



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E BIOQUÍMICOS EM
INDIVÍDUOS MULTITRANSFUNDIDOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marília Sabo Fernandes

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

MARÍLIA SABO FERNANDES

**DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E BIOQUÍMICOS EM
INDIVÍDUOS MULTITRANSFUNDIDOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica.**

Orientador: Prof^o Dr^o Robson Luiz Puntel

Co-orientador: Prof^aDr^a Vanusa Manfredini

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

F363 d Fernandes, Marília Sabo
Determinação de parâmetros oxidativos e bioquímicos em indivíduos
multitransfundidos / Marília Sabo Fernandes. – Uruguaiana, 2012.
77fl; 30 cm.

Orientador: Prof. Robson Luiz Puntel.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do
Pampa, 2012.

1. Indivíduos multitransfundidos. 2. Anemia. 3. Enzimas antioxidantes.
4. Proteínacarbonil. I. Puntel, Robson Luiz. II. Título.

CDU 577.1

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE PARAMETROS OXIDATIVOS E BIOQUÍMICOS EM
INDIVIDUOS MULTITRANSFUNDIDOS**

Elaborada por

Marília Sabo Fernandes

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^o Dr^o **Robson Luiz Puntel** (UNIPAMPA)

Presidente/Orientador



Prof^o Dr^a **Roselei Fachinetto** (UFSM)



Prof^o Dr^o **Michel Mansur Machado** (UNIPAMPA)

Uruguaiana, RS, Brasil

2012

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa

DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E BIOQUÍMICOS EM INDIVÍDUOS MULTITRANSFUNDIDOS

Autora: Marília Sabo Fernandes
Orientador: Prof. Dr. Robson Luiz Puntel
Co-orientador: Prof. Dr. Vanusa Manfredini
Local e Data da Defesa: Uruguaiiana, 07 de dezembro de 2012.

O ferro é um elemento essencial que participa de várias atividades metabólicas das células. No entanto, acredita-se que o excesso de ferro pode ser uma das principais causas de estresse oxidativo, em sujeitos submetidos à terapia de transfusão de sangue. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar os níveis de ferro plasmático e avaliar os marcadores de estresse oxidativo e da atividade das enzimas antioxidantes em indivíduos anêmicos que receberam repetidas transfusões sanguíneas no último ano, em comparação com os controles saudáveis (doadores de sangue). Participaram deste estudo 50 indivíduos multitransfundidos e 20 controles (nenhuma transfusão), divididos em 4 grupos: grupo controle (n = 20); grupo que recebeu até cinco (<5 transfusões) transfusões de sangue (n = 15); grupo que recebeu de cinco a dez (5-10 transfusões) transfusões de sangue (n = 17); grupo que recebeu mais do que 10 (>10 transfusões) transfusões de sangue (n = 18). O conteúdo de ferro plasmático e os marcadores de estresse oxidativo (proteína carbonil, TBARS e DCFH-DA oxidação) foram significativamente mais elevados, enquanto que níveis de total-SH foi significativamente menor nos indivíduos que receberam transfusões de sangue, em comparação aos controles. A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) estavam significativamente diminuídas nos pacientes multitransfundidos quando comparados aos indivíduos controles. Além disso, encontramos correlações estatisticamente significativas entre o número de transfusões, o teor de ferro plasmático, os marcadores de estresse oxidativo (proteína carbonil, TBARS, e total-SH) e a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx). Em resumo, nossos dados confirmam o envolvimento do estresse oxidativo em pacientes anêmicos após repetidas transfusões de sangue. Além disso, verificou-se que as alterações nos marcadores de estresse oxidativo estão significativamente correlacionados com o conteúdo de ferro e o número de transfusões sanguíneas.

Palavras chave: Indivíduos multitransfundidos; anemia, enzimas antioxidantes, proteína carbonil, TBARS, total -SH.

ABSTRACT

Dissertation of Master
Graduate Course in Biochemistry
Federal University of Pampa

OXIDATIVE AND BIOCHEMISTRY PARAMETERS DETERMINATION IN MULTITRANSFUSED SUBJECTS

Author: Marília Sabo Fernandes

Advisor: Robson Luiz Puntel

Co-Advisor: Vanusa Manfredini

Place and Date of Defense: Uruguaiana, December 07, 2012.

Iron is an essential element that participates in several metabolic activities of cells. However, its excess is believed to be a major cause of iron-induced oxidative stress in subjects undergoing blood transfusion therapy. Thus, the objective this study was to determine the plasmatic iron content and evaluate the oxidative stress markers and the activity of the antioxidant enzymes in anemic subjects receiving repeated blood transfusions in the past year, comparing with healthy controls (blood donors). A total of 50 individuals multitransfused and 20 controls (no transfusion), divided into 4 groups: control group (n=20); group that received up to five (<5 transfusions) blood transfusions (n=15); group that received from five up to ten (5 – 10 transfusions) blood transfusions (n=17); group that received over than ten (>10 transfusions) blood transfusions (n=18). Plasmatic iron and oxidative stress markers (protein carbonyl, TBARS and DCFH-DA oxidation) were significantly higher, whereas total -SH levels was significantly lower in subjects receiving blood transfusion compared to controls. Additionally, the activity of the antioxidant enzymes (CAT, SOD and GPx) were significantly lower in the multitransfused subjects when compared to controls subjects. Moreover, we found statistically significant correlations between the number of transfusions, the plasmatic iron content, the oxidative stress markers (protein carbonyl, TBARS, and total -SH) and the activity of the antioxidant enzymes (CAT, SOD, and GPx). In summary, our data confirm the involvement of oxidative stress in anemic patients after repeated blood transfusions. Additionally, we found that the changes in the oxidative stress markers are significantly correlated with both iron content and number of blood transfusions.

Keywords: Multitransfused subjects, anemia, antioxidant enzymes, protein carbonyl, TBARS, total -SH.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Hemocomponentes sanguíneos.....	15
Figura 2. Fisiopatologia da sobrecarga de ferro transfusional.....	16
Figura 3. Homeostase do ferro	18
Figura 4. Redução do oxigênio molecular na mitocôndria.....	20
Figura 5. Sistema enzimático oxidante e antioxidante.....	22

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1: Plasmatic labile iron levels in studied subjects (controls; group <5; group 5-10 and group >10)	49
Figure 2: Pearson's correlation among plasmatic iron content and number of blood transfusions.....	50
Figure 3: Protein carbonyl levels in studied subjects (controls; group <5; group 5-10 and group >10).....	51
Figure 4: TBARS levels in different groups (controls; group<5; group 5-10 and group >10).....	52
Figure 5: DCFH-DA oxidation in different groups (controls; group<5; group 5-10 and group >10).....	53
Figure 6: Total SH levels in different groups (controls; group <5; group 5-10 and group >10).....	54
Figure 7: Pearson's correlation among number of blood transfusions and protein carbonyl (A), TBARS (B) and Total –SH content (C).....	55
Figure 8: Catalase activity in different groups (controls; group <5; group 5-10 and group >10).....	56
Figure 9: Superoxide dismutase activity in different groups (controls; group <5; group 5-10 and group >10).....	57
Figure 10: Glutathione peroxidase activity in different groups (controls; group<5; group 5-10 and group >10).....	58
Figure 11: Pearson's correlation among number of transfusions and CAT (A), SOD (B) and GPx (C) activity.....	59

Figure 12: Pearson's correlation among plasmatic iron content and CAT (A), SOD (B), GPx (C), Total -SH (D), Protein carbonyl (E) and TBARS (F)..... 60-61

LISTA DE TABELAS**ARTIGO CIENTÍFICO**

Table I. Characteristics of the subjects.....	62
Table II. Pearson correlations in both control and multitransfused subjects.....	63

LISTA DE ESQUEMAS**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Esquema 1. Reação de Fenton..... 19

ARTIGO CIENTÍFICO

Scheme1. Fenton Reaction..... 48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ERO - espécies reativas de oxigênio
SUS - Sistema Único de Saúde
CHAD- concentrado de hemácias
HH - hemocromatose hereditária
OH⁻ - radical hidroxila
O₂⁻ - radical superóxido
HO₂ - hidroperoxila
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
GSH - glutationa
GPx - glutationa peroxidase
CAT - catalase
SOD - superóxido dismutase
DNA - Ácido desoxirribonucleico
LPO -peroxidação lipídica
MDA -malondialdeído
CO - grupamentos carbonílicos
Pro - prolina
Arg - arginina
Lis - lisina
Ter - treonina
TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
LDL - lipoproteína de baixa densidade
DCFH-DA -diacetato dediclorofluoresceína
SH - grupamentos tiólicos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Transfusão Sanguínea	14
2.1.1. Hemocomponentes	14
2.1.2. Concentrado de Hemácias	14
2.2. Ferro	17
2.2.1. Homeostase do Ferro	17
2.2.2. Toxicidade	18
2.3. Estresse Oxidativo	19
2.4. Marcadores do Estresse Oxidativo	20
2.4.1. Peroxidação Lipídica	21
2.4.2. Oxidação de proteínas	21
2.4.3. Total-SH	22
2.4.4. Enzimas antioxidantes	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. ARTIGO CIENTÍFICO	24
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	68
7. PERSPECTIVAS	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO I	76

1. INTRODUÇÃO

A transfusão sanguínea pode salvar vidas e existem várias condições hematológicas para as quais a transfusão contínua de concentrado de hemácias é a única terapia disponível (LAMBING et al, 2012). Nos EUA, aproximadamente de 14 a 15.000.000 unidades de sangue são coletadas anualmente e transfundidas em cerca de cinco milhões pessoas (LANGLOIS et al, 2004). Entretanto, os indivíduos que recebem regularmente transfusões de concentrados de hemácias inevitavelmente desenvolvem sobrecarga cumulativa de ferro, e conseqüentemente, risco de toxicidade devido a esse metal (SAZAMA et al, 2010; SHANDER et al, 2009; LAMBING et al, 2012). O excesso de ferro transfusional pode ocasionar inúmeras complicações no organismo (SAZAMA et al, 2010), tais como o estresse oxidativo (FIBACH et al, 2010), peroxidação lipídica (CIGHETTI et al, 2002), osteoporose (TSAY et al, 2010), cirrose, miocardiopatia e distúrbio do sistema endócrino (HERSHKO et al, 2010), hemocromatose (ALLEN, 2010), necrose hepatocelular (TOYOKUNI, 2011), fibrose hepática (RAMM et al, 2005), carcinoma hepatocelular (KEW, 2009), sendo a principal causa secundária de óbito em pacientes com talassemias (SIMÕES et al, 2010). A sobrecarga de ferro afeta a morbidade e a mortalidade em indivíduos dependentes de transfusões sanguíneas (SAZAMA et al, 2010; GHOTI et al, 2010).

O ferro é um metal potencialmente tóxico por ser capaz de catalisar reações de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como a Reação de Fenton, podendo desencadear um desequilíbrio no balanço redox celular. Quando a geração de ERO ultrapassa a capacidade de reparo das defesas antioxidantes do organismo, cria-se um estado denominado de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006; CHUNG et al, 2005). Conseqüentemente, as ERO interagem com vários componentes celulares, ocasionando oxidação de biomoléculas e danos celulares (GHOTI et al, 2010; GATTERMANN et al, 2011; HALLIWELL, 2006; SHANDER et al, 2009; FIBACH & RACHMILEWITZ, 2008).

Considerando que o número de transfusões sanguíneas é um preditor da sobrecarga de ferro nos tecidos, conseqüentemente, as múltiplas transfusões sanguíneas geram risco de toxicidade ao organismo. Entretanto pouco se sabe como as transfusões sanguíneas afetam o sistema antioxidante em seres humanos e poucos estudos foram desenvolvidos até a presente data. Neste contexto, objetivo deste estudo foi determinar os níveis de ferro plasmático e avaliar os marcadores de estresse oxidativo e da atividade das enzimas antioxidantes em indivíduos multitransfundidos, como evidência de estresse oxidativo nesses indivíduos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Transfusão sanguínea

A transfusão sanguínea é uma prática relevante na terapêutica moderna e consiste, resumidamente, na técnica médica de transferência de sangue de um doador saudável a um receptor (BRASIL I, 2008). Somente no Brasil, no ano de 2010, foram realizados o quantitativo de 3.970.792 procedimentos transfusionais, referindo-se a rede pública, serviços filantrópicos, privados conveniados aos SUS e somente privados (BRASIL II, 2011).

2.1.1 Hemocomponentes

Os hemocomponentes são obtidos através do processamento do sangue total oriundo da doação de sangue de um doador saudável. No Brasil, este processo está regulamentado pela Lei nº 10.205, de 21/3/2001, pela Resolução da Diretoria Colegiada nº 153, de 14 de junho de 2004 e pela Portaria nº 1353, de 13 de junho de 2011. Toda doação de sangue deve ser altruísta, voluntária e não-gratificada, assim como o anonimato do doador e o sigilo de suas informações devem ser garantidos. O processamento é feito por meio de centrifugação refrigerada, no qual se fraciona o sangue total em hemocomponentes eritrocitários, plasmáticos e plaquetários (Figura 1).

2.1.2 Concentrado de Hemácias:

O concentrado de hemácias (CHAD) é o hemocomponente constituído pelos glóbulos vermelhos ou eritrócitos, após a remoção do plasma. Os glóbulos vermelhos estão presentes no sangue, em condições normais, por aproximadamente de $4,5$ a $6,5 \times 10^6/\text{mm}^3$. São constituídas basicamente por hemoglobina, uma metaloproteína composta de quatro grupamentos heme que contém o ferro. Tem como função o transporte de oxigênio e gás carbônico no organismo, com meia vida aproximada de 120 dias (VERRASTRO, 2005; PIERGÉ et al, 2008).

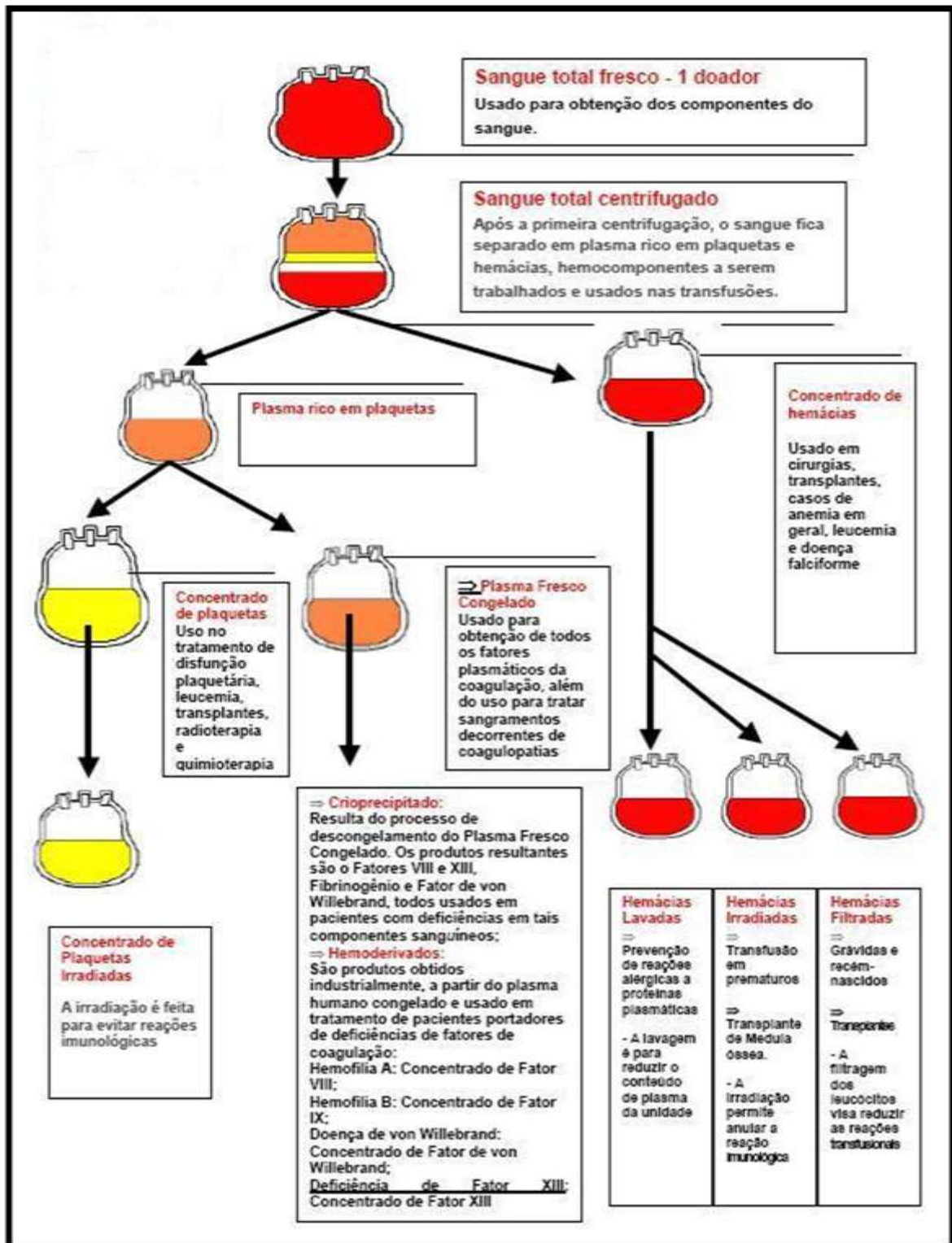


Figura 1. Hemocomponentes sanguíneos.¹

¹Figura disponível em <<http://www.fundaçãohemominas.mg.gov.br>>

As transfusões frequentes de glóbulos vermelhos são necessárias em doenças que estão associadas com a produção ineficaz e/ou o excesso de destruição de eritrócitos, comotalassemia major, doença falciforme, anemia crônica e certas neoplasias malignas. A terapia de transfusão aguda de concentrado de hemácias em pacientes criticamente doentes tem efeitos significativos, como o aumento da mortalidade, a internação prolongada e o risco elevado de infecção hospitalar. A terapia de transfusão crônica de concentrado de hemácias tem como consequência a sobrecarga cumulativa de ferro, podendo catalisar a produção de ERO e está associada às lesões no fígado, coração, e órgãos endócrinos (OZMENT et al, 2009).

Cada unidade de CHAD contém aproximadamente 250 mg de ferro heme, 100 vezes mais do que a ingesta diária desse metal, e o acúmulo significativo de ferro pode ocorrer após a transfusão de 10 a 20 unidades de concentrado de hemácias. Um indivíduo após receber cerca de 20 unidades de CHAD, vai acumular aproximadamente 5g de ferro, excedendo o nível de ferro do organismo e ocasionando sobrecarga de ferro transfusional (SHANDER, 2009; LIST, 2010; ANDREWS, 1999; CRICHTON, 2003; PORTER, 2001; MAJHAIL et al, 2008) (Figura 2).

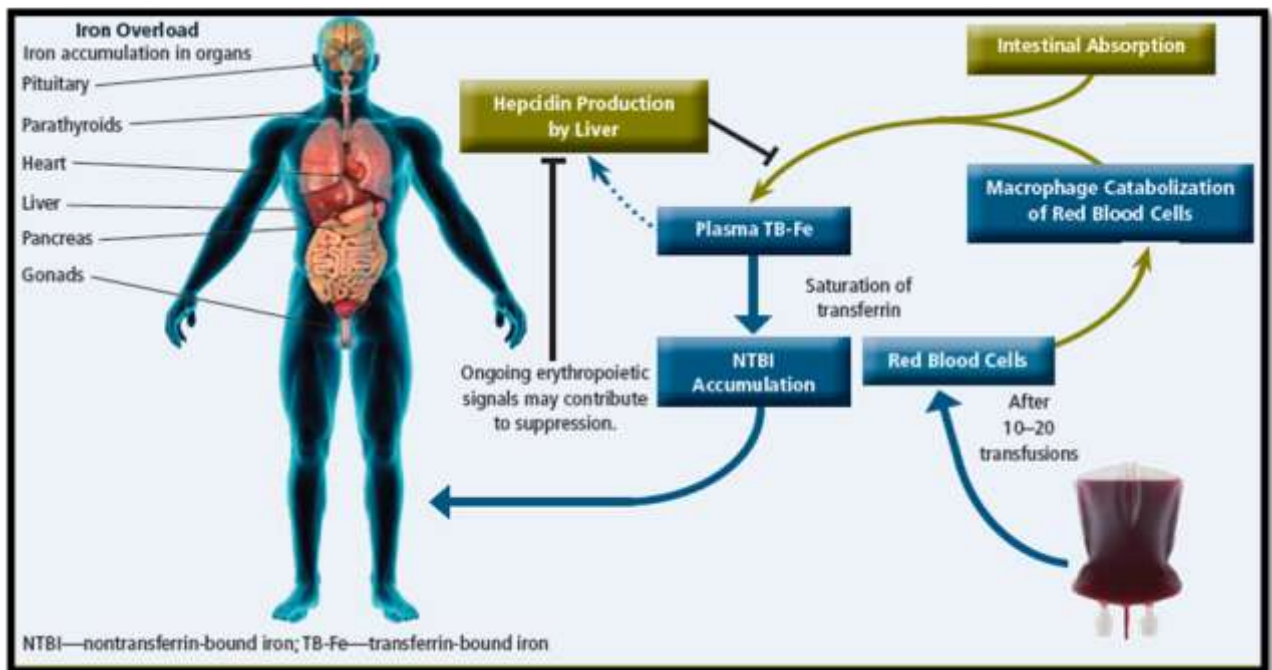


Figura 2. Fisiopatologia da sobrecarga de ferro transfusional.²

²Figura retirada de SHAH et al, 2012

2.2 Ferro

O ferro é um elemento essencial para a atividade celular e desempenha um papel fundamental em várias reações bioquímicas que envolvem o transporte de oxigênio e a transferência de elétrons no metabolismo energético celular (LINDER, 1991; COLPO, 2008; MAJHAIL et al, 2008; SAZAMA et al, 2010). O ferro distribui-se amplamente nos tecidos, totalizando cerca de 3,5 a 4,5g em um indivíduo adulto, onde 70 a 80% são considerados ferro funcional. O ferro circula no plasma ligado a transferrina, e no estado de equilíbrio, não há ferro livre circulante. A maior parte do ferro está incorporado a hemoglobina e o resto é armazenado em ferritina, mioglobina, enzimas ou como ferro livre (SHAH et al, 2012; ANDREWS, 2005).

2.2.1 Homeostase do ferro

A homeostase do ferro é bem regulada no organismo, pois tanto um aporte deficiente, quanto um acúmulo excessivo de ferro conduzem a um desequilíbrio. A absorção do ferro é controlada a nível intestinal pelo regulador hepcidina, que no excesso de ferro inibe sua absorção intestinal e na deficiência de ferro, aumenta a absorção intestinal desse metal (MAJHAIL et al, 2008; SAZAMA et al, 2010). Segundo GHOTI et al, 2010, a hepcidina é o melhor regulador do metabolismo do ferro. A produção de hepcidina é regulada por vários fatores, e está aumentada em resposta a sobrecarga de ferro e inflamação, e diminuída após a hipóxia, intensa atividade eritropoiética e estresse oxidativo (LEE & BEUTLER, 2009) (Figura 3). Pacientes multitransfundidos com mielodisplasia desenvolvem sobrecarga de ferro e estresse oxidativo, suprimindo a produção de hepcidina (LEE & BEUTLER, 2009). Aproximadamente 1-2mg de ferro é eliminado do organismo diariamente pelas secreções corpóreas, descamação da pele e intestino e sangramento menstrual. O organismo não possui um mecanismo específico para eliminar o excesso de ferro, e o aumento do aporte de ferro, tanto por via gastrointestinal como por via parenteral, necessariamente leva a condição patológica de sobrecarga de ferro (GATTERMANN et al, 2011; MAJHAIL et al, 2008; LAMBING et al, 2011; SAZAMA et al, 2010). Distúrbios no metabolismo do ferro podem ser encontrados na hemocromatose hereditária (HH), alguns tipos de anemia (talassemia major, anemia sideroblástica, hemolítica crônica), hepatopatia crônica,

hemodiálise prolongada, hepatite C, porfiria cutânea tarda, síndrome da sobrecarga de ferro, entre outros (FREITAS E MENEGHINI, 2001).

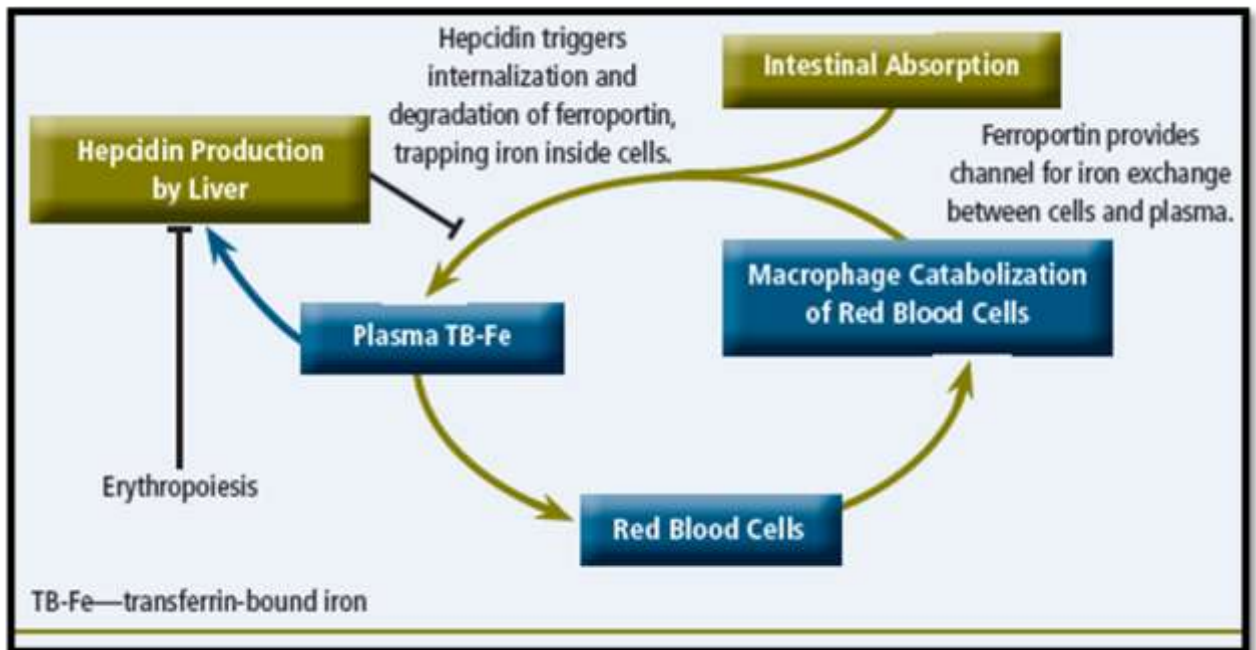


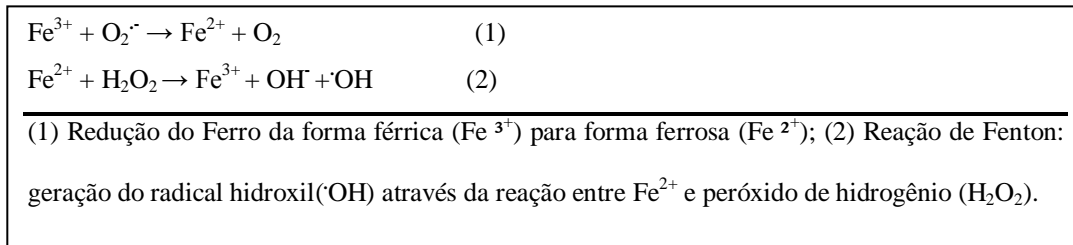
Figura 3. Homeostase do ferro.³

2.2.2 Toxicidade

O ferro é um metal potencialmente tóxico por ser capaz de catalisar reações de geração de ERO, devido a sua capacidade de doar e receber elétrons, interconvertendo-se entre o estado férrico e ferroso. Consequentemente, as ERO interagem com vários componentes celulares ocasionando oxidação de biomoléculas (GHOTI et al, 2010; FIBACH & RACHMILEWITZ, 2008; EMERIT et al, 2001; GURZAU et al, 2003). Quando a sobrecarga de ferro supera a capacidade de transporte de ferro da transferrina, ele é depositado nos tecidos como ferro livre (SHANDER et al, 2009). O ferro livre participa da reação de Fenton (Esquema 1), que catalisa uma reação não enzimática a partir de peróxido de hidrogênio, resultando na formação do radical hidroxila (OH^\cdot), um potente oxidante, com capacidade de atravessar membranas e reagir com moléculas celulares, sobrecarregar a capacidade antioxidante celular e esgotar antioxidantes celulares como a glutatona (GSH), resultando em dano tecidual oxidativo e disfunção de diversos órgãos vitais (GATTERMANN et al, 2011; HALLIWELL, 2006; SHANDER et al, 2009; FIBACH & RACHMILEWITZ, 2008).

³Figura retirada de SHAH et al, 2012

Vários estudos têm relatado o aumento do risco de câncer em condições de sobrecarga de ferro, como observado na hemocromatose, onde o aumento das células contendo ferro pode produzir eventos genotóxicos pela indução do estresse oxidativo (TOYOKUNI, 1996).



Esquema 1: Reação de Fenton

2.3. Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são átomos ou moléculas que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, o que confere uma alta reatividade a essas moléculas, e são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio sofre redução, resultando na formação de água. Durante esse processo, cerca de 2 a 3% desse oxigênio molecular sofre redução incompleta, originando intermediários reativos, tais como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), hidroxil (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente essa redução ocorre na mitocôndria e, em condições normais, o organismo possui mecanismos compensatórios para sequestro das espécies reativas formadas nesse processo (FERREIRA et al, 1997) (Figura 4).

As ERO no organismo são neutralizadas por substâncias antioxidantes. Segundo HALLIWELL (2000), “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada a do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”. Os antioxidantes podem agir enzimaticamente detoxificando o agente oxidante antes que ele cause lesão, como a glutatona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD); ou não enzimaticamente, reparando a lesão ocorrida, como a glutatona (HALLIWELL, 2000; FERREIRA et al, 1997).

Quando ocorre um desequilíbrio no balanço redox, onde a geração de ERO ultrapassa a capacidade de reparo das defesas antioxidantes do organismo, com a potencialidade de

exercer efeitos deletérios, cria-se um estado denominado de estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006; VASCONCELOS et al, 2007). Os danos oxidativos causados pelos altos níveis de ERO ocasionam modificações importantes a biomoléculas conduzindo a danos celulares, nas membranas lipídicas, nas proteínas citosólicas e de membrana, e danos nas bases nitrogenadas do ácido desoxirribonucléico(DNA) (BIANCHI et al, 1999), e têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, tais como as cardiopatias e aterosclerose (BATLOUNI, 1997), diabetes tipo II (MANFREDINI et al, 2010), problemas pulmonares (FERREIRA et al, 1997), erros inatos do metabolismo (SITTA et al, 2009; RIBAS et al, 2010), envelhecimento cutâneo (HIRATA et al, 2004), carcinogênese (LOUREIRO et al, 2002), entre outros.

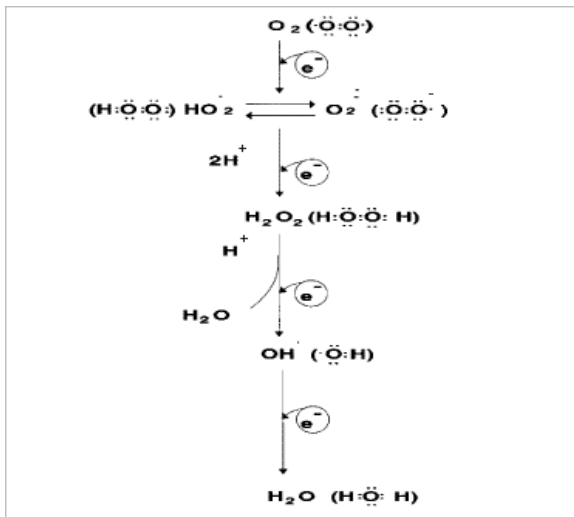


Figura 4. Redução tetraivalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água. Varias espécies de ERO são formadas nesse processo. ⁴

2.4. Marcadores do estresse oxidativo

Usamos os biomarcadores sanguíneos do balanço redox para refletir os danos causados pelas ERO e a eficiência das defesas antioxidantes do organismo. Esses marcadores podem avaliar o dano oxidativo em componentes celulares como as estruturas lipídicas, através da peroxidação lipídica (LPO) e avaliar o dano oxidativo a proteínas, através dos compostos carbonílicos e sulfidrílicos. Também podem avaliar a defesa antioxidante enzimática, como a SOD, a CAT e a GPx, que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ERO (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999; AMES et al, 1993).

⁴Figura retirada de FERREIRA et al, 1997

2.4.1. Peroxidação lipídica (LPO)

As ERO podem atacar as membranas celulares, as quais contêm uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. A peroxidação lipídica dá-se pela reação dos radicais livres com os lipídeos insaturados das membranas, resultando na formação de hidro ou lipoperóxidos, que são altamente reativos e podem dar início a uma cascata oxidativa, com severos danos a integridade da membrana. Nessa reação ocorre à liberação de produtos de degradação de ácidos graxos, como o malondialdeído (MDA), e a quantificação deste composto têm sido utilizado para avaliar a extensão do dano oxidativo (MARNETT, 1999; OHKAWA et al, 1979).

2.4.2. Oxidação de proteínas

As proteínas são alvos imediatos para a modificação oxidativa ocasionada por ERO, alterando sua estrutura e provocando perda de função e fragmentação das estruturas protéicas. A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode se usada para medir a extensão do dano oxidativo (BERLETT & STADMAN, 1997; BEAL, 2003; DALLE-DONNE et al., 2003). Os grupamentos carbonílicos (CO) são produzidos pela oxidação da cadeia lateral de aminoácidos suscetíveis, como prolina (Pro), arginina (Arg), lisina (Lis) e treonina (Tre), ou pela clivagem oxidativa das proteínas. Também, os CO podem ser introduzidos nas proteínas por uma reação secundária das cadeias laterais com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica, como o malondialdeído. O conteúdo de proteína carbonil é atualmente o marcador de oxidação protéica mais usado e observa-se seu aumento em várias doenças humanas, tais como Doença de Alzheimer, *Diabetes mellitus*, processos inflamatórios e artrite reumatóide. Vale ressaltar que níveis elevados de proteína carbonil também são indicadores de doenças derivadas do metabolismo protéico, e não somente de estresse oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2003). As proteínas modificadas oxidativamente são produtos quimicamente estáveis, sendo um fator importante para a sua detecção e armazenamento (RUTKOWSKA et al., 2005).

2.4.3. Total-SH

Os compostos tiólicos são antioxidantes que contêm em sua estrutura o grupamento-SH, entre estes compostos estão a glutatona, a cisteína e as proteínas tiólicas. Esses compostos estão envolvidos no sequestro de radicais livres, e são capazes de quelar íons metálicos danosos, desempenhando assim um papel crucial na defesa antioxidante dos eritrócitos no plasma (WLODEK et al, 2010).

2.4.4. Enzimas antioxidantes

As enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, servem como linha primária de defesa na destruição dos radicais livres. A SOD é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de oxigênio e oxigênio. A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio. A GPx é uma enzima que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis, às custas da glutatona (FERREIRA et al, 1997) (Figura 5).

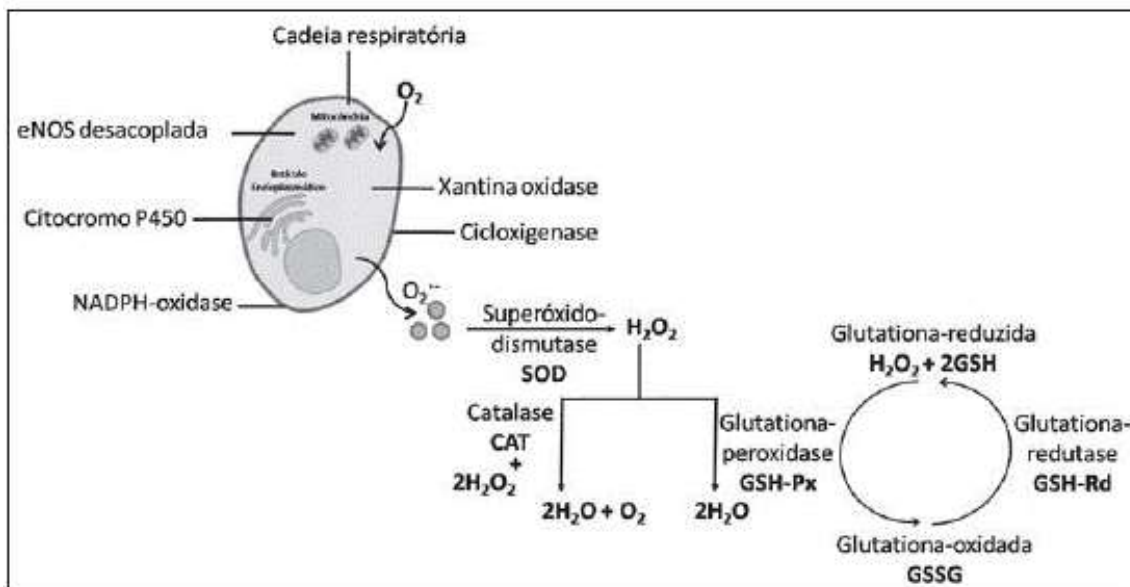


Figura 5. Sistema enzimático oxidante e antioxidante. eNOS = óxido nítrico sintetase endotelial; O_2^- = ânion superóxido; $O_2 =$ oxigênio.⁵

⁵Figura retirada de DEBLIN et al, 2009

3. OBJETIVOS

3.3. Objetivo Geral

Determinar os níveis de ferro plasmático e avaliar os marcadores de estresse oxidativo e da atividade das enzimas antioxidantes em indivíduos multitransfundidos, como evidência de estresse oxidativo nesses indivíduos.

3.4. Objetivos específicos

- Quantificar os níveis de ferro sérico no plasma de indivíduos multitransfundidos e controles;
- Verificar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos de indivíduos multitransfundidos e controles;
- Quantificar o dano oxidativo em proteínas plasmáticas, pelo método do carbonil, em plasma de indivíduos multitransfundidos e controles;
- Quantificar o dano oxidativo em lipídios de membrana pelo método de TBA-RS em plasma de indivíduos multitransfundidos e controles;
- Determinar o conteúdo de sulfidrilas totais no plasma de indivíduos multitransfundidos e controles;
- Quantificar os níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no plasma de indivíduos multitransfundidos e controles;
- Correlacionar os parâmetros do estresse oxidativo (carbonil, TBARS, total-SH, ROS) com o teor de ferro plasmático e o número de transfusões sanguíneas;
- Correlacionar as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) com o teor de ferro plasmático e o número de transfusões sanguíneas.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra organizado neste item. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. O artigo está disposto na forma que foi submetido para publicação na edição da revista científica *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

4.1. **Oxidative Stress Parameters In Anemic Subjects After Repeated Blood Transfusions: A Positive Correlation With Plasmatic Labile Iron Content**

Marília Sabo Fernandes¹, Tatiana Tamborena Rissi¹, Luiza Zuravski¹, Juliana Mezzomo¹,
Carmen Regla Vargas³, Vanderlei Folmer¹, Félix Alexandre Antunes Soares², Vanusa
Manfredini¹, Robson Luiz Puntel^{1*}

¹*Universidade Federal do Pampa - Campus Uruguaiana BR-472 Km 7, Uruguaiana, 97500-970, RS, Brazil.*

²*Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.*

³*Serviço de Genética Médica – Laboratório de Análise de Metabólitos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, CEP 90035-003, RS, Brazil.*

Abstract

Iron is an essential element that participates in several metabolic activities of cells; however, its excess can be a major cause of oxidative stress (OS) in subjects undergoing blood transfusion therapy. The objective of this study was to determine the plasmatic iron content, evaluate the OS markers and the activity of the antioxidant enzymes in anemic subjects receiving repeated blood transfusions. Here, 50 anemic subjects (divided into 3 subgroups: 1) received up to five blood transfusions [n=15]; 2) received from five up to ten transfusions [n=17]; and 3) received more than ten transfusions [n=18]) and 20 controls were analyzed. Plasmatic labile iron, protein carbonyl, thiobarbituric acid-reactive substances and dichlorofluoresceindiacetate oxidation were significantly higher, whereas Total -SH levels were significantly lower in anemic subjects compared to controls. Additionally, the activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were significantly lower in the transfused subjects. Moreover we found statistically significant correlations between the number of transfusions, plasmatic iron content, the OS markers and the activity of the antioxidant enzymes. Our data confirms the involvement of OS in patients following therapy with repeated blood transfusions. Additionally we found that the changes in the OS markers are tightly correlated with both iron content and the number of transfusions.

Keywords: Politransfused subjects, anemia, antioxidant enzymes, protein carbonyl, TBARS, Total -SH.

Abbreviations: TBARS: Thiobarbituric acid-reactive substances; DCFH-DA: dichlorofluoresceindiacetate; Total -SH: Total thiol groups; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase.

1. Introduction

Iron is an essential trace element of cells and it participates in various redox processes because its capacity to accept and donate electrons, interconverting between the Fe^{3+} and Fe^{2+} forms (1-3). Additionally, iron is a vital constituent of various enzymes, including iron-sulphur and haem proteins of the respiratory chain, as well as ribonucleotidoreductase, among others (1, 4). Moreover, iron has the unique ability to alter its oxidation and redox states in response to several ligands, which makes it indispensable for life processes (5). However, this unique redox property renders iron potentially toxic in biological systems due to generation of reactive oxygen species (ROS) during its redox cycling (6). In order to prevent ROS over production, circulating and intracellular free iron are tightly regulated by binding to transferrin, ferritin and other proteins (7).

However, in some situations the iron balance may be disturbed, either locally or systemically, resulting in labile iron ("free iron" – not bound to ferritin or transferrin) which could participate in Fenton chemistry (Scheme 1) and subsequently generating large amounts of ROS (8). Indeed, iron overload could occur under some conditions, such as in several chronic anemias, secondary to repeated blood transfusions, and following increased gastrointestinal absorption (9-10). So, subjects undergoing repeated blood transfusions are believed to be at risk of toxicity associated with iron overload (11). Additionally, iron balance could also be disrupted in patients in the end-stage of renal failure following therapy to treat hemodialysis-associated anemia (12).

Accordingly, it was pointed that elevated tissue iron can overwhelm the protective mechanisms and lead to an increase in iron complexes with small molecules such as nucleotides and citrate in the serum of these patients and also within cytoplasm and organelles (13-14). Indeed, it was previously reported that under repeated blood transfusions the levels of iron increase, being available to generate catalytically active complexes, and consequently

free radicals and oxidative damage (14). Actually, such labile iron is catalytically active, promoting free radical formation that culminates in the oxidation of biomolecules. Accordingly, iron overload in humans and in experimental animals seems to be associated with oxidative stress (15). In particular, the catalytically active iron promotes oxidative stress in organs that accumulate it on excess (16-17). Indeed, it is known that an imbalance in the oxidant/antioxidant status of the cell is associated with oxidative stress and this causes important modifications in cellular macromolecules leading to cell damage (18). Thus, oxidative stress is believed to be one of the most important factors determining cell injury in patients with iron overload (19). Hence, the end-result of the oxidation reactions is the formation of lipid peroxides and protein carbonyls, damaged deoxyribonucleic acid (DNA) bases, and mitochondrial dysfunction (5, 20). Additionally, individuals with iron overload also demonstrate impaired antioxidant defenses (10, 21). Accordingly, the long-term consequence of chronic iron overload is organ injury, which could contribute to the initiation and development of several chronic pathologies, such as endocrinopathies, diabetes mellitus, cirrhosis, hypogonadism and heart failure (22-24).

In general, oxidative damage of biomolecules can be counteracted by enzymatic as well as nonenzymatic defenses (25). Indeed, humans are well equipped with several biological mechanisms to defend against intracellular oxidative stress. One of the most important mechanisms involves the actions of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) (26). However, despite their well-developed antioxidant defense system, cells can be oxidatively damaged under some pathological conditions (18, 27).

Considering the exposed, we hypothesize that oxidative stress can be correlated with plasmatic iron content in anemic patients following therapy with repeated blood transfusions. Moreover, to the best of our knowledge, data about labile iron accumulation in anemic

subjects receiving repeated blood transfusion and its correlation with the oxidative damage markers are scarce in the literature. Therefore, in order to verify this hypothesis we evaluated the oxidative stress markers and the activity of the enzymatic antioxidant defenses in the blood of patients receiving repeated transfusions and in control subjects (no transfused). Additionally, we determined the plasmatic labile iron content in these subjects and correlated with each other evaluated markers.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

1,1,3,3-tetramethoxypropane, 2-thiobarbituric acid (TBA), sodium dodecyl sulfate (SDS), 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), trichloroacetic acid (TCA), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA), 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH), were purchased from Sigma, St. Louis, MI, USA. The kit for iron determination was obtained from BioSystems, kits for SOD and GPx from Randox® Laboratories, UK, and kit for protein determination from BioClin. All the other chemicals were commercial products of the highest purity grade available.

2.2. Subjects

This study was approved by the Ethics Committee in Research of Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), protocol number 001/2012. Altogether 50 anemic individuals receiving blood transfusion and 20 healthy individuals (blood donors) from the Banco de Sangue do Município de Uruguaiiana were included in the study. Anemic subjects, selected for the study, do not present other diagnosed disease, such as cancer, renal failure, hepatic disease, blood loss or others. Indeed the inclusion criteria adopted here were: chronic anemic patients that received the blood therapy during last year prior to collection (i.e. 12 months

from the first transfusion until sample collection to analysis). Additionally, it is important to mention here that the sample collection was done before a new transfusion, namely clinical screening. The anemic subjects were divided into 3 subgroups: 1) subgroup that received up to five (<5 transfusions) blood transfusions (n=15); 2) subgroup that received from five up to ten blood transfusions (n=17); and 3) subgroup that received more than ten blood transfusions (n=18). Some characteristics of the subjects included in this study, including data concerning the number of transfusions are pointed in Table I.

2.3. Sample collection

Blood from either controls or anemic subjects were collected by venous arm puncture and stored into tubes containing heparin. The plasma and cells were separated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min and were subsequently used for biochemical analyses. All biochemical assays were done in duplicate or triplicate, depending on availability of samples.

2.4. Analysis of hemoglobin

The electrophoretic analysis of hemoglobin was performed using the Minicap (Sebia, Norcross, France) according to the manufacturer's instructions, running controls with every test as described previously. The Minicap system uses the principle of capillary electrophoresis in free solution. Charged molecules are separated by their electrophoretic mobility in an alkaline buffer with a specific pH. Separation also occurs according to the electrolyte pH and electro-osmotic flow. Electropherograms were expressed with divided zones from Z1 to Z15 based on standardizing the location of HbA according to previous described (28).

2.5. Measurement of plasmatic labile iron content

The plasmatic iron content was determined by its reactivity with ferrozine (which does not detect heme iron) in the presence of the denaturant sodium dodecyl sulfate and the reducing agents ascorbate and sodium metabisulphite, according to previously described (29). Accordingly, ferrous ions react with ferrozine forming a coloured complex that can be measured by spectrophotometry (30). We follow the previously validated convention of using the term labile iron (“free iron”) to non heme iron that has reacted quickly in the ferrozine assay (within few minutes), instead of the term “non heme iron” that include others (e.g. ferritin and transferrin iron) (31).

2.6. Protein carbonyl determination

Content protein carbonyl was determined as described by (32). The carbonyl protein presence is indicative of oxidation. Plasma samples were added 0.2 mL of trichloroacetic acid (TCA), 10% and placed on ice for 5 minutes. After centrifugation (5 min, 8000), was added 1 mL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2M HCl to 10mM and samples 1 mL of 2M HCl in white tubes and incubated for 90 min at 37 ° C. The proteins were dissolved in 6M guanidine and interference was removed after washing with ethanol-ethyl acetate 1:1 (v / v). The extent of the damage will be done by reading absorbance at 370nm. The results were expressed as nmolcabonyl/mg protein.

2.7. Determination of TBARS levels

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were determined in plasma by the method of Ohkawa et al. (33). In brief, samples were incubated at 100 °C for 60 min in acid medium containing 0.45% sodium dodecyl sulfate and 0.6% thiobarbituric acid. After

centrifugation, the reaction product was determined at 532 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as standard and the results were expressed as nmol MDA/mg protein.

2.8. Total thiol (Total -SH) determination

Plasmatic total -SH were determined as described by Ellman (34). The colorimetric assay was carried out in 1 M phosphate buffer, pH 7.4. A standard curve using glutathione was constructed in order to calculate the total -SH content in samples. Total -SH content was expressed as nmol total -SH /mg protein.

2.9. Determination of DCHF-DA oxidation

The determination of intracellular oxidant production was based on 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) cleavage to 2',7'-dichlorofluorescein (DCHF) that can be oxidized to the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein by ROS according to previously described (35-36). The plasma sample was diluted (1: 10) in Tris/HCl 10 mM buffer. Then, 50 μ L of diluted plasma was incubated in 10 mM Tris/HCl buffer and 10 μ M DCHF-DA at 37 ° C for 30 min. The DCF fluorescence intensity emission was measured using a Perkin-Elmer spectrofluorometer at an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 520 nm, 20 min after the addition of DCHF-DA to the medium. The results were expressed as arbitrary fluorescence unit (AFU).

2.10. Catalase activity

Catalase (CAT) enzyme activity was measured by the method previously described (37). Packed erythrocytes were hemolyzed by adding 100 volumes of distilled water, then, 20 μ L of this hemolyzed sample was added to a cuvette and the reaction was started by the addition of 100 μ L of freshly prepared 300mM H₂O₂ in phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) to

give a final volume of 1 mL. The rate of H₂O₂ decomposition was measured spectrophotometer at 240nm during 120 seg. The CAT activity was expressed as UI/mg protein.

2.11. Superoxide dismutase activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured in erythrocytes using the Kit RANSOD® (Randox Laboratories, UK). This method employs xanthine and xanthine oxidase to produce superoxide radicals which react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-feniltetrazol chloride (INT) to form compound formazan red. The superoxide dismutase activity was measured by the degree of inhibition of this reaction at 505 nm. The SOD activity was expressed as UI/mg protein.

2.12. Glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined in erythrocytes using the Kit RANSEL® (Randox Laboratories, UK), according to the method previously described(38). The GPx activity was expressed as UI/mg protein.

2.13. Protein determination

The protein content is determined by the biuret method, through the Total Protein Kit Bioclin®, using bovine serum albumin as standard. The copper ions in an alkaline medium (biuret reagent) react with peptide, producing a purple color, whose intensity is proportional to the concentration of proteins in the samples being measured in a spectrophotometer at 545nm.

2.14. Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA), followed by post hoc Tukey multiple range test when appropriated. $P < 0.05$ was considered significant. Pearson correlation between variables was also carried out.

3. Results

Some characteristics of the subjects included in this study are presented on Table I. The eletrophoretic hemoglobin profile of the subjects included in this study indicates that none individual presented hemoglobinopathy (100% had normal hemoglobin profile; data not shown). Indeed, fetal hemoglobin variant was found in 8% of individuals, at normal proportions (less than 10% of total current hemoglobin). As expected, the plasmatic labile iron content was statistically ($P < 0.05$) high in the transfused subjects when compared to control group (Figure 1). Nonetheless, only subjects receiving >5 transfusions presented iron levels statistically different from controls (Figure 1). Additionally, we found a statistically significantly correlation between the number of transfusions and the iron content (Figure 2). Moreover, we does not found significant correlation between the iron content and the age of the subjects ($r = -0.613$; $P = 0.437$).

The oxidative stress analyzed markers such as protein carbonyl (Figure 3), TBARS (Figure 4) and DCFH-DA oxidation (a marker ROS, Figure 5) were significantly ($P < 0.05$) higher, whereas total -SH (Figure 6) levels were significantly ($P < 0.05$) lower in transfused subjects compared to controls. However, statistical analysis revealed that only subjects receiving >10 transfusions presented statistically significant decrease in SH groups when compared to controls (Figure 6). Indeed, to other evaluated oxidative stress markers, the changes were seen to all groups of transfused subjects, independent from the number of transfusions (see Figures 3-5). Likewise plasmatic iron content, we found statistically

significant correlations between the number of transfusions and protein carbonyl (Figure 7A), TBARS (Figure 7B), and total -SH (Figure 7C).

In general, the activity of the all antioxidant enzymes reported here (CAT, SOD and GPx) were significantly ($P < 0.05$) lower in the transfused subjects than in controls (Figures 8, 9 and 10, respectively). However, CAT activity did not differ from controls in the group that received < 5 transfusions (Figure 8), whereas SOD activity was statistically different from controls only in the group that received > 10 transfusions (Figure 9). Additionally, we also found statistically significant negative correlations between the number of transfusions and the activity of the antioxidant enzymes CAT (Figure 11A), SOD (Figure 11B), and GPx (Figure 11C).

Analyzing the groups of anemic and controls subjects we found statistically significant correlations between the evaluated oxidative stress markers and the plasmatic labile iron content (see Figure 12 A-F), except to DCDH-DA oxidation (Table II). In general, the iron content was negatively correlated to the activity of the antioxidant enzymes (Figures 12 A-C) and with total -SH (Figure 12D). In contrast, iron content was positively correlated to the protein carbonyl (Figure 12E) and TBARS levels (Figure 12F). Other correlations are also presented in Table II. In short, it was found that the activity of antioxidant enzymes and total -SH levels were positively correlated, being negatively correlated with the levels of protein carbonyl and TBARS. In contrast, protein carbonyl and TBARS were found to be positively correlated (Table II).

4. Discussion

This study demonstrates for the first time that the number of blood transfusion in anemic subjects was significantly correlated with plasmatic labile iron content and with oxidative stress markers (TBARS, protein carbonyl, total thiol, SOD, CAT and GPx).

Accordingly, iron content (Figure 1), protein carbonyl levels (Figure 3), TBARS (Figure 4) and ROS (as measured by DCFH-DA oxidation; Figure 5) were significantly higher, while the total thiol content (Figure 6) and the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx; Figures 8-10) were significantly lower in anemic subjects receiving repeated blood transfusion, when compared to control subjects. Additionally, we found that the plasmatic labile iron was positively correlated to the number of blood transfusions (Figure 2) and does not correlate with the age ($r = -0.613$; $P = 0.437$). Altogether, the presented results confirm our hypothesis that the markers of oxidative stress are correlated with plasmatic iron content in anemic patients following therapy with repeated blood transfusions. However, we found some changes in the oxidative stress parameters even in the absence of significant iron accumulation, suggesting that alterations in oxidative stress markers could precede iron accumulation in patients following blood therapy. Anyway, this point is extremely relevant and deserves further attention in future investigations.

Nevertheless, our data are in accordance to a previous study showing that the serum iron content was significantly higher and was positively correlated with oxidative stress in beta-thalassemic patients that received blood transfusions (beta thalassaemia major patients) when compared to subjects that does not received transfusion (beta thalassaemia intermedia patients) (19). Additionally, based on data concerning hemoglobin profile (data not shown), were discarded hemoglobin disorders in these individuals. These data is extremely important to avoid misinterpretations, once it was previously shown that any imbalance between the α and β chains plays a crucial role in producing oxidative stress (39-40). Taking into account our results, and that previously found, it is plausible to assume that, under blood transfusion therapy the excess of labile iron (catalytically active iron) must generate free radicals (ROS) via Fenton chemistry (Scheme 1), resulting in oxidative damage to biomolecules *in vivo* (41-42). Our assumption is further supported by previous report showing that iron-catalyzed ROS

generation leads to an increase in the genomic instability in hematopoietic progenitor cells (43-45). Moreover, in animal models it was shown that iron overload causes liver damage via both oxidative and nitrosative mechanisms (46).

Taking into account the presented results, we suggest that the repeated blood transfusion increase the amount of labile iron available to participate in the Fenton chemistry (Scheme 1), thus leading to a increase in the ROS generation, as measured by the increase in DCFH-DA oxidation (Figure 5). Indeed, we assume that under repeated blood transfusions, the iron content increase to values that overwhelm the protective mechanisms, leading to an increase in the amount of iron available to form complexes with small molecules, the called “catalytically active iron complexes”. Thus, we assume that ROS generated (via Fenton chemistry) are responsible for the oxidation of DCFH-DA found in the transfused subjects, which is supported by previous report showing that overload with iron (ferric nitrilotriacetate) lead to an increase in oxidation of DCFH-DA in cultures rat hepatocytes (47).

We found the levels of TBARS significantly increased in subjects receiving blood transfusion (Figure 4), which was positively correlated to the iron content (Figure 12F) and the number of transfusions (Figure 7B). These findings are in accordance to previous reports showing that the levels of lipid peroxidation products were increased in beta thalassaemic patients receiving blood transfusions (19, 30, 48) and in subjects with hepatic iron overload (49). Moreover, we found a significantly increase in the protein carbonyl in the subjects receiving repeated blood transfusion (Figure 3), which was found to be significantly correlated with iron content (Figure 12E). Likewise other oxidative markers, our data are in accordance to a previous paper showing a significant increase in the protein carbonyl content in conditions of iron overload (47).

Moreover, we found a significant reduction in total SH in the subjects receiving repeated blood transfusion (Figure 6), which are in accordance to previous report showing a

decrease in thiol content in the liver of rats treated with iron (50). Albeit not completely understood, we believed that thiols are oxidized (consumed/used) in these subjects due to oxidative stress status following iron overload. However, other possibility is that the iron could react nonenzymatically with thiols in plasma to generate ROS, which directly lead to reduction of antioxidant capacity in plasma and the increased susceptibility of blood components to oxidation (51). Thus, this thiol-dependent free radical generation by iron overload might be a potential contributing factor for the changes in the oxidative markers reported here. Our assumptions are supported by other previous studies showing that oxygen radicals can be produced by iron-catalyzed autooxidation of cysteine or glutathione (GSH) (52-53). So, the generated ROS (either by Fenton chemistry as well as via iron-catalyzed autooxidation of thiols) are the putative responsible for the oxidation of other biomolecules reported here, such as lipids and proteins.

Additionally, we found a severe decrease in the antioxidant enzymes activity in the subjects with iron overload (Figures 8-10), which are in accordance with previous reports (47, 54). In fact, we clearly show a statistically significant negative correlation among enzymes activity and the plasmatic labile iron content (Figures 12 A-C), TBARS (Table II) and protein carbonyl (Table II). In line with this, we suppose that the decrease in the antioxidant enzymatic activity further contributes to the oxidative stress condition. Indeed, according to Chakbraborty and Bhattacharyya the decrease in the antioxidant enzymes strongly contributes to the increase in the markers of oxidative stress (TBARS, protein carbonyl and ROS)(55). Although our data do not support this supposition, we hypothesize that a decrease in the antioxidant enzymes reported here could, at least in part, be due to a decrease in their expression. Indeed, it was previously shown that both CAT and GPx were down regulated under oxidative stress conditions in human cells (56-57). However, the detail mechanisms of

regulation in the expression of antioxidant enzymes under iron overload remain to be better explored.

Considering the exposed, it is reasonable to suggest that antioxidants could be associated with blood therapy. In fact, previous data reported that antioxidant supplementation is safe and favorably affects the markers of oxidative stress, albeit it does not result in a significant clinical benefit (58-59). Additionally, ironchelators that efficiently decrease the levels of labile iron are putative candidate to counteract the iron-induced ROS generation (42, 60). However, more studies are necessary to better understand the mechanism(s) associated to iron-induced oxidative changes, tentatively to minimize the side effects associated to blood transfusion therapy and uncertainly to improve some clinical benefits.

5. Conclusions

In summary, our data confirm the involvement of oxidative stress in and its correlation with to plasmatic labile iron content in anemic patients following therapy with repeated blood transfusions. However, we found some alterations on oxidative stress markers even in the absence of significant iron accumulation, which encourages us to further explore the changes in the oxidative stress parameters in subjects receiving blood therapy that occur previously to iron overload. Moreover, to the best of our knowledge, it is important to emphasize that this is the first report concerning the correlation between oxidative stress markers and the labile iron content in anemic subjects following repeated blood therapy. Additionally, we found that the changes in the oxidative stress markers are, at least in part, correlated to both iron content and number of transfusions. However, more studies must be performed in order to establish the temporal relationship among the oxidative changes reported here and consequently to better understand the mechanism(s) involved with iron toxicity and/or blood transfusions, tentatively to improve the quality of life of these subjects. Likewise, the mechanisms of

regulation in the expression of antioxidant enzymes under iron overload deserve further attention.

Acknowledgements

This work was supported by grants from UNIPAMPA (Universidade Federal do Pampa), UFSM (Universidade Federal de Santa Maria), FAPERGS (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FINEP (Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00) and INCT-EN (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção). Additional support was given by CNPq/FAPERGS/DECIT/SCTIE-MS/PRONEM #11/2029-1.

References

- (1) Emerit, J., Beaumont, C., and Trivin, F. (2001) Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*, 55, 333-339.
- (2) Proeggente, A. R., England, T. G., Rice-Evans, C. A., and Halliwell, B. (2001) Iron supplementation and oxidative damage to DNA in healthy individuals with high plasma ascorbate. *Biochem Biophys Res Commun*, 288, 245-251.
- (3) Premkumar, K., Min, K., Alkan, Z., Hawkes, W. C., Ebeler, S., and Bowlus, C. L. (2007) The potentiating and protective effects of ascorbate on oxidative stress depend upon the concentration of dietary iron fed C3H mice. *J Nutr Biochem*, 18, 272-278.
- (4) Ponka, P. (1999) Cellular iron metabolism. *Kidney Int Suppl*, 69, S2-11.
- (5) Kruszewski, M. (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res*, 531, 81-92.
- (6) Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S. V., and Torti, F. M. (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J*, 357, 241-247.
- (7) Young, I. S., and Woodside, J. V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 54, 176-186.

- (8) Nathan, D. G. (1995) An orally active iron chelator. *N Engl J Med*, 332, 953-954.
- (9) Greenberg, P. L. (2006) Myelodysplastic syndromes: iron overload consequences and current chelating therapies. *J Natl Compr Canc Netw*, 4, 91-96.
- (10) Walter, P. B., Fung, E. B., Killilea, D. W., Jiang, Q., Hudes, M., Madden, J., Porter, J., Evans, P., Vichinsky, E., and Harmatz, P. (2006) Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol*, 135, 254-263.
- (11) Lambing, A., Kachalsky, E., and Mueller, M. L. (2012) The dangers of iron overload: bring in the iron police. *J Am Acad Nurse Pract*, 24, 175-183.
- (12) Kuo, K. L., Hung, S. C., Wei, Y. H., and Tarng, D. C. (2008) Intravenous iron exacerbates oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 19, 1817-1826.
- (13) Zanninelli, G., Loreal, O., Brissot, P., Konijn, A. M., Slotki, I. N., Hider, R. C., and Ioav Cabantchik, Z. (2002) The labile iron pool of hepatocytes in chronic and acute iron overload and chelator-induced iron deprivation. *J Hepatol*, 36, 39-46.
- (14) Gutteridge, J. M., Rowley, D. A., Griffiths, E., and Halliwell, B. (1985) Low-molecular-weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin Sci (Lond)*, 68, 463-467.
- (15) Sinha, S., and Saxena, R. (2006) Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non-enzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere*, 62, 1340-1350.
- (16) Hershko, C., Cappellini, M. D., Galanello, R., Piga, A., Tognoni, G., and Masera, G. (2004) Purgine iron from the heart. *Br J Haematol*, 125, 545-551.
- (17) Halliwell, B. (1996) Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res*, 25, 439-454.
- (18) Domanski, A. V., Lapshina, E. A., and Zavodnik, I. B. (2005) Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 761-769.
- (19) Cighetti, G., Duca, L., Bortone, L., Sala, S., Nava, I., Fiorelli, G., and Cappellini, M. D. (2002) Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients. *Eur J Clin Invest*, 32 Suppl 1, 55-60.
- (20) Welch, K. D., Davis, T. Z., Van Eden, M. E., and Aust, S. D. (2002) Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med*, 32, 577-583.
- (21) Westerman, M. P., Zhang, Y., McConnell, J. P., Chezick, P. A., Neelam, R., Freels, S., Feldman, L. S., Allen, S., Baridi, R., Feldman, L. E., and Fung, L. W. (2000) Ascorbate levels in red blood cells and urine in patients with sickle cell anemia. *Am J Hematol*, 65, 174-175.

- (22) Zurlo, M. G., De Stefano, P., Borgna-Pignatti, C., Di Palma, A., Piga, A., Melevendi, C., Di Gregorio, F., Burattini, M. G., and Terzoli, S. (1989) Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet*, 2, 27-30.
- (23) Chern, J. P., Lin, K. H., Tsai, W. Y., Wang, S. C., Lu, M. Y., Lin, D. T., Lin, K. S., and Lo, S. H. (2003) Hypogonadotropic hypogonadism and hematologic phenotype in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 25, 880-884.
- (24) Cunningham, M. J., Macklin, E. A., Neufeld, E. J., and Cohen, A. R. (2004) Complications of beta-thalassemia major in North America. *Blood*, 104, 34-39.
- (25) De Freitas, J. M., and Meneghini, R. (2001) Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutat Res*, 475, 153-159.
- (26) Scott, M. D. (2006) H₂O₂ injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. *Free Radic Biol Med*, 40, 1264-1272.
- (27) Watanabe, S., Togashi, S., and Fukui, T. (2002) Contribution of nitric oxide to potassium bromate-induced elevation of methaemoglobin concentration in mouse blood. *Biol Pharm Bull*, 25, 1315-1319.
- (28) Kim, J. E., Kim, B. R., Woo, K. S., Kim, J. M., Park, J. I., and Han, J. Y. (2011) Comparison of capillary electrophoresis with cellulose acetate electrophoresis for the screening of hemoglobinopathies. *Korean J Lab Med*, 31, 238-243.
- (29) Repka, T., Shalev, O., Reddy, R., Yuan, J., Abrahamov, A., Rachmilewitz, E. A., Low, P. S., and Hebbel, R. P. (1993) Nonrandom association of free iron with membranes of sickle and beta-thalassemic erythrocytes. *Blood*, 82, 3204-3210.
- (30) Chakraborty, D., and Bhattacharyya, M. (2001) Antioxidant defense status of red blood cells of patients with beta-thalassemia and Ebeta-thalassemia. *Clin Chim Acta*, 305, 123-129.
- (31) Kuross, S. A., and Hebbel, R. P. (1988) Nonheme iron in sickle erythrocyte membranes: association with phospholipids and potential role in lipid peroxidation. *Blood*, 72, 1278-1285.
- (32) Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., and Stadtman, E. R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186, 464-478.
- (33) Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95, 351-358.
- (34) Ellman, G., and Lysko, H. (1979) A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem*, 93, 98-102.

- (35) Yang, H. W., Hwang, K. J., Kwon, H. C., Kim, H. S., Choi, K. W., and Oh, K. S. (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod*, *13*, 998-1002.
- (36) Karja, N. W., Kikuchi, K., Fahrudin, M., Ozawa, M., Somfai, T., Ohnuma, K., Noguchi, J., Kaneko, H., and Nagai, T. (2006) Development to the blastocyst stage, the oxidative state, and the quality of early developmental stage of porcine embryos cultured in alteration of glucose concentrations in vitro under different oxygen tensions. *Reprod Biol Endocrinol*, *4*, 54.
- (37) Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, *105*, 121-126.
- (38) Paglia, D. E., and Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, *70*, 158-169.
- (39) Scott, M. D., van den Berg, J. J., Repka, T., Rouyer-Fessard, P., Hebbel, R. P., Beuzard, Y., and Lubin, B. H. (1993) Effect of excess alpha-hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model beta-thalassemic erythrocytes. *J Clin Invest*, *91*, 1706-1712.
- (40) Manca, L., and Masala, B. (2008) Disorders of the synthesis of human fetal hemoglobin. *IUBMB Life*, *60*, 94-111.
- (41) Zhang, Y., Huang, Y., Deng, X., Xu, Y., Gao, Z., and Li, H. (2012) Iron overload-induced rat liver injury: Involvement of protein tyrosine nitration and the effect of baicalin. *Eur J Pharmacol*, *680*, 95-101.
- (42) Britton, R. S., Leicester, K. L., and Bacon, B. R. (2002) Iron toxicity and chelation therapy. *Int J Hematol*, *76*, 219-228.
- (43) Koptyra, M., Falinski, R., Nowicki, M. O., Stoklosa, T., Majsterek, I., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J., and Skorski, T. (2006) BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*, *108*, 319-327.
- (44) Naka, K., Muraguchi, T., Hoshii, T., and Hirao, A. (2008) Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal*, *10*, 1883-1894.
- (45) Rassool, F. V., Gaymes, T. J., Omidvar, N., Brady, N., Beurlet, S., Pla, M., Reboul, M., Lea, N., Chomienne, C., Thomas, N. S., Mufti, G. J., and Padua, R. A. (2007) Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: a model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? *Cancer Res*, *67*, 8762-8771.
- (46) Toyokuni, S. (2011) Iron as a target of chemoprevention for longevity in humans. *Free Radic Res*, *45*, 906-917.
- (47) Ye, S. F., Hou, Z. Q., and Zhang, Q. Q. (2007) Protective effects of *Phellinus linteus* extract against iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Phytotherapy Research*, *21*, 948-953.

- (48) Laksmiawati, D. R., Handayani, S., Udyaningsih-Freisleben, S. K., Kurniati, V., Adhiyanto, C., Hidayat, J., Kusnandar, S., Dillon, H. S., Munthe, B. G., Wirawan, R., Soegianto, R. R., Ramelan, W., and Freisleben, H. J. (2003) Iron status and oxidative stress in beta-thalassemia patients in Jakarta. *Biofactors*, 19, 53-62.
- (49) Walter, P. B., Fung, E. B., Killilea, D. W., Jiang, Q., Hudes, M., Madden, J., Porter, J., Evans, P., Vichinsky, E., and Hartz, P. (2006) Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Brit J Haematol*, 135, 254-263.
- (50) Devi, S. L., and Anuradha, C. V. (2010) Oxidative and nitrosative stress in experimental rat liver fibrosis: Protective effect of taurine. *Environ Toxicol Phar*, 29, 104-110.
- (51) Chung, K. Y., Lee, S. J., Chung, S. M., Lee, M. Y., Bae, O. N., and Chung, J. H. (2005) Generation of free radical by interaction of iron with thiols in human plasma and its possible significance. *Thromb Res*, 116, 157-164.
- (52) Dabbagh, A. J., Mannion, T., Lynch, S. M., and Frei, B. (1994) The effect of iron overload on rat plasma and liver oxidant status in vivo. *Biochem J*, 300 (Pt 3), 799-803.
- (53) Albro, P. W., Corbett, J. T., and Schroeder, J. L. (1986) Generation of hydrogen peroxide by incidental metal ion-catalyzed autooxidation of glutathione. *J Inorg Biochem*, 27, 191-203.
- (54) Zhang, Y., Huang, Y., Deng, X. R., Xu, Y., Gao, Z. H., and Li, H. L. (2012) Iron overload-induced rat liver injury: Involvement of protein tyrosine nitration and the effect of baicalin. *European Journal of Pharmacology*, 680, 95-101.
- (55) Chakraborty, D., and Bhattacharyya, M. (2001) Antioxidant defense status of red blood cells of patients with beta-thalassemia and E beta-thalassemia. *Clinica Chimica Acta*, 305, 123-129.
- (56) Yoshida, H., Sasaki, K., Hirowatari, Y., Kurosawa, H., Sato, N., Furutani, N., and Tada, N. (2004) Increased serum iron may contribute to enhanced oxidation of low-density lipoprotein in smokers in part through changes in lipoxygenase and catalase. *Clin Chim Acta*, 345, 161-170.
- (57) Lapenna, D., de Gioia, S., Ciofani, G., Mezzetti, A., Uchino, S., Calafiore, A. M., Napolitano, A. M., Di Ilio, C., and Cucurullo, F. (1998) Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 97, 1930-1934.
- (58) Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., Gentile, C., and Livrea, M. A. (2006) Cytoprotective effects of the antioxidant phytochemical indicaxanthin in beta-thalassemia red blood cells. *Free Radic Res*, 40, 753-761.

- (59) Herrera, J., Nava, M., Romero, F., and Rodriguez-Iturbe, B. (2001) Melatonin prevents oxidative stress resulting from iron and erythropoietin administration. *Am J Kidney Dis*, 37, 750-757.
- (60) Thephinlap, C., Ounjaijean, S., Khansuwan, U., Fucharoen, S., Porter, J. B., and Srichairatanakool, S. (2007) Epigallocatechin-3-gallate and epicatechin-3-gallate from green tea decrease plasma non-transferrin bound iron and erythrocyte oxidative stress. *Med Chem*, 3, 289-296.

Figure Legends

Figure 1: Plasmatic labile iron levels in studied subjects (controls (n=20); up to five transfusions (n=15); 5-10 transfusions (n=17); over 10 transfusions (n=18)). Data are expressed as means \pm SEM. (a) indicates significant differences ($P < 0,05$) from control group; (b) significant difference ($P < 0.05$) from group up to five transfusion; (c) significant difference ($P < 0.05$) from group 5-10 transfusion by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test.

Figure 2: Pearson's correlation among plasmatic iron content and number of blood transfusions.

Figure 3: Protein carbonyl levels in studied subjects (controls (n=20); up to five transfusions (n=15); 5-10 transfusions (n=17); over 10 transfusions (n=18)). Data are expressed as means \pm SEM. (a) indicates significant differences ($P < 0.05$) from control group; (b) significant difference ($P < 0.05$) from group up to five transfusion; (c) significant difference ($P < 0.05$) from group 5-10 transfusion by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test.

Figure 4: TBARS levels in different groups (controls; group <5 ; group 5-10 and group >10). Data are expressed as means \pm SEM. (a) indicates significant differences ($P < 0.05$) from control group by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test.

Figure 5: DCFH-DA oxidation in different groups (controls; group <5 ; group 5-10 and group >10). Data are expressed as means \pm SEM. (a) indicates significant differences ($P < 0.05$) from control group by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test.

Figure 6: Total SH levels in different groups (controls; group <5; group 5-10 and group >10). Data are expressed as means \pm SEM. (a) indicates significant differences ($P < 0.05$) from control group; (b) significant difference ($P < 0.05$) from group up to five transfusion; (c) significant difference ($P < 0.05$) from group 5-10 transfusion by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test.

Figure 7: Pearson's correlation among number of blood transfusions and protein carbonyl (A), TBARS (B) and Total -SH content (C).

Figure 8: Catalase activity in different groups (controls; group <5; group 5-10 and group >10). Data are expressed as means \pm SEM. (a) indicates significant differences ($P < 0.05$) from control group; (b) significant difference ($P < 0.05$) from group up to five transfusion; (c) significant difference ($P < 0.05$) from group 5-10 transfusion by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test.

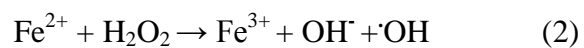
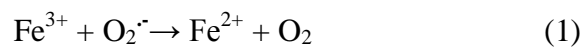
Figure 9: Superoxide dismutase activity in different groups (controls; group <5; group 5-10 and group >10). Data are expressed as means \pm SEM. (a) indicates significant differences ($P < 0.05$) from control group; (b) significant difference ($P < 0.05$) from group up to five transfusion; (c) significant difference ($P < 0.05$) from group 5-10 transfusion by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test.

Figure 10: Glutathione peroxidase activity in different groups (controls; group <5; group 5-10 and group >10). Data are expressed as means \pm SEM. (a) indicates significant differences ($P < 0.05$) from control group; (b) significant difference ($P < 0.05$) from group up to five

transfusion; (c) significant difference ($P < 0.05$) from group 5-10 transfusion by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple range test.

Figure 11: Pearson's correlation among number of transfusions and CAT (A), SOD (B) and GPx (C) activity.

Figure 12: Pearson's correlation among plasmatic iron content and CAT (A), SOD (B), GPx (C), Total -SH (D), Protein carbonyl (E) and TBARS (F).

Scheme**Scheme 1:** Fenton reaction

(1) Iron reduction in the ferric form (Fe^{3+}) to ferrous form (Fe^{2+}); (2) Fenton reaction that generates hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) through reaction between Fe^{2+} and hydrogen peroxide (H_2O_2).

Figure 1

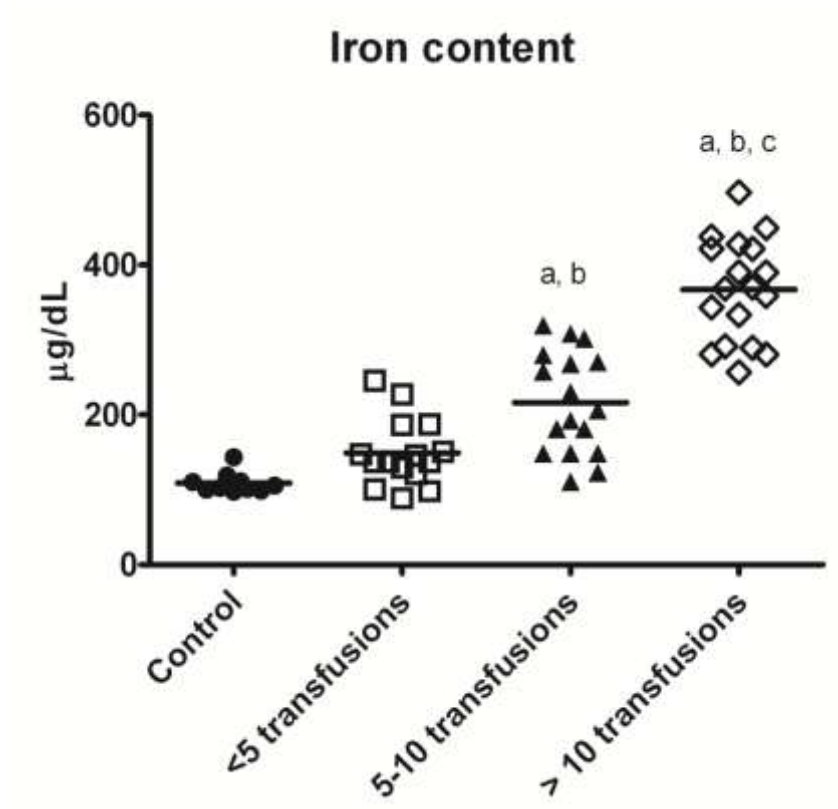


Figure 2

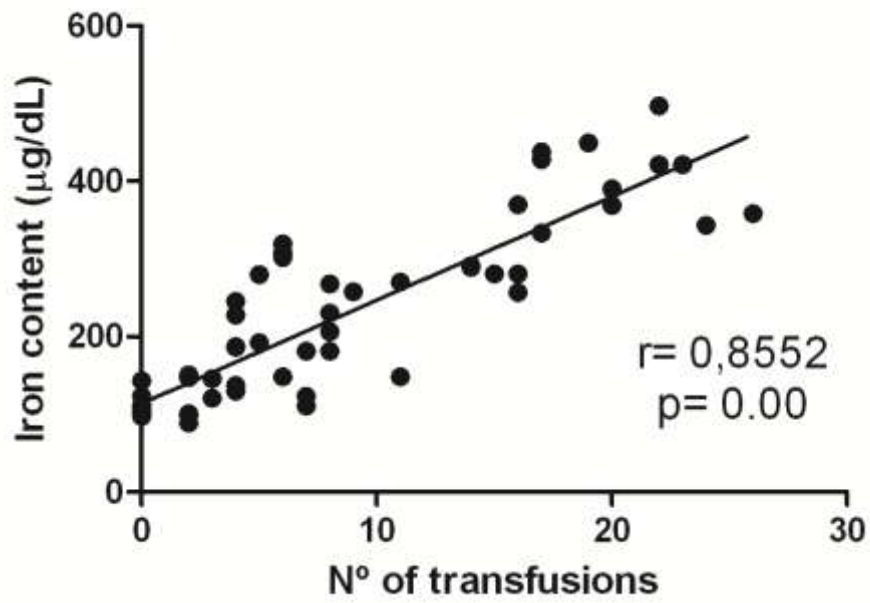


Figure 3

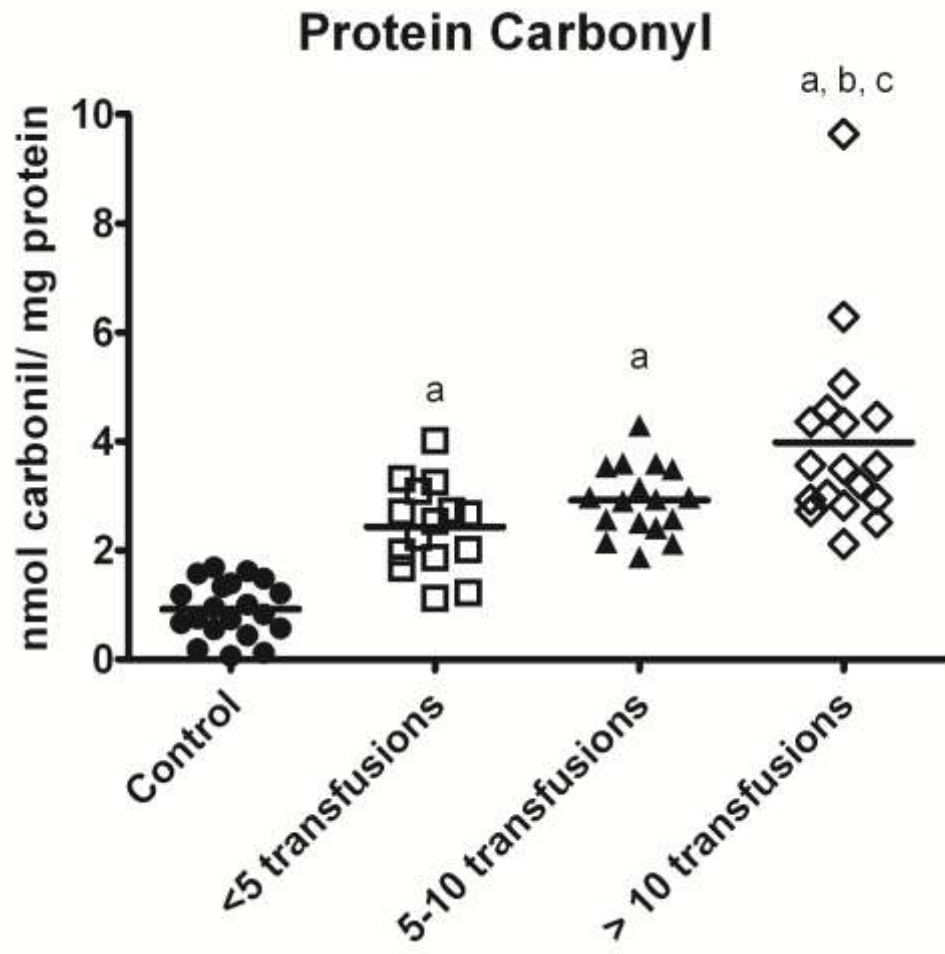


Figure 4

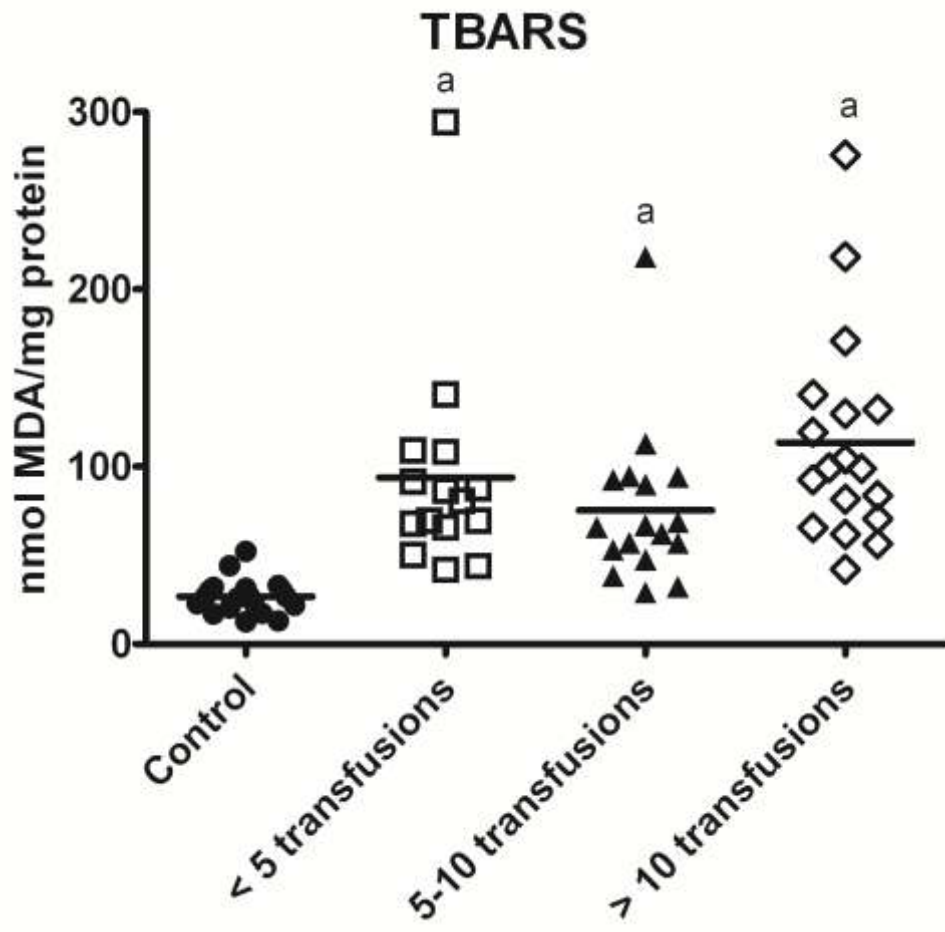


Figure 5

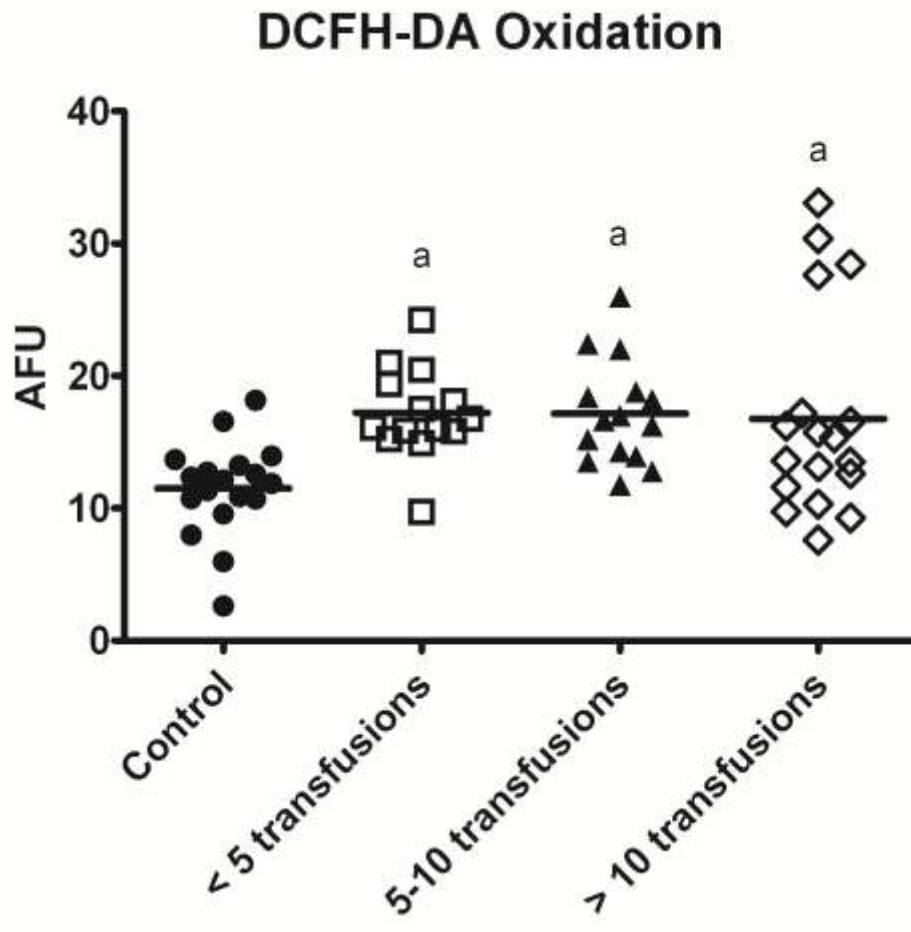


Figure 6

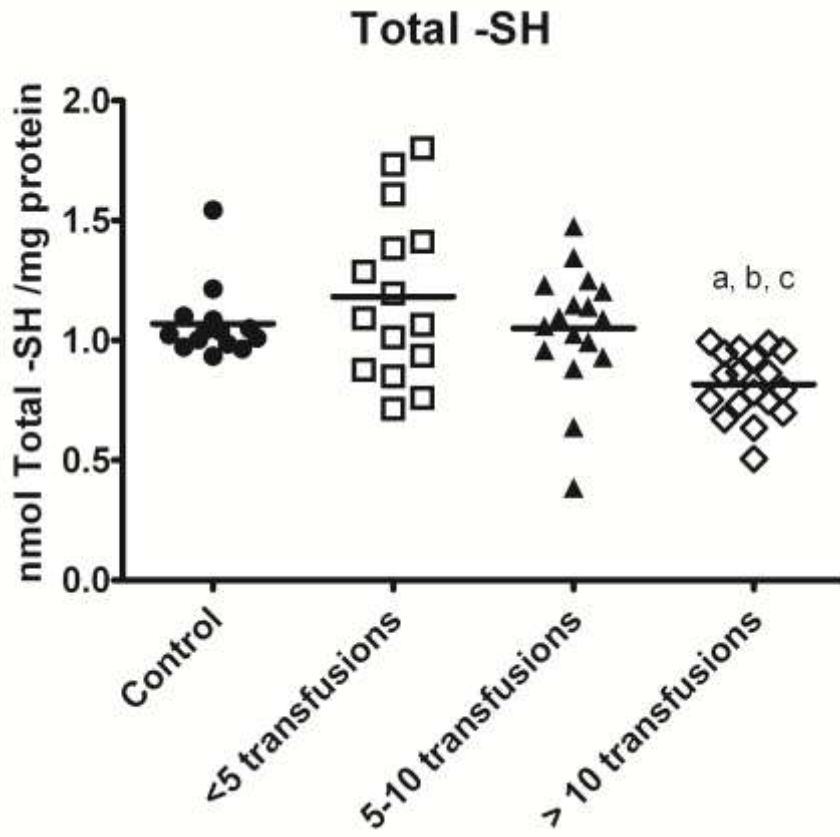
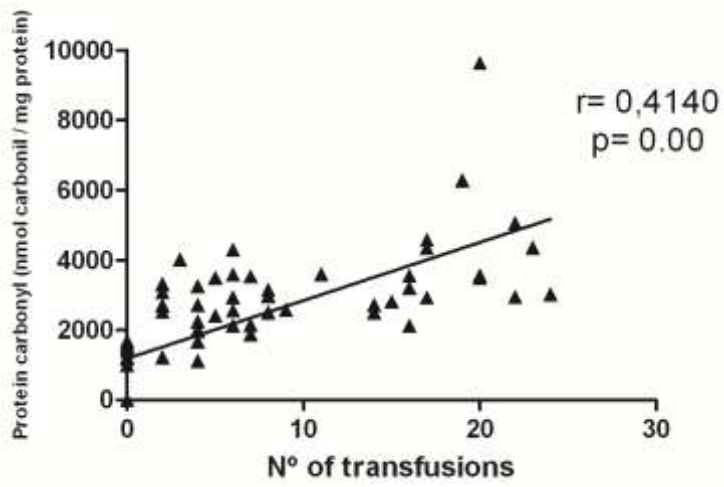
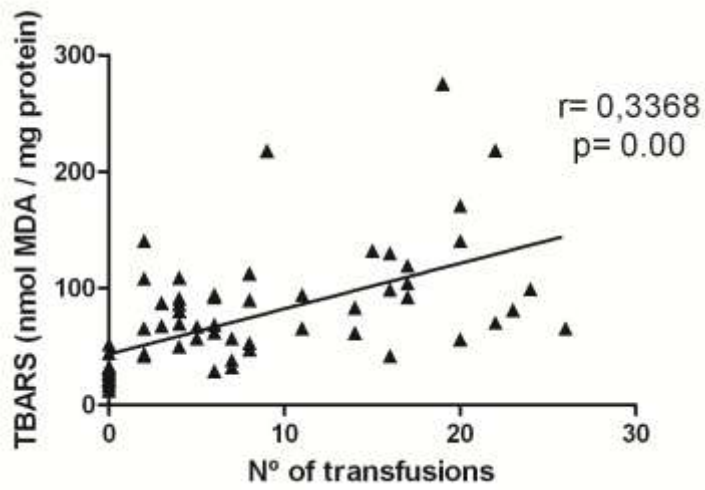


Figure 7

A



B



C

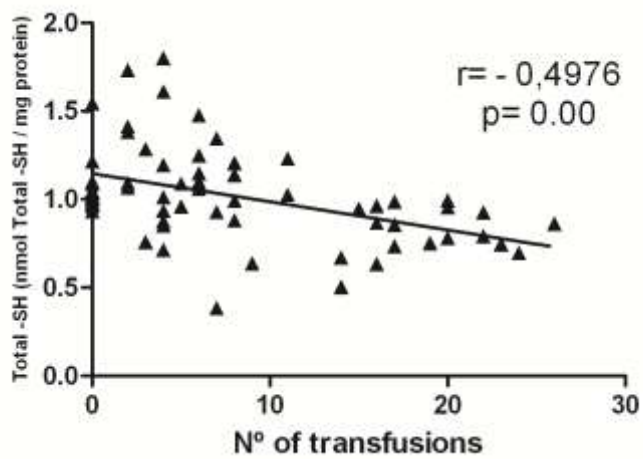


Figure 8

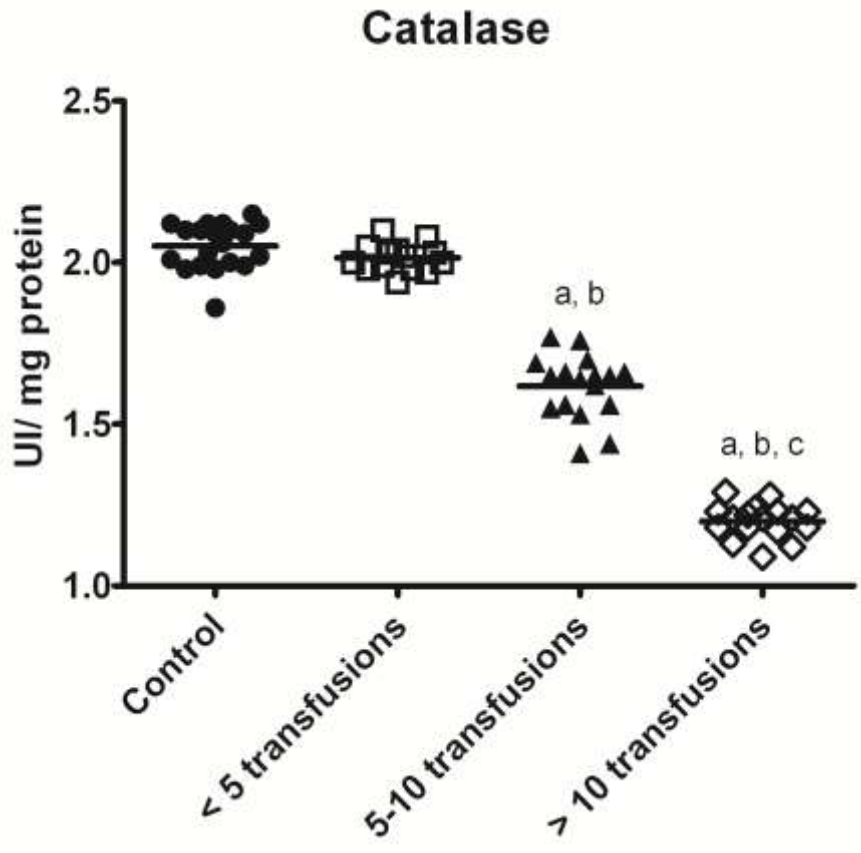


Figure 9

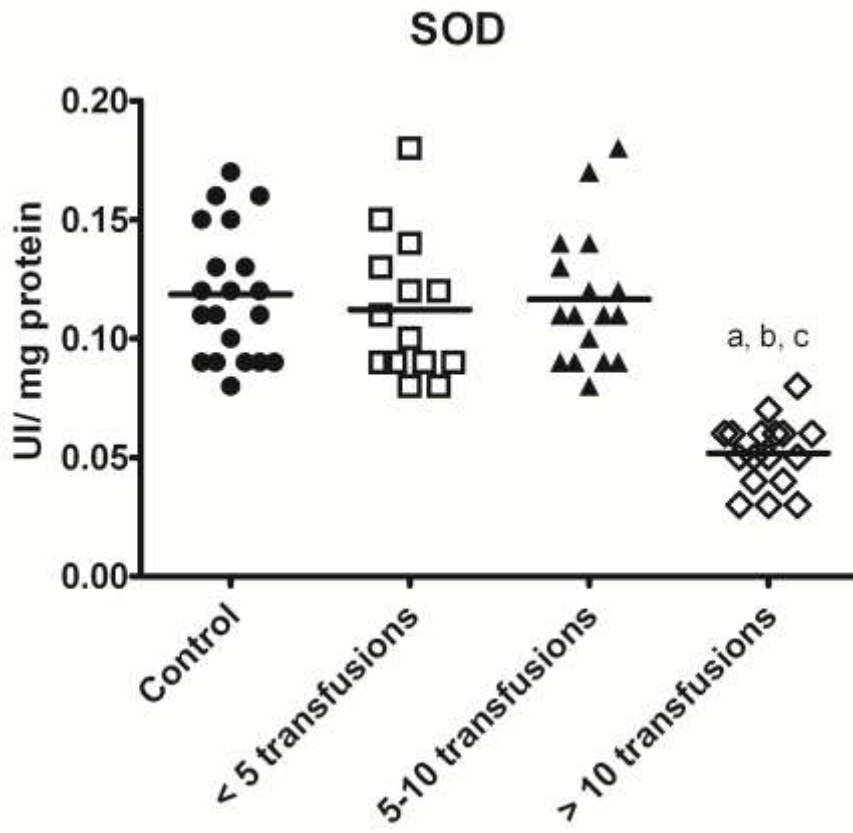


Figure 10

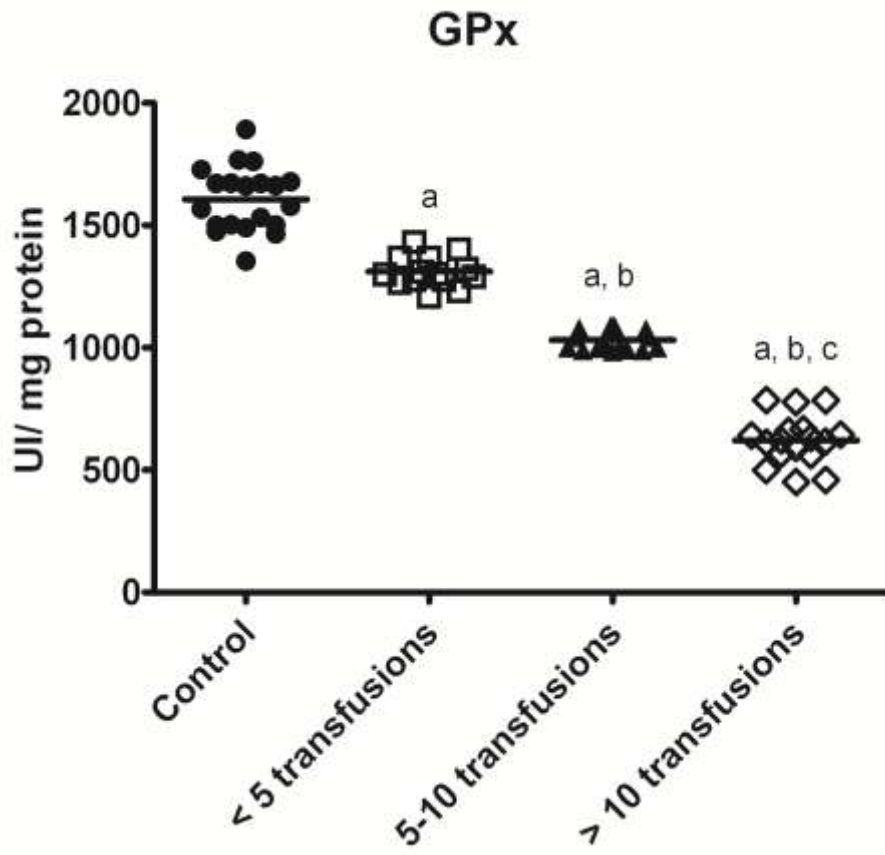
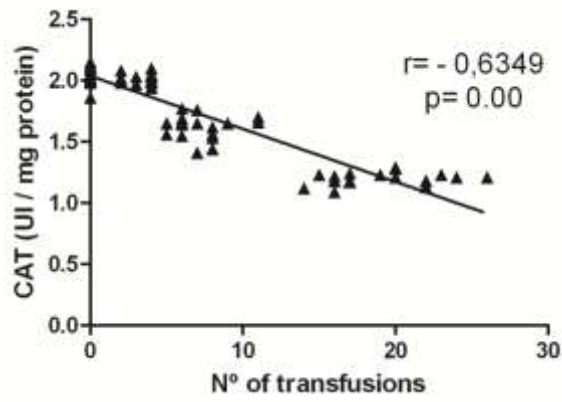
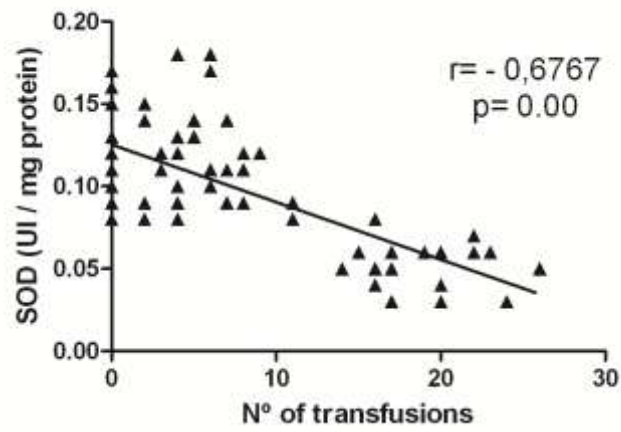


Figure 11

A



B



C

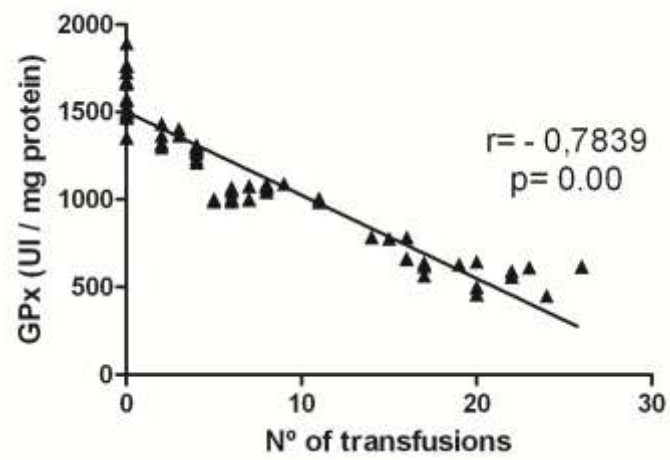
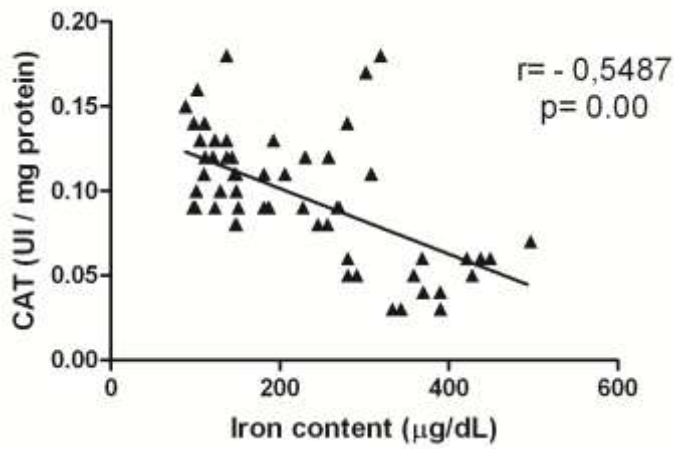
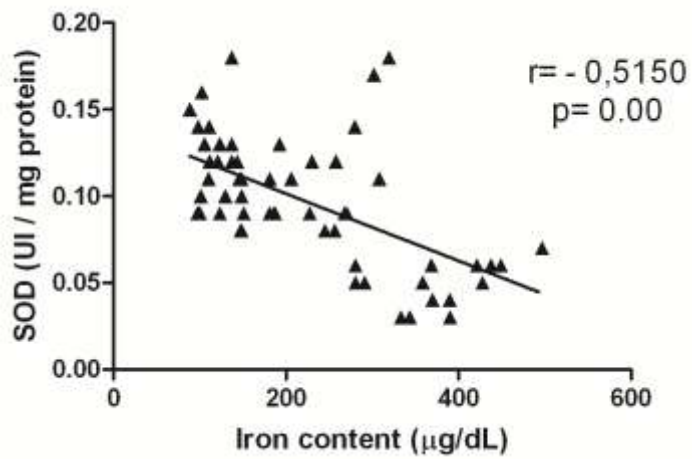


Figure 12

A



B



C

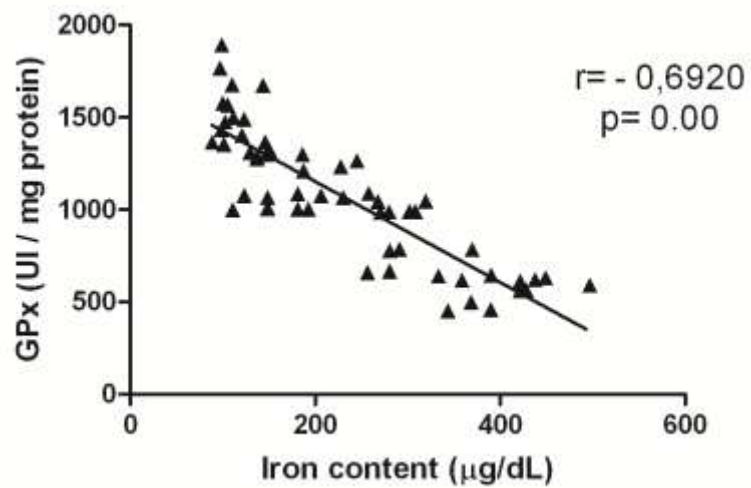
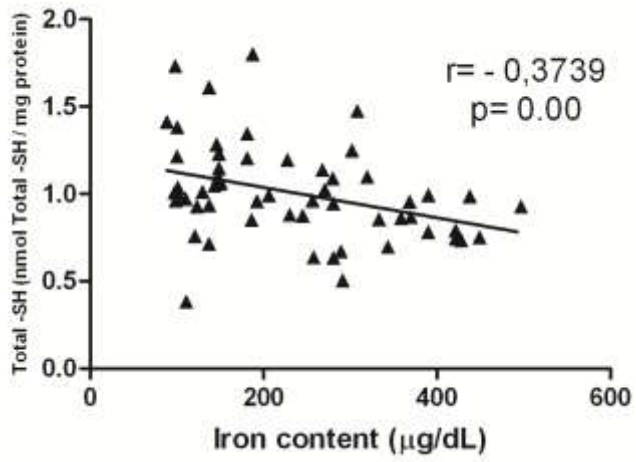
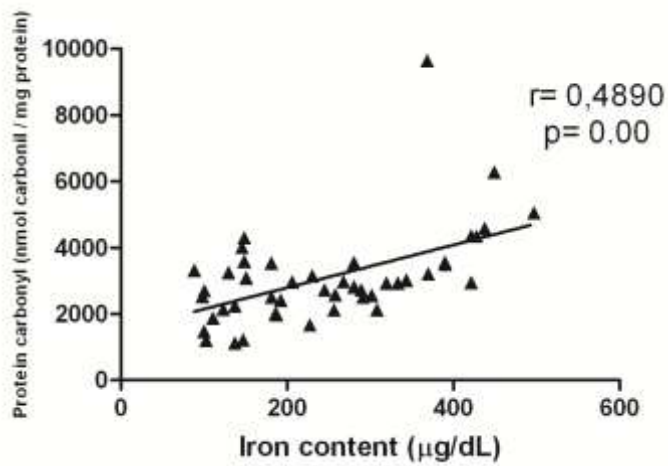


Figure 12

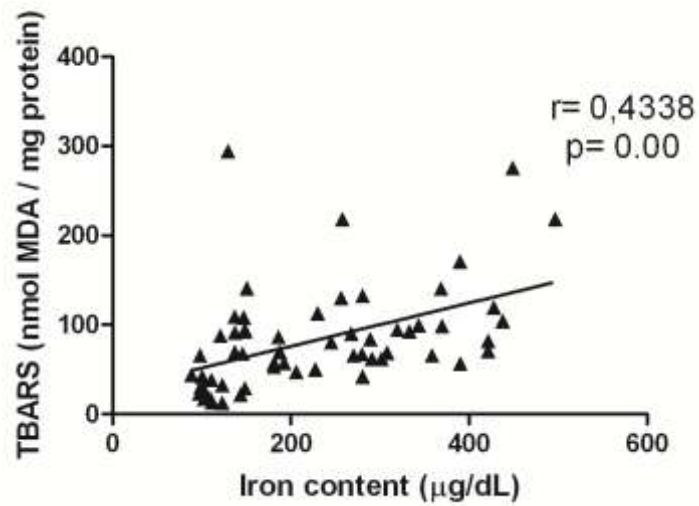
D



E



F



Tables

Table I: Characteristics of the subjects

	Mean of Age*	Male	Female	Mean of Number of transfusions*
Group control	40.1 (20-50)	15 (75%)	5 (25%)	0 (0)
Group <5	62.8 (24-92)	14 (93.3%)	1 (6.6%)	3.20 (2-4)
Group 5-10	64.8 (49-84)	11 (64.7%)	6 (35.2%)	7.17 (5-9)
Group >10	57.5 (24-74)	14 (77.7%)	4 (22.2%)	18.78 (14-26)

*Results from age and number of transfusions are expressed as mean (min - max).

Table II: Pearson correlations in both control and politransfused subjects

	GPx	SOD	CAT	TBARS	DCFH-DA oxidation	Protein Carbonyl	Iron
Total SH	.3990* P=.000	.4124* P=.000	.4082* P=.000	-.2147* P=.006	-.1211 (n.s.)	-.0646 (n.s.)	
Protein Carbonyl	-.4418* P=.000	-.2390* P=.002	-.3033* P=.000	.4604* P=.000	-.3202* P=.000	-	
DCFH-DA oxidation	.0541 (n.s.)	-.0484 (n.s.)	.0703 (n.s.)	-.1421 (n.s.)	-	-	-.0068 (n.s.)
TBARS	-.2409* P=.002	-.1584* P=.045	-.1232 (n.s.)	-	-	-	
CAT	.9325* P=0.00	.7158* P=.000	-	-	-	-	
SOD	.7359* P=.000	-	-	-	-	-	
N° of transfusions					.0810 (n.s.)		

TBARS: Thiobarbituric acid-reactive substances; Total -SH: Total thiol groups; DCFH-DA: dichlorofluoresceindiacetate; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; GPx: Glutathione peroxidase; n.s.: not significant; * Significant correlation at indicated P value.

5. DISCUSSÃO

A análise dos dados obtidos nesse estudo demonstrou que os indivíduos multitransfundidos apresentaram os parâmetros oxidativos alterados. Com o aumento do número de transfusões sanguíneas houve um aumento significativo dos níveis de peroxidação lipídica, uma diminuição significativa dos níveis de grupamentos tiólicos, um aumento significativo dos níveis de carbonilação de proteína, um aumento significativo dos níveis de espécies reativas de oxigênio, um aumento significativo do nível de ferro sérico, e uma diminuição significativa da atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase. Essas alterações foram observadas principalmente em indivíduos que receberam mais de dez transfusões sanguíneas, concordando com o estudo de MAJHAIL et al, 2008, onde descreve que indivíduos que receberam de 10 a 20 unidades de concentrado de hemácias já desenvolvem os efeitos oxidativos da sobrecarga cumulativa de ferro.

Foi observado um aumento significativo do nível de ferro plasmático nos indivíduos multitransfundidos com o aumento do número de transfusões sanguíneas, tendo uma correlação significativa positiva do TBARS e carbonil com o conteúdo de ferro plasmático e uma correlação significativa negativa do total-SH, CAT, SOD, GPx, com o conteúdo de ferro plasmático. Esses dados estão de acordo com o estudo de CIGHETTI et al, 2002, que observou que o ferro sérico está significativamente mais elevado em pacientes talassemicos dependentes de transfusões sanguíneas do que nos talassemicos não dependentes de transfusão sanguíneas, e correlacionou positivamente peroxidação lipídica e ferro sérico. Estes resultados confirmam que o ferro é um catalisador eficaz para a geração de ERO, o que resulta em peroxidação lipídica e aumento do estresse oxidativo in vivo (ZHANG et al, 2012). Uma análise retrospectiva multivariada de 902 pacientes demonstrou forte relação entre os níveis de ferro sérico com a sobrevida global reduzida, e com sobrevivência livre de leucemia (SANZ et al., 2008). Essa correlação entre a sobrecarga de ferro e o risco de progressão leucêmica é apoiada por estudos que demonstram aumento da instabilidade genômica em células progenitoras hematopoiéticas expostas a níveis aumentados de ROS (KOPTYRA ET AL, 2006; NAKA et al, 2008; RASSOOL ET AL, 2007). Em modelos animais, a sobrecarga de ferro é demonstrada pelo mecanismo de dano hepatocelular mediado por ERO, onde a sobrecarga de ferro facilita a formação de ERO, que perturba o equilíbrio redox das células e causa estresse oxidativo e nitrosativo (TOYOKUNI, 2011).

O MDA plasmático é um biomarcador bem reconhecido de peroxidação lipídica. Nosso estudo demonstrou aumento significativo dos níveis de MDA nos indivíduos multitransfundidos, com correlação significativa positiva com o número de transfusões sanguíneas recebidas. Nosso resultado está de acordo com diversos estudos onde demonstram que o aumento da peroxidação lipídica é amplamente observado em pacientes talassêmicos que dependem de transfusões sanguíneas contínuas para sobreviver (CIGHETTI et al, 2002; LAKSMITAWATI et al, 2003; CHAKRABORTY et al, 2001). WALTER e cols. (2006) demonstraram que a análise da regressão comparando MDA com a concentração de ferro no fígado de indivíduos talassemicos e indivíduos com anemia falciforme mostram que, em ambas as doenças, concentrações mais elevadas de ferro no fígado estão associadas com maiores níveis de MDA plasmático.

A dosagem dos grupamentos tiólicos totais são usados como parâmetro de medida de dano oxidativo as proteínas plasmáticas. Os tiois estão presentes no plasma em substâncias de baixo peso molecular, tais como cisteína e glutatona, e como resíduo de proteínas maiores, como a albumina. Em geral, 80% dos tiois livres do plasma estão contidos na albumina (RADI et al, 1991). Observamos que os níveis de grupamentos tiólicos foram significativamente diminuídos com o aumento do número de transfusões sanguíneas, numa correlação significativa negativa com o número de transfusões sanguíneas. Estes dados estão de acordo com o estudo de DEVI et al, 2010, onde demonstrou que os níveis de proteínas tiólicas na mitocôndria de fígado de ratos tratados com ferro e álcool eram significativamente diminuídos em relação aos ratos tratados somente com álcool. CHUNG et al, 2005 demonstrou que o ferro reage não enzimaticamente com tiois no plasma, principalmente a albumina, gerando espécies reativas de oxigênio, desencadeando redução da capacidade antioxidante no plasma e aumento da susceptibilidade de oxidação de LDL colesterol. Pesquisas recentes relataram que a sobrecarga de ferro e aumento dos níveis de tiois plasmáticos estão associadas com o aumento da mortalidade em pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda secundária a circulação extracorpórea (QUINLAN et al, 2000).

A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação de proteínas, e sua quantificação pode ser usada para medir a extensão do dano oxidativo (BERLETT & STADMAN, 1997; BEAL, 2003; DALLE-DONNE et al, 2003). Atualmente é um marcador de oxidação proteica bastante usado e está aumentado em várias doenças humanas, como Doença de Alzheimer, Diabetes mellitus, inflamação e artrite reumatóide (DALLE-DONNE et al, 2003). São produzidos pela oxidação da cadeia lateral de aminoácidos (prolina, arginina, lisina e treonina), ou pela clivagem oxidativa das proteínas.

Também podem ser introduzidos nas proteínas por uma reação dos aminoácidos cisteína, histidina e lisina com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (DALLE-DONNE et al, 2003). As proteínas modificadas oxidativamente são produtos quimicamente estáveis, sendo um fator importante para a sua detecção e armazenamento (RUTKOWSKA et al, 2005). No nosso estudo encontramos um aumento significativo de grupamentos carbonílicos com o aumento do número de transfusões sanguíneas, com correlação significativa positiva. Nosso estudo está de acordo com o estudo de SHE-FANG et al, 2007, onde demonstrou aumento de peroxidação lipídica e formação de proteína carbonil em hepatócitos de ratos tratados com sobrecarga de ferro. Segundo VENKATRAMAN et al, 2004, as modificações de proteínas durante o estresse oxidativo pode causar aumento no teor de proteína carbonil e perda de grupamentos tiólicos.

A fim de detectar as ERO geradas pela sobrecarga de ferro, foi medida a emissão DCFH-DA no plasma. Observamos um aumento significativo de ERO nos indivíduos multitransfundidos em relação ao grupo controle, com uma correlação significativa positiva com o número de transfusões sanguíneas. Nossos estudos estão de acordo com SHE-FANG et al, 2007, onde demonstrou que o tratamento com ferro ao plasma humano aumentou a emissão de DCFH-DA em uma concentração dose-dependente.

Este trabalho investigou a capacidade antioxidante dos indivíduos multitransfundidos pela mensuração das enzimas antioxidantes CAT, SOD, GPx. Foi observado que a atividade dessas enzimas foram significativamente diminuídas com o aumento do número de transfusões sanguíneas, e ainda, observamos uma correlação significativa negativa das enzimas antioxidantes com o número de transfusões sanguíneas. Provavelmente esta diminuição da atividade das enzimas antioxidantes está relacionada ao seu consumo como sequestrador de oxidantes. Segundo CHAKRABORTY et al, 2011, estes níveis baixos de enzimas antioxidantes provavelmente contribuem para níveis aumentados de MDA, proteína carbonil e ERO. CHUNG et al, 2005, demonstrou que após o tratamento de plasma humano com ferro, a capacidade antioxidante diminuiu em 50%, sugerindo que o plasma sob condição de sobrecarga de ferro pode se tornar mais suscetível à ação de oxidantes. Nosso estudo discorda em partes com o estudo de ZHANG et al, 2012, onde observou aumento de proteínas carbonil, de MDA, da atividade da SOD e diminuição do conteúdo de sulfidrilas e da atividade de GPx em ratos com lesão hepática tratados com sobrecarga de ferro. Nosso estudo concorda com o estudo de SHE-FANG et al, 2007, que demonstrou uma depleção de 47% na atividade da GPx em hepatócitos expostos a sobrecarga de ferro. No entanto, os

mecanismos de regulação da expressão das enzimas antioxidantes na sobrecarga de ferro necessitam ser mais explorados.

Considerando o exposto, é razoável sugerir que os antioxidantes podem ser associados com a terapia de sangue. De fato, dados anteriores relatam que a suplementação com antioxidantes é segura e afeta favoravelmente os marcadores de estresse oxidativo, embora isso não resulte em um benefício clínico significativo. No entanto, são necessários mais estudos para compreender melhor os mecanismos associados aos danos oxidativos ocasionados por ferro, na tentativa de minimizar os efeitos secundários associados a terapia de transfusão de sangue repetida e melhorar a qualidade de vida destes indivíduos.

6. CONCLUSÃO

- Em resumo, este estudo confirma o envolvimento de estresse oxidativo em pacientes anêmicos após a terapêutica com múltiplas transfusões sanguíneas, e sua correlação com o teor plasmático de ferro. A concentração de ferro plasmático estava significativamente aumentada nos indivíduos multitransfundidos;
- As enzimas de defesas antioxidantes (CAT, SOD, GPx) encontraram-se significativamente diminuídas nos indivíduos submetidos a múltiplas transfusões sanguíneas;
- O dano oxidativo a proteínas plasmáticas (proteína carbonil) e o dano oxidativo a lipídeos (TBARS) encontraram-se significativamente maiores nos indivíduos submetidos a múltiplas transfusões sanguíneas;
- O conteúdo de grupamentos tiólicos totais (TOTAL-SH) foi significativamente reduzido nos indivíduos submetidos a múltiplas transfusões sanguíneas;
- O conteúdo de ERO foi significativamente aumentado nos indivíduos multitransfundidos com o aumento do número de transfusões sanguíneas;
- Além disso, verificou-se que as alterações nos marcadores de estresse oxidativo são correlacionadas, pelo menos em parte, com o conteúdo de ferro plasmático e o número de transfusões sanguíneas;

7. PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados apresentados nessa dissertação faz-se necessário:

- Quantificar os níveis séricos de ferritina e transferrina;
- Quantificar os níveis de glutatona reduzida e glutatona oxidada;
- Elucidar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) com a toxicidade do ferro e/ou com as múltiplas transfusões sanguíneas no desenvolvimento do estresse oxidativo;
- Elucidar mecanismos de regulação da expressão das enzimas antioxidantes sob a sobrecarga de ferro transfusional;
- Instituir uma terapia antioxidante nos indivíduos em tratamento com múltiplas transfusões sanguíneas, a fim de neutralizar e/ou reverter os danos oxidativos observados neste estudo, como tentativa de melhorar a qualidade de vida desses indivíduos.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M.K., 2010. Hereditary hemochromatosis: a literature review and case report. *Physiother. Can.* 62, 276–284.
- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HEGEN, T.M.; 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Pro Natl Acad Sci USA.* 90: 7915-7922.
- ANDREWS NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999;341:1986-95.
- ANDREWS, N. 2005. Iron metabolism. In N. Andrews, C. Breyman, C. Gasche, & ITO Staff (Eds.), *ITO textbook—Iron therapy in various settings*. Retrieved from <http://www.irontherapy.org/a.php3?d=iron-metabolism--56&a=ITO-Textbook-Chapter-1:-Iron-Metabolism--4233>
- ANDREWS, NC. 1999. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*; 341:1986–1995.
- BATLOUNI, M. 1997. Hipotese oxidativa na aterosclerose e empregados antioxidantes na doença arterial coronária. *Arquivo Brasileiro Cardiologia.* 68(1).
- BEAL, D. J., COHEN, R. R., BURKE, M. J., & MCLENDON, C. L. 2003. Cohesion and performance in groups: A Meta-analytic clarification of construct relations. *Journal of Applied Psychology*, 88(6), 989-1004.
- BERLETT, BS, E STADTMAN, ER 1997. Oxidação de proteínas no envelhecimento, doenças e estresse oxidativo. *J. Biol. Chem.* 372, 20313-20316.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.O. 1999. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev Nutrição.* 12(2):123-130.
- BRASIL I. 2008. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção a Saúde. Departamento de atenção especializada. Guia para o uso de hemocomponentes. Brasília.
- BRASIL II. 2011. Ministério da saúde. Sangue e Hemoderivados: Produção hemoterápica: Sistema Único de Saúde-SUS. Serie G. Estatística e Informação em Saúde. Brasília.
- CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYYA, M. 2001. Antioxidant defense status of red blood cells of patients with β -thalassemia and $\delta\beta$ -thalassemia. *Clinica Chimica Acta* 305 (123–129).
- CHUNG, K. Y., LEE, S. J., CHUNG, S. M., LEE, M. Y., BAE, O. N., AND CHUNG, J. H. 2005. Generation of free radical by interaction of iron with thiols in human plasma and its possible significance. *Thromb Res*, 116, 157-164.
- CHUNG, K.Y. LEE,S.J. CHUNG,S.M. LEE,M.Y. BAE,O.N. CHUNG, J.H. 2005. Generation of free radical by interaction of iron with thiols in human plasma and its possible significance. *Thrombosis Research* (116, 157-164).

CIGHETTI, G. DUCA, L. BORTONE, L. SALA, S. NAVA, I. FIORELLI, G. CAPPELLINI, M. D.2002. Oxidative status and malondialdehyde in b-thalassaemia patients. *European Journal of Clinical Investigation*.32(1):55–60.

COLPO, E., BEM, A.F., PIENIZ, S., SCHETTERT, S.D., SANTOS, R.M., FARIAS, I.L.G., BERTONCELLO, I., MOREIRA, C.M., MORETTO, M.B., ROCHA, J.B.T. 2008. A single high dose of ascorbic acid and iron not correlated with oxidative stress in healthy volunteers. *Annals of Nutrition and Metabolism* 53, 79-85.

CRICHTON RR, WARD RJ. 2003. An overview of iron metabolism: molecular and cellular criteria for the selection of iron chelators. *Curr Med Chem*; 10:997–1004.

DALLE-DONNE, I., D. GIUSTARINI, R. COLOMBO, R. ROSSI AND A. MILZANI, 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.*, 9: 169-176.

DEVI, S. L.; ANURADHA, C.V. 2010.Oxidative and nitrosative stress in experimental rat liver fibrosis: Protective effect of taurine. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29 104–110.

EMERIT, J., BEAUMONT, C., AND TRIVIN, F. 2001. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*, 55, 333-339.

FERREIRA, A.L.A. MATSUBARA, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RevAssistenciaMedica Brasil*. 43(1):61-68.

FIBACH, E. & RACHMILEWITZ, E. 2008.The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current Molecular Medicine*, 8, 609–619.

FIBACH, E. RACHMILEWITZ, E. A. VICHINSKY, E. P. NEUFELD, E. J. 2010. The role of antioxidants and iron chelators in the treatment of oxidative stress in thalassemia. *Annals of the New York Academy of Science*. 1202:10-16.

FREITAS JM, MENEGHINI R. MUTAT RES. 2001. 6. Iron and its sensitive balance in the cell. *Apr* 18;475(1-2):153-9. Review. PMID:11295160

GATTERMANN, N., & RACHMILEWITZ, E.A. 2011.Iron overload in MDS-pathophysiology, diagnosis, and complications. *Annals of Hematology*, 90, 1–10. doi:10.1007/s00277-010-1091-1.

GHOTI, H. FIBACH, E. MERKEL, D. AVRAHAM, G. P. GRISARIU, S. RACHMILEWITZ, E. A. 2010. Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron overloaded patients with myelodysplastic syndromes. *Letters to the Editor.Hematologica*. 95(8):1433-1434.

GURZAU E.S., C. NEAGU, A. E. GURZAU, 2003:Essential metals - case study on iron, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Special Issue on Methodologies for Assessing Exposures to Metals: Speciation, Bioaccessibility and Bioavailability in the Environment, *Food and Feed*, 56 (1), 190-200.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. Oxford University Press.

HALLIWELL, B. 2000. The antioxidant paradox. *Lancet* **355**, 1179 – 1180.

HALLIWELL, B.; 2006. Proteasomal dysfunction; a common feature of all neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (11-12): 2007-2019;

HERSHKO, C. VICHINSKY, E. P. NEUFELD, E. J. 2010. Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia. *Annals of the New York Academy of Science*. 1202:1-9.

HIRATA, L.L. SATO, M.E.O. SANTOS, C.A.M. 2004. Cutaneous aging and free radicals. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 23(3):418-424.

KEW, M.C. 2009. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 286, 38–43.

KOPTYRA, M., FALINSKI, R., NOWICKI, M.O., STOKLOSA, T., MAJSTEREK, I., NIEBOROWSKA SKORSKA, M., SKORSKI, T. 2006. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*, 108, 319–327.

LAKSMITAWATI, D.R., HANDAYANI, S., UDYANINGSIH-FREISLEBEN, S.K., KURNIATI, V., ADHIYANTO, C., HIDAYAT, J., KUSNANDAR, S., DILLON, H.S., MUNTHE, B.G., WIRAWAN, R., SOEGIANTO, R.R., RAMELAN, W. & FREISLEBEN, H.J. 2003. Iron status and oxidative stress in beta-thalassaemia patients in Jakarta. *Biofactors*, 19, 53–62.

LAMBING, MSN, NP-C (NURSE PRACTITIONER), ELLEN KACHALSKY, LMSW (SOCIAL WORKER), & MARY LINDA MUELLER. 2012. The dangers of iron overload: Bring in the Iron Police. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners* 24 -175–183.

LANGLOIS D'ESTAINTOT B, SANTAMBROGIO P, GRANIER T, GALLOIS B, CHEVALIER JM, PRE'CIGOUX G, LEVI S, AROSIO P: 2004. Crystal structure and biochemical properties of the human mitochondrial ferritin and its mutant Ser144. *Ala. J Mol Biol*; 340:277–293.

LEE, P.L. & BEUTLER, E. 2009. Regulation of hepcidina and iron-overload disease. *Annual Review of Pathology*, 4, 489–515.

LEI Nº 10.205, de 21 de março de 2001. Disponível em: www.saude.mg.gov.br/atos_normativos/...de.../Lei_10205.pdf

LINDER, M.C. 1991. Nutrition and metabolism of the trace elements. Elsevier Science Publishing Company. New York. 215-276.

LIST, A.F. 2010. Iron overload in myelodysplastic syndromes: Diagnosis and management. *CancerControl*, 17(Suppl.), 2–8.

LOUREIRO, A.P.M. MASCIO, P.D. MEDEIROS, M.H.G. 2002. Exocyclic DNA adducts: implications in mutagenesis and carcinogenesis. *Quimica Nova*. 25(5):777-793.

MAJHAIL, N.S. LAZARUS, H.M. BURNS, L.J. 2008. Iron overload in hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 41, 997–1003.

MANFREDINI, V. BIANCINI, B.G. VANZIN, S. C. DAL VESCO, M. A. CIPRIANI, F. BIASI, L. TREMÉA, R. DEON, M. PERALBA, M. C. WAJNER, M. VARGAS, R.C. 2010. Simvastatin Treatment Prevents Oxidative Damage to DNA in Whole Blood Leukocytes of Dyslipidemic Type 2 Diabetic Patients. *Cell Biochemistry and Function*. 28:360-366.

NAKA, K., MURAGUCHI, T., HOSHII, T., & HIRAO, A. 2008. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxidants and Redox Signaling*, 10, 1883–1894.

OHKAWA, H., OHISHI, N., AND YAGI, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95, 351-358.

OZMENT, C.P., & TURI, J.L. 2009. Iron overload following red blood cell transfusion and its impact on disease severity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790, 694–701. doi:10.1016/j.bbagen.2008.09.010

PAGLIA D E & VALENTINE WN. 2008. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Cm. Med.* 70:158-69,

PIERIGÈ F, SERAFINI S, ROSSI L, MAGNANI M. (JANUARY 2008). "Cell-based drug delivery". *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2): 286–95.

PORTARIA Nº 1.353 DE 13 DE JUNHO DE 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/resolucao_153_2004.pdf.

PORTER, J.B. 2001. Practical management of iron overload. *Br. J. Haematol.* 115. 239–252.

QUINLAN GJ, MUMBY S, LAMB NJ, MORAN LK, EVANS TW, GUTTERIDGE JM. 2000. Acute respiratory distress syndrome secondary to cardiopulmonary bypass: do compromised plasma iron-binding anti-oxidant protection and thiol levels influence outcome? *Crit Care Med*; 28:2271–6.

RADI R, BUSH KM, COSGROVE TP, FREEMAN BA. 1991. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Arch Biochem Biophys*; 286:117–25.

RAMM, G.A., RUDELL, R.G. 2005. Hepatotoxicity of iron overload: mechanisms of iron-induced hepatic fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* 25, 433–449.

RASSOOL, F.V., GAYMES, T.J., OMIDVAR, N., BRADY, N., BEURLET, S., PLA, M. PADUA, R.A. 2007. Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: A model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? *Cancer Research*, 67, 8762–8771.

RESOLUÇÃO-RDC Nº 153, DE 14 DE JUNHO DE 2004. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/resolucao_153_2004.pdf

REPKA T, SHALEV O, REDDY R, YUAN J. 2010. Nonrandom association of free iron with membranes of sickle and β -thalassemic erythrocytes. *Blood* 1993;82:3204–10.

RIBAS, G. S. MANFREDINI, V. DE MARI, J. WAYHS, Y. C. VANZIN, C. S. BIANCINI, G. B. SITTA, A. DEON, M. WAJNER, M. VARGAS, C. R. 2010. Reduction of lipid and protein damage in patients with disorders of propionate metabolism under treatment: a possible protective role of L-carnitine supplementation. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 28:127-132.

RUTKOWSKA, J., CICHON, M., PUERTA, M. & GIL, D. 2005. Negative effects of elevated testosterone on female fecundity in zebra finches. *Hormones and Behavior*, 47, 585–591. doi:10.1016/j.jhbeh. 2004.12.006.

SANZ G, NOMDEDEU B, SUCH E, BERNAL T, BELKAID M, ARDANAZ, MT, MARCO V, PEDRO C, RAMOS F, DEL CANIZO MC, LUNO E, COBO F, CARBONELL F, GOMEZ V, MUNOZ JA, AMIGO ML, BAILEN A, BONADAD S, TORMO M, ANDREU R, ARRIZABALAGA B, ARILLA MJ, BUENO J, REQUENA MJ, BARGAY J, SANCHEZ J, SENENT L, ARENILLAS L, DE PAZ R, XICOY B, DUARTE R, CERVERA J: December 6–9, 2008. Independent impact of iron overload and transfusion dependency on survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome. Presented at the Annual Meeting of the American Society of Hematology.; San Francisco, California. Abstract 640

SAZAMA. SHANDER. 2010. Clinical consequences of iron overload from chronic red blood cell transfusions, its diagnosis, and its management by chelation therapy. *TRANSFUSION*;50:1144-1155.

SHAH, J. SANDRA E. KURTIN, RN, LOUISE ARNOLD, PETRA LINDROOS-KOLQVIST, SARA TINSLEY. 2012. Management of Transfusion-Related Iron Overload in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *Clinical Journal of Oncology Nursing • Supplement to Volume 16, Number 3*.

SHANDER, A. CAPPELLINI, M.D. GOODNOUGH, L.T. 2009. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. *Vox Sanguinis* 97, 185–197.

SHE-FANG YE¹, ZHEN-QING HOU¹ AND QI-QING ZHANG. 2007. Protective Effects of *Phellinus linteus* Extract against Iron Overload-mediated Oxidative Stress in Cultured Rat Hepatocytes. *Phytother. Res.* 21, 948–953.

SIMÕES, B.P. PIERONI, F. BANOS, G. M. N. MACHADO, C. L. CANÇADO, R. D. SALVINO, N. A. ANGELO, I. VOLTARELLI, J. C. 2010. Brazilian consensus meeting on stem cell transplantation: hemoglobinopathies committee. *Rev Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 32(1).

SITTA, A. MANFREDINI, V. BIASI, L. TREMÉA, R. SCHWARTZ, I. WAJNER, M. VARGAS, C. R. 2009. Evidence that DNA damage is proportional to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 679:13-16.

TOYOKUNI S. 1996. Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Rad Biol Med* 20:553–566

TOYOKUNI, S. 2011. Iron as a target of chemoprevention for longevity in humans. *Free. Radic. Res.* 45, 906–917.

TSAY, J. YANG, Z. W. ROSS, F. P. CUNNINGHAM-RUNDLES, S. LIN, H. COLEMAN, R. MAYER-KUCHUK, P. DOTY, S. B. GRADY, R.W. GIARDINA, P. J. BOSKEY, A. L. VOGIATZI, M. G. 2010. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood*. 116(14):2582-2589.

VASCONCELOS, S.M.L. GOULART, M.O.F. MOURA, J.B.F. MANFREDINI, V. BENFATO, M.S. KUBOTA, L.T. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quimica Nova*. 30(5):1323-1338.

VENKATRAMAN, A., LANDAR, A., DAVIS, A.J., ULASOVA, E., PAGE, G., MURPHY, M.P., DARLEY-USMAR, V., BAILEY, S.M., 2004. Oxidative modification of hepatic mitochondria protein thiols: effect of chronic alcohol consumption. *Am.J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286, G521–G527.

VERRASTRO, Therezinha, 2005. Atheneu, *Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo.

WALTER, P.B. ELLEN B. FUNG,³ DAVID W. KILLILEA,¹ QING JIANG,¹ MARK HUDES,⁴ JACQUELINE MADDEN,² JOHN PORTER,⁵ PATRICIA EVANS,⁴ ELLIOTT VICHINSKY³ AND PAUL HARMATZ. 2006. Oxidative stress and inflammation in iron overloaded patients with b-thalassaemia or sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, 135, 254–263.

ZHANG A,B,Y. HUANG A.Y. DENG C.X. XU A. Y. GAO A.Z. HAILING LI. 2012. Iron overload-induced rat liver injury: Involvement of protein tyrosine nitration and the effect of baicalin. *European Journal of Pharmacology* 680 95–101.

ANEXO I

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unipampa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
Comitê de Ética em Pesquisa
Unipampa/CEP - Portaria nº 728/09/GR/Unipampa
Registrado na CONEP - Ofício nº 3210/CNS/GM/MS
Endereço eletrônico: cep@unipampa.edu.br



Uruguaiana, 09 de janeiro de 2012.

CARTA DE APROVAÇÃO Nº 001 2012

Prezado Pesquisador Responsável

Robson Luiz Puntel

Comunicamos que o protocolo de pesquisa intitulado DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E BIOQUÍMICOS EM INDIVÍDUOS POLITRANSFUNDIDOS, registro ProPesq 10.120.11.CEP, registro Unipampa/CEP 090 2011, foi avaliado por este CEP e está **aprovado** para execução a partir da presente data.

Lembramos que qualquer alteração no protocolo de pesquisa submetido a avaliação deverá ser comunicada ao Unipampa/CEP imediatamente, bem como eventos adversos, e que o relatório parcial deverá ser entregue em **julho de 2012**.

Atenciosamente,

Rosana Soibelman Glock
Coordenadora CEP