



## ARTIGO ORIGINAL

# Oxidant-antioxidant status in Egyptian children with sickle cell anemia: a single center based study<sup>☆</sup>



Mona Kamal El-Ghamrawy<sup>a,\*</sup>, Wagdi Maurice Hanna<sup>b</sup>, Amina Abdel-Salam<sup>a</sup>,  
Marwa M. El-Sonbaty<sup>b</sup>, Eman R. Youness<sup>c</sup> e Ahmed Adel<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Pediatria, New Children's Hospital, Universidade do Cairo, Cairo, Egito

<sup>b</sup> Departamento de Saúde Infantil, Centro Nacional de Pesquisa, Cairo, Egito

<sup>c</sup> Departamento de Bioquímica Médica, Centro Nacional de Pesquisa, Cairo, Egito

Recebido em 1 de julho de 2013; aceito em 4 de setembro de 2013

### KEYWORDS

Antioxidants;  
Nitrite;  
Paraoxonase;  
Malondialdehyde;  
Sickle cell anemia;  
Children

### Abstract

**Objective:** the present study was conducted to investigate the oxidant-antioxidant status in Egyptian children with sickle cell anemia.

**Methods:** the serum levels of total antioxidant capacity (TAO), paraoxonase (PON), vitamin E, nitrite, and malondialdehyde (MDA) were measured in 40 steady state children with homozygous sickle cell anemia (24 males and 16 females) and 20 apparently healthy age- and gender-matched controls

**Results:** mean serum TAO, PON, vitamin E, and nitrite levels were significantly lower in the group with sickle cell anemia, whereas mean serum MDA was significantly higher in these children compared to controls. No significant differences in mean levels of TAO, PON, nitrite, vitamin E, and MDA were found in sickle cell anemia patients receiving hydroxyurea when compared with those not receiving hydroxyurea. A significant negative correlation between serum nitrite and the occurrence of vaso-occlusive crises (VOC) was observed ( $r = -0.3$ ,  $p = 0.04$ ). PON level was found to be positively correlated with patients' weight and BMI ( $r = -0.4$ ,  $p = 0.01$ ;  $r = -0.7$ ,  $p < 0.001$ , respectively), but not with frequency of VOC. The area under the curve of serum nitrite in predicting occurrence of VOC was 0.782, versus 0.701 for PON, and 0.650 for TAO ( $p = 0.006$ ). Serum MDA was not correlated with nitrite, PON, TAO, or vitamin E levels. No significant correlations were detected between serum nitrite and hemoglobin or antioxidant enzymes.

**Conclusion:** children with sickle cell anemia have chronic oxidative stress that may result in increased VOC, and decreased serum nitrite may be associated with increases in VOC frequency. A novel finding in this study is the decrease in PON level in these patients, which is an interesting subject for further research.

© 2014 Sociedade Brasileira de Pediatria. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2013.09.005>

\* Como citar este artigo: El-Ghamrawy MK, Hanna WM, Abdel-Salam A, El-Sonbaty MM, Youness ER, Adel A. Oxidant-antioxidant status in Egyptian children with sickle cell anemia: a single center based study. J Pediatr (Rio J). 2014;90:286-92.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [melghamrawi@yahoo.com](mailto:melghamrawi@yahoo.com) (M.K. El-Ghamrawy).

**PALAVRAS-CHAVE**

Antioxidantes;  
Nitrito;  
Paraoxonase;  
Malondialdeído;  
Anemia falciforme;  
Crianças

**Estado oxidante-antioxidante em crianças egípcias com anemia falciforme: estudo baseado em um único centro****Resumo**

**Objetivo:** o presente estudo foi realizado com o objetivo de investigar o estado oxidante-antioxidante em crianças egípcias com anemia falciforme.

**Métodos:** dosamos os níveis séricos da capacidade antioxidante total (CAT), paraoxonase (PON), vitamina E, nitrito e malondialdeído (MDA) em 40 crianças estáveis com anemia falciforme homocigótica (24 meninos e 16 meninas), e 20 controles pareados por idade/sexo aparentemente saudáveis.

**Resultados:** os níveis séricos médios da CAT, PON, vitamina E e nitrito foram significativamente menores, ao passo que o nível sérico médio de MDA foi significativamente maior em crianças com anemia falciforme (AF), em comparação aos controles. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis médios de CAT, PON, nitrito, vitamina E e MDA em pacientes com AF em tratamento com hidroxiureia, em comparação aos que receberam hidroxiureia. Encontramos uma correlação negativa significativa entre o nitrito sérico e a ocorrência de crises vaso-oclusivas agudas (CVO) ( $r = -0,3$ ,  $p = 0,04$ ). Descobrimos que o nível de PON está correlacionado positivamente com o peso e o IMC dos pacientes ( $r = -0,4$ ;  $p = 0,01$ ;  $r = -0,7$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente), porém não com a frequência de CVO. A área sob a curva (ASC) do nitrito sérico na previsão da ocorrência de CVO foi 0,782, em comparação a 0,701 para PON e 0,650 para CAT ( $p = 0,006$ ). O MDA não está correlacionado a nitrito, PON, CAT ou vitamina E. Não foram detectadas correlações significativas entre nitrito sérico e hemoglobina ou enzimas antioxidantes.

**Conclusão:** crianças com AF apresentam estresse oxidativo crônico que pode resultar em aumento das CVO. Em crianças com AF, a redução nos níveis de nitrito sérico pode estar associada a aumentos da frequência de CVO. Um novo achado neste estudo é a redução no nível de PON em pacientes com AF, que é um campo interessante de novas pesquisas.

© 2014 Sociedade Brasileira de Pediatria. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

**Introdução**

A anemia falciforme (AF) é uma das doenças monogênicas mais comuns no mundo, predominantemente vista na África e sudeste da Ásia. Trata-se de uma doença multisistêmica, associada a episódios de doença aguda e danos progressivos a órgãos.<sup>1</sup> AF resulta de uma mutação pontual no código genético, de forma que o ácido glutâmico seja substituído por valina na cadeia de globinas da hemoglobina. Essa substituição transforma a hemoglobina de adultos normais (HbA) em hemoglobina falciforme (HbS). Quando desoxigenada, a HbS sofre polimerização, e quando uma quantidade essencial de polímero de HbS acumula em um eritrócito falciforme, ocorre lesão celular, e uma quantidade suficiente de eritrócitos danificados causa o fenótipo da doença falciforme (DF), reconhecida pela anemia hemolítica e vaso-oclusão.<sup>2</sup>

A DF emerge como um modelo importante de estresse oxidativo. Como as células vermelhas do sangue (CVS) carregam oxigênio para os tecidos do corpo, eles já são ricos em combustível oxidativo. Suas características estruturais diferentes fazem com que sejam suscetíveis a oxidação. O estresse oxidativo crônico resultante de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas oxidantes (ERO) e as enzimas antioxidantes constitui um fator fundamental na disfunção endotelial, inflamação e dano de múltiplos órgãos na DF. Além disso, a doença é caracterizada

por dano à membrana das células devido a um aumento nos produtos da peroxidação lipídica, como malondialdeído (MDA), e a um aumento no consumo de óxido nítrico (NO - Nitric Oxide).<sup>3,4</sup>

O aumento da produção de ERO é causado pelos mecanismos intrínsecos da doença, como aumento da atividade de várias oxidases (oxidase nicotinamida adenina dinucleotido fosfato [NADPH] e xantina oxidase endotelial),<sup>5</sup> auto-oxidação de HbS, liberação de ferro heme, aumento da dimetilarginina assimétrica,<sup>6</sup> desacoplamento da atividade de síntese do óxido nítrico e redução dos níveis de NO.<sup>7</sup> Isso melhorou a produção de radicais livres na AF e, posteriormente, reduziu a biodisponibilidade de NO inativa no relaxamento vascular por NO.<sup>8</sup> Relaxamento vascular prejudicado e redução da adesão endotelial contribuem para os fenômenos vaso-oclusivos.<sup>9</sup>

Vários relatos indicam que pacientes com AF tiveram seus níveis de antioxidantes, como NO, capacidade antioxidante total (CAT) e vitamina E, esgotados, em comparação a um grupo de controle de pessoas saudáveis normais.<sup>10-13</sup> Ademais, um estudo mostrou melhora significativa na peroxidação lipídica na AF, em comparação ao grupo de controle.<sup>14</sup> Contudo, poucos estudos avaliaram o papel dos oxidantes e o estado antioxidante em crianças com AF. Até onde sabemos, nenhum estudo foi realizado em pacientes com DF no Egito. Nosso objetivo foi avaliar o estado oxidante-antioxidante em crianças egípcias com AF, estáveis, por

meio da dosagem dos níveis séricos de MDA dos produtos da peroxidação lipídica, nitrito, paraoxonase (PON), vitamina E e capacidade antioxidante total (CAT).

## Materiais e métodos

Trata-se de um estudo caso-controle prospectivo realizado no New Children's Hospital, Universidade do Cairo, Egito, Departamentos de Saúde Infantil e Bioquímica Médica, Centro Nacional de Pesquisa, Cairo, Egito. Participaram do estudo 40 crianças com diagnóstico confirmado de AF homozigótica (Hb SS) (24 meninos e 16 meninas, com idades entre  $10,6 \pm 4,5$  anos) e 20 indivíduos saudáveis no grupo controle (pareados por idade e sexo, 12 meninos e oito meninas com idades entre  $10 \pm 2,8$  anos [ $p < 0,05$ ]). Para isso, obtivemos o consentimento dos responsáveis legais dos pacientes e do grupo de controle. Todos os recrutados estavam estáveis, comparecendo a visitas de monitoramento de rotina durante o período do estudo (de 1º de dezembro de 2011 a 30 de junho de 2012). Excluimos pacientes com idade superior a 18 anos, com doença febril aguda nas últimas 72 horas ou crises vaso-oclusivas agudas (CVO) três meses antes do início do estudo, doença grave concomitante e os participantes de um programa de transfusão sanguínea regular. Nenhum dos indivíduos recrutados recebeu suplementação de antioxidantes ou vitamínicos, como, por exemplo, vitamina E. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Cairo e pelo Comitê de Ética do Centro Nacional de Pesquisa, Cairo, Egito, de acordo com o Comitê Institucional de Proteção de Seres Humanos, e adotado pela 18ª Assembleia Médica Mundial, Helsinki, Finlândia.

Foram realizados anamnese detalhada e exames clínicos completos. Na inscrição, foram registrados vários episódios dolorosos graves nos 12 meses anteriores (frequência de CVO por ano), com uma definição funcional de CVO como dor nas extremidades, costas, abdômen, peito ou cabeça, levando à consulta clínica não agendada ou ida ao pronto-socorro e internações e que não puderam ser explicados se não por DF, com exclusão das síndromes mão-pé e torácica, osteomielite e qualquer episódio de dor tratada inteiramente em casa.<sup>15</sup>

Dentre os pacientes, 31 se encontravam em terapia de hidroxiureia (HU), com uma dose média de  $19,8 \pm 3,4$ ; faixa 15-30 mg/kg/dia, oral, uma vez ao dia. A duração média da HU foi de  $2,12 \pm 1,49$  anos. O aumento da dose foi guiado pela resposta clínica e hematológica sem tentativa de atingir a dose máxima de tolerância (DMT). Segundo a definição da DMT<sup>16</sup>; três indivíduos recebiam a DMT no momento da inscrição.

Amostras de sangue foram coletadas e processadas para determinar MDA, nitrito, PON, CAT e vitamina E, como segue: 5 mL de sangue foram coletados em tubos básicos e deixados para coagular durante 30 minutos, a 25° C; estes foram então centrifugados a 3.000 rotações por minuto durante 15 minutos, a 4° C, e o soro foi separado em tubos limpos e adequadamente etiquetados para investigação.

**Determinação da peroxidação lipídica:** A peroxidação lipídica foi avaliada dosando o nível de MDA. Ela foi determinada pela dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico utilizando o método de Ruiz-Larrea et al.,<sup>17</sup> no qual

as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico reagem com o mesmo para produzir um complexo avermelhado, com pico de absorvância a 532 nm.

**Determinação de nitrito sérico:** O nitrito sérico ( $\text{NO}_2^-$ ), como um marcador substituto para óxido nítrico sérico, foi dosado utilizando o reagente de Griess, de acordo com o método de Moshage et al.<sup>18</sup>; o nitrito, um produto final estável do radical óxido nítrico, é utilizado principalmente como indicador da produção de óxido nítrico.<sup>19</sup>

**Determinação da atividade da PON:** A atividade arilésterase da PON foi mensurada por espectrofotometria em sobrenadantes utilizando fenilacetato como substrato.<sup>20</sup>

**Dosagem dos níveis séricos da CAT:** Os níveis séricos da CAT foram determinados utilizando um método de dosagem automatizado que tem como base o branqueamento da cor característica de um cátion radical 2,2'-azino-bis mais estável (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) [ABTS] por antioxidantes (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA).<sup>21</sup> O cátion radical ABTS é descolorado por antioxidantes de acordo com suas concentrações e capacidades antioxidantes. Os resultados são expressos em equivalentes de mmolTrolox/L.

**Dosagem de vitamina E:** A vitamina E, como o tocoferol, foi dosada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).<sup>22</sup> Eritrócitos recém-obtidos foram armazenados em pirogalol 2% em etanol a 70° C. Todas as amostras foram analisadas em até dois meses de armazenamento utilizando uma coluna de fase reversa C-18 (Waters, Milford, MA), um sistema de solventes à base de metanol 95% e um detector UV/VIS a 292 nm.<sup>22</sup>

## Análise estatística

Os dados dos pacientes foram analisados utilizando o *software* SPSS 17.0 para Windows 7. As variáveis quantitativas foram expressas pela média e DP (desvio-padrão), e comparadas através do teste *t* de Student não pareado e do teste de Mann-Whitney. O teste de classificação de Spearman foi utilizado para correlacionar as variáveis quantitativas. As variáveis qualitativas foram expressas em números (frequência) e percentual e comparadas entre os grupos utilizando o teste Qui-quadrado. A análise de regressão logística foi realizada e foram calculados a precisão, a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN). Foi feita a curva de características de operação do receptor (COR) e calculada a área sob a curva (ASC). O corte ideal foi determinado para as variáveis necessárias. O valor de *p* foi considerado significativo se inferior a 0,05.

## Resultados

A tabela 1 ilustra uma comparação das variáveis testadas entre os pacientes com AF e o grupo controle. Os valores médios de nitrito, PON, CAT e vitamina E foram significativamente menores e o nível de MDA maior nos pacientes com AF que no grupo controle. Essa diferença estatisticamente significativa em todas as variáveis avaliadas também foi observada ao comparar os pacientes com AF e o grupo controle do mesmo sexo. O sexo não parecia afetar o estado oxidante-antioxidante dos pacientes com AF; não houve diferenças

**Tabela 1** Comparação dos níveis séricos do malondialdeído, nitrito, paraoxonase, capacidade antioxidante total e vitamina E em pacientes com anemia falciforme e controles

Variáveis	Casos de AF (n = 40)		Controle (n = 20)		Valor de p
	Média ± DP	Escala	Média ± DP	Escala	
MDA (nmol/mL)	2,56 ± 0,34	2-3,2	0,84 ± 0,04	0,79-0,91	0,0001 <sup>a</sup>
Nitrito (um/mL)	8,61 ± 1,1	6,6-11,7	13,88 ± 2,29	9,78-17,30	0,0001 <sup>a</sup>
PON (u/mL)	191,33 ± 33,19	108-269	247,8 ± 24,7	206-292	0,0001 <sup>a</sup>
CAT (mmol/l)	0,87 ± 0,10	0,56-0,99	1,03 ± 0,10	0,88-1,2	0,0001 <sup>a</sup>
Vitamina E (mg/mL)	0,174 ± 0,123	0,005-0,400	0,580 ± 0,259	0,10-0,90	0,0001 <sup>a</sup>

Variáveis	Meninos		Valor de p	Meninas		Valor de p
	Casos (n = 24)			Casos (n = 16)		
	Média ± DP	Média ± DP		Média ± DP	Média ± DP	
MDA (nmol/mL)	2,62 ± 0,34	0,85 ± 0,05	0,0001 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,34	0,83 ± 0,02	0,0001 <sup>a</sup>
Nitrito (um/mL)	8,67 ± 1,07	14,48 ± 1,3	0,0001 <sup>a</sup>	8,51 ± 1,17	12,98 ± 3,1	0,005 <sup>a</sup>
PON (u/mL)	188,08 ± 36,2	236,83 ± 18,8	0,0001 <sup>a</sup>	196,1 ± 28,4	264,2 ± 24,1	0,0001 <sup>a</sup>
CAT (mmol/l)	0,87 ± 0,08	1,04 ± 0,11	0,0001 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,12	1,02 ± 0,09	0,005 <sup>a</sup>
Vitamina E (mg/mL)	0,185 ± 0,131	0,417 ± 0,175	0,001 <sup>a</sup>	0,158 ± 0,112	0,825 ± 0,139	0,0001 <sup>a</sup>

Variáveis	Pacientes com AF (n = 40)				Valor de p
	Casos com meninos (n = 24)		Casos com meninas (n = 16)		
	Média ± DP	Escala	Média ± DP	Escala	
MDA (nmol/mL)	2,6 ± 0,34	2,1-3,2	2,4 ± 0,34	2-3,1	0,17
Nitrito (um/mL)	8,67 ± 1,07	6,9-11,7	8,5 ± 1,17	6,6-9,9	0,67
PON (u/mL)	188,08 ± 36,2	108-269	169,19 ± 28,4	129-243	0,46
CAT (mmol/l)	0,87 ± 0,08	0,71-0,9	0,87 ± 0,12	0,56-0,98	0,91
Vitamina E(mg/mL)	0,185 ± 0,131	0,005-0,400	0,158 ± 0,112	0,01-0,40	0,580

AF, anemia falciforme; DP, desvio-padrão; MDA, malondialdeído; PON, paraoxonase; CAT, capacidade antioxidante total.

<sup>a</sup> Estatisticamente significativo.

significativas nos níveis médios de nitrito, PON, CAT e nível de MDA em meninos e meninas com DF (tabela 1).

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis médios de nitrito, PON, CAT e MDA entre os casos com DF em terapia de HU e os que não receberam HU (tabela 2). Em comparação ao nível médio de vitamina E nos controles estudados, a prevalência de deficiência de vitamina E dentre os pacientes com AF foi de 100%.

Não foram detectadas correlações significativas entre a frequência das CVO e os níveis de MDA, vitamina E, PON ou CAT ( $p > 0,05$ ). Contudo, o nitrito sérico estava correlacionado negativamente à frequência de CVO ( $r = -0,3$ ,  $p = 0,04$ ), porém não estava correlacionado ao nível de hemoglobina, MDA, PON, CAT ou vitamina E ( $r = 0,19$ ,  $-0,3$ ,  $0,08$ ,  $0,03$  e  $0,05$ , respectivamente,  $p > 0,05$ ). Descobrimos que o MDA não está correlacionado a nenhuma das variáveis testadas, incluindo PON, CAT e vitamina E ( $p > 0,05$ ).

Descobrimos que o nível de PON está correlacionado positivamente ao peso e ao IMC dos pacientes ( $r = -0,4$ ,  $p = 0,01$ ;  $r = -0,7$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente). Não foram detectadas correlações significativas entre o PON sérico e a frequência de CVO, índices laboratoriais de hemólise,

inclusive hemoglobina, contagem de reticulócitos ou lactato desidrogenase (LDH), ou níveis de MDA, nitrito, vitamina E ou CAT ( $p > 0,05$ ) (tabela 3).

A figura 1 mostra a sensibilidade e a especificidade do nitrito, PON e CAT na previsão da ocorrência de CVO em diferentes valores de corte. Como não temos um padrão de base, comparamos o nitrito, PON e CAT pela curva de COR (Característica de Operação do Receptor), e descobrimos que as áreas sob a curva de nitrito (0,782) foram significativamente maiores em comparação às de PON (0,701) e CAT (0,650) ( $p = 0,006$ ), indicando que a previsibilidade geral do nitrito é significativamente maior em comparação a PON ou CAT. Contudo, ao determinar a sensibilidade ou especificidade do nitrito, descobrimos que estas se tornaram insatisfatórias, sendo improvável a sua adoção como bom indicador da ocorrência de CVO.

## Discussão

Nossos dados mostraram que houve reduções nos níveis de nitrito sérico, PON, CAT e vitamina E, um aumento

**Tabela 2** Comparação dos níveis séricos do malondialdeído, nitrito, paraoxonase, capacidade antioxidante total e vitamina E em pacientes com anemia falciforme recebendo HU e os não recebendo HU

Variáveis	Casos de AF recebendo HU (n = 31)		Casos de AF não recebendo HU (n = 9)		Valor de p
	Média ± DP	Escala	Média ± DP	Escala	
MDA (nmol/mL)	2,55 ± 0,34	2-3,2	2,57 ± 0,37	2,1-3,1	0,91
Nitrito (um/mL)	8,67 ± 0,94	6,6-10,1	8,39 ± 1,57	6,9-11,7	0,51
PON (u/mL)	186,6 ± 30,9	108-240	207,3 ± 37,6	148-269	0,10
CAT (mmol/l)	0,88 ± 0,09	0,63-0,9	0,82 ± 0,12	0,56-0,93	0,08
Vitamina E (mg/mL)	0,17 ± 0,127	0,005-0,4	0,19 ± 0,12	0,01-0,4	0,583

AF, anemia falciforme; DP, desvio-padrão; HU, hidroxiureia; MDA, malondialdeído; PON, paraoxonase; CAT, capacidade antioxidante total.

**Tabela 3** Correlações dos níveis de PON e as variáveis clínicas e laboratoriais dos pacientes

	Coefficiente de correlação	Valor de p
Idade (anos)	0,24	0,13
Idade na época do diagnóstico (anos)	0,30	0,06
Frequência de CVO (vezes/anos)	-0,21	0,20
Peso (Kg)	0,404	0,010 <sup>a</sup>
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	0,67	- 0,001 <sup>a</sup>
Hemoglobina (g/dl)	0,17	0,30
Reticulócitos (%)	-0,058	0,723
LDH (U/L)	0,247	0,125
MDA (nmol/mL)	-0,26	0,10
Nitrito (um/mL)	0,08	0,63
CAT (mmol/l)	-0,136	0,402
Vitamina E(mg/mL)	-0,08	0,62

CVO, crises vaso-oclusivas; IMC, índice de massa corporal; LDH, lactato desidrogenase; MDA, malondialdeído; PON, paraoxonase; CAT, capacidade antioxidante total.

<sup>a</sup> Estatisticamente significativo.

no estresse oxidativo, conforme representado pelo nível de MDA em crianças com AF. O sexo, bem como a terapia de hidroxiureia, não parece afetar o estado oxidante-antioxidante de crianças com AF. O nitrito sérico foi o único marcador correlacionado negativamente à frequência de CVO. A previsibilidade geral do nitrito na ocorrência de CVO foi significativamente maior em comparação a PON e CAT, porém um aumento em sua sensibilidade foi invariavelmente acompanhado por uma redução concomitante na especificidade.

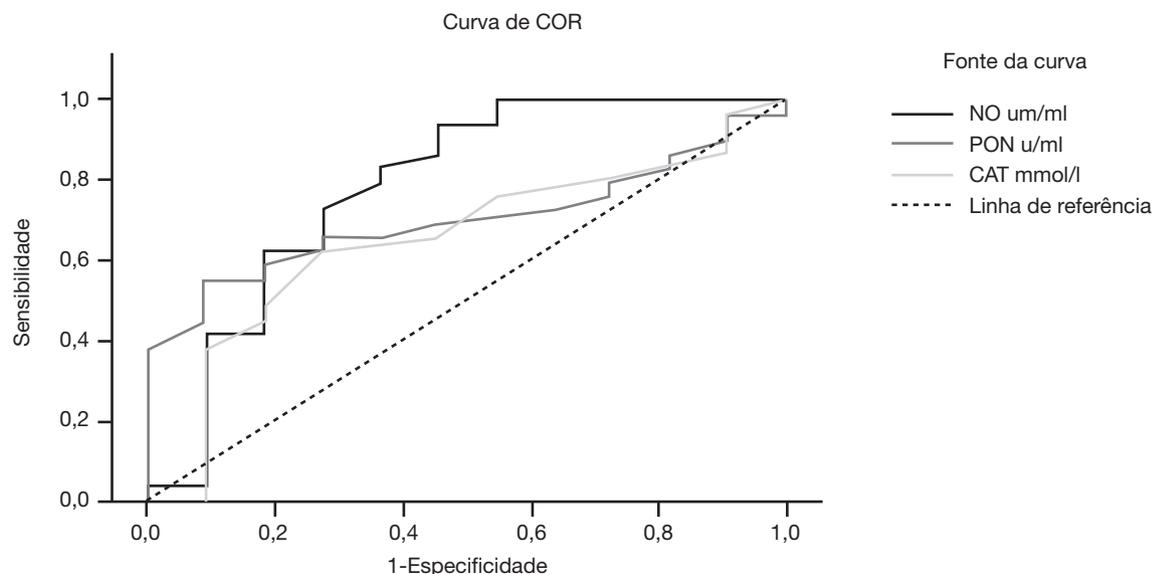
Vários estudos mostraram reduções nos níveis de atividade de nitrito,<sup>10,12</sup> PON, CAT<sup>11,12</sup> e vitamina E<sup>13</sup> em pacientes adultos com DF estáveis. Além disso, o aumento nos valores de MDA como produto da peroxidação lipídica foi relatado como um índice da geração de ERO e estresse oxidativo em várias doenças, inclusive DF.<sup>23</sup> Acreditamos que este estudo foi o primeiro a investigar o estado oxidante-antioxidante em crianças egípcias com AF e a relatar o aumento do estresse oxidativo em crianças com DF.

Um dos principais achados de nosso estudo foi que o nível de nitrito é comparável em meninos e meninas com AF. Isso contradiz estudos anteriores, que relatam reduções na produção de nitrito basal estimulada e nas respostas ao óxido nítrico exógeno em pacientes do sexo masculino com AF, em comparação às mulheres.<sup>24</sup> Contudo, essas diferenças

desaparecem ao considerar apenas crianças. As diferenças entre os sexos na biodisponibilidade de óxido nítrico são provavelmente causadas, em parte, pelos efeitos protetores do estrogênio ovariano na expressão da síntese do óxido nítrico e pela atividade em mulheres na puberdade.<sup>24</sup>

Na literatura, a HU é descrita como um indutor da expressão da hemoglobina fetal, que reduz a polimerização da hemoglobina S em pacientes com AF, reduzindo a mortalidade e as CVO.<sup>25</sup> Estudos *in vitro* e em animais demonstraram que a HU poderá desempenhar um papel adicional como doadora de NO.<sup>26</sup> A ativação da expressão da hemoglobina fetal por HU poderá ocorrer por meio dessa via de NO.<sup>27</sup> Estudos clínicos sugeriram um efeito antioxidante da HU na AF por meio da dosagem dos níveis de glutathione e de outros antioxidantes em pacientes com AF tratado com HU e naqueles que não receberam essa medicação.<sup>28</sup> Contudo, o pequeno número de pacientes portadores da DF não tratados com hidroxiureia em nossa coorte torna difícil quaisquer conclusões sobre os efeitos diretos ou indiretos da HU sobre os marcadores oxidantes e antioxidantes dosados.

O presente estudo mostrou uma fraca associação entre as reduções no nível sérico de nitrito e o aumento na frequência de CVO. Contudo, não identificamos quaisquer correlações do nível sérico de nitrito com os índices laboratoriais, como o nível de hemoglobina, outros antioxidantes ou MDA.



**Figura 1** Curva de COR de nitrito, PON e CAT para predição da ocorrência de crises vaso-occlusivas.

Curva de COR, curva de características de operação do receptor; PON, paraoxonase; CAT, capacidade antioxidante total; NO, nitrito.

A doença falciforme é extremamente heterogênea por diversos motivos, e a ocorrência de CVO parece multifatorial. Mesmo que o baixo nível de nitrito seja um desses fatores, é impossível concluir que o nível sérico de nitrito poderá fornecer um prognóstico específico ou informações clínicas além das geradas pela dosagem convencional, como concentração de hemoglobina. Contudo, pode servir como um biomarcador simples de estresse oxidativo em crianças com AF estáveis para ajudar na seleção e acompanhamento das que necessitam de suplementação antioxidante.

No presente estudo, medimos a CAT, pois seu valor é mais informativo que o conhecimento de um antioxidante individual.<sup>12</sup> Seu nível reflete a contribuição coletiva para propriedade de redução dos componentes antioxidantes individuais isentos de proteína ou doadores de elétrons. Contudo, não descobrimos uma correlação entre a CAT e o aumento da frequência de CVO.

Uma nova observação importante em nosso estudo foi a redução no nível de PON em crianças com AF. Descobrimos que o nível de PON aumenta com o peso corporal e IMC, porém não está correlacionado à frequência de CVO ou aos indicadores de hemólise. Contudo, e até onde sabemos, não há relatos sobre o nível de PON ou seu impacto sobre o fenótipo em pacientes com DF. A paraoxonase é uma esterase sérica dependente de cálcio sintetizada pelo fígado e liberada na circulação, onde se associa principalmente com lipoproteínas de alta densidade e protege as lipoproteínas de alta densidade e as membranas celulares da peroxidação lipídica.<sup>29</sup> A enzima da PON dificilmente desempenha um papel na proteção contra o estresse oxidativo.<sup>30</sup> Pacientes com doença cardíaca coronária apresentaram aumento da peroxidação lipídica e redução na atividade da PON.<sup>31</sup> Isso pode sugerir que pacientes com AF que apresentaram redução na atividade da PON e aumento da peroxidação lipídica (MDA) podem estar sujeitos a outras formas de vasculopatia, inclusive doença cardíaca coronária, principalmente em crianças, sugerindo a necessidade de estudos futuros.

Nosso estudo mostrou que o estresse oxidativo é evidente em crianças pequenas com AF. Assim, ele destaca a necessidade da realização de ensaios clínicos que examinem o valor da suplementação de vitamina E ou outros agentes que aumentem a capacidade antioxidante total dessas crianças, e se isso poderá melhorar seu quadro clínico.

Crianças com AF apresentam estresse oxidativo crônico que poderá resultar em aumento das CVO. Em crianças com AF, a redução nos níveis de nitrito sérico poderá estar associada a aumentos da frequência de CVO. Um novo achado neste estudo é a redução no nível de PON em pacientes com AF, que é um campo interessante de novas pesquisas.

## Financiamento

Foram utilizados os equipamentos da Pediatric Hematology Clinic, Universidade do Cairo e os equipamentos do Departamento de Bioquímica do Centro Nacional de Pesquisa. Este trabalho não recebeu recursos específicos de nenhuma agência de financiamento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

## Agradecimentos

Agradecemos a todos os pacientes que participaram de nosso estudo. Gostaríamos de expressar nossa gratidão a nossos colegas e enfermeiros do setor de Hematologia Pediátrica e da Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) que facilitaram este trabalho.

## Referências

- Weatherall D, Hofman K, Rodgers G, Ruffin J, Hrynkow S. A case for developing North-South partnerships for research in sickle cell disease. *Blood*. 2005;105:921-3.
- Steinberg MH. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal*. 2008;8:1295-324.
- Ray D, Deshmukh P, Goswami K, Garg N. Antioxidant vitamin levels in sickle cell disorders. *Natl Med J India*. 2007;20:11-3.
- Wood KC, Granger DN. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:926-32.
- Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. Endothelial cell NADPH oxidase mediates the cerebral microvascular dysfunction in sickle cell transgenic mice. *FASEB J*. 2005;19:989-91.
- Landburg PP, Teerlink T, Biemond BJ, Brandjes DP, Muskiet FA, Duits AJ, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44:229-32.
- Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA*. 2005;294:81-90.
- Kaul DK, Liu XD, Zhang X, Ma L, Hsia CJ, Nagel RL. Inhibition of sickle red cell adhesion and vasoocclusion in the microcirculation by antioxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H167-75.
- Francis RB Jr, Johnson CS. Vascular occlusion in sickle cell disease: current concepts and unanswered questions. *Blood*. 1991;77:1405-14.
- Emokpae AM, Ojiefu UP, Aisha KG. Antioxidant enzymes and acute phase proteins correlate with marker of lipid peroxide in adult Nigerian sickle cell disease patients. *Iran J Basic Med Sci*. 2010;13:177-82.
- Arinola OG, Olaniyisa SA, Akibinu MO. Evaluation of antioxidant levels and trace elements status in Nigerian sickle cell disease patients with plasmodium parasitae-mia. *Pak J Nut*. 2008;7:766-9.
- Foluke F, Kayode A, Johan A, Modupe K. Total anti-oxidant status in sickle cell disease patients in steady state. *J Natl Med Assoc*. 2008;100:891-4.
- Hasanato RM. Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia. *Ann Saudi Med*. 2006;26:17-21.
- Hundekar PS, Suryakar AN, Karnik AC, Valvi R, Ghone RA, Bhagat SS. The effect of antioxidant supplementation on the oxidant and antioxidant status in sickle cell anemia. *J Clin Diag Res*. 2011;5:1339-42.
- Darbari DS, Onyekwere O, Nourai M, Minniti CP, Luchtman-Jones L, Rana S, et al. Markers of severe vaso-occlusive painful episode frequency in children and adolescents with sickle cell anemia. *J Pediatr*. 2012;160:286-90.
- Kinney TR, Helms RW, O'Branski EE, Ohene-Frempong K, Wang W, Daeschner C, et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. *Pediatric Hydroxyurea Group. Blood*. 1999;94:1550-4.
- Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Liza M, Lacort M, de Groot H. Antioxidant effects of estradiol and 2-hydroxyestradiol on iron-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Steroids*. 1994;59:383-8.
- Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*. 1995;41:892-6.
- Guevara I, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*. 1998;274:177-88.
- Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1995;96:2882-91.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37:277-85.
- Jain SK, Levine SN, Duett J, Hollier B. Reduced vitamin E and increased lipofuscin products in erythrocytes of diabetic rats. *Diabetes*. 1991;40:1241-4.
- Yıldırım F, Sermetow K, Aycicek A, Kocyigit A, Erel O. Increased oxidative stress in preschool children exposed to passive smoking. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87:523-8.
- Reiter CD, Gladwin MT. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:99-107.
- Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. *JAMA*. 2003;289:1645-51.
- King SB. Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:737-44.
- Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J Clin Invest*. 2003;111:231-9.
- Teixeira Neto PF, Gonçalves RP, Elias DB, de Araújo CP, Magalhães HI. Analysis of oxidative status and biochemical parameters in adult patients with sickle cell anemia treated with hydroxyurea, Ceará, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33:207-10.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics*. 1996;33:498-507.
- Amengual-Cladera E, Nadal-Casellas A, Gómez-Pérez Y, Gomila I, Prieto RM, Proenza AM, et al. Phytotherapy in a rat model of hyperoxaluria: the antioxidant effects of quercetin involve serum paraoxonase 1 activation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011;236:1133-8.
- Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Stefanovic A, Vujovic A, et al. PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. *Clin Biochem*. 2008;41:1067-73.