.5	13.3 ± 1.4	41.0 ± 4.5	0.7 ± 0.4	169.4 ± 368.2	290.7 ± 35.5
Weight (Kg)	57.8 ± 21.5	69.7 ± 29.4	72.1 ± 24.2	63.2 ± 16.5	39.7 ± 16.3	43.2 ± 18.4
AA ala	4.5 ± 0.4	13.3 ± 1.4	40.0 ± 4.8	0.9 ± 0.7	242.6 ± 277.0	261.5 ± 45.5
Height (cm)	154.6 ± 11.6	161.7 ± 18.6	156.4 ± 5.9	154.9 ± 51.7	146.5 ± 21.4	157.9 ± 25.7
BMI (Kg/m ²)	4.8 ± 0.2	13.1 ± 0.9	40.6 ± 3.4	1.0 ± 0.6	179.8 ± 364.8	257.8 ± 50.4
AS pla	4.7 ± 0.3	13.0 ± 0.9	39.9 ± 3.0	0.6 ± 0.4	141.2 ± 90.8	253.6 ± 44.5
Weight (Kg)	62.4 ± 23.4	59.8 ± 10.6	76.4 ± 29.2	64.7 ± 16.8	39.7 ± 15.6	49.4 ± 16.4
AS ala	2.7 ± 0.7 ¹	7.8 ± 1.4 ¹	23.7 ± 4.6 ¹	6.6 ± 3.2 ²	847.8 ± 792.3 ²	216.7 ± 40.8 ¹
Height (cm)	155.7 ± 12.4	161.4 ± 5.7	157.4 ± 6.3	154.3 ± 9.9	146.7 ± 23.6	157.2 ± 40.8 ¹
BMI (Kg/m ²)	3.2 ± 0.6 ¹	9.4 ± 1.5 ¹	27.6 ± 4.4 ¹	6.7 ± 5.2 ²	482.3 ± 498.4 ²	227.0 ± 46.0 ¹
SS ala	3.2 ± 0.6 ¹	9.4 ± 1.5 ¹	27.6 ± 4.4 ¹	6.7 ± 5.2 ²	482.3 ± 498.4 ²	227.0 ± 46.0 ¹
After treatment						
AA pla	4.6 ± 0.4	13.1 ± 1.2	39.7 ± 4.0	0.8 ± 0.2	84.9 ± 112.8	271.5 ± 25.7
AA ala	4.5 ± 0.4	13.3 ± 1.4	40.0 ± 4.2	1.0 ± 0.5	220.0 ± 344.9	234.0 ± 48.7
AS pla	5.0 ± 0.5	13.5 ± 1.8	40.8 ± 5.2	0.8 ± 0.5	155.7 ± 163.6	250.5 ± 43.2
AS ala	4.5 ± 0.3	12.7 ± 1.0	38.7 ± 3.1	1.2 ± 0.5	105.7 ± 90.58	248.7 ± 39.0
SS pla	2.7 ± 0.7 ¹	7.9 ± 1.7 ¹	23.6 ± 5.6 ¹	8.3 ± 5.1 ²	298.6 ± 131.8 ²	205.0 ± 49.6 ¹
SS ala	3.1 ± 0.6 ¹	9.2 ± 1.9 ¹	27.4 ± 6.0 ¹	8.1 ± 4.9 ²	282.7 ± 353.0 ²	219.6 ± 45.5 ¹

¹ Values below the normal physiologic levels; ² values above the normal physiologic levels. Data are

presented as mean ± SD. Pla: placebo treatment; ala: alpha-lipoic acid treatment.

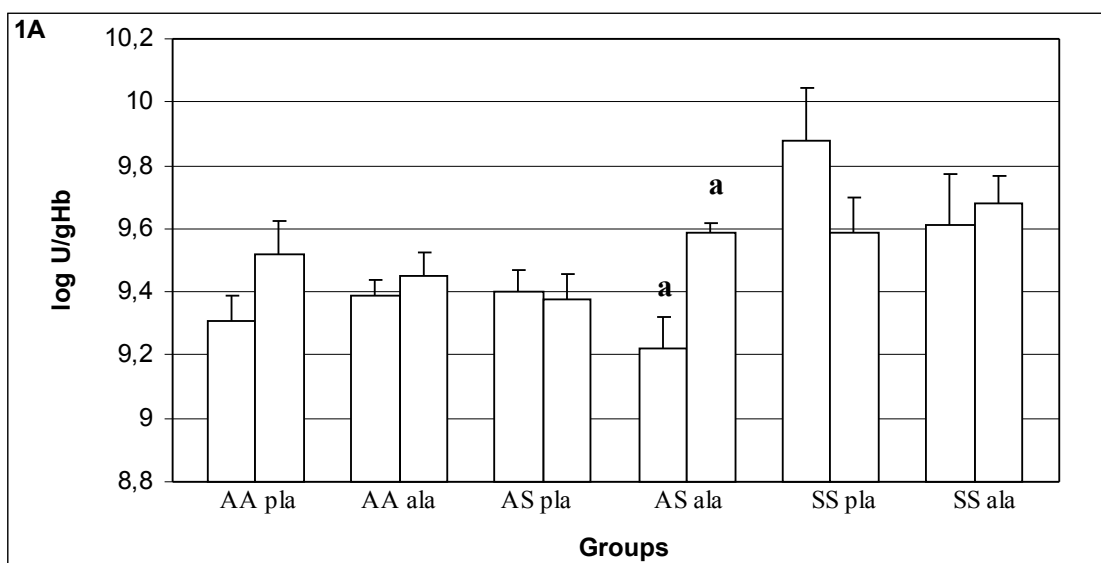
Table 3: Clinical characteristics and anthropometric assessment of the subjects

before and after the treatment.

Values are expressed as mean ± SD, p<0,05 . ¹ Significant increase after the ALA treatment. Pla: placebo treatment; ala: alpha-lipoic acid treatment. M: male; F: female.

Enzyme activity

Data on the enzyme activities of the healthy controls, sickle cell trait subjects and patients with sickle cell anemia are shown in **Figure 1**. Erythrocytes from sickle cell trait subjects presented significant increase in CAT activity after ALA supplementation (**Figure 1A**). All groups showed significant reduced GPx activity after the treatment (**Figure 1B**). On the other hand, SOD activity was not different in any group (**Figure 1C**).



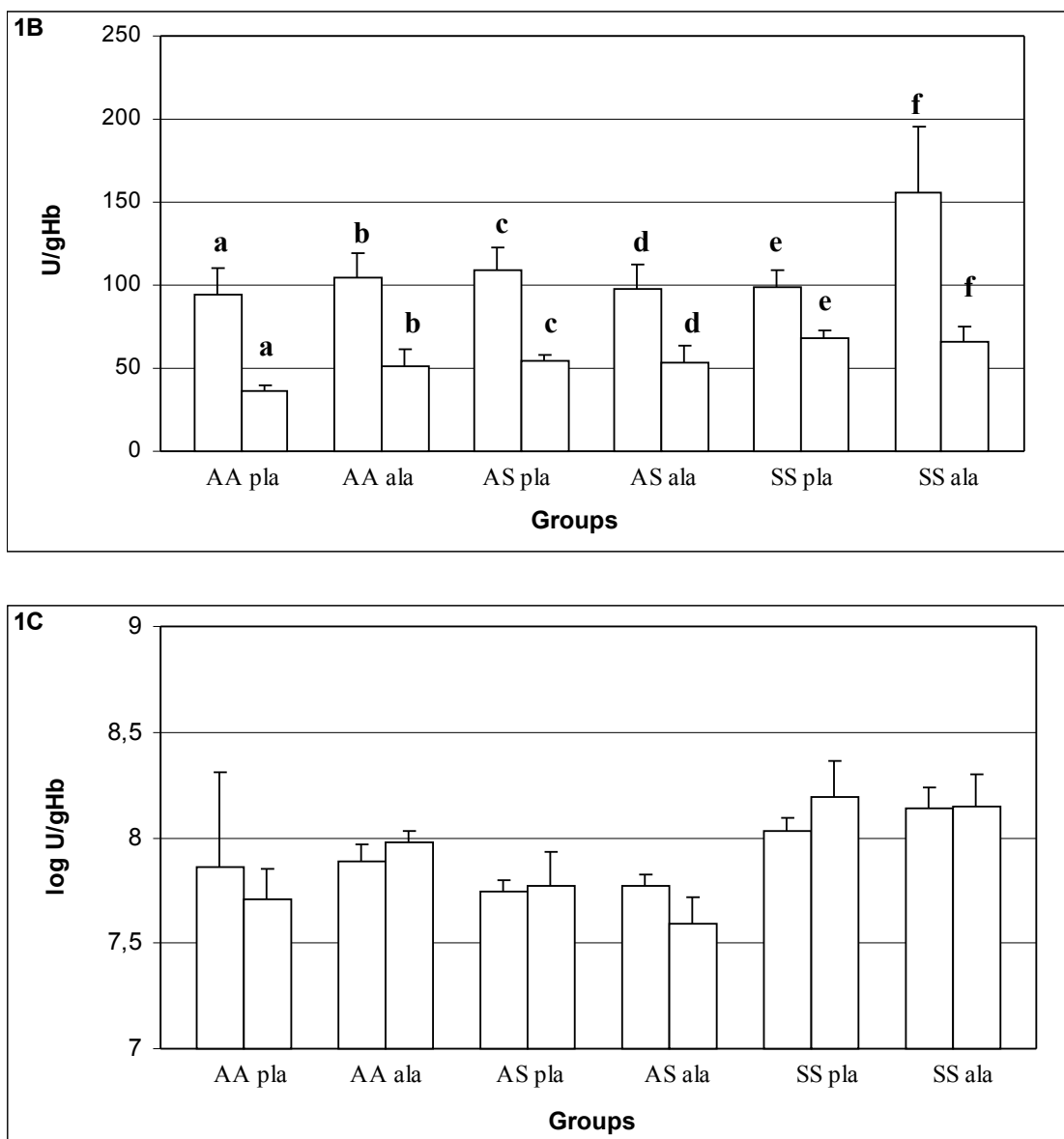


Figure 1: Enzyme activities in normal subjects (AA), sickle cell trait subjects (AS) and sickle cell patients (SS) before (white bars) and after (grey bars) treatment. Values are expressed as mean \pm SEM. Paired t test was done, significance was defined to $p < 0, 05$. The equal letters indicate significant differences between the means. **1A)** Catalase activity; **1B)** Glutathione peroxidase activity; **1C)** Superoxide dismutase activity. Pla: placebo treatment; ala: alpha-lipoic acid treatment.

Total Antioxidant Status

The normal AA group that ingested ALA showed significant decrease in the total antioxidant state after the treatment (**Figure 2**).

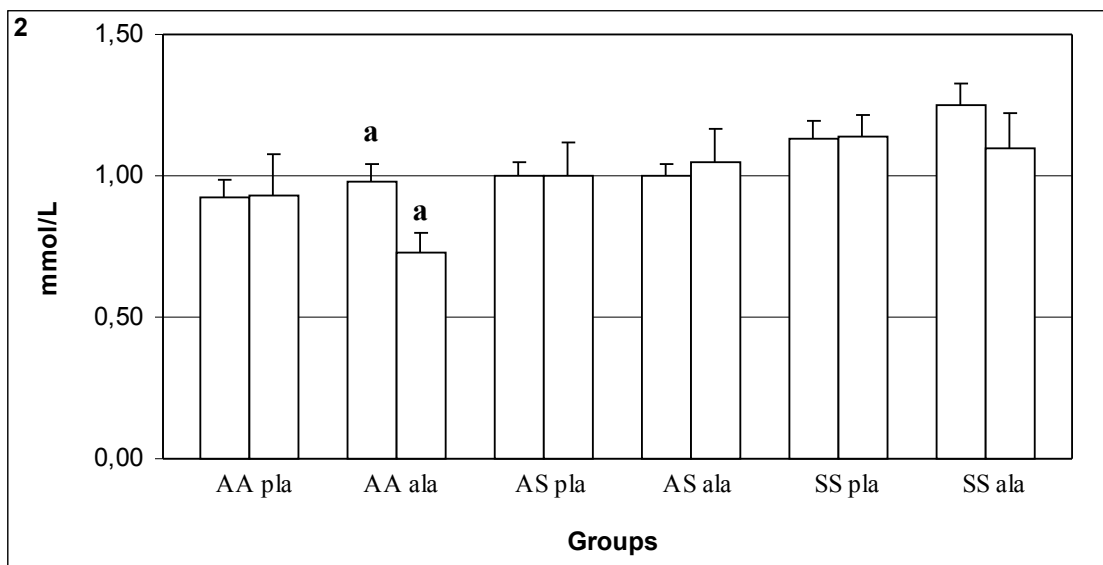


Figure 2: Total antioxidant status in serum of normal subjects (AA), sickle cell trait subjects (AS) and sickle cell patients (SS) before (white bars) and after (grey bars) treatment. Values are expressed as mean \pm SEM. Paired *t* test was done, significance was defined to $p < 0, 05$. The equal letters indicate significant differences between the means. Pla: placebo treatment; ala: alpha-lipoic acid treatment.

Carbonyl Assay

The carbonyl content in plasma proteins from RBCs are shown in **Figure 3**. There was a significant decrease in carbonyl levels of AA group after ALA supplementation.

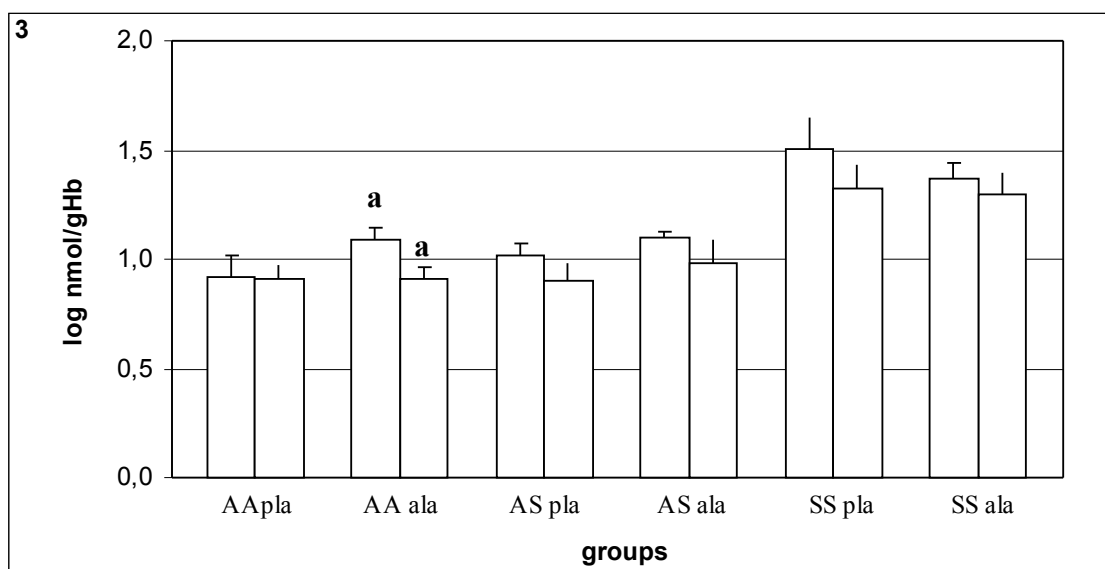


Figure 3: Carbonyl content in plasma of normal subjects (AA), sickle cell trait subjects (AS) and sickle cell patients (SS) before (white bars) and after (grey bars) treatment. Values are expressed as log mean \pm SEM. Paired *t* test was done, significance was defined to $p < 0, 05$. The equal letters indicate significant differences between the means. Pla: placebo treatment; ala: alpha-lipoic acid treatment.

Malondialdehyde determination

The lipid peroxidation index was determined on the basis of MDA levels. Surprisingly, the AA group also exhibited significant reduction in MDA levels after ALA treatment (**Figure 4**).

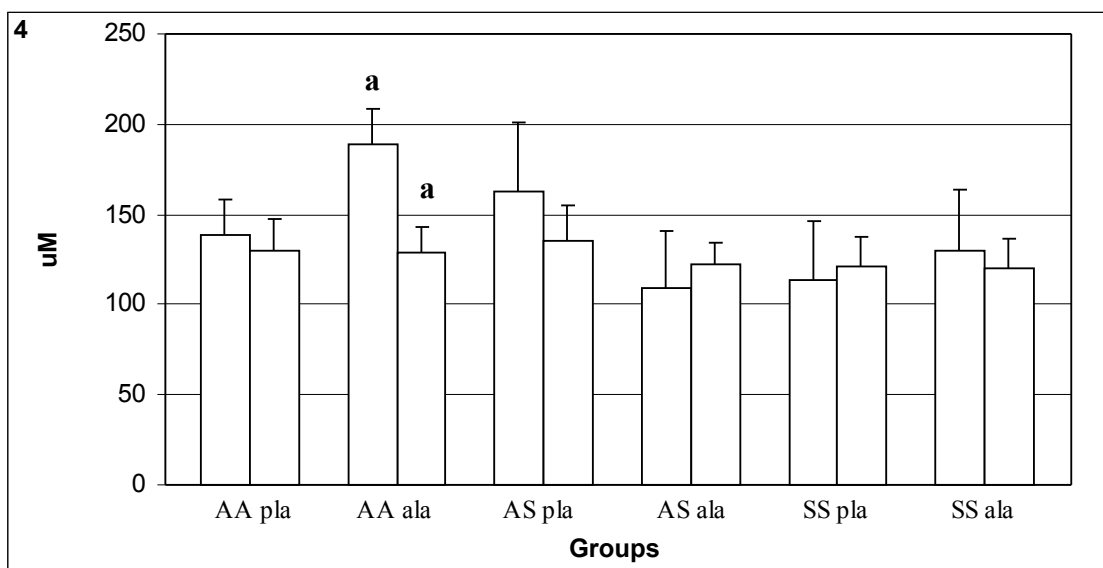


Figure 4: Malondialdehyde levels in serum of normal subjects (AA), sickle cell trait subjects (AS) and sickle cell patients (SS) before (white bars) and after (grey bars) treatment. Values are expressed as mean \pm SEM. Paired t test was done, significance was defined to $p < 0, 05$. The equal letters indicate significant differences between the means. Pla: placebo treatment; ala: alpha-lipoic acid treatment.

DISCUSSION

Results of blood characteristics, as expected, showed erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and transferrin values below the normal physiologic levels in SCD patients. It is probably due to the fact that these patients are subjected to a state of chronic anemia caused by frequent hemolysis. On the other hand, these successive hemolytic crisis and repeated blood transfusion to prevent complications generate a chronic iron overload status (29, 30) and consequent increase in the ferritin levels. Reticulocytes, the erythrocyte precursors, were also elevated in SCD patients as result from premature erythrocyte lyse.

Anthropometry data showed increase in weight and consequently in BMI of the SS group after the ALA supplementation. It was a positive result because this was the only group that presented malnutrition cases (data not shown). Kim et al. (31) showed that ALA may act as an anti-obesity agent reducing food intake and body weight in rodents since ALA suppresses AMP-activated protein kinase, which functions as a fuel sensor in the cell and is activated upon energy depletion. Suppression of AMP-activated protein kinase in the brain is a signal for filled energy stores and leads to a restriction in food intake. However, data are still insufficient to determinate the ALA anti-obesity effect in humans. SCD patients present increased resting energy expenditure (REE) compared to healthy control possibly due to elevated red blood cell and/or protein turnover, increased cardiac output and/or an inflammatory response. REE contributes to approximately 70% of total energy expenditure and the increase in REE may contribute to the etiology of the low BMI observed in individuals with SCD (32). Furthermore, frequent bouts of pain and infection may increase

energy expenditure, decrease energy intake and lead to a subsequent energy deficit. Hence, it is possible that these aspects of the SCD malnutrition pathophysiology have been involved in the ALA action on the present result.

Erythrocytes are cells that possess a very specific enzymatic system capable to reduce and neutralize free radicals. The first line of enzymatic antioxidants is SOD, which catalyses dismutation of the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) into H_2O_2 , that is converted to H_2O by CAT and GPx in synergy with GSH. GPx can also reduce organic peroxides into their corresponding alcohols (33). In the present study, it is possible that CAT activity was stimulated in the AS group due to an increase in H_2O_2 production. Nevertheless, there was no difference in SOD activity in any group assessed. Since H_2O_2 levels were not evaluated, data are insufficient to determinate the reason of the increase in CAT activity in AS group but, the results indicate that ALA is involved in this process since CAT activity did not show alteration in the AS placebo group (Figure 1A).

On the other hand, GPx activity decreased in all the groups (Figure 1B). GPx activity is dependent on reduced glutathione (GSH) levels. The ratios of reduced (GSH) to oxidized (GSSG) glutathione in normal cells are high; conversion of GSSG back to GSH is achieved by glutathione reductase enzymes, which catalyze this reaction using NADPH as the electron acceptor (34). So, GSH levels influence GPX activity and act as a very important antioxidant compound. GSH is formed in a stepwise process from its constituent amino acids: glutamate, cysteine, and glycine (35). Cellular free cysteine is maintained at low concentrations by incorporation into glutathione, and cysteine is generally considered to be the rate-limiting substrate for

the formation of glutathione (36). Because of the importance of a constant amino acid supply for glutathione production, feeding diets that are marginal in protein could conceivably lead to a problem in maintaining the cellular glutathione content (37). It was reported that dietary cysteine depletion causes significant decreases in glutathione and cysteine concentrations in liver, spleen and heart if the diet does not contain an adequate amount of methionine. Thus, the level of cysteine also affects the intracellular glutathione quantity. (38) The foods provided to the subjects did not include animal sources of protein that are the richest sources of essential amino acids. This is because the animal protein is also the principal source of heme-iron which is harmful to the SCD patient due to the chronic iron overload status. However, the diet of the SCD patients might have small quantities of the animal protein (meat, specially) to prevent high iron intake but sufficient to supply the essential amino acids. Moreover, most individuals enrolled in this study were from families with low remuneration (48% receiving monthly one Brazilian minimum salary, \cong U\$ 200.00). Hence, it is possible that their protein intake has been prejudiced and that this had influenced GSH levels in erythrocytes. Although the present result suggest that the decrease in GPx activity is probably due to a nutritional factor, more data are necessary to understand the responsible mechanism.

On the other hand, AA group treated with ALA presented significant reduction in MDA and carbonyl levels (Figure 4). Total antioxidant status (TAS) also showed a significant decrease in the same group (Figure 2). It seems that ALA, in the AA group, actuated in synergism with the cellular antioxidants compounds to protect and to reduce oxidative damage and this resulted in TAS depletion.

Sickle cell patients (SS group) did not show any change in the enzyme activities of CAT, GPx and SOD (Figures 1A,B and C, respectively) or oxidative damage in plasmatic proteins and membrane lipids assessed by the carbonyl (Figure 3) and MDA (Figure 4) assays, respectively. It is possible that this ALA dose (200 mg/day) was not sufficient to reduce cellular damage or even improve the antioxidant profile of these patients. ALA has been studied as a therapeutic agent in a variety of diseases, primarily in the treatment of diabetic neuropathies. Recently, ALA has been suggested as a new treatment option for Alzheimer- type dementia (39). A recent meta-analysis comprising 1,258 diabetic patients with symptomatic distal symmetric polyneuropathy (DSP) from four randomized clinical trials suggested that treatment with ALA using 600 mg i.v. as a daily infusion for 3 weeks reduced pain, paresthesia, and numbness to a clinically meaningful degree (40). Another study conducted as a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-response trial used ALA treatment (600; 1,200; and 1,800 mg/day) over 5 weeks (41). The authors conclude that an oral dose of 600 mg once daily appears to provide the optimum risk-to-benefit ratio.

In our study, we have applied a 200mg/day dose, which would be the minimum necessary to produce an antioxidant effect. However, since there are data that support the safety of oral ALA supplementation, it is possible that higher doses produce beneficial effects in SCD. (42) This is the first work that assessed only ALA as an antioxidant agent in SCD treatment. Although our results have demonstrated a positive effect of the treatment in normal individuals, data in SCD are still insufficient to evaluate the real ALA effect in this pathology. Future studies should test a higher

dose of ALA and assess other antioxidant parameters related to inflammatory process in SCD.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are deeply indebted to the many patients with sickle cell anaemia, trait and the control subjects who donated blood for these studies. We are grateful to Carem Fortunato from CAPAF/RS for their help in subject selection. We wish also thank to the Banco de Alimento/RS for provided monthly the food to the subjects and their families. The authors also wish to thank Dr. C. R. Carlini for generously providing the equipments.

REFERENCES

1. Ahmed SG, Ibrahim UA. Haemoglobin-S in sickle cell trait with papillary necrosis. *Journal of Clinical Investigation* 2006; 115:408–417.
2. Kiryluk K, Jadoon A, Gupta M, Radhakrishnan J. Sickle cell trait and gross renal artery stenosis. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117:706–710.
3. Tomer A, Harker LA, Kasey S, Eckman JR. Thrombogenesis in sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107:398–407.
4. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 113:721–728.
5. Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E. Red blood cells, nuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated. *Journal of Haematology* 2005; 132 : 108–113.
6. Aslan M, Ryan TM, Adler B et al. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vasodilation in sickle cell disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98:15215–15220.
7. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: implications for microvascular pathophysiology. *Microcirculation* 2004; 11:129–151.
8. Kaul DK, Hebbel RP. Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in sickle cell mice but not in normal mice. *J. Clin. Invest* 2000; 106:411–420.
9. Osarogiagbon UR, Choong S, Belcher JD, Vercellotti GM, Paller MS, Hebbel RP. Endothelial dysfunction and microvascular pathophysiology in sickle transgenic mice. *Blood* 2000; 96:314–320.
- 10.** Dasgupta T, Hebbel RP, Kaul DK. Protective effect of arginine on oxidative stress in sickle cell disease mouse models. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 41:1771–1780.

11. Chiu D, Lubin B. Abnormal vitamin E and glutathione peroxidase levels in sickle cell disease. *Laboratory and Clinical Medicine* 1979; 94: 542-548.
12. Natta CL, Chen LC, Chow CK. Selenium and Glutathione Peroxidase Levels in sickle cell disease. *Haematologica* 1990; 83: 130-132.
- 13.** Antunes F, Salvador A, Marinho HS, Alves R, Pinto RE. Lipid peroxidation in sickle cell disease. An integrative Kinetic model. *Free Radical Biology and Medicine* 1996; 21: 917-943.
14. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species in disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* 1996, 313: 17-28.
15. Stadman ER, Berkett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging. *Research in Toxicology* 1997; 10: 485-494.
- 16.** Ohnishi ST, Ohnishi T, Ogunmola GB . A Nutritional Approach to Sickle Cell Disease. *Journal of Nutrition* 1995; 125: 330 –338.
- 17.** Wollin SD, Jones PJH: Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition* 1995; 125: 3330.
18. Perez GO, Castaneda REG. Therapeutic perspectives on the combination of α -lipoic acid and vitamin E. *Nutrition Research* 2006; 26: 1-5.
19. Marangon K, Devaraj S, Tirosh O, Packer L, Jialal I. Comparison of the effect of α -tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1999; 27: 1114–1120.
20. Constantinescu A, Tritschler H, Packer L. Alpha-lipoic acid protects against oxidative damage to erythrocytes induced by peroxy radicals. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 33: 669–679.

21. Lexis LA, Fassett RG, Coombes JS. α -Tocopherol and α -Lipoic Acid Enhance the defence in Cyclosporine A-Treated Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006; 98: 68–73.

22. Wilson JB, Headlee ME, Huisman TH. A new high performance liquid chromatography method for the separation and quantitation of various hemoglobin variants in adults and newborn babies. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Medicine* 1983; 102: 174-186.

23. Sutton M, Bouhassira E, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification and genotyping of the β -like gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology* 1989; 32: 66-69.

24. World Health Organization. WHO consultation on obesity; prevention and control. Geneva WHO, 1998. Internet: <http://www.who.int/childgrowth/standards/en/> (accessed 5/10/2006)

25. Taniguchi N, Gutteridge J M C. Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species. Oxford: Oxford University Press, 2000.

26. Pinto RE, Bartley W. Effect of age and sex on Glutathione reductase and glutathione S-transferase activities and on aerobic Glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochemical Journal* 1969; 112: 1-10.

27. Levine RL, Garland D, Oliver CN et al. Damage to proteins and lipids tissues by reactive oxygen species. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 464-478.

28. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free iron in serum by HPLC-UV. *LCGC North America* 2004; 22: 362-365.

29. Darbari D, Loyevsky M, Gordeuk V et al. Fluorescence measurements of the labile iron pool in neutrophils. *Blood* 2003; 102: 357-364.

30. Harmatz P, Butensky E, Vichinsky E. Severity of iron overload in patients with chronic red blood cell transfusion therapy. *Blood* 2000; 96: 76-79.

31. Kim MS, Park JY, Namkoong C et al. Anti-obesity effects of α -lipoic acid on hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine* 2004; 10: 727-733.

32. Fung EB, Malinauskas BM, Kawchak DA et al. Energy expenditure and intake in mice during acute illness. *Clinical Nutrition* 2001; 20: 131-138.

33. Cheng TY, Zhu Z, Masuda S, Morcos NC. Effects of multinutrient antioxidant defense systems in healthy human beings. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2001; 12: 388–

34. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. New York: Wiley, 2007.

35. Larsson A, Holmgren A, Orrenius A, Mannervik B. *Functions of glutathione: biochemical, toxicological, and clinical aspects*. New York: Raven Press, 1983.

36. Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Semin Liver Dis* 1998;

37. Jackson AA, Gibson NR, Lu Y, Jahoor F. Synthesis of erythrocyte glutathione in relation to the safe amount of dietary protein. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 101–107.

38. Takeuchi F, Izuta S, Tsubouchi R, Shibata Y. Glutathione levels and related enzymes in B-6-deficient rats fed a high methionine and low cystine diet. *The Journal of Nutrition* 1991; 121:

39. Teichert J, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Plasma kinetics, metabolism, and effects of α -lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2003; 43:1257-1267.

40. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant α -lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med* 2004; 21:114–121.

41. Ziegler D, Ametov A, Barinov A et al. Oral Treatment With α -Lipoic Acid in Diabetic Polyneuropathy: The SYDNEY 2 trial. *Diabetes Care* 2006; 29:2365-2370.

42. Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of α -lipoic acid in humans. *Toxicology and Pharmacology* 2006; 46: 29–41.

3.2 Material e Métodos Suplementares

3.2.1 Amostras Clínicas

O sangue periférico (10 mL) foi coletado por punção venosa realizada por profissionais capacitados, utilizando EDTA 5% e citrato 2% como anticoagulantes e tubo sem anticoagulante com gel separador. O tubo de vácuo foi imediatamente aberto após a coleta, para evitar o processo de falcização dos eritrócitos dentro dos tubos. O plasma foi removido após consecutivas centrifugações (10 min, 1500 rpm) e lavado com NaCl (0,9% p/v). Os eritrócitos foram resuspendidos em PBS (50 mM NaCl, 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,4). Para a obtenção dos extratos, as hemácias foram lisadas utilizando etanol 2% (1:10).

3.2.2 Índices Hematimétricos

Os hemogramas foram obtidos utilizando o equipamento ABX Micros 60[®] (ABX Diagnostics Ltda), em contador automatizado de células (método de impedância). O exame diferencial foi realizado através de extensão sangüínea com coloração de May Grunwald – Giensa e visualizado ao microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada mediante análise de 100 leucócitos.

3.2.3 Transferrina

A transferrina foi quantificada no soro por método imunoturbidimétrico, utilizando o Kit Transferrina Turbiquest® (Labtest Diagnóstica Ltda), sendo que os resultados foram expressos em mg/dL.

3.2.4 Ferritina

A dosagem da ferritina no soro foi realizada no aparelho Cobas Mira Plus (Roche®) segundo o protocolo do kit Ferritina Turbiquest® (Labtest Diagnóstica Ltda) utilizando a turbidimetria para quantificação final em ng/mL.

3.2.5 Vitamina C

Os níveis séricos de vitamina C e MDA foram medidos simultaneamente pelo método descrito por Mustafa Karatepe. Ao soro foi adicionado 0,6 mL de ácido perclórico 0,1M e, após a centrifugação (10 min, 4500 rpm), injetou-se 100 µL no HPLC. Utilizou-se uma coluna LC-18-DB, cuja fase móvel era composta por 82,5:17,5 (v/v) de fosfato de potássio monobásico 30 mM e metanol (pH 3,6). O efluente foi monitorado a 250 nm (KARATEPE *et al.*, 2004).

3.2.6 Descarte de reagentes

O descarte do material biológico foi realizado segundo resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.3 Resultados Suplementares

3.3.1 Níveis Vitamina C em Soro

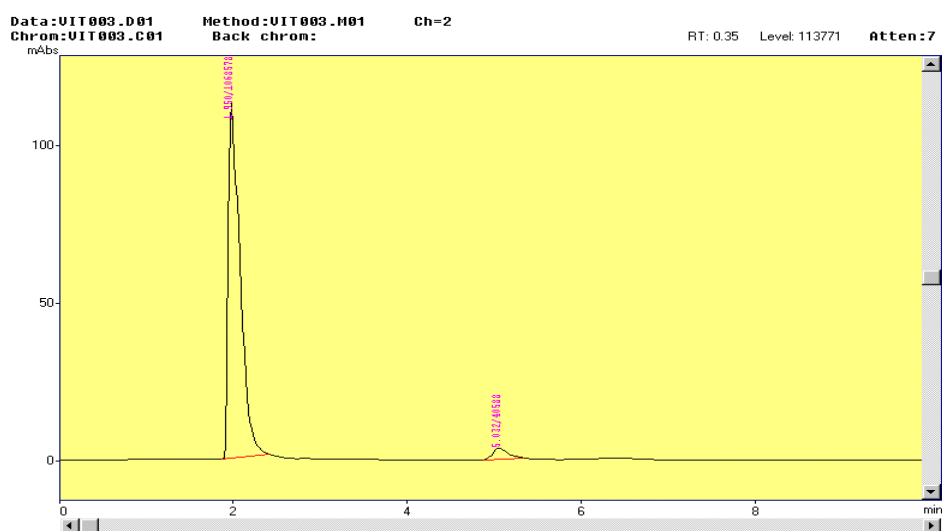


Figura 5: Cromatograma representativo da vitamina C e do MDA, respectivamente, de um doente falciforme (HbSS). Os picos da vitamina C e do MDA eluem a 1, 950 min e 5, 032 min, e possuem uma área de 1068578 e 40588, respectivamente.

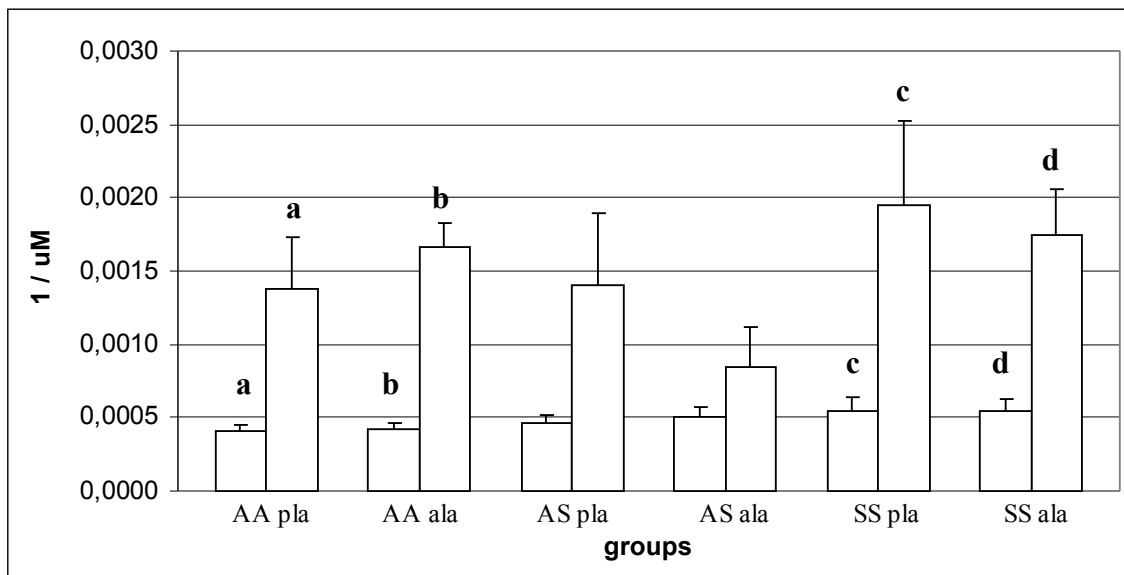


Figura 6: Níveis de Vitamina C em soro de indivíduos normais (AA), traço-falciformes (AS) e pacientes falciformes (SS) antes (barras brancas) e após (barras cinza) o tratamento. Os valores são expressos como média \pm EP. Os dados foram transformados (1/x) e o teste *t* de Student para amostras pareadas foi aplicado. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. As letras iguais indicam médias estatisticamente diferentes entre si. Pla: tratamento com placebo; ala: tratamento com ácido lipóico.

Surpreendentemente, na quantificação dos níveis séricos de vitamina C, os resultados mostraram diminuição significativa nos grupos AA e SS tratados, tanto com AL, como com PLA. O grupo AS também apresentou diminuição dos níveis de vitamina C, contudo este dado não foi significativo.

3.3.2 Tabela de Frequência de Consumo Alimentar

Tabela 4: Frequência (%) de consumo alimentar dos indivíduos normais (HbAA), traço-falciformes (HbAS) e pacientes falciformes (HbSS) antes da suplementação.

HbAA						
Frequência de consumo						
Alimento	nunca	1-2x/dia	<3x/sem	>3x/sem	<4x/mês	>4x/mês
Arroz	0	88	0	12	0	0
Feijão	5	94	0	0	0	0
Carne vermelha	5	53	18	0	24	0
Frango	5	19	38	25	13	0
Peixe	25	0	0	0	75	0
Fígado	60	0	20	0	20	0
Ovos	0	6	50	19	25	0
Frutas	0	13	50	25	0	12
Soja*	80	0	0	0	20	0
Chá verde	75	20	5	0	0	0
Leite e derivados	5	90	0	5	0	0
Verduras**	6	32	50	6	6	0
Azeite de Oliva	50	0	30	5	15	0
Bolacha recheada	25	6	19	0	50	0
HbAS						
Alimento	nunca	1-2x/dia	<3x/sem	>3x/sem	<4x/mês	>4x/mês
Arroz	0	86	14	0	0	0
Feijão	0	86	14	0	0	0
Carne vermelha	0	56	19	0	25	0
Frango	0	15	38	8	31	8
Peixe	20	0	7	0	73	0
Fígado	46	0	0	0	54	0
Ovos	7	58	21	0	7	7
Frutas	0	69	19	6	6	0
Soja*	86	7	0	0	0	7
Chá verde	47	20	13	0	20	0
Leite e derivados	0	73	0	0	20	7
Verduras**	8	0	31	15	46	0
Azeite de Oliva	71	7	15	0	0	7
Bolacha recheada	57	0	21	7	15	0
HbSS						
Alimento	nunca	1-2x/dia	<3x/sem	>3x/sem	<4x/mês	>4x/mês
Arroz	0	100	0	0	0	0

Feijão	0	92	0	0	8	0
Carne vermelha	0	77	15	8	0	0
Frango	15	31	40	7	7	0
Peixe	0	0	46	0	54	0
Fígado	35	0	15	0	50	0
Ovos	14	29	43	7	7	0
Frutas	7	20	60	13	0	0
Soja*	100	0	0	0	0	0
Chá verde	88	0	12	0	0	0
Leite e derivados	25	60	15	0	0	0
Verduras**	25	5	70	0	0	0
Azeite de Oliva	66	8	16	0	0	10
Bolacha recheada	15	23	40	7	15	0

* em grão. ** considerado qualquer tipo de vegetal ingerido como salada ou refogado.

4. DISCUSSÃO

Os índices hematimétricos no grupo falciforme, como esperado, apresentaram valores de eritrócito, hemoglobina, hematócrito e transferrina abaixo dos níveis fisiológicos normais. Este resultado é, provavelmente, devido ao fato de que estes pacientes estão sujeitos a um estado de anemia crônica causado por freqüentes crises hemolíticas. Por outro lado, estas sucessivas crises hemolíticas e repetidas transfusões sangüíneas - muito utilizadas no tratamento de complicações da AF – acabam gerando uma sobrecarga de ferro no organismo (HARMATZ *et al.*, 2000; DARBARI *et al.*, 2003) e conseqüente aumento nos níveis de ferritina. O índice de reticulócitos, células precursoras dos eritrócitos, estava também elevado nos pacientes falciformes como resultado da lise prematura dos eritrócitos na corrente sangüínea. Os indivíduos normais e traço falciformes apresentaram índices hematimétricos normais de acordo com o sexo e a faixa etária conforme era esperado.

Os dados antropométricos mostraram aumento significativo de peso e, conseqüentemente, de índice de massa corporal (IMC) no grupo falciforme após a suplementação com AL. Este foi um resultado positivo visto que o grupo de pacientes falciformes foi o único a apresentar casos de desnutrição. Kim *et al.* (2004) mostraram que AL pode atuar como um agente anti-obesidade reduzindo a ingestão alimentar e o peso corporal em roedores. O AL é capaz de suprimir a proteína cinase ativada-AMP, que funciona como um sensor das reservas energéticas na célula e é ativada no caso de depleção destes estoques. A supressão da proteína cinase ativada-AMP, no cérebro, é um sinal de que as reservas energéticas estão completas e leva à restrição da ingestão alimentar. Contudo, os dados ainda são insuficientes para se determinar o efeito anti-obesidade do AL em humanos (KIM *et al.*, 2004).

Pacientes falciformes apresentam gasto energético basal (GEB) aumentado em relação aos indivíduos saudáveis possivelmente devido ao elevado *turnover* protéico e eritrocitário, ao aumento do débito cardíaco e à resposta inflamatória decorrente da doença. O GEB corresponde a aproximadamente 70% do gasto energético total (GET) e, o aumento do GEB pode contribuir para a etiologia do baixo IMC observado em pacientes falciformes (FUNG *et al.*, 2001). Além disso, as freqüentes crises de dor e infecções podem aumentar o GEB, reduzir a ingestão alimentar e levar à subseqüente déficit energético. Considerando os diversos fatores envolvidos na etiologia da desnutrição e do baixo peso na AF, é possível que estes tenham influenciado e/ou estimulado uma diferente ação do AL nos pacientes SS.

Os eritrócitos são células que possuem um sistema enzimático muito específico capaz de reduzir e neutralizar os radicais livres (RL). A primeira linha de

enzimas antioxidantes é a SOD, que catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e este, por sua vez, é convertido em H_2O e O_2 pela ação da CAT e da GPx sinergicamente com a GSH. A GPx pode também reduzir peróxidos orgânicos em seus correspondentes alcoóis (CHENG *et al.*, 2001). No presente estudo, foi verificado um aumento na atividade de CAT no grupo AS após o tratamento com o AL (Figura 1A do artigo). É possível que este aumento seja resultado de um aumento na produção de H_2O_2 . Por outro lado, os resultados da SOD não mostraram diferença de atividade em nenhum dos grupos estudados. Visto que, no presente trabalho, os níveis de H_2O_2 não foram avaliados, os dados são insuficientes para se determinar os motivos para o aumento na atividade da CAT no grupo AS.

A atividade da GPx, por sua vez, diminuiu em todos os grupos (Figura 1B do artigo). A atividade da GPx é dependente dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). A proporção de GSH para glutathiona oxidada (GSSG) é alta nas células normais. A conversão de GSSG para GSH é feita pela enzima glutathiona redutase, que catalisa esta reação utilizando NADPH como acceptor de elétrons (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Assim, os níveis de GSH influenciam a atividade da GPx e, ela mesma, atua como um importante composto antioxidante. GSH é formada a partir de seus aminoácidos constituintes: glutamato, cisteína e glicina (LARSSON *et al.*, 1983).

A cisteína livre intracelular é mantida em baixas concentrações pela sua incorporação à GSH e é considerada substrato limitante na formação da GSH (LU, 1998). Contudo, a glicina pode ser considerada o aminoácido limitante sob algumas circunstâncias (CHENG *et al.*, 2001). Devido à importância de um suprimento

constante de aminoácidos para a produção de GSH, uma dieta deficiente em proteínas poderia, conceitualmente, levar a problemas na manutenção do conteúdo intracelular deste composto antioxidante (JACKSON *et al.*, 2004).

Um estudo reportou que a depleção dietética de cisteína causa significativa diminuição da concentração de GSH e de cisteína no fígado, baço e no coração caso a dieta não forneça quantidades adequadas de metionina. Assim, os níveis de cisteína afetam também a quantidade intracelular de GSH (TAKEUSHI *et al.*, 1991).

A cesta básica fornecida aos pacientes, neste estudo, não incluiu fontes de proteína animal, que são as mais ricas em aminoácidos essenciais. Isto porque a proteína animal é também a principal fonte de ferro-heme, que é prejudicial aos pacientes falciformes devido à sobrecarga de ferro apresentada por estes indivíduos. Contudo, a dieta destes pacientes deveria conter pequenas quantidades de proteína animal para prevenir uma alta ingestão de ferro-heme, mas suprir as necessidades de aminoácidos essenciais. É interessante salientar que a maioria dos indivíduos incluídos neste estudo pertence a famílias de baixa renda. Assim, é possível que a ingestão proteica dos pacientes tenha sido prejudicada e isto tenha influenciado os níveis eritrocitários de GSH. Embora o presente resultado indique que a diminuição da atividade de GPx, nos indivíduos estudados, seja provavelmente devido à alimentação, mais dados são necessários a fim de se esclarecer seus mecanismos responsáveis.

Considerando que os níveis séricos de vitamina C diminuíram nos grupos AA e SS tanto após o tratamento com placebo quanto com AL (Figura 6), este resultado pode ser decorrente da alimentação. Alguns fatores podem influenciar a biodisponibilidade de vitamina C na dieta, entre eles o modo de preparo dos

alimentos e a baixa ingestão de frutas e verduras. A vitamina C é facilmente destruída pela oxidação e pelo calor. Além disso, por ser hidrossolúvel, é extraída e descartada para a água de cocção (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2002). Frutas e verduras são nossas principais fontes de vitamina C (BLOCK *et al.*, 2001). O Ministério da Saúde recomenda o consumo de, no mínimo, 3 porções de frutas e de verduras diariamente (aproximadamente 400g/dia considerando uma dieta de 2000Kcal) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Os dados do questionário de frequência alimentar indicam uma baixa ingestão de frutas e verduras pela maioria dos indivíduos dos grupos AA e SS. A Tabela 4 mostra que 50% dos indivíduos do grupo AA e 60% do grupo SS consomem frutas menos de 3 vezes por semana. No grupo SS, 7% não costumam incluir frutas na dieta e 25% não consomem verduras. Por outro lado, quase 70% dos indivíduos traço-falciformes consomem frutas de 1 a 2 vezes por dia. Além disso, os alimentos fornecidos aos pacientes durante o período do estudo incluíram somente alimentos não perecíveis. Assim, é possível que esta associação de baixo consumo de frutas e verduras com o não fornecimento de alimentos ricos em vitamina C na cesta básica tenha resultado em diminuição dos níveis desta vitamina.

Após o tratamento com AL, o grupo AA apresentou significativa redução do dano oxidativo em proteínas plasmáticas e em lipídios de membrana representados pelos níveis de carbonil e MDA, respectivamente (Figura 3 e 4 do artigo). O mesmo grupo apresentou também diminuição da capacidade antioxidante total (TAS) após a suplementação com AL (Figura 2 do artigo). De acordo com estes dados, parece que o AL, no grupo AA, atuou em sinergismo com outros compostos antioxidantes para

reduzir o dano oxidativo e isto resultou em depleção da capacidade antioxidante total destes indivíduos.

Os pacientes falciformes (grupo SS) não demonstraram alteração tanto na atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GPx e SOD) quanto nos níveis de dano oxidativo (carbonil e MDA). É possível que a dose de AL utilizada para a suplementação (200 mg/dia) não tenha sido suficiente para reduzir o dano oxidativo ou mesmo melhorar o perfil antioxidante destes pacientes.

O AL tem sido estudado como um agente terapêutico em uma variedade de doenças, principalmente no tratamento da neuropatia diabética. Recentemente foi sugerido o uso do AL no tratamento do Alzheimer (HAGER *et al.*, 2001).

A suplementação da dieta humana com micronutrientes tem se tornado altamente popular nas últimas décadas. Desde o início dos anos 1990, o AL tem sido empregado como suplemento dietético geralmente em doses que variam de 100–200 mg/dia (CREMER *et al.*, 2006). Contudo, uma recente meta-análise compreendendo 1258 pacientes diabéticos, com polineuropatia distal sintomática, provenientes de quatro ensaios clínicos randomizados sugeriu que o tratamento com 600 mg i.v. de AL como infusão diária durante 3 semanas reduz dor, parestesia e dormência em grau clinicamente significativo sem causar efeitos adversos significativos (ZIEGLER *et al.*, 2004). Há evidências de que a dose de 600mg administrada oralmente também é eficaz e reduz os sintomas da polineuropatia diabética (RUHNAU *et al.*, 1999). Em um recente ensaio clínico randomizado, duplo-cego, foram administradas doses orais diárias de AL (600, 1200 e 1800 mg) durante 5 semanas a pacientes diabéticos. Foi concluído que uma dose de 600mg, uma vez

ao dia, parece prover uma ótima proporção risco-benefício no tratamento com o AL (ZIEGLER *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, cada paciente recebeu uma dose diária de 200 mg de AL que deveria ser o mínimo necessário para produzir um efeito antioxidante. Contudo, visto que há dados que suportam a segurança da suplementação com AL (CREMER *et al.*, 2006), é possível que uma dose maior produzisse um efeito benéfico na AF.

Este foi o primeiro trabalho que avaliou somente o efeito do AL como um agente antioxidante no tratamento da AF. Embora nosso trabalho tenha demonstrado um efeito positivo do tratamento em indivíduos normais, os dados ainda são insuficientes para elucidar o efeito real do AL na anemia falciforme.

Assim, uma perspectiva para este estudo é testar uma dose maior de AL (possivelmente 600mg/dia) e avaliar outros parâmetros da capacidade antioxidante relacionados, também, ao processo inflamatório na AF visto que este tem ganhado grande importância na fisiopatologia da doença.

5. Perspectivas do Estudo:

- ❖ Testar uma dose maior de ácido lipóico (600mg/dia);
- ❖ Incluir um número maior de indivíduos por grupo estudado;
- ❖ Medir os níveis de peróxido de hidrogênio em plasma;
- ❖ Medir os níveis de glutathione total em plasma;
- ❖ Medir os níveis de vitamina E em soro;
- ❖ Avaliar e medir marcadores de processo inflamatório;
- ❖ Avaliar quantitativamente o consumo alimentar de vitaminas e outros compostos com ação antioxidante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDALLA, DSP. Estresse Oxidativo e Alimentação. In: Tirapegui, J. Nutrição - Fundamentos e Aspectos Atuais. São Paulo, Atheneu, Cap. 13, p. 181, 2006.

ADDIS, G.; SPECTOR, R.; SHAW, E.; MUSUMADI, L. & DHANDA, C. The physical, social and psychological impact of priapism on adult males with sickle cell disorder. *Chronic Illness*, 3:145-154, 2007

AL-RIMAWI, H.S.; ABDUL-QADER, M.; JALLAD, M.F. & AMARIN, Z.O. Acute splenic sequestration in female children in the north of Jordan. *Journal of Tropical Pediatrics*, 56 (2): 416-420, 2006.

AMER, J.; GHOTI, H.; RACHMILEWITZ, E.; KOREN, A.; LEVIN, C. & FIBACH, E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *British Journal of Haematology*, 132: 108-113, 2005.

ANVISA - Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes, 1ª ed. Brasília, 2001.

ATAGA, K.I. & KEY, N.S. Hypercoagulability in Sickle Cell Disease: New Approaches to an Old Problem. *Hematology*, p. 91-96, 2007

ATAGA, K.I. & ORRINGER, E.P. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *American Journal of Medicine*, 115: 721– 728, 2003.

BALLAS, S.K. & MOHANDAS, N. Pathophysiology of vaso-occlusion. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 10(6): 1229-1239 , 1996.

BANDEIRA, F.M.G.C.; PERES, J.C.; CARVALHO, E.J.; BEZERRA, I.; ARAÚJO, A.S.; MELLO, M.R.B. & MACHADO, C. Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados em hospital Hemope, Recife-PE. *Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia*, 26: 189-194, 2002.

BAUM, K.F.; DUNN, D.T.; MAUDE, G.H. & SERJEANT, G.R. The painful crises of homozygous sickle cell disease. A study of risk factors. *Archives of Internal Medicine*, 147: 1231-1234, 1987.

BECKER, K.; TILLEY, L.; VENNERSTROM, J.L.; ROBERTS, D.; ROGERSON, S. & GINSBURG, H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology*, 34: 163-189, 2004.

BELCHER, J.D.; MAHASETH, H.; WELCH, T.E.; OTTERBEIN, L.E.; HEBBEL, R.P. & VERCELLOTTI, G.M. Heme oxygenase-1 is a modulator of inflammation and vaso-

occlusion in transgenic sickle mice. *Journal of Clinical Investigation*, 116: 808-816, 2006.

BEUTLER, E. The sickle cell diseases and related disorders. 5^a ed. McGraw-Hill, 1995.

BIEWENGA, G.P.; HAENEN, G.R. & BAST, A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*, 29 (3): 315–331, 1997.

BLOCK, G.; NORKU, E.; HUDES, M.; MANDEL, S. & HELZLSOUER, K. Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption? *American Journal of Epidemiology*, 154: 1113-1118, 2001.

BONNER, M. J.; GUSTAFSON, K. E.; SHUMACHER, E. & THOMPSON, R. J. The impact of sickle cell disease on cognitive functioning and learning. *School Psychology Review*, 28(2): 182-193, 1999.

BROWN, R. T.; ARMSTRONG, F. D. & ECKMAN, J. R. Neurocognitive aspects of pediatric sickle cell disease. *Journal of Learning Disabilities*, 26(1): 33-45, 1993.

BRUGNARA, C. Sickle cell disease: From membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 25: 927-933, 2003.

BUNN, H.F. & FORGET, B.G. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspects. 1^a ed. W.B. Saunders Company, 1986.

BUNN, F.H. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 337: 762-769, 1997.

CESQUINI, M.; TORSONI, M.A.; STOPPA, G.R. & OGO, S.H. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57: 124-129, 2003.

CHENG, T.Y.; ZHU, Z.; MASUDA, S. & MORCOS, N.C. Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12: 388–395, 2001.

CHIU, D. & LUBIN, B. Abnormal vitamin E and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 94: 542-548, 1979.

CLARKE, H.J.; JINNAH, R.H.; BROOKER, A.F. & MICHAELSON, J.D. Total replacement of the hip for avascular necrosis in sickle cell anemia. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 71: 465- 470, 1989.

CLASTER, S. & VICHINSKY, E.P. Managing sickle cell disease. *British Medical Journal*, 327: 1151-1155 , 2003.

CONSTANTINESCU, A.; TRITSCHLER, H. & PACKER, L. Alpha-lipoic acid protects against hemolysis of human erythrocytes induced by peroxy radicals. *Biochemistry & Molecular Biology International*, 33: 669–679, 1994.

COVAS, D.T.; LUCENA, A.I.; VIANNA, B.P.P. & ZAGO, M.A. Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica*, 89: 273-280, 2004.

CREMER, D.R.; RABELER, R.; ROBERTS, A. & LYNCH, B. Long-term safety of a-lipoic acid (ALA) consumption: A 2-year study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 46: 193-2001, 2006.

CREMER, D.R.; RABELER, R.; ROBERTS, A. & LYNCH, B. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 46: 29–41, 2006.

DARBARI, D.; LOYEVSKY, M.; GORDEUK, V.; KARK, J.A.; CASTRO, O.; RANA, S.; APPREY, V. & KURANTSIN-MILLS, J. Fluorescence measurements of the labile iron pool of sickle erythrocytes. *Blood*, 102: 357-364, 2003.

DHALLA, N.S.; ELMOSELHI, A.B.; HATA, T. & MAKINO, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 47: 446–456, 2000.

DAILLY, E.; URIEN, S.; BARRÉ, J.; REINERT, P. & TILLEMENT, J.P. Role of Bilirubin in the Regulation of the Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Activity of Plasma in Sickle Cell Disease. *Biochemical and Biophysical Communications*, 248: 303-306, 1998.

DAS, D.K. & ESSMAN, W.B. Oxygen radicals systemic events and disease processes. 1^a ed. Karges Publ. Basel, 1990.

DAVIES, S.C. & ONI, L. Fortnightly review: management of patients with sickle cell disease. *British Medical Journal*, 315:656-60, 1997.

DEAN, J. & SCHECHTER, A. N. Sickle cell anemia: molecular and cellular bases of therapeutic approaches. *New England Journal of Medicine*, 299(14): 752-63, 1978.

DE FREITAS, J.M. & MENEGHINI, R. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutation Research*, 475: 153-159, 2001.

DE JONG, P.E.; DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W. & STATIUS VAN EPS, L.W. The tubular reabsorption of phosphate in sickle-cell nephropathy. *Clinical Science and Molecular Medicine*, 55: 429-434, 1978.

EATON, W. Linus Pauling and sickle cell disease. *Biophysical Chemistry*, 100: 109-116, 2003.

ECKMAN, J.R. Leg ulcers in sickle cell disease. *Hematology/ Oncology Clinics of North America*, 10: 1321-1332, 1996.

EJINDU, V.C.; HINE, A.L.; MASHAYEKHI, M.; SHORVON, P.J. & MISRA, R.R. Musculoskeletal Manifestations of Sickle Cell Disease. *Radigraphics* 27(4): 1005-1021, 2007.

EVANS, J.L. & GOLDWINE, I.D. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2 (3): 401-413, 2000.

FALK, R.J. & JENNETTE, J.C. Renal disease in Sickle cell disease. In: Embury, S.H.; Hebbel, R.P.; Mohandas, N. & Steinberg, M.H. Sickle Cell Disease: Basic Principles and Clinical Practice. New York, Raven Press, p. 673-680, 1994.

FALK, R.H. & HOOD, W.B. The heart in sickle cell anemia. *Archives of Internal Medicine*, 142: 1680-1684, 1982.

FALLETTA, J.M.; WOODS, G.M.; VERTER, J.I.; BUCHANAN, G.R.; PEGELOW, C.H.; IYER, R.V.; MILLER, S.T.; HOLBROOK, C.T.; KINNEY, T.R.; VICHINSKY, E.; BECTON, D.L.; WANG, W.; JOHNSTONE, H.S.; WETHERS, D.L.; REAMAN, G.H.; DEBAUN, M.R.; GROSSMAN, N.J.; KALINYAK, K.; JORGENSEN, J.H.; BJORNSEN, A.; THOMAS, M.D. & REID, C. Discontinuing penicillin prophylaxis in children with sickle cell anemia. Prophylactic Penicillin Study II. *Journal of Pediatrics*, 127: 685-90, 1995.

FRANCK, P.F.H.; BEVERS, E.M. & LUDIN, B. Uncoupling of the membrane skeleton from the lipid bilayer. The cause of accelerated phospholipid flip-flop leading to an enhanced procoagulant activity of sickled cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 75:183-190, 1985.

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

FUNG, E.B.; MALINAUSKAS, B.M.; KAWCHAK, D.A.; KOH, B.Y.; ZEMEL, B.S.; GROPPER, S.S.; OHENE-FREMPONG, K. & STALLINGS, V.A. Energy expenditure and intake in children with sickle cell disease during acute illness. *Clinical Nutrition* 20(2): 131-138, 2001.

GAFFNEY, J.W.; BIERMAN, F.Z.; DONNELLY, C.M.; SUTTON, M.; PIOMELLI, S. & GERSONY, W.M. Cardiovascular adaptations to transfusion/ chelation therapy of homozygote sickle cell anemia. *American Journal of Cardiology*, 62(1): 121-125, 1988.

GASTON, M.H.; VERTER, J.I.; WOODS, G.; PEGELOW, C.; KELLEHER, J.; PRESBURY, G.; ZARKOWSKI, H.; VICHINSKY, E.; IYER, R. & LOBEL, J.S. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia. *New England Journal of Medicine*, 314(25): 1593-1596, 1986.

GEE, B.E. & PLATT, O.S. Growth and development. In: Embury, S.H.; Hebbel, R.P.; Mohandas, N. & Steinberg, M.H. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. New York, Raven Press, p. 589-597, 1994.

GIBSON, J.S. & ELLORY, J.C. Membrane Transport in Sickle Cell Disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 28: 303-314, 2002.

GLADER, B.E. Anemia. In: Embury, S.H.; Hebbel, R.P.; Mohandas, N. & Steinberg, M.H. Sickle cell disease: basic principles and clinical practice. New York, Raven Press, p. 545-553, 1994.

GOLDBERG, M.F. Classification and pathogenesis of proliferative sickle retinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, 71: 649-655, 1971

HAGER, K.; MARAHRENS, A.; KENKLIESM, R.; RIEDERER, P. & MÜNCH, G. Alpha-lipoic acid as a new treatment option for Alzheimer type dementia. *Archives of Gerontology Geriatric*, 32:275-282, 2001.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed, New York, Oxford University Press, 2007.

HALSEY, C. & ROBERTS, I.A.G. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 120: 177-186, 2003.

HAN, D.; HANDELMAN, G.; MARCOCCI, L.; SEN, C.K.; ROY, S.; KOBUCHI, H.; TRITSCHLER, H.J.; FLOHE, L. & PACKER, L. Lipoic acid increases *de novo* synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *BioFactors*, 6: 321-338, 1997.

HARMATZ, P.; BUTENSKY, E. & VICHINSKY, E. Severity of iron overload in patients with sickle cell disease receiving chronic red blood cell transfusion therapy. *Blood*, 96: 76-79, 2000.

HEBBEL, R.P.; EATON, J.W.; BALASINGAM, M. & STEINBERG, M.H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 70: 1253-1259, 1982.

HEBBEL, R.P. Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell and sickle disease pathophysiology. *Blood* 77:214-37, 1991.

HERMANN, R.; NIEBCH, G.; BORBE, H.O.; FIEGER-BUSCHGES, H.; RUUS, P.;

NOWAK, H.; RIETHMULLER, H.; PEUKERT, M. & BLUME, H. Enantioselective pharmacokinetics and bioavailability of different racemic alpha-lipoic formulations in healthy volunteers. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 4: 167–174, 1996.

HILLERY, C.A.; MING, C.D., WINFRED, C.W. & SCOTT, I.P. Hydroxyurea therapy decreases the *in vitro* adhesion of sickle erythrocytes to thrombospondin and laminin. *British Journal of Haematology*, 109: 322-327, 2000.

JACKSON, A.A.; GIBSON, N.R.; LU, Y. & JAHOOOR, F. Synthesis of erythrocyte glutathione in healthy adults consuming the safe amount of dietary protein. *American Journal of Clinical Nutrition*; 80: 101–107, 2004.

JAIN, S.K. & WILLIAMS, D.M. Reduced levels of plasma ascorbic acid (vitamin C) in sickle cell patients: its possible role in oxidant damage to sickle cells *in vivo*. *Clinica Chimica Acta*, 149: 257-260, 1985.

JAMES, H.; NAHAVANDI, M.; WYCHE, M.Q. & TAYLOR, R.E. Quantitative analysis of trimethylsilyl derivative of hydroxyurea in plasma by chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography* , 831: 42-47, 2006.

KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North America*, 22: 362-365, 2004.

KING, S.B. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radicals Biology and Medicine*, 37: 737-744, 2004.

KIZITO, M.E.; MWOROZI, E.; NDUGWA, C. & SERJEANT, G.R. Bacteraemia in homozygous sickle cell disease in Africa: is pneumococcal prophylaxis justified? *Archives of Disease in Childhood*, 92:21–23, 2007.

KLINGS, E.S. & FARBER, H.W. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respiratory Research*, 2: 280–285, 2001.

KUMAR, S. & BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*, 157: 175-188, 2005.

LACHANT, N.A. & TANAKA, K.R. Antioxidants in sickle cell disease: the *in vitro* effects of ascorbic acid. *American Journal of the Medical Sciences*, 292: 3–10, 1986.

LANG, K.S.; ROLL, B.; MYSSINA, S.; SCHITTENHELM, M.; SCHEEL-WALTER, H.G.; KANZ, L.; FRITZ, J.; LANG, F.; HUBER, S.M. & WEDER, T. Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 12: 365-372, 2002.

LARSSON, A.; HOLMGREN, A.; ORRENIUS, A. & MANNERVIK, B. Functions of glutathione: biochemical, physiological, toxicological, and clinical aspects. New York: Raven Press, 1983.

LAVELLE, D.E. The molecular mechanism of fetal hemoglobin reactivation. *Seminars in Hematology*, 4: 3-10, 2004.

LEONARD, M.B.; ZEMEL, B.S.; KAWCHAK, D.A.; OHENE-FREMPONG, K. & VIRGINIA, V.A. Plasma zinc status, growth, and maturation in children with sickle cell disease. *Journal of Pediatrics* 132(3): 467-470, 1998.

LEXIS, L.A.; FASSETT, R.G. & COOMBES, J.S. α -Tocopherol and α -Lipoic Acid Enhance the Erythrocyte Antioxidant Defence in Cyclosporine A-Treated Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98: 68–73, 2006.

LU, S.C. Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Seminars in Liver Disease* 18:331–343, 1998.

MACK, A.K. & KATO, G.J. Sickle cell disease and nitric oxide: A paradigm shift? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38: 1237–1243, 2006.

MAHAN, K. & ESCOTT-STUMP, S. Terapia Clínica Nutricional para Anemia – Anemia Falciforme. In: Krause alimentos, nutrição e dietoterapia. São paulo, Rocca, Cap. 35, p. 771-773, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual da Anemia Falciforme para a População – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

MANTADAKIS, E.; CAVENDER, J.D.; ROGERS, Z.R. & BUCHANAN, G.R. Prevalence of priapism in children and adolescents with sickle cell anaemia. *American Journal of Pediatric Hematology- Oncology*, 21(6): 518–22, 1999.

MARANGON, K.; DEVARAJ, S.; TIROSH, O.; PACKER, L. & JIALAL, I. Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 27: 1114–1121, 1999.

MITCHELL, M.J.; LEMANEK, K.; PALERMO, T.M.; CROSBY, L.E.; NICHOLS, A. & POWERS, S.W. Perspectives on Pain Management, Coping, and Family Functioning in Pediatric Sickle Cell Disease. *Clinical Pediatrics*, 46 (4): 311-319, 2007.

MORIKAWA, T.; YASUNO, R. & WADA, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding α -lipoic acid synthase located in mitochondria. *FEBS Letter*, 498 (1): 16–21, 2001.

MRUK, D.D.; SILVESTRINI, B.; MO, M. & CHENG, Y. Antioxidant superoxide dismutase – a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65: 305-311, 2002.

MUIRHEAD, H.; COX, J.M.; MAZZARELLA, L. & PERUTZ, M.F. Structure and function of haemoglobin: A three-dimensional fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 28: 117-150, 1967.

NAHAVANDI, M.; TAVAKKOLI, F.; HASAN, S.P.; WYCHE, M.Q. & CASTRO, O. Cerebral oximetry in patients with sickle cell disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 34: 143-148, 2004.

NATTA, C. & MACHLIN, L. Plasma levels of tocopherol in sickle cell anemia subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 32: 1359-62, 1979.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. The management of sickle cell disease (NIH Publication No.02-2117). Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2002.

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

NASSERULLAH, Z.; ALSHAMMARI, A.; AL ABBAS, M.; ABU-KHAMSSEEN, Y.; QADRI, M.; JAFER, M. & WABEL, M.A. Regional experience with newborn screening for sickle cell disease, other hemoglobinopathies and G6PD deficiency. *Annals of Saudi Medicine*, 23: 354-357, 2003.

OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red disorder. *Blood Reviews*, 18: 65-73, 2004.

OKPALA, I.; THOMAS, V.; WESTERDALE, N.; JEGEDE, T.; RAJ, K.; DALEY, S.; COSTELLO-BINGER, H.; MULLEN, J.; ROCHESTER-PEART, C.; HELPS, S.; TULLOCH, E.; AKPALA, M.; DICK, M.; BEWLEY, S.; DAVIES, M. & ABBS, I. The comprehensiveness care of sickle cell disease. *European Journal of Haematology*, 68: 157-162, 2002.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DA LA SALUD. Tratamiento de las hemoglobinopatías y de los transtornos afines. Séria de Informes Técnicos, n° 509, 1972.

PACE, B.S. & ZEIN, S. Understanding mechanism of γ -Globin gene regulation to develop strategies for pharmacological fetal hemoglobin induction. *Developmental Dynamics*, 235: 1727-1737, 2006.

PACKER, L.; WITF, E.H. & TRITSCHLER, H.J. Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, 19 (2): 227-250, 1995.

PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.L. & WELLS, I.C. Sickle-cell anemia, a molecular disease. *Science*, 110: 543-548, 1949.

PEREZ, O.G. & CASTANEDA, R.E.G. Therapeutic perspectives on the combination of α -lipoic acid and vitamin E. *Nutrition Research* 26: 1– 5, 2006.

PERUTZ, M.F.; ROSSMAN, M.G.; CULLIS, A.F.; MUIRHEAD, H. & NORTH, A.C.T. Structure of hemoglobin. *Nature*, 185: 416-420, 1960.

PERUTZ, M.F. Molecular pathology of human haemoglobin. *Biochimie*, 54: 621-622, 1972.

PERUTZ, M.F.; PAOLI, M. & LESK, A.M. Fix L, a haemoglobin that acts as an oxygen sensor: signalling mechanism and structural basis of its homology with PAS domains. *Chemistry & Biology*, 6(11): 291-297, 1999.

PERUTZ, M.F. & MITCHINSON, J.M. State of hemoglobin in Sickle cell anemia. *Nature*, 166: 677-680, 1950.

PLATT, O.S.; THORINGTON, B.D.; BRAMBILLA, D.J.; MILNER, P.F.; ROSSE, W.F.; VICHINSKY, E.P. & KINNEY, T.R. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *New England Journal of Medicine*, 235:11-16, 1991.

POWARS, D.R. Sickle cell anemia and major organ failure. *Hemoglobin*, 14: 573-598, 1990.

POWARS, D.R. Sickle-Cell Anemia: β^S Gene-cluster Haplotypes as Prognostic Indicators of Vital Organ failure. *Seminars in Hematology*, 28: 202-208, 1991.

POWARS, D.R.; ELLIOT- MILLS, D.D.; CHAN, L.; NILAND, J.; HITI, A.L.; OPAS, L.M. & JOHNSON C. Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. *Annals of Internal Medicine*, 115(8): 614-620, 1991

POWARS, D.R. & Johnson, C.S. Priapism. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 10: 1363-1372, 1996.

RELJANOVIC, M.; REICHEL, G.; RETT, K.; LOBISCH, M.; SCHUETTE, K.; MÖLLER, W.; TRITSCHLER, H.J. & MEHNERT, H. Treatment of diabetic polyneuropathy with the antioxidant thioctic acid (alpha - lipoic acid): a two year

multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial (ALADIN II). *Free Radical Research*, 31: 171–179, 1999.

REN, H.; GHEBREMESKEL, K.; OKPALA, I.; UGOCHUKWU, C.C.; CRAWFORD, M. & IBEBULAM, O. Abnormality of erythrocyte membrane n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in sickle cell haemoglobin C (HbSC) disease is not as remarkable as in sickle cell anaemia (HbSS). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 74: 1-6, 2006.

REPKA, T. & HEBBEL, R.P. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood*, 78: 2753–2758, 1991.

RICE-EVANS, C.; OMORPHOS, S.C. & BAYSAL, E. Sickle cell membranes and oxidative damage. *Biochemical Journal*, 237: 265–269, 1986.

RICHARD, R.E.; SIRITANARATKUL, N.; JONLIN, E.; SKARPIDI, E.; HEIMFELD, S. & BALU, C.A. Collection of blood stem cells from patients with sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 35: 384-388, 2005.

ROUTHIEAUX, J.; SARCONI, S. & STEGENGA, K. Neurocognitive Sequelae of Sickle Cell Disease: Current Issues and Future Directions. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, 22: 160-164, 2005.

RUHNAU, K.J.; MEISSNER, H.P.; FINN, J.R.; RELJANOVIC, M.; LOBISCH, M.; SCHUTTE, K.; NEHRDICH, D.; TRITSCHLER, H.J.; MEHNERT, H. & ZIEGLER, D. Effects of 3-week oral treatment with the antioxidant thioctic acid (alpha-lipoic acid) in symptomatic diabetic polyneuropathy. *Diabetic Medicine*, 16 (12): 1040–1043, 1999.

SERJEANT, G.R. Sickle-cell disease. *Lancet* 350:725-30, 1997.

SHINAR, E.; STALEV, O.; RACHMILEWITZ, E.A. & SCHRIER, S.L. Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in severe beta thalassemia. *Blood*, 70: 158-164, 1987.

SIDDIQUI, A.K. & AHMED, S. Pulmonary manifestations of sickle cell disease. *Postgraduate Medicine*, 79: 384-390, 2003.

STAMATOYANNOPOULOS, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Experimental Hematology* 33: 259–271, 2005.

STEINBERG, M.H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. *TRENDS in Pharmacological Science*, 27: 204-210, 2006.

STEINBERG, M.H. Sickle cell anemia and fetal hemoglobin. *The American Journal of the Medical Science*, 308: 259-265, 1994.

STEINBERG, M.H. Management of Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 340: 1021-1030, 1999.

STEINBERG, M.H. Predicting clinical severity sickle cell anaemia. *British Journal of Haematology*, 129: 465-481, 2005.

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

STEINBERG, M.H. & RODGERS, G.P. Pathophysiology of Sickle Cell Disease: Role of Cellular and Genetic Modifiers. *Seminars in Haematology*, 38: 299-306, 2001.

STYLES, L.A. & VICHINSKY, E.P. Core decompression in avascular necrosis of the hip in sickle-cell disease. *American Journal of Hematology*, 52:103–107, 1996.

TANGNEY, C.C.; PHILLIPS, G.; BELL, R.A.; FERNANDES, P.; HOPKINS, R. & WU, S.M. Selected Indices of Micronutrients Status in Adult patients with Sickle Cell Anemia (SCA). *American Journal of Hematology* 32: 161-166, 1989.

TAKEUSHI, F.; IZUTA, S.; TSUBOUCHI, R. & SHIBATA, Y. Glutathione levels and related enzyme activities in vitamin B-6-deficient rats fed a high methionine and low cystine diet. *The Journal of Nutrition* 121: 1366-1373, 1991.

TAYLOR, M.Y.; WYATT-ASHMEAD, J.W.; GRAY, J.; BOFILL, J.A.; MARTIN, R. & MORRISON, J.C. Pregnancy loss after first-trimester viability in women with sickle cell trait: Time for a reappraisal? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 194: 1604-1608, 2006.

TEICHERT, J.; KERN, J.; TRITSCHLER, H.J.; ULRICH, H. & PREISS, R. Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *International Journal Of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 36 (12): 625–628, 1998.

TEICHERT, J.; HERMANN, R.; RUUS, P. & PREISS, R. Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 43:1257-1267, 2003.

THOMAS, S.; LOWE, J.E.; KNOWLES, R.G.; GREEN, I.C.; GREEN, M.H.L. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. *Mutation Research*, 402: 77-84, 1998.

TOMER, A.; HARKER, L.A.; KASEY, S. & ECKMAN, J.R. Thrombogenesis in sickle cell disease. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 137: 398–407, 2001.

VERNON, M.I. Sickle-Cell Anemia Hemoglobin: The Molecular Biology of the First "Molecular Disease"—The Crucial Importance of Serendipity. *Genetics*, 167: 1-7, 2004.

VICHINSKY, E. & LUBIN, B.H. Suggested guidelines for the treatment of children with sickle cell anemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1(3): 483-501, 1987.

VICHINSKY, E.P.; EUMAYR, L.D.N.; EARLES, A.N.; WILLIAMS, R.; LENNETTE, E.; DEAN, D.; NICKERSON, B.; ORRINGER, E.; MC KIE, V.; BELLEVUE, R.; DAESCHNER, C.; MANCI, E.A.; ABOUD, M.; MONCINO, M.; BALLAS, S. & WARE, R. Causes And Outcomes Of The Acute Chest Syndrome In Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, 342(25):1855-1865, 2000.

WAGENER, F.A.D.T.G.; ABRAHAM, N.G.; KOOYK, Y.V.; WITTE, T. & FIGDOR, C.G. Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle-cell disease and inflammation. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, 22: 52-54, 2001.

WARE, R.E. & FILSTON, H.C. Surgical management of children with hemoglobinopathies. *Surgical Clinics of North America*, 72(6): 1223-1236, 1992.

WATSON, R.J.; BURKO, H.; MEGAS, H. & ROBINSON, M. The hand-foot syndrome in sickle cell disease in young children. *Pediatrics*, 31: 975-982, 1963.

WAUGH, S.M.; WALDER, J.A. & LOW, P.S. Partial characterization of the copolymerization reaction of erythrocyte membrane band 3 with hemichromes. *Biochemistry*, 26: 1777-1783, 1987.

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

WOLLIN, S.D. & JONES, P.J.H. Alpha-lipoic acid and cardiovascular disease. *Journal of Nutrition*, 133: 3327-3330, 2003.

YASIN, Z.; WITTING, S.; PALASCAK, M.B.; JOINER, C.H.; RUCKNAGEL, D.L. & FRANCO, R.S. Phosphatidylserine externalization in sickle red blood cells: associations with cell age, density, and hemoglobin F. *Blood*, 102: 365-370, 2003.

ZIEGLER, D.; RELJANOVIC, M.; MEHNERT, H. & GRIES, F.A. Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 107 (7): 421-430, 1999.

ZIEGLER, D.; NOWAK, H.; KEMPLER, P.; VARGHA, P. & LOW, P.A. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant α -lipoic acid: a meta-analysis. *Diabetic Medicine*, 21:114-121, 2004.

ZIEGLER, D.; AMETOV, A.; BARINOV, A.; DYCK, P.J.; GURIEVA, I.; LOW, P.A.; MUNZEL, U.; YAKHNO, N.; RAZ, I.; NOVOSADOVA, M.; MAUS, J. & SAMIGULLIN, R. Oral Treatment With α -Lipoic Acid Improves Symptomatic Diabetic Polyneuropathy: The SYDNEY 2 trial. *Diabetes Care*, 29:2365-2370, 2006.

ANEXO 1: Termo de Consentimento

Prezado Paciente

A anemia falciforme é uma doença genética que acomete cerca de 0,01% da população brasileira. É causada por uma alteração estrutural na hemoglobina – proteína transportadora de oxigênio - fazendo com que as células vermelhas do sangue adquiram um formato de foice. É caracterizada por destruição dessas células (hemólise) e episódios de dores abdominais e musculoesqueléticas.

Entretanto, existem pessoas que apresentam o traço falciforme (1:70), ou seja, são indivíduos clinicamente normais, podendo suas células adquirir o formato de foice em algumas situações peculiares.

O ácido alfa-lipóico é uma substância muito utilizada como suplemento alimentar e administrada na forma de cápsulas. É um potente antioxidante via seqüestro de espécies reativas de oxigênio, interações redox com outros antioxidantes e inibição da lipoperoxidação. Seus efeitos benéficos têm sido estudados e reconhecidos principalmente no tratamento do diabetes, contudo estes benefícios são atribuídos principalmente ao controle dos níveis de açúcar do sangue.

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos pedindo a sua participação, tem como objetivo principal avaliar o perfil nutricional de pacientes que apresentam anemia falciforme ou traço falciforme e testar o uso do ácido lipóico como um agente antioxidante no tratamento desta patologia.

Para o desenvolvimento deste trabalho, precisamos de um grupo de pessoas portadoras de anemia falciforme e traço falciforme. Esse grupo de indivíduos receberá cápsulas contendo ou não ácido lipóico que deverão ser administradas diariamente por três meses (sem interrupção) .

Ao final de três e de seis meses (portando serão 3 coletas no total) será coletado o sangue de cada indivíduo para a avaliação nutricional, essas amostras de sangue (10 ml) serão coletadas por um profissional habilitado e com todas as técnicas adequadas.

Os riscos associados ao presente estudo são apenas os de uma coleta de sangue venoso. Pode haver um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue no local da coleta. Lembramos que todo material utilizado é descartável e estéril e o profissional que irá realizar a coleta está capacitado para esta função. Além disso, a quantidade de sangue coletada não fará falta alguma ao paciente.

Os benefícios envolvidos são os de verificar a atividade antioxidante do ácido alfa-lipóico e promover educação nutricional tendo em vista as necessidades dos pacientes e o seu nível sócio-econômico.

Eu, _____, fui informado do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim o desejar, sem prejuízo para o meu tratamento.

O (a) profissional _____ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

() Concordo com a coleta e a utilização do material obtido.

() Concordo com a extração, armazenamento e utilização do DNA obtido.

Paciente: _____

Pesquisador: Prof. Dra. Mara da S. Benfato

Data: ___/___/___

Telefone para esclarecimentos: 0 XX 51-3316-7603

ANEXO 2: Questionário Nutricional**Dados Pessoais**

Nome:
Endereço:
Telefone:

Perfil:

Idade:
Sexo:
Estado civil:
Origem étnica:

Patologias Atuais

Outras doenças graves ou crônicas? Qual(ais)?

Alergias ou intolerância alimentar? Quais?

Medicações em uso (quais? / frequência?)

Qual o tratamento para Anemia Falciforme, se está fazendo? Há quanto tempo?

Informações Nutricionais

Toma algum tipo de suplemento nutricional ? Qual(ais)? _____

Apresentou perda de peso recente não planejada?

() sim () não Quanto? _____ Kg Quanto tempo?

Peso atual: _____ Altura: _____ IMC: _____ (_____)

Peso usual: _____

Quantas refeições / lanches faz por dia? Quais?

() Desjejum () colação () Almoço () Lanche () Jantar () Ceia

Faz ou já fez algum tipo de dieta?Qual?

Toma bebida alcoólica? Com que frequência?

É fumante? () Sim () Não

Sintomas da doença:

Atividade Física

Pratica algum tipo de atividade física ? Qual? _____

Com que frequência? _____

Questionário de Frequência Alimentar

Com que frequência ingere os seguintes alimentos:

Alimento	Vezez p/ semana	Vezez p/ mês	Vezez p/ ano
Arroz			
Feijão			
Macarrão			
Lentilha			
Carne vermelha			
Carne de frango			
Peixe			
Fígado			
Ovos			
Tomate			
Uva			
Maçã			
Laranja			
Limão			
Soja			
Chá (verde)			
Vinho			
Óleo de soja			
Leite			
Queijo			
Azeite de Oliva			
Sardinha			
Espinafre			
Rúcula			
Brócolis			
Mamão			
Cenoura			

Beterraba			
Banana			
Bergamota			
Melancia			
Manteiga			
Margarina			
Bolacha recheada			

ANEXO 3: Curriculum Vitae

Martins, V.D.

1. Dados Pessoais**Nome:** Vanessa Duarte Martins Brandão**Data de Nascimento:** 16/06/1981**Local:** Porto Alegre, RS, Brasil**Telefone:** 9179 3780**E-mail:** vane_nutri@yahoo.com.br**2. Formação Acadêmica / Titulação**

- ❖ Mestrado em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: Mar/2006- Fev/2008. Orientador: Prof. Dra. Mara da Silveira Benfato.
- ❖ Graduação em Nutrição – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período 2001-2005.

3. Atividades Extracurriculares e Estágios

- ❖ Estágio Voluntário de Nutrição na ONG CAPAF – Centro de Apoio ao Portador de Anemia Falciforme (carga horária: 320 h) – Mar /2006 a Nov /2007.
- ❖ Palestra sobre “Necessidades Nutricionais na Anemia falciforme” na V Semana da Consciência Negra promovida pela Secretaria Municipal de Turismo e Cultura de Guaíba – Nov /2006.
- ❖ Oficina/Minicurso: “Dietoterapia na Anemia Falciforme” apresentado no 7º Salão de Extensão da UFRGS – 27/ Set / 2006 com carga horária de 3h.

- ❖ Iniciação Científica (bolsista PROPESQ-Ufrgs) no Laboratório de Estresse Oxidativo do Depto. de Biofísica da UFRGS – Jan /2002 a Mai /2005.
- ❖ Palestra sobre “Treinamento de recursos humanos em unidades de alimentação e nutrição” na disciplina de Administração de Serviços de Alimentação e Nutrição do Curso de Nutrição da UFRGS – Jun/2004
- ❖ Estágio voluntário supervisionado no Serviço de Oncologia Pediátrica do HCPA (carga horária: 210h) – Jan/2004 a Mar/2004.
- ❖ Participação na Campanha de Prevenção de Risco Cardiovascular promovida pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – 20 a 24 / Out / 2003.

4. Artigos Científicos Publicados

- ❖ MARTINS, V.D.; MANFREDINI, V. & BENFATO, M.S. High levels of catalase in sod mutants of *Saccharomyces cerevisiae* in high aeration conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 347-351, 2005.
- ❖ MANFREDINI, V.; MARTINS, V.D. & BENFATO, M.S. Adaptative response to enhanced basal oxidative damage in sod mutants from *S. cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 276: 175-181, 2005.
- ❖ MANFREDINI, V.; MARTINS, V.D. & BENFATO, M.S. Chá verde: benefícios para a saúde humana. *Infarma*, 16: 68-70, 2004.

5. Apresentação em Eventos e Publicação de Resumos

- ❖ XIX Salão de Iniciação Científica. Título do trabalho: Estresse Oxidativo na Anemia por Deficiência de Ferro em Indivíduos Idosos – Propesq/UFRGS, Out / 2007.

- ❖ XIX Salão de Iniciação Científica. Título do trabalho: Alterações na Hemostasia de Pacientes Falciformes podem estar Associadas à Carbonilação do Fibrinogênio – Propesq/UFRGS, Out /2007.
- ❖ XIX Salão de Iniciação Científica. Título do trabalho: Avaliação do Efeito da Qualidade da Alimentação sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo em Indivíduos Traço Falciformes e Pacientes Falciformes – Propesq/UFRGS, Out /2007.
- ❖ Free Radicals in Montivideo 2007. Título do trabalho: Oxidative stress in older patients with iron deficiency anaemia (IDA) – SFRBM, Set /2007.
- ❖ Free Radicals in Montivideo 2007. Título do trabalho: Blood antioxidant parameters in sickle cell trait subjects and sickle cell anaemia patients – SFRBM, Set /2007.
- ❖ Free Radicals in Montivideo 2007. Título do trabalho: Alpha-lipoic acid effect in carbonyl and malondialdehyde levels in sickle cell disease patients and sickle cell trait subjects – SFRBM, Set /2007.
- ❖ Free Radicals in Montivideo 2007. Título do trabalho: Alpha-lipoic acid effect in antioxidant enzymes in the sickle cell disease – SFRBM, Set /2007.
- ❖ IX Jornada de Estudos Farmacêuticos e VII Mostra Científica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Título do trabalho: Terapia Farmacológica na Anemia Falciforme e suas Perspectivas: uma revisão – URI Campus de Erechim, Set /2007.
- ❖ 27ª Semana Científica do HCPA. Título do trabalho: Avaliação do Efeito da Qualidade da Alimentação sobre Parâmetros de Estresse Oxidativo – HCPA, Set / 2007.

- ❖ 27ª Semana Científica do HCPA. Título do trabalho: Alterações na Hemostasia de Pacientes Falciformes podem estar Associadas à Carbonilação do Fibrinogênio – HCPA, Set /2007.
- ❖ 8º Salão de Extensão. Título do trabalho: Anemia Falciforme – Quê doença é essa? – Prorext/UFRGS, Set/2007.
- ❖ 7º Salão de Extensão. Título do trabalho: Anemia Falciforme: Educação para Melhor Qualidade de Vida – Prorext/UFRGS, Set/2006.
- ❖ XVI Salão de Iniciação Científica. Título do trabalho: Atividade Antioxidante do Óleo Volátil de *Baccharis punctulata* - Propesq/UFRGS, Out/2004.
- ❖ XV Salão de Iniciação Científica. Título do trabalho: Níveis Elevados de catalase em Mutantes *SOD* de *S. cerevisiae* em Condições de Alta Aeração - Propesq/UFRGS, Nov/2003.
- ❖ 49º Congresso Nacional de Genética-SBG. Título do trabalho: Ativação de Defesas Antioxidantes Protege os Mutantes *SOD* de *S. cerevisiae* de Dano Intracelular - Águas de Lindóia, SP, Set/2003.
- ❖ XIV Salão de Iniciação Científica. Título do trabalho: Indução da Catalase nos Mutantes *SOD* de *S. cerevisiae* em Condições de Alta Aeração - Propesq-UFRGS, Dez/2002.