



**Universidade de Brasília – UnB**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular**

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO PERÓXIDO DE  
HIDROGÊNIO EM ASSOCIAÇÃO COM O POLIMORFISMO  
DA HAPTOGLOBINA.**

***LEONORA RIOS DE SOUZA MOREIRA***

2007

# **AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM ASSOCIAÇÃO COM O POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA.**

**Aluna:** Leonora Rios de Souza Moreira

**Orientador:** Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia

Dissertação apresentada ao Curso de Pós  
Graduação em Patologia Molecular da UnB  
como requisito para obtenção do título de  
mestre.

BRASÍLIA – DF  
Fevereiro, 2007

*Leonora Rios de Souza Moreira*



**Universidade De Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular**

***Leonora Rios de Souza Moreira***

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM  
ASSOCIAÇÃO COM O POLIMORFISMO DA HAPTOGLOBINA.**

Dissertação de Mestrado

MEMBROS DA BANCA

*Prof. Dr. Cesar Koppe Grisolia*  
*Presidente/ Orientador*  
*(Universidade de Brasília)*

*Prof. Dra. Zulmira Guerreiro Marques Lacava*  
*Membro Titular Interno*  
*(Universidade de Brasília)*

*Prof. Dra. Maria de Fátima Menezes Almeida Santos*  
*Membro Titular Interno*  
*(Universidade de Brasília)*

*Leonora Rios de Souza Moreira*

"Nossas dúvidas são traidoras e nos  
fazem perder o bem que poderíamos  
conquistar se não fosse o medo de  
errar"

(W. Shakespeare)

Em memória do meu tio Nô, que deixou o  
nosso convívio durante o período do meu  
mestrado... Mas que está sempre vivo no  
meu coração.

## **AGRADECIMENTOS**

### A DEUS

“Que nos deu o dom da vida, nos presenteou com liberdade, nos abençoou com inteligência e nos deu a graça de lutarmos para a conquista das nossas realizações”  
(Ruy Barbosa)

Ao Professor Doutor César Koppe Grisólia, pela orientação e por ter acreditado em mim. Pela atenção no decorrer destes dois anos. Por toda dedicação, disponibilidade e experiência que tornaram possível a realização deste mestrado.

À Professora Doutora Maria de Nazaré Klautau Guimarães, por toda dedicação, incentivo e amizade. Pelo acompanhamento, conhecimento e experiência a mim dedicados durante esse período. Muito obrigada!!

Aos meus pais, Luísa e Eduardo, por todo carinho, amor, apoio e dedicação comigo, por tudo que me ensinaram em diferentes fases da minha vida. Por todo estímulo e por terem me encorajado e me dado a mão em todos os momentos. Por sempre terem sido exemplos para mim... E aos quais devo tudo que conquistei!!!!

Ao Leandro, pelo amor, carinho, compreensão. Pela paciência durante esses dois anos. Pelo estímulo nos melhores e piores momentos deste mestrado! E por tudo que tem me ajudado a aprender!!!!

Aos meus irmãos Erica, Ricardo e Alexandre pela amizade, estímulo, por sempre terem curtido minhas conquistas.

Ao meu avô Wilson pelo carinho, amor, exemplo de vida!

A todos os alunos da Universidade de Brasília, que gentilmente se prontificaram a participar deste projeto.

À Izabel pela inestimável ajuda com as estatísticas. Por toda paciência e disponibilidade nesta fase tão importante, além de todo tempo dedicado à leitura e correção desta dissertação.

Às professoras Zulmira Lacava e Maria de Fátima Santos por terem aceitado participar desta banca de mestrado e pelas ajudas prestadas, pela análise e enriquecimento desta dissertação.

Ao amigo Arthur, quem muito me ensinou no laboratório. Por todo tempo dedicado para que eu aprendesse as PCRs e eletroforeses. Além das ajudas no laboratório, os momentos alegres e de “implicância” jamais serão esquecidos.

À amiga Eliza “Glorinha”, pelas infinitas ajudas no laboratório e ainda pelos momentos de descontração que tornaram os momentos no laboratório extremamente divertidos.

Ao Ornil pela disponibilidade e ajuda durante o período de coletas de sangue.

À Ana Luisa por todo tempo e paciência durante a padronização do teste do cometa e ainda pelas críticas na escrita desta introdução.

Aos amigos de laboratório Penha Cristina, Carol, Neide, Diogo, Mila, Guilherme Penalva, Letícia pelas ajudas no decorrer deste mestrado. A todos os colegas do Laboratório de Genética que sempre se interessavam pelo meu trabalho, além das festinhas e outros momentos de diversão.

Às amigas do laboratório Flavinha, Dri, Lane e de fora dele Viviane, Gê, Soraya, Marina, Ju, pelos momentos de descontração e apoio durante o mestrado.

**SUMÁRIO**

LISTA DE ABREVIATURAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Estresse Oxidativo	19
1.1.1. Estresse Oxidativo e Envelhecimento	20
1.1.2. Metabolismo do Ferro E Estresse Oxidativo	20
1.1.3. Espécies Reativas de Oxigênio e danos oxidativos ao DNA	22
1.1.4. A importância dos mecanismos antioxidantes	24
1.1.5. Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	26
1.2. Haptoglobina	26
1.2.1. Estrutura Molecular e Genética	28
1.2.2. Distribuição Mundial do polimorfismo	32
1.2.3. Polimorfismos Associados ao Estresse Oxidativo	33
1.3. Sistemas teste para avaliação de danos ao DNA: A eletroforese de células isoladas (Single Cell Gel Electrophoresis – SCGE ou Teste do Cometa) como um ensaio eficaz para avaliação de danos na molécula do DNA	35
2. HIPÓTESE	34
3. OBJETIVOS	38



4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Critérios para seleção dos doadores	39
4.2. Descrição da amostra	39
4.3. Coleta e processamento das amostras	41
4.4. Delineamento experimental	42
4.5. Eletroforese de células isoladas (Teste do Cometa)	44
4.6. Critérios para avaliação dos níveis de dano ao DNA	45
4.7. Determinação do fenótipo da Haptoglobina em gel de amido	47
4.8. PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida	48
4.9. Análises Estatísticas	52
5. RESULTADOS	54
5.1. Amostra em Estudo	54
5.2. Fenotipagem dos indivíduos	55
5.3. Avaliação do Índice de Dano pelo Teste do Cometa	57
5.4. Análises estatísticas	64
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÕES	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
9. ANEXOS	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol
8-OH-dG	8-hidroxideoxiguanosina
Ala	Alanina
ANOVA	Aanálise de variância
Cu	Cobre
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
E°	Potencial Padrão de Redução
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie reativa de Oxigênio
Fe	Ferro
g	Gramma
GPx	Glutaciona Peroxidase
H <sub>2</sub> O	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido Clorídrico
hGPX1	Glutaciona Peroxidase 1 humana
Hp	Haptoglobina
ID	Índice de dano
IL 1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
kDa	Quilodalton
LDL	Low density lipoprotein
Leu	Leucina
mA	Miliamper
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimol
mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
nm	Nanômetro
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>·</sup>	Radical Superóxido
OH <sup>·</sup>	Radical Hidroxila
PCR	Polimerase Chain Reaction
Pro	Prolina
RNS	Reative Nitrogen Species
ROS	Reative oxigen Species
SCGE	Single Cell Gel Eletrophoresis
SOD	Supeóxido Dismutase

TBE	Tris EDTA borato
TNF	Fator de Necrose Tumoral
V	Voltes
Val	Valina

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<i>Figura 1</i>	Ligação do complexo Hp-Hb ao receptor CD 163 dos macrófagos	25
<i>Figura 2</i>	Padrões típicos de migração da haptoglobina dos fenótipos Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2, em gel de amido	28
<i>Figura 3</i>	Estrutura da molécula de haptoglobina. Cada cadeia $\alpha$ se liga a uma cadeia $\beta$ e a outra cadeia $\alpha$ por pontes dissulfeto. Não há ligação entre as cadeias $\beta$ .	29
<i>Figura 4</i>	Estrutura da proteína de haptoglobina. Cadeias $\alpha$ (externas, em roxo) e cadeias $\beta$ (no meio, em amarelas), com ligação de carboidratos na posição N-terminal (internas, azul e roxo)	29
<i>Figura 5</i>	Esquema da estrutura proposta para haptoglobina humana. <b>A)</b> Hp 1-1, <b>B)</b> Hp 2-1, <b>C)</b> Hp 2-2. Todos os fenótipos possuem a cadeia invariável $\beta$ . As ligações por pontes dissulfeto ocorrem entre as cadeias $\alpha$ e entre as $\alpha$ e $\beta$ . Não existem ligações entre as cadeias $\beta$ .	31
<i>Figura 6</i>	Cromossomo 16 de <i>Homo sapiens</i> . A seta indica a localização exata do <i>locus</i> gênico de Hp	32
<i>Figura 7</i>	Distribuição dos indivíduos participantes do estudo de acordo com o sexo.	40

<i>Figura 8</i>	Distribuição dos indivíduos participantes do estudo de acordo com a idade.	40
<i>Figura 9</i>	Delineamento experimental	43
<i>Figura 10</i>	Foto de gel de amido com padrões típicos da migração de haptoglobina, onde: A representa Hemoglobina livre; B, Hp2-2; C, Hp1-1; D, Hp2-1; E, Hp2-1 e F representa Hp2-1.	52
<i>Figura 11</i>	Foto de gel de poliacrilamida com padrões típicos da migração de haptoglobina, onde: A representa alelo $Hp^{1F}$ ; B, alelo $Hp^{1S}$ e C, $Hp^2$ .	52
<i>Figura 12</i>	Distribuição dos indivíduos em estudo quanto ao fenótipo da haptoglobina.	56
<i>Figura 13</i>	Distribuição dos indivíduos em estudo quanto ao fenótipo da haptoglobina, separados por sexo.	56
<i>Figura 14</i>	Teste do cometa: Onde <b>A</b> representa o controle negativo com nucleóides classificados como nível zero de dano. <b>B</b> representa tratamento com $H_2O_2$ onde se observam nucleóides classificados como dano nível 1 (B1), dano nível 2 (B2) e nível 3 (B3). Fotos das amostras obtidas no Laboratório de Genética da UnB	57
<i>Figura 15</i>	Distribuição da porcentagem das células do controle e dos tratamentos com $H_2O_2$ dos indivíduos participantes do estudo segundo o sexo e o dano dos nucleóides no teste do cometa.	59

<i>Figura 16</i>	Distribuição da porcentagem das células do controle agrupados pelo fenótipo, segundo a classificação do nível de dano no DNA no teste do cometa (0, 1, 2, 3, 4)	59
<i>Figura 17</i>	Distribuição da porcentagem das células do tratamento de 250 $\mu$ M, agrupadas pelo fenótipo, segundo a classificação do nível de dano no DNA no teste do cometa (0, 1, 2, 3, 4).	60
<i>Figura 18</i>	Distribuição da porcentagem das células do tratamento de 1mM, agrupadas pelo fenótipo, segundo a classificação do nível de dano no DNA no teste do cometa (0, 1, 2, 3, 4).	61
<i>Figura 19</i>	Distribuição da porcentagem das células do tratamento de 2mM, agrupadas pelo fenótipo, segundo a classificação do nível de dano no DNA no teste do cometa (0, 1, 2, 3, 4).	62
<i>Figura 20</i>	Distribuição da porcentagem das células dos indivíduos de fenótipo Hp1-1 agrupadas pelos tratamentos aos quais as células foram submetidas.	63
<i>Figura 21</i>	Distribuição da porcentagem das células dos indivíduos de fenótipo Hp 2-1 agrupadas pelos tratamentos aos quais as células foram submetidas.	63
<i>Figura 22</i>	Distribuição da porcentagem das células dos indivíduos de fenótipo Hp 2-2 agrupadas pelos tratamentos aos quais as células foram submetidas.	64

- Figura 23* Distribuição do log do índice de dano de acordo com o tratamento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que as células foram submetidas. Controle sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os tratamentos de 250, 1000 e 2000 indicam a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em μM. 65
- Figura 24* Distribuição do log do índice de dano de acordo com o fenótipo de Hb 66
- Figura 25* Distribuição do log do índice de dano de acordo com o tratamento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que as células foram submetidas e o fenótipo de Hp. 67

**ÍNDICE DE TABELAS**

<i>Tabela 1</i>	Valores em porcentagens das variáveis: Hábito de fumar, presença de doenças cardiovasculares na família, exposição (ocupacional ou acidental) à substâncias químicas e uso de anticoncepcionais (pelas mulheres da amostra). Universidade de Brasília, UnB, 2005/2006.	41
<i>Tabela 2</i>	Critérios de classificação das células analisadas segundo o nível de dano ao DNA.	46
<i>Tabela 3</i>	Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores usados no presente estudo.	49
<i>Tabela 4</i>	Pares de iniciadores usados na PCR para detecção dos alelos da haptoglobina.	50



## **RESUMO**

Organismos aeróbicos sofrem ação constante dos radicais livres gerados nesse processo. A reação de Fenton é a maior fonte de formação de  $\text{OH}^\cdot$  *in vivo*, uma vez que o  $\text{Fe}^{++}$  é o metal mais abundante do organismo e está mais capacitado a catalisar reações de oxidação em biomoléculas. É bem conhecido que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  causa quebras nas fitas do DNA por meio da geração de  $\text{OH}^\cdot$  próximos à molécula pela reação de Fenton.

Dentre as enzimas séricas conhecidas, Hp tem ação antioxidante. Hp pode ligar-se à hemoglobina livre no sangue, prevenindo a perda de  $\text{Fe}^{++}$  o que reduz os danos oxidativos ao DNA. O polimorfismo de Hp apresenta três fenótipos principais Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2 sendo que o fenótipo Hp 1-1 confere maior atividade enzimática e conseqüentemente maior capacidade antioxidante, pois sendo uma molécula menor, liga-se mais efetivamente a Hb livre.

Este estudo procurou avaliar os danos do DNA em leucócitos humanos de sangue periférico, coletados de doadores saudáveis, induzidos por exposição ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  e buscar possíveis associações entre o ID com os fenótipos de Hp. Para avaliação do ID ao DNA foi utilizado o teste do cometa. Utilizou-se a técnica de PCR e o gel de poliacrilamida para a genotipagem da Hp.

Os resultados dos testes do cometa e das PCRs mostram uma diferença significativa entre os IDs observados entre os indivíduos com o fenótipo Hp 1-1 e o fenótipo Hp 2-1.

**PALAVRAS-CHAVE:** Polimorfismo da haptoglobina, Antioxidantes, Teste do Cometa.

### **ABSTRACT**

Aerobic organisms, suffers constant action of free radicals produced in this process. Fenton reaction is the major source of formation of OH<sup>·</sup> hydroxyl *in vivo*, once iron is the most abundant metal in organism and is more able to catalyse oxidation reactions in biomolecules. It is well-known that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causes strand breaks in DNA by the generation of OH<sup>·</sup> near to DNA molecule by Fenton reaction.

Among seric enzymes known, Hp acts as antioxidant. Hp can bind free hemoglobin in blood, preventing iron loss what reduces the oxidative damage in DNA. Hp polymorphism has three major phenotypes: Hp 1-1, Hp 2-1 and Hp 2-2. The phenotype Hp 1-1 has the highest enzymatic activity, because it codify a smaller molecule than that codified by the phenotypes Hp 1-2 and Hp 2-2, which binds more effectively to free hemoglobin.

This study aimed to evaluate DNA damage in human leukocytes of peripheral blood stream, collected from healthful donors, induced by the exposition to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and then to find possible associations between DNA damage and haptoglobin phenotypes. Comet assay was carried out to evaluate DNA damage. PCR and polyacrylamide gel electrophoresys was used for genotyping of Hp.

The results of comet assay and PCRs shows a statistical difference between the DNA damage observed in individuals who carries phenotype Hp 1-1 and the individuals carrying phenotype Hp 2-1.

**KEY WORDS:** haptoglobin polymorphism, comet assay, antioxidant

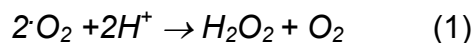
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. ESTRESSE OXIDATIVO

Organismos aeróbicos sofrem ação constante de radicais livres gerados em processos inflamatórios ou por algumas disfunções biológicas ou ainda provenientes do metabolismo dos alimentos (Barreiros *et al.*, 2006) ou durante o processo natural de respiração celular. Durante o processo de redução do oxigênio ( $O_2$ ) em água ( $H_2O$ ), ocorrem formações de moléculas ou átomos com elétron desemparelhado – *radicais livres* ou *espécies reativas de oxigênio* (Naoum, 1997). Um radical livre é definido como um átomo ou molécula que contenha elétrons não pareados e tenha uma existência independente (em Hermes-Lima, 2004). Essas substâncias são classificadas de forma mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ROS ou ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS ou ERN) que incluem radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ), radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), todos considerados metabólitos normais em células aeróbias (Naoum, 1997). O  $H_2O_2$  apesar de extremamente tóxico, não é considerado uma espécie radical. Estresse oxidativo é um estado no qual existe um desbalanço entre os sistemas de defesas antioxidantes e agentes oxidantes e geralmente ocorre como consequência de um aumento na produção de EROs ou quando os sistemas de defesa antioxidantes são ineficientes (Akyol *et al.*, 2005).

Aproximadamente de 1 a 4% de todo oxigênio consumido pelos vertebrados produz íon superóxido, sendo a mitocôndria o principal local de produção destes

radicais livres. A reação de dismutação do íon superóxido, mostrada na equação 1, que ocorre espontaneamente ou catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), é a principal fonte de  $H_2O_2$  *in vivo* (em Hermes-Lima, 2004).

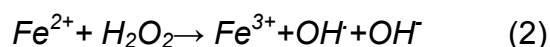


### 1.1.1. Estresse Oxidativo e Envelhecimento

A teoria básica de Harman (1956) sugere que o envelhecimento celular ocorre por um acúmulo gradual de biomoléculas lesadas por radicais livres além de outros agentes. Os sistemas antioxidantes enzimáticos de defesa falham contra os radicais livres devido a um grande acúmulo de danos no DNA ao longo dos anos (Cooke *et al.*, 2003). Essa falha dos sistemas antioxidantes enzimáticos leva a um maior acúmulo de danos ao DNA. O envelhecimento pode ainda aumentar a taxa de geração de  $O_2\cdot$  que pode levar a um aumento de oxidação protéica (em Hermes-Lima, 2004). Com o envelhecimento há um aumento na concentração de carbonil-proteínas em fibroblastos humanos cultivados. Isso ocorreria devido ao fato de que com o envelhecimento, existe uma diminuição nos níveis de alguns antioxidantes que podem extinguir os radicais livres e prevenir a oxidação, além disso, há uma diminuição de atividade proteolítica, o que contribui para o acúmulo de proteínas com danos (Hermes-Lima, 2004).

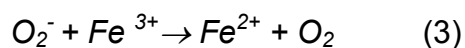
### 1.1.2. Metabolismo do Ferro e Estresse Oxidativo

A hemoglobina é a proteína mais abundante e funcionalmente mais importante dos eritrócitos (Tseng *et al.*, 2004). Sua característica mais importante reside na sua capacidade de combinar-se fraca e reversivelmente com o oxigênio e liberá-lo nos capilares teciduais. Quando os eritrócitos estão muito velhos, suas membranas tornam-se frágeis e os eritrócitos podem romper-se durante a passagem por um vaso de pequeno calibre. Neste caso, a hemoglobina liberada dos eritrócitos velhos ou durante hemólise torna-se muito tóxica devido à capacidade oxidativa do ferro. O ferro liberado da hemoglobina irá participar da reação de Fenton, na qual, reage com o peróxido de hidrogênio endógeno, gerando um radical hidroxila muito reativo e além de outras espécies reativas de oxigênio que causam danos às células. (Naoum, 1997; Wassel, 2000; Tseng *et al.*, 2004; Guéye *et al.*, 2006).



A reação de Fenton, mostrada na equação 2, é a maior fonte de formação de  $OH^{\bullet}$  em organismos vivos (Hermes-Lima, 2004). Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical  $OH^{\bullet}$  em seu interior. Nos organismos humanos, os metais de transição mais importantes para a ocorrência da reação de Fenton são  $Cu^+$  e  $Fe^{2+}$ . A importância deste último metal é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade (Barreiros *et al.*, 2006). Para que a reação de Fenton possa continuar, é necessário que o  $Fe^{3+}$  seja convertido em  $Fe^{2+}$ , pelos agentes redutores como o  $O_2^{\bullet}$  e o ascorbato. Essa reação de

redução (equação 3) é denominada reação de Harber-Weiss (Ferreira e Matsubara, 1997; Hermes-Lima, 2004).



Além disso, em condições fisiológicas normais, a hemoglobina se auto-oxida com a produção de  $10^7$  radicais livres por dia, que são neutralizados pelas defesas antioxidantes da célula. No entanto, qualquer situação patológica que diminua as defesas antioxidantes, provoca o desequilíbrio intermolecular com elevação de radicais livres como  $O_2^\bullet$  e  $OH^\bullet$ , além de espécies reativas como  $H_2O_2$ . A situação descrita ocorre, por exemplo, em quatro hemopatias de origem hereditária que causam a formação excessiva de radicais livres: anemia falciforme, talassemia beta maior, metahemoglobinemias e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (Naoum,1997).

### **1.1.3. Espécies reativas de Oxigênio e danos oxidativos ao DNA**

Como mencionado anteriormente,  $OH^\bullet$  é a espécie de oxigênio mais reativa. Pode reagir com o DNA, adicionando-se à dupla ligação nas bases e ainda seqüestrando um átomo de hidrogênio do grupo metil da timina e/ou de cada uma das ligações C-H da 2'-desoxirribose causando quebra no DNA. A adição deste radical à dupla ligação entre os carbonos C5 e C6 das pirimidinas leva à formação dos radicais C5-OH e C6-OH e o seqüestro do átomo de hidrogênio da timina

resulta no radical alil (Cooke *et al.*, 2003). Os radicais formados diferem de acordo com suas propriedades redox, sendo o radical C5-OH redutor e o C6-OH oxidante.

Os radicais pirimidinas originam numerosos produtos através de uma variedade de mecanismos (Breen e Murphy, 1995). Os tipos de produtos formados dependem de ausência ou presença de oxigênio, presença de agentes redutores ou oxidantes, entre outras condições (Dizdaroglu, 1992; Breen e Murphy, 1995). Os radicais são reduzidos ou oxidados dependendo de propriedades redox, ambiente redox e parceiros de reação. Os radicais de purinas podem ser oxidados ou reduzidos dependendo de suas diferentes estruturas mesoméricas (Cooke *et al.*, 2003).

Foi demonstrado que mecanismos oxidativos no DNA possuem papel potencial na iniciação, promoção e progressão da carcinogênese. Dado que o risco cumulativo de câncer aumenta com a idade e está associado com a acumulação de danos no DNA, estes danos têm sido estudados nos processos de carcinogênese (Cooke *et al.*, 2003). Doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Huntington e Parkinson, possuem o estresse oxidativo implicados em sua patogenicidade (Cooke *et al.*, 2003).

Os danos oxidativos ao DNA induzidos por EROs, geram frequentemente a 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG), isto é, uma lesão oxidativa no oxigênio 8 da guanina, que é o sítio mais sensível do DNA a esse tipo lesão, causando mutações tanto *in vitro* como *in vivo*, podendo desta forma ser utilizado como um bom marcador molecular para carcinogênese (Nakajima *et al.*, 1996; Rosa *et al.*, 1998). Collins *et al.* (1998) examinaram uma população europeia e encontraram forte associação entre doença coronariana precoce e níveis do biomarcador 8-OH-

dG nos linfócitos. Porém não está definida a razão desta associação, ou seja, porque altos níveis de 8-OH-dG nos linfócitos estariam associados com doenças coronarianas precoces (Cooke *et al.*, 2003). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^\bullet$  não estão diretamente envolvidos nos danos ao DNA. Entretanto, as suas interações com metais de transição promovem quebras no DNA e modificações nas bases (em Hermes-Lima, 2004).

#### **1.1.4. A importância dos mecanismos antioxidantes**

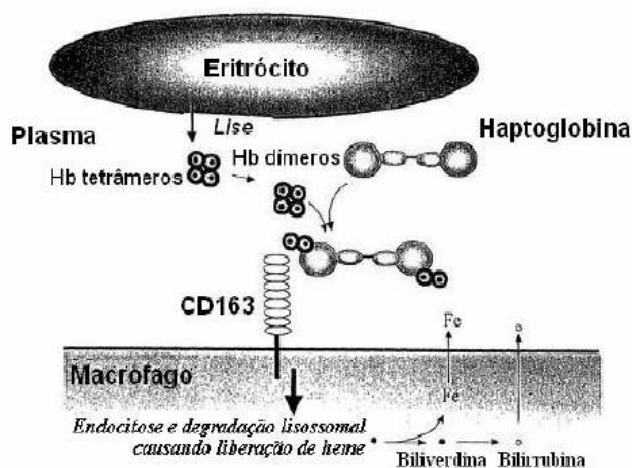
Várias doenças neurodegenerativas, desordens inflamatórias crônicas, bem como o câncer estão associados a danos mediados por radicais livres (Langlois e Delanghe, 1996; Wassel, 2000; Janaydeh, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004).

Muitas enzimas séricas atuam como antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), que catalisa as reações de dismutação do íon superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A glutatona peroxidase (GPx) e catalase, por exemplo, catalisam a reação de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água (em Hermes-Lima, 2004).

Os eritrócitos são as células que provavelmente estão submetidas a maior tensão de oxigênio. Tensões maiores até mesmo do que as células do pulmão, pois a hemoglobina, proteína que se liga ao oxigênio, constitui cerca de 90% das proteínas do eritrócito. Além da grande quantidade de hemoglobina, a maior parte das drogas e tóxicos, ao entrarem no corpo vão para o sangue, desta forma o eritrócito não pode evitar a exposição a xenobióticos (Josephy, 1997).



A haptoglobina funciona como antioxidante devido à sua capacidade de se ligar à hemoglobina livre no plasma, formando um composto solúvel, muito estável e de alta afinidade, que reduz os danos oxidativos ao DNA. Este complexo será então endocitado por um processo mediado pelo receptor CD 163 dos macrófagos e metabolizado nos lisossomos (Lim *et al.*, 1998; Melamed-Frank *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2004), como mostrado na figura 1.



**Figura 1:** Ligação do complexo Hp-Hb ao receptor CD 163 dos macrófagos ([www.wipo.org/.../getbykey5?KEY=02/32941.020725](http://www.wipo.org/.../getbykey5?KEY=02/32941.020725))

Existem diferenças de afinidade de ligação entre o receptor CD163 e o fenótipo Hp 1-1 e o fenótipo Hp 2-2 da haptoglobina, sendo que a afinidade de Hp 2-2 é maior que os demais (Zvy e Levy, 2006). Apesar da maior afinidade do complexo com o receptor, o fenótipo Hp 1-1 apresenta, além de maior concentração plasmática, maior afinidade com a hemoglobina (Sadrazadeh e Bozorgmehr, 2004).

### 1.1.5. Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )

O  $H_2O_2$  é um agente oxidante relativamente fraco, tendo um valor de  $E^{\circ}$  de +0,32V, menor que o do ozônio ou do íon superóxido. Sabe-se que quanto mais positivo é o potencial padrão de redução ( $E^{\circ}$ ), mais fortemente oxidante é a espécie radical. O que torna o  $H_2O_2$  tão potencialmente perigoso é sua habilidade de atravessar membranas biológicas e sua alta estabilidade (Hermes-Lima, 2004). Por ter vida longa e capacidade de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro. Assim é altamente tóxico para as células e esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes quando em presença de ferro (Ferreira e Matsubara, 1997). Entretanto, no ambiente intracelular, a presença de vários mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de decomposição mantém o peróxido de hidrogênio em baixas concentrações (Hermes-Lima, 2004). Além disso, o  $H_2O_2$  participa da reação de Fenton que produz  $OH^{\bullet}$  (Ferreira e Matsubara, 1997; Wassel, 2000), espécie radical mais reativa.

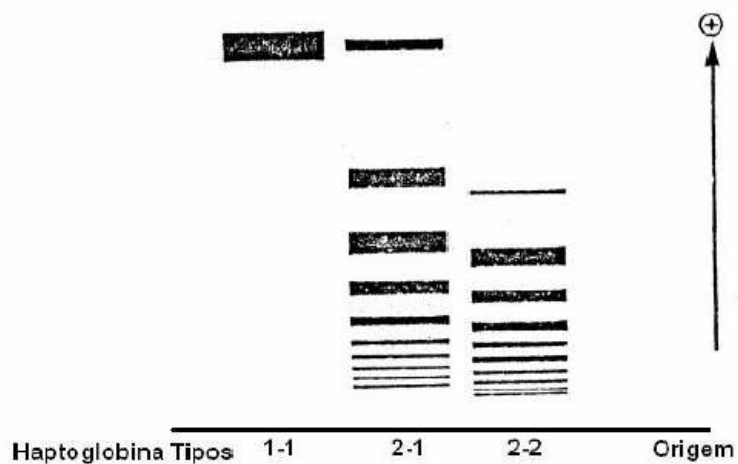
## 1.2. HAPTOGLOBINA

Haptoglobina (Hp) é uma proteína sérica descoberta em 1938 por Polonovski e Jayle (em Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004). É uma proteína de fase aguda sintetizada no fígado em resposta a citocinas inflamatórias (Wassel, 2000),

como interleucina-6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) (Langlois e Delanghe, 1996).

A variação molecular desta proteína foi observada pela primeira vez em 1946 por Jayle e Judas (Langlois e Delanghe, 1997; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004). Existem três tipos principais de Hp humana, classificada em três fenótipos principais Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2 (Smithies, 1955) atribuídos aos seus dois alelos autossômicos  $Hp^1$  e  $Hp^2$  (Smithies e Walker, 1956). Os fenótipos diferem na mobilidade eletroforética (Figura 2) e no número de componentes protéicos, tendo atividades biológicas e conseqüências clínicas diferentes e estando associados, desta forma, a doenças inflamatórias, incluindo infecções, aterosclerose, desordens auto-imunes e atividade antioxidante. Hp possui vasta atividade imunorregulatória, como, por exemplo, a prevenção da diferenciação de monócito em macrófago (Wassel, 2000; Melamed-Frank *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2002; Lavie *et al.*, 2003; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004; Tseng *et al.*, 2004).

Várias funções para a haptoglobina têm sido descritas, sendo que sua maior função biológica é a de se ligar à hemoglobina livre, formando um complexo de alta afinidade. Essa ligação previne a perda de ferro e injúrias renais causada pela hemoglobina livre (Melamed-Frank *et al.*, 2001; Tseng *et al.*, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004).

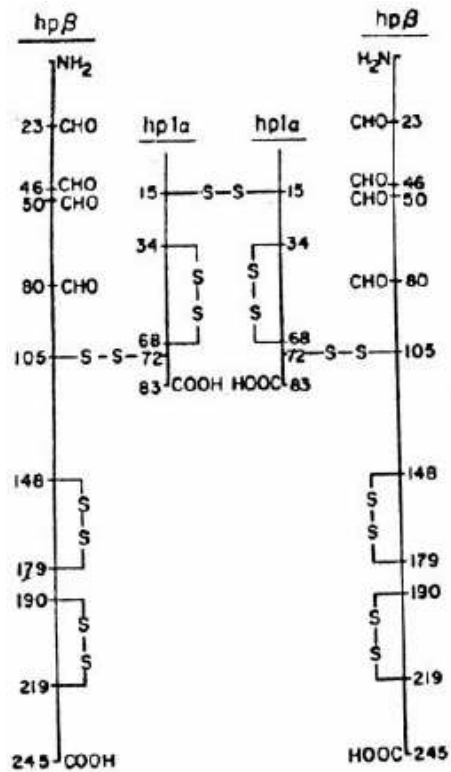


**Figura 2:** Padrões típicos de migração da haptoglobina dos fenótipos Hp 1-1, Hp 2-1, Hp 2-2, em gel de amido (Langlois e Delanghe, 1996).

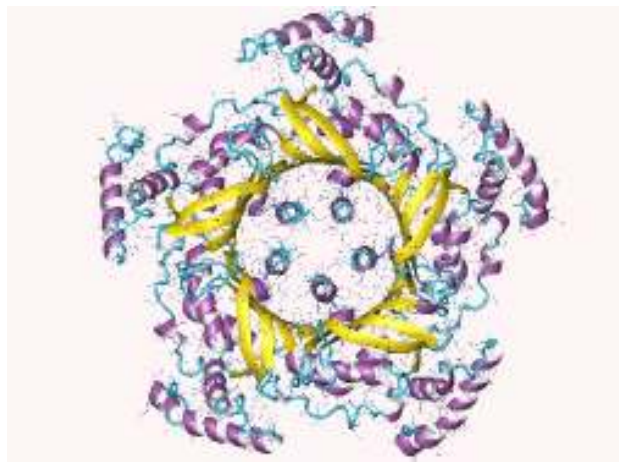
### 1.2.1. Estrutura Molecular e Genética

A molécula de Hp consiste de duas cadeias polipeptídicas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) (Wassel, 2000). A Hp humana tem arranjo  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$  conectadas covalentemente por pontes dissulfeto: cada cadeia  $\alpha$  se liga a uma cadeia  $\beta$  e à outra cadeia  $\alpha$  por ponte dissulfeto. Não há ligação entre as cadeias  $\beta$  (Malchy *et al.*, 1973; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004) (Figura 3). A figura 4 mostra a estrutura da proteína de Hp.

A cadeia  $\beta$  é composta por 245 aminoácidos e não exibe nenhum polimorfismo, a cadeia  $\alpha$  possui um polimorfismo:  $\alpha_1$  possui 83 aminoácidos enquanto que  $\alpha_2$  possui 142 aminoácidos (Yano *et al.*, 1998). A cadeia  $\beta$  é mais pesada (40 kDa) que as cadeias  $\alpha$  ( $\alpha_1$  8,9 kDa e  $\alpha_2$  16 kDa) (Tseng *et al.*, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004).



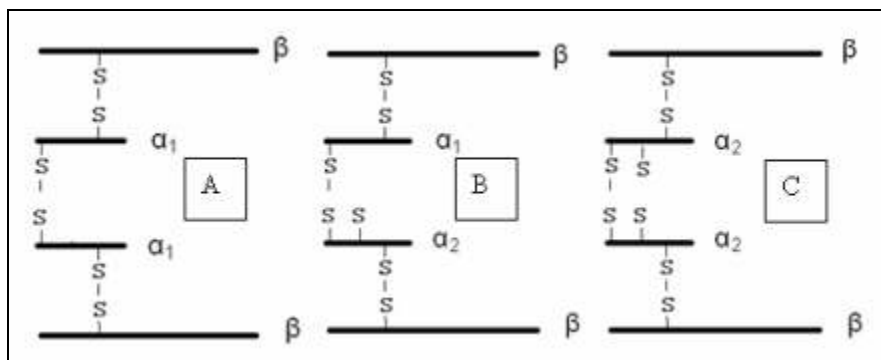
**Figura 3:** Estrutura da molécula de haptoglobina. Cada cadeia  $\alpha$  se liga a uma cadeia  $\beta$  e a outra cadeia  $\alpha$  por pontes dissulfeto. Não há ligação entre as cadeias  $\beta$ . (Harris, 1980).



**Figura 4:** Estrutura da proteína de haptoglobina. Cadeias  $\alpha$  (externas, em roxo) e cadeias  $\beta$  (no meio, em amarelas), com ligação de carboidratos na posição N-terminal (internas, azul e roxo) (<http://160.114.99.91/astrojan/protein/pictures/gtpch.jpg>).

A molécula do homozigoto Hp 1-1 (Figura 5 A) possui duas cadeias  $\alpha_1$  ligadas a duas cadeias  $\beta$ , enquanto que a molécula do homozigoto Hp 2-2 (Figura 5 C) possui duas cadeias  $\alpha_2$ , ligadas a duas cadeias  $\beta$ . Já a estrutura do heterozigoto Hp 2-1 (Figura 5 B) possui uma cadeia  $\alpha_1$  e uma  $\alpha_2$  ligadas a duas cadeias  $\beta$ . Devido ao grupo tiol presente na cadeia  $\alpha_2$  mas não na cadeia  $\alpha_1$ , Hp 2-1 e Hp 2-2 podem formar grandes polímeros (Langlois e Delanghe, 1996; Koch, 2002; Tseng *et al.*, 2004). A proteína monomérica, menor, tem maior afinidade de ligação com a hemoglobina livre no plasma.

Em 1962, Smithies *et al.* mostraram que existem dois tipos de cadeias  $\alpha_1$  em gel de eletroforese, classificadas de acordo com sua velocidade de migração: Hp 1 $\alpha$ F (F = Fast) e Hp 1 $\alpha$ S (S = Slow). A forma Hp 1 $\alpha$ F possui um ácido aspártico (Asp) na posição 52 e uma lisina (Lys) na posição 53, enquanto que a forma Hp 1 $\alpha$ S possui uma asparagina (Asn) e um ácido glutâmico (Glu) nas mesmas posições. Considera-se que a cadeia  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2FS}$ ) foi formada pela inserção do 11<sup>o</sup> ao 69<sup>o</sup> aminoácido da cadeia  $\alpha_{1F}$  na cadeia  $\alpha_{1S}$  (Langlois e Delanghe, 1996; Yano *et al.*, 1998; Wassel, 2000; Koch *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2004).



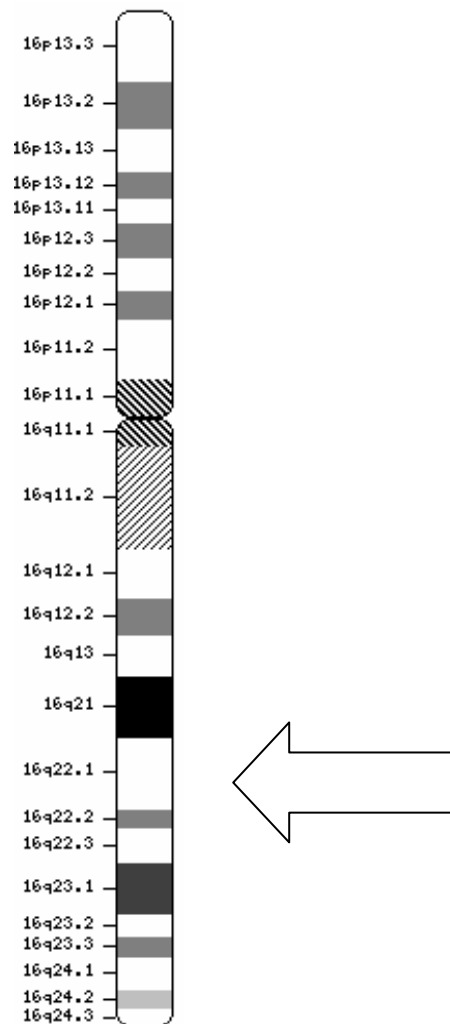
**Figura 5:** Esquema da estrutura proposta para haptoglobina humana. **A)** Hp 1-1, **B)** Hp 2-1, **C)** Hp 2-2. Todos os fenótipos possuem a cadeia invariável  $\beta$ . As ligações por pontes dissulfeto ocorrem entre as cadeias  $\alpha$  e entre as  $\alpha$  e  $\beta$ . Não existem ligações entre as cadeias  $\beta$ .

A principal diferença entre os alelos  $Hp^1$  e  $Hp^2$  é a presença de um segmento duplicado no DNA de aproximadamente 1700 pb no alelo  $Hp^2$ , mas não no alelo  $Hp^1$  (Maeda *et al.*, 1984). Considera-se que o alelo  $Hp^2$  tenha surgido pela inserção de resíduos homólogos derivados de  $Hp^{1F}$  na região 3' terminal na região do éxon 2 em  $Hp^{1S}$  por um *crossing-over* desigual em um indivíduo heterozigoto  $Hp^{1F}/Hp^{1S}$  (Smithies *et al.*, 1962). Existem relatos de mosaicos devido a uma reversão de  $Hp^2$  em  $HP^1$  como consequência de uma recombinação intramolecular em estágios iniciais da embriogênese em crianças filhas de pais expostos à radiação da bomba atômica (Asakawa *et al.*, 1999).

O gene da haptoglobina é expresso nos hepatócitos (Langlois e Delanghe, 1996), no tecido adiposo e nos pulmões, exercendo atividade antioxidante e antimicrobiana (Dobryszczycka, 1997). Seus *loci*, localizados no cromossomo 16q22.1, (Figura 6) possuem cinco éxons responsáveis pela codificação do  $Hp^1$  e sete éxons que codificam o  $Hp^2$  (Wassel, 2000; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004).

As três cadeias  $\alpha$  diferentes são codificadas por três alelos ( $Hp^{1F}$ ,  $Hp^{1S}$ ,  $Hp^2$ ) (Sadzadeh e Bozorgmehr, 2004).

Devido ao polimorfismo da haptoglobina, seis genótipos principais diferentes já foram descritos:  $Hp^{1S-1S}$ ,  $Hp^{1F-1S}$ ,  $Hp^{1F-1F}$ ,  $Hp^{2-1S}$ ,  $Hp^{2-1F}$ ,  $Hp^{2-2}$  (Yano *et al.*, 1998).



**Figura 6:** Cromossomo 16 de *Homo sapiens*. A seta indica a localização exata do locus gênico de Hp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=16>)



### 1.2.2. Distribuição Mundial do Polimorfismo

O homem é o único mamífero que possui polimorfismo da haptoglobina. Estima-se que o alelo  $Hp^2$  tenha surgido na Índia, há aproximadamente 2 milhões de anos, de onde se espalhou pelo mundo devido a uma forte pressão seletiva. Esse espalhamento sugere uma vantagem evolutiva do alelo  $Hp^2$  (Shultze e Heremans, 1966 em Wassel, 2000; Langlois e Delanghe, 1996).

Altas frequências do alelo  $Hp^1$  são encontradas na África e América do Sul (Sadzadeh e Bozorgmehr, 2004), chegando ao máximo de 86% nas Ilhas Polinésias (Nagel *et al.*, 1964). Já as frequências na Ásia e Austrália são mais baixas, 18% entre os aborígenes australianos (Flory, 1964) e 26% no Japão (Shindo, 1990).

### 1.2.3. Polimorfismos associados ao estresse oxidativo

Existem evidências que determinados polimorfismos de enzimas séricas estão envolvidas em processos de proteção contra o estresse oxidativo. No polimorfismo Val 16 Ala da SOD, a forma mutante (AA) é mais ativa que a forma selvagem (VV). O alto nível de SOD pode estar relacionado à diminuição do estresse oxidativo e aumento da longevidade em moscas. Outros invertebrados mutantes para SOD também apresentaram maior longevidade. Em contraste, o aumento dos níveis de SOD pode levar a um desbalanço oxidativo, desta forma o alelo “Ala” pode estar relacionado a várias doenças relacionadas ao estresse

oxidativo e mecanismos de defesa contra radicais livres anormais (Taufers *et al.*, 2005; Akyol *et al.*, 2005).

Outro polimorfismo, Pro 198 Leu da hGPX1, a forma selvagem Pro/Pro tem menor risco de recorrência de câncer de bexiga, quando comparado à forma mutante Pro/Leu (Zhao *et al.*, 2005). Em outro estudo, a atividade de hGPX1, foi menor nas proteínas codificadas pelo alelo “Leu” foi menos responsiva a selênio que a proteína codificada pela forma selvagem do alelo, sugerindo uma perda de função antioxidante do alelo mutante (Hu e Diamond, 2003).

Haptoglobina é um potente antioxidante contra o LDL e atua de forma dose-dependente, mostrando-se um antioxidante cerca de 20 vezes mais potente que a vitamina E (Tseng *et al.*, 2004). Entretanto, o polimorfismo da haptoglobina gera três fenótipos principais: Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2, sendo que fenótipo Hp1-1 tem maior atividade antioxidante que os demais fenótipos, devido à sua maior concentração plasmática e à maior capacidade de se ligar à hemoglobina livre, além da maior estabilidade da vitamina C no soro. Por outro lado, os indivíduos Hp 2-2 apresentam maior quantidade de ferro no soro, o que aumenta a oxidação (Langlois *et al.*, 1997; Wassel, 2000; Bernard *et al.*, 2003; Tseng *et al.*, 2004; Sadrzadeh e Bozorgmehr, 2004). Alguns autores sugeriram que todos os três fenótipos principais da haptoglobina se ligam à hemoglobina na proporção de 1:1, ou seja, um dímero Hp  $\alpha\beta$  se liga a um dímero Hb  $\alpha\beta$ , mas está claro que os três fenótipos apresentam algumas diferenças funcionais (Guéye *et al.*, 2006).

### **1.3. SISTEMAS-TESTES PARA AVALIAÇÃO DE DANOS AO DNA: A ELETROFORESE DE CÉLULAS ISOLADAS (*Single cell gel electrophoresis* – SCGE ou Teste do Cometa), como um ensaio eficaz para a avaliação de danos na molécula do DNA**

O teste do cometa é uma técnica simples e muito difundida nos estudos genotoxicológicos para avaliar danos no DNA em células eucarióticas individuais. É um ensaio rápido, muito sensível e de baixo custo (Henderson *et al.*, 1998; García *et al.*, 2004), além de requerer pequeno número de células por amostra (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005). Este teste, no qual as células são embebidas em agarose e lisadas, detecta quebras no DNA em células eucarióticas (Collins, 2004). As células são lisadas e posteriormente sofrem eletroforese em pH alto (>13). A aplicação da corrente elétrica às células resulta no transporte dos fragmentos de DNA para fora do núcleo (Silva *et al.*, 2000). A proporção de danos no DNA é proporcional ao tamanho da cauda, que significa a migração diferencial do DNA para fora do nucleóide (Olive *et al.*, 1990). O DNA é visualizado por microscopia de fluorescência, após coloração com brometo de etídio. Este é um corante intercalante que se liga mais eficientemente ao DNA de dupla hélice que ao DNA de hélice simples (Collins, 2004).

Uma vantagem significativa do teste do cometa é sua aplicabilidade a qualquer organismo eucariótico e tipo celular (Silva *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003). O teste do cometa é ideal para estudos em humanos porque não requer nenhum pré-tratamento com radioatividade ou outros procedimentos prejudiciais. Normalmente, as células brancas do sangue são usadas, pois são obtidas de

forma relativamente não invasiva, não requer desagregação tecidual e se comportam bem neste teste. Entretanto, o dano detectado nas células brancas, pelo teste do cometa pode não refletir o dano em outros tecidos (Collins, 2004).

O teste do cometa pode ser usado para detectar diversos tipos de danos no DNA, como quebras de fita simples e fita dupla, sítios álcali-labil, ligação cruzada de DNA-DNA e DNA - proteína (Brendler-Schwaab *et al.*, 2005). Uma vantagem importante do teste do cometa sobre os outros testes de genotoxicidade *in vivo* como os de micronúcleo ou teste de aberrações cromossômicas é que os dois últimos são aplicáveis apenas às células em proliferação (Hartmann *et al.*, 2004). Todavia, uma desvantagem desta metodologia é não poder detectar aneuploidias (Hartmann *et al.*, 2003).

## 2. HIPÓTESE

A variação fenotípica de Hp leva a diferente suscetibilidade de danos ao DNA

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral verificar a relação entre os danos oxidativos no DNA induzidos por  $H_2O_2$  e o polimorfismo da haptoglobina.

Como objetivos específicos destacam-se:

1. Verificar danos oxidativos ao DNA causado pelo  $H_2O_2$  em diferentes concentrações por meio do Teste do Cometa
2. Realizar a fenotipagem de Hp por meio de gel de amido e PCRs com gel de poliacrilamida
3. Estabelecer possíveis relações entre o índice de danos do DNA e o fenótipo da haptoglobina.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília (UnB), sob o parecer número 365/2005, registro no CONEP número 11357, processo número 0.001668/2005-18.

### **4.1. CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DOS DOADORES**

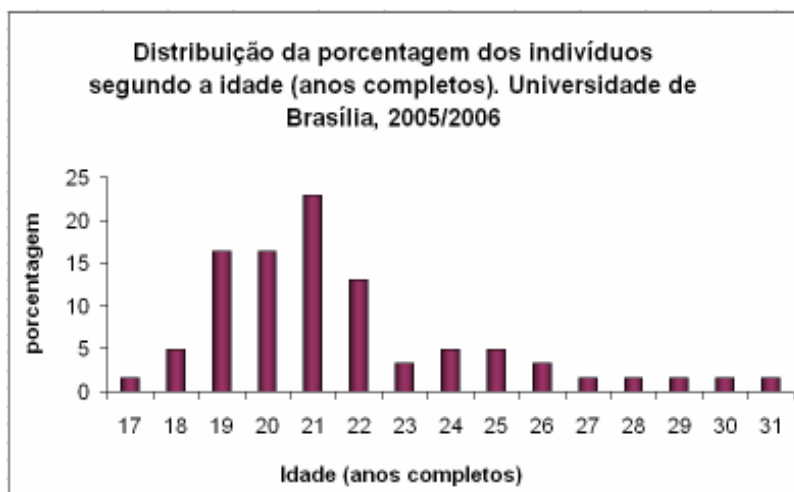
Foram coletadas amostras de sangue e dados clínicos de 61 doadores saudáveis, com idades variando entre 17 e 31 anos, na Universidade de Brasília, nos meses de novembro de 2005 a maio de 2006. Os indivíduos participantes do trabalho forneceram seus dados por meio do preenchimento de um Termo de Concordância (Anexo 1). O sigilo de cada doador foi mantido pelo uso de códigos numéricos para identificar as respectivas amostras.

### **4.2. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA**

Entre os 61 indivíduos participantes do estudo, foram observadas 32 mulheres e 29 homens (figura 7). Com relação à distribuição segundo a idade, pode-se notar um padrão bi-modal, sendo que a maior proporção da amostra é formada por indivíduos mais jovens (até 22 anos) conforme mostrado na figura 8. A média de idade foi de 21,6 anos  $\pm$  2,99 anos.



**Figura 7:** Distribuição dos indivíduos participantes do estudo de acordo com o sexo.



**Figura 8:** Distribuição dos indivíduos participantes do estudo de acordo com a idade.

A tabela 1 resume os valores (em porcentagens) das principais variáveis observadas no questionário.



**Tabela 1:** Valores em porcentagens das variáveis: Hábito de fumar, presença de doenças cardiovasculares na família, exposição (ocupacional ou acidental) à substâncias químicas e uso de anticoncepcionais (pelas mulheres da amostra).  
Universidade de Brasília, UnB, 2005/2006.

%	Hábito de Fumar	Exposição à Raio X	Doenças Cardiovasculares ou Neuro-degenerativas	Exposição à substâncias químicas	Uso de Anticoncepcional
Sim	95	73,78	52,5	24,6	53,12
Não	5	26,22	47,5	75,4	46,87

A observação da amostra quanto ao consumo ou não de bebidas alcoólicas revelou que maior parte da amostra (75,4%) é composta por indivíduos com pouco (menos de uma vez por semana) ou nenhum consumo de bebidas, enquanto que os que têm hábito de consumir bebidas alcoólicas mais de duas vezes por semana representam 1,63% da amostra.

#### 4.3. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

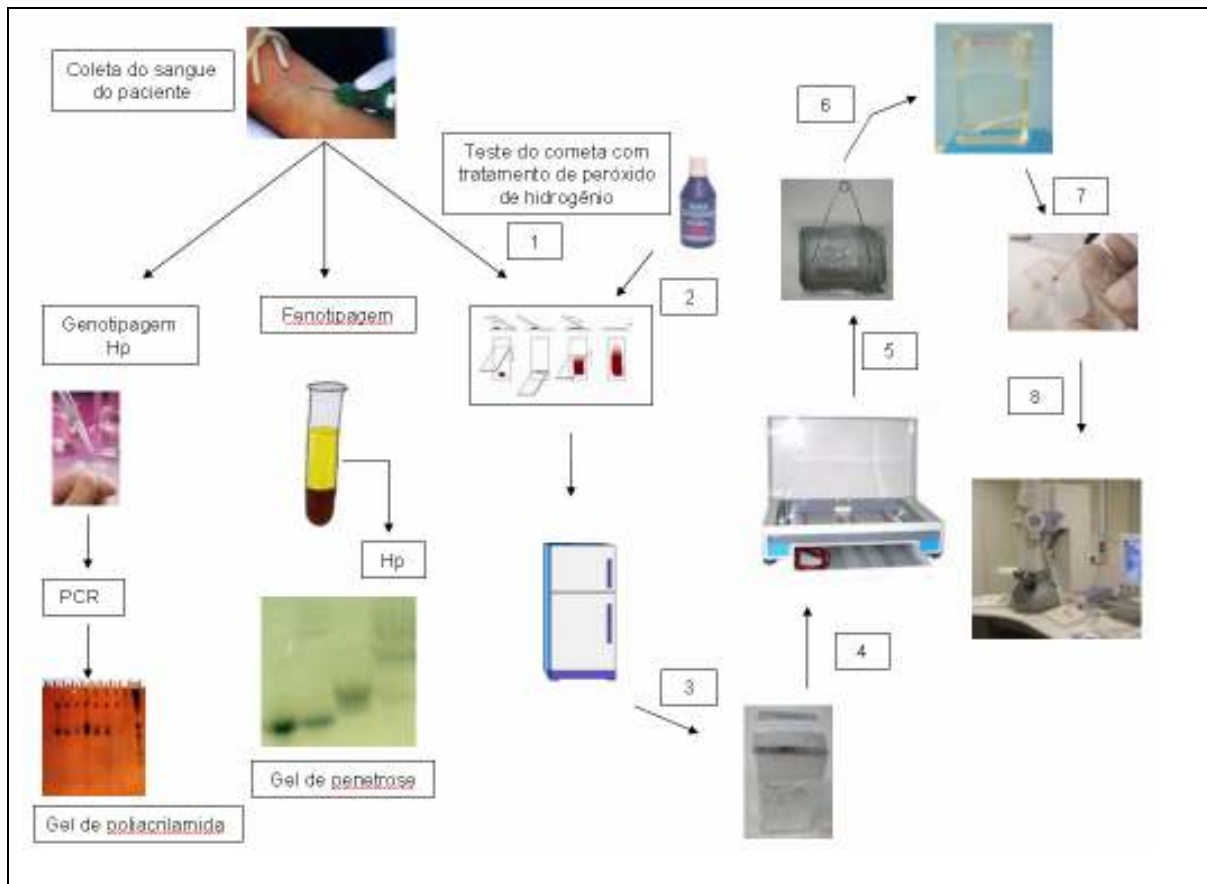
As amostras de sangue venoso foram coletadas utilizando o sistema de coleta a vácuo (Vacutainer), contendo EDTA K<sub>3</sub> como anticoagulante. Cada tubo pode armazenar aproximadamente 4,5mL de sangue.

Sob a ação da gravidade, componentes celulares e partículas que apresentam diferença em suas características físico-químicas específicas como massa molecular, forma e densidade podem ser separados. O processamento do sangue consistiu na separação do plasma, que foi armazenado em Eppendorf e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação do polimorfismo da haptoglobina. Em outro Eppendorf os eritrócitos e a fração leucocitária foram armazenados com igual volume de solução tampão de eritrócitos (citrato de tripotássio-fosfato dibásico de potássio-fosfato monobásico de potássio) contendo glicerol a 40% e também foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O Eppendorf contendo mistura das frações leucocitária e eritrocitária foi utilizado para posterior extração de DNA (Simões, 1980).

A extração de DNA foi feita com uso do Kit de Extração GFX<sup>TM</sup> Genomic Blood DNA Purification da Amersham Biociences, contendo solução de lise, solução de extração e soluções de lavagem, usado de acordo com as especificações do fabricante.

#### **4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Um resumo do delineamento experimental está mostrado na figura 9.



**Figura 9.** Delineamento experimental.

- 1- Sangue do paciente recém coletado na lâmina. Secagem na geladeira por 5 minutos
- 2- Tratamento com  $H_2O_2$  por 5 minutos na geladeira
- 3- Solução de lise por no mínimo 1 hora
- 4- Eletroforese por 40 minutos com tampão alcalino
- 5- Solução de neutralização por 30 minutos
- 6- Secagem por 1 hora e fixação das lâminas por 5 minutos
- 7- Coloração das lâminas com brometo de etídio
- 8- Leitura em microscópio eletrônico de fluorescência

#### 4.5. ELETROFORESE DE CÉLULAS ISOLADAS (TESTE DO COMETA)

As lâminas de 26x76mm foram mergulhadas em agarose normal 15mg/mL e secaram a temperatura ambiente. Num Eppendorf misturou-se 15µL de sangue total com 120µL de agarose low melting na concentração de 5mg/mL. Para cada lâmina, foram utilizados aproximadamente 60µL desta mistura (sangue + agarose).

O teste do cometa foi feito de acordo com o protocolo proposto por Singh *et al.* (1988), com modificações. O tratamento das lâminas foi feito com 50µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 250 µM, 1mM e 2mM por 5 minutos a 4°C, pois o tratamento das células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na geladeira minimiza possíveis processos celulares de dano (Collins, 2004). Para o controle negativo, as amostras foram preparadas sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e submetidas às mesmas condições. Após o preparo, as lâminas ficaram em uma solução de lise, composta de 89mL de uma solução de lise estoque (2,5M NaCl; 100mM EDTA; 10mM Tris; pH ajustado para 10,0 com NaOH, 890mL de água destilada e 1% lauroyl sarcosine), 1mL de Triton X-100 e 10 DMSO. Protegidas da luz, as lâminas permaneceram nesta solução, a 4°C, por um tempo mínimo de 1 hora. Após esse tempo, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese contendo o tampão de eletroforese a 4°C, e então colocadas na cuba, até que as lâminas ficassem totalmente imersas. O tampão de eletroforese foi preparado com 0,2M EDTA; 10M NaOH e 965mL de água destilada, pH > 13,0. As condições da eletroforese foram: 250V, 350mA, por 40 minutos. Após este procedimento, as lâminas ficaram imersas em um tampão





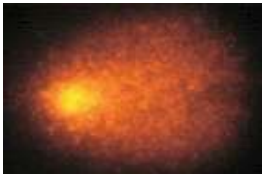
de neutralização (48,5g de Tris por litro, pH ajustado para 7,5 com HCl P.A.) por 30 minutos, alternando 5 minutos no tampão, 5 minutos fora, à temperatura ambiente. Após a neutralização, as lâminas secaram à temperatura ambiente por 1 hora e foram fixadas com etanol 100% por 5 minutos. O processo de coloração foi feito com brometo de etídio (20 $\mu$ g/mL). A escolha do corante específico de DNA usado para visualização do cometa depende da necessidade específica da investigação. Supõe-se que essa escolha possua baixo efeito na sensibilidade e na geração de resultados confiáveis durante o ensaio. Os corantes fluorescentes mais comumente utilizados são brometo de etídio, iodeto de propídeo e DAPI (Tice *et al.*, 2000). Neste estudo o corante escolhido foi o brometo de etídio.

#### **4.6. CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE DANO AO DNA**

Os níveis de cometas foram classificados em cinco categorias diferentes (0, 1, 2, 3, 4) de acordo com o nível de dano observado no DNA (Collins *et al.*, 1995).

A análise das lâminas envolveu a contagem de 90 a 110 células por lâmina/tratamento em cada indivíduo. A classificação visual dos cometas foi baseada na migração dos fragmentos do DNA nuclear, corados com brometo de etídio e analisados em microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop 2, com filtro de barreira verde de 510-560nm e aumento de 400x. Os critérios da classificação dos nucleóides foram feitos com base no tamanho da cauda, diâmetro do núcleo e a intensidade de coloração. Assim, os nucleóides foram divididos em cinco categorias, a saber (tabela 2):

**Tabela 2:** Critérios de classificação das células analisadas segundo o nível de dano ao DNA.

<b>Classificação</b>	<b>Descrição do cometa</b>	<b>Interpretação</b>	<b>Figura*</b>
0	Sem cauda aparente e núcleo grande	Nenhum dano	
1	Cauda pequena e nucleóide grande	Pouco dano	
2	Nucleóide e cauda de tamanhos médios	Dano médio	
3	Nucleóide de tamanho médio e cauda de tamanho grande	Dano grande	
4	Nucleóide pouco aparente, cauda longa e difusa	Núcleo apoptótico	

O número de cometas em cada categoria foi contado e o dano ao DNA foi calculado pela seguinte expressão de Índice de Dano (ID):

$$ID = \frac{(1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4)}{(\Sigma/100)} \quad (4)$$

onde:

$n_0, n_1, n_2, n_3, n_4$  são os números de células encontradas nas categorias de 0 a 4, respectivamente;  $\Sigma$  é a soma de todos os cometas contados, ou seja, o número de células analisadas.

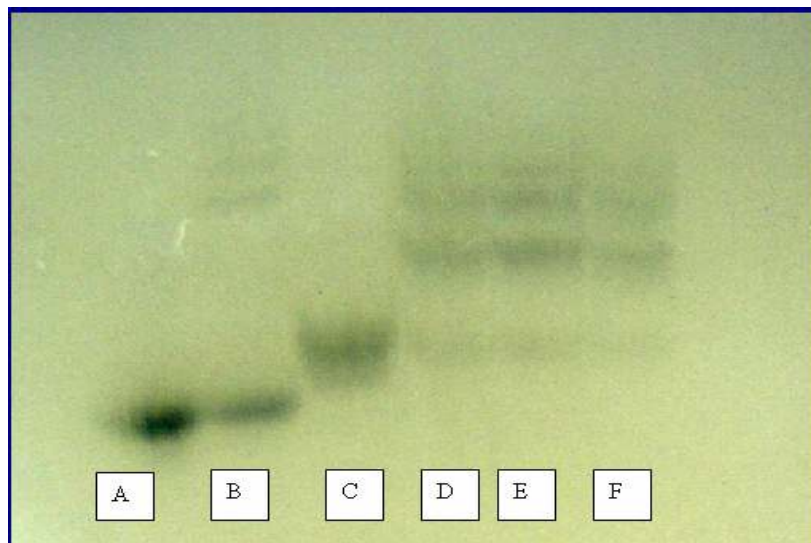
Assim, o ID pode variar de zero (ausência de dano) a 400 (todas as células com máximo de dano). (Collins *et al.*, 1995; Jaloszynski *et al.*, 1997).

#### 4.7. DETERMINAÇÃO DO FENÓTIPO DA HAPTOGLOBINA EM GEL DE AMIDO

A primeira etapa da avaliação dos polimorfismos da haptoglobina foi realizada através da eletroforese em gel de penetrose (figura 10) a 14% e a classificação de cada fenótipo foi feita com base em coloração específica para esta proteína (Moreira, 1990)

O gel de penetrose a 14% é composto por 25,2g de penetrose adicionado de 180mL tampão Tris-Citrato, pH 7,4 a 7,6 (12,144g de ácido cítrico e 5,88g de Tris por litro). A mistura deve ser aquecida até atingir a fervura e então colocada em uma forma até que esfrie. A preparação das amostras consiste em uma alíquota de 15 $\mu$ L de plasma sanguíneo da respectiva amostra, misturada ao mesmo volume de solução de hemoglobina livre obtida por meio da lise de hemácias em água destilada gelada. Cada amostra é então colocada em um pequeno pedaço de papel de filtro absorvente que é inserida no gel de penetrose (Moreira, 1990)

Para a eletroforese foi utilizado tampão de ácido bórico (18,55g de ácido bórico por litro), pH 8,0, por aproximadamente 6 horas, com voltagem de 125V e cerca de 30mA (Moreira, 1990).



**Figura 10:** Foto de gel de amido com padrões típicos da migração de haptoglobina, onde: A representa Hemoglobina livre; B, Hp2-2; C, Hp1-1; D, Hp2-1; E, Hp2-1 e F representa Hp2-1.

#### 4.8. PCR E ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para confirmar os resultados do gel de penetrose, as amostras de DNA foram submetidas à genotipagem por reação em cadeia de polimerase (PCR). A PCR é alelo – específica, baseada na metodologia descrita por Yano *et al.*, (1998), com modificações. Uma combinação de cinco diferentes iniciadores (tabela 3) foi utilizada, com o objetivo de diferenciar os alelos  $Hp^{1F}$ ,  $Hp^{1S}$  e  $Hp^2$  (tabela 4) da haptoglobina.



Apesar de terem sido utilizadas três PCRs para cada uma das amostras de DNA, a composição dos Epperdorfs e os ciclos da reação foram os mesmos para os três sistemas, alterando apenas o par de iniciador utilizado. Cada tubo de reação de PCR era composto por 16,1µL de água mili-Q autoclavada; 3,1µL de tampão de reação fornecido com a enzima para concentração de 1X; 1,25µL de solução de MgCl<sub>2</sub> 20mM; 2,5µL de solução de dNTP 200µM; 1,5 unidade de Taq DNA Polimerase (5unidades/µL, Biotools B&M Labs); 1,0µL de Iniciador 7,5µM, 1,0µL de DNA. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (PTC-100, MI Research, Inc.) com o seguinte programa: Temperatura de desnaturação de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 58°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

**Tabela 3:** Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores usados no presente estudo.

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência dos oligonucleotídeos (5' – 3')</b>
F3	CAGGAGTATACACCTTAAATG
S2	TTATCCACTGCTTCTCATTG
C42	TTACACTGGTAGCGAACCGA
C72	AATTTAAAATTGGCATTTCGCC
C51	GCAATGATGTCACGGATATC

**Tabela 4:** Pares de iniciadores usados na PCR para detecção dos alelos da haptoglobina.

<b>Reação</b>	<b>Par de iniciadores</b>	<b>Alelo alvo</b>	<b>Tamanho do fragmento (pb)</b>
Hp S	C51-S2	$Hp^{1S}$	1,2 k
Hp F	F3-C72	$Hp^{1F}$	1,4k
Hp2	F3-C42	$Hp^2$	935

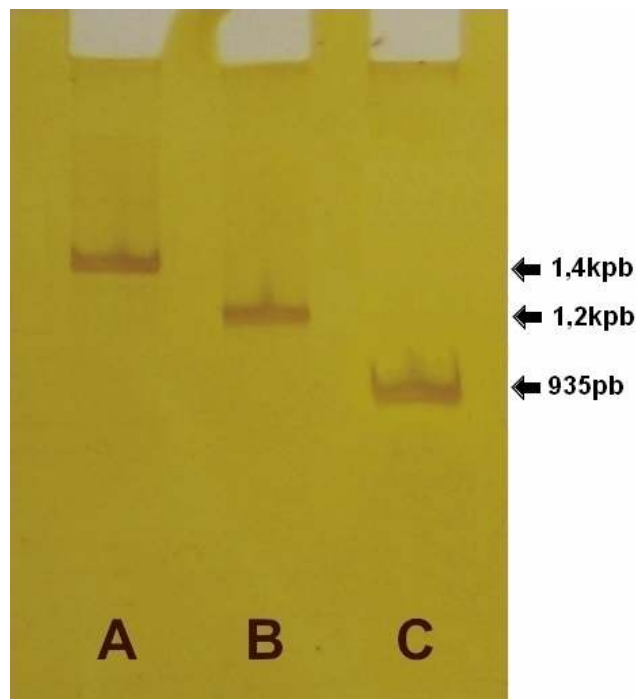
Os produtos da PCR foram analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (figura 11). O gel foi preparado com 4,0mL de solução de poliacrilamida (29g de acrilamida e 1g de N.N' Methilene-bis-acrilamide, adicionados a 100mL de água miliQ.), 2mL de tampão TBE 10X (108g de tris, 55g de ácido bórico, 9,3 g de EDTA, dissolvidos em 1litro de água destilada), 1,4mL de glicerol, 12,4mL de água destilada, 15 $\mu$ L de TEMED e 350 $\mu$ L de persulfato de amônia 0,1%. A eletroforese ocorreu em cuba vertical, com tampão TBE 1X (10,8g de tris, 55g de ácido bórico, 9,3 g de EDTA, dissolvidos em 1 litro de água destilada), por aproximadamente 1 hora e meia, com voltagem de 150V e cerca de 70mA.

Após a eletroforese o gel foi submetido à coloração química para revelação dos segmentos de DNA presentes no gel. Primeiro foi adicionado ao gel uma solução fixadora (144mL de etanol, 6mL de ácido acético e 750mL de água destilada) permanecendo sob agitação por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1mL de nitrato de prata 10%, permanecendo sob agitação por mais 10 minutos. Após o tempo de incubação com nitrato de prata, o gel foi lavado rapidamente com água destilada para a retirada do reagente. As bandas foram visualizadas com a adição 300mL de solução reveladora (22,5g de NaOH por litro)

previamente aquecida e 500 $\mu$ L de formoldeído. O gel permaneceu sob agitação até o total aparecimento das bandas. Após a revelação, o gel era mantido em solução fixadora até que estivesse seco.

Os fenótipos observados em ambos os géis foram comparados para garantir a correta fenotipagem dos indivíduos.

Todos os indivíduos foram fenotipados, em gel de amido, quanto ao tipo de hemoglobina (AA, AS, SS, AC, CS, SS), sendo que todos os indivíduos que não possuíam hemoglobina AA foram excluídos da amostra para evitar interferências nas análises, pois deve haver na diferença de afinidade entre as ligações da Hp e os diversos tipos de Hb.



**Figura 11:** Foto de gel de poliacrilamida com padrões típicos da migração de haptoglobina, onde: A representa alelo  $Hp^{1F}$ ; B, alelo  $Hp^{1S}$  e C,  $Hp^2$ .

#### 4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para analisar os dados do cometa, foi realizada a ANOVA (Análise de Variância) das médias de cada tratamento e fenótipos, utilizando o software MINITAB<sup>®</sup>, versão 14.20 (2005). Os dados obtidos apresentaram heterogeneidade de variabilidade (teste de Levene,  $P < 0,05$ ), por isso foi necessário realizar uma transformação logarítmica (teste de Levene,  $P > 0,05$ ) para a realização da ANOVA. Os resultados obtidos foram representados graficamente por meio do diagrama de *box-plot*. O *box-plot* foi escolhido por colocar em evidência a metade principal da distribuição dos valores. É geralmente nesta faixa inter-quartis de 25 a 75% que se encontram os dados mais estáveis e desta forma mais importantes. A

mediana é representada por uma barra horizontal no centro do gráfico e a média como um ponto vermelho, os dados discrepantes do restante da distribuição (*outliers*) são representados por um asterisco.

Quando encontrada diferença estatisticamente significativa na ANOVA, esta foi avaliada por teste de Tukey (tratamentos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou de Fisher (fenótipos de Hp) para comparação pareada das médias, ao nível de significância de cinco por cento (5%), em ambos os testes.

Para as análises estatísticas, a mediana foi escolhida como medida de tendência central, e não a média, para reduzir a influência de valores altos e baixo que freqüentemente ocorrem no teste do cometa (Garcia *et al.*, 2005).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. AMOSTRA EM ESTUDO

Quanto à exposição a radiações (raios-X, radioterapias ou exames com isótopo radioativo e ressonância) nos últimos seis meses, as diferenças estatísticas não foram significativas entre os índices de danos observados entre as pessoas expostas e as não expostas (ANOVA,  $P = 0,747$ ), assim como a diferença entre os fenótipos da Hp e a exposição a radiações (ANOVA,  $P = 0,100$ ).

Quanto ao uso ou não de anticoncepcionais hormonais pelas mulheres participantes do estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a variável uso de anticoncepcional e o índice de dano observado (ANOVA,  $P = 0,529$ ) e nem entre esta variável e os diversos fenótipos de Hp (ANOVA,  $P = 0,546$ ).

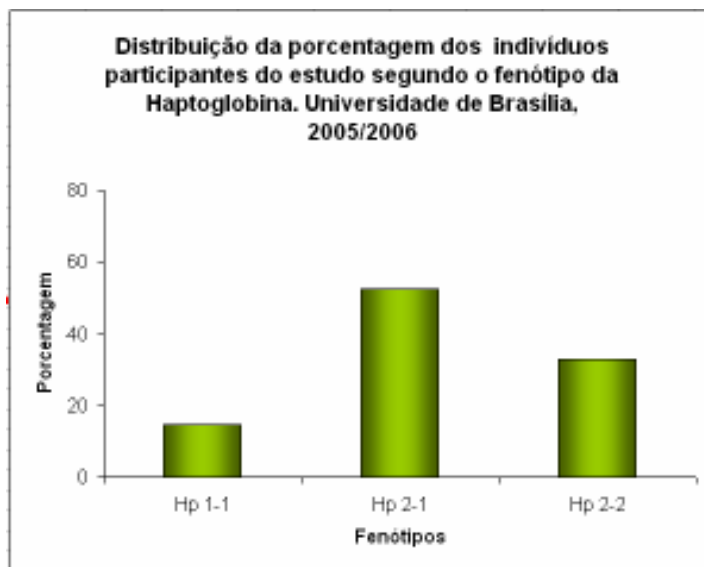
A ANOVA mostrou que não existem diferenças estatisticamente significantes ( $P = 0,575$ ) entre o índice de dano do grupo de pessoas com antecedentes de doenças familiares e sem antecedentes das mesmas doenças.

Devido à heterogeneidade dos dados de exposição à substância química, foi realizada uma transformação de raiz para assegurar a pressuposição da ANOVA de que os dados devem ser homogêneos e então realizar a ANOVA. A ANOVA com transformação de raiz revelou diferenças estatisticamente significantes entre os índices de dano do grupo exposto à substância química e o grupo não exposto ( $P = 0,09$ ).

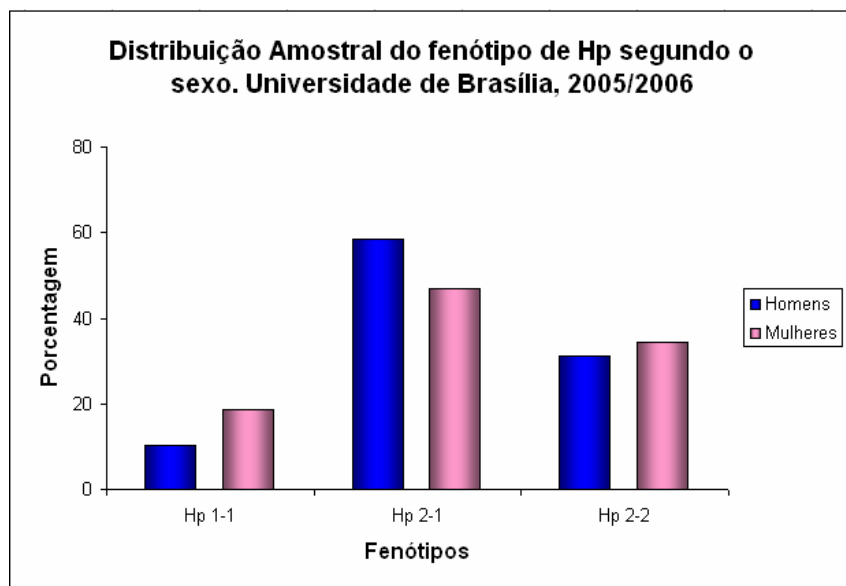
## 5.2. FENOTIPAGEM DOS INDIVÍDUOS

Após a fenotipagem da haptoglobina, por gel de penetrose e gel de poliacrilamida e observada a concordância dos fenótipos de cada indivíduo em ambas metodologias, observou-se que aproximadamente 15% dos indivíduos apresentavam fenótipo Hp 1-1, enquanto que 52% apresentavam fenótipo Hp 2-1 e 33%, o fenótipo Hp 2-2 (Figura 12).

A distribuição amostral por sexo mostrou que entre os homens, foram observados 10% com o fenótipo Hp 1-1, 59% com o fenótipo Hp 2-1 e 31% com o fenótipo Hp 2-2. Entre o grupo das mulheres, a porcentagem observada para os fenótipos Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2 foram de 19%, 47% e 34%, respectivamente (Figura 13).



**Figura 12:** Distribuição dos indivíduos em estudo quanto ao fenótipo da haptoglobina.

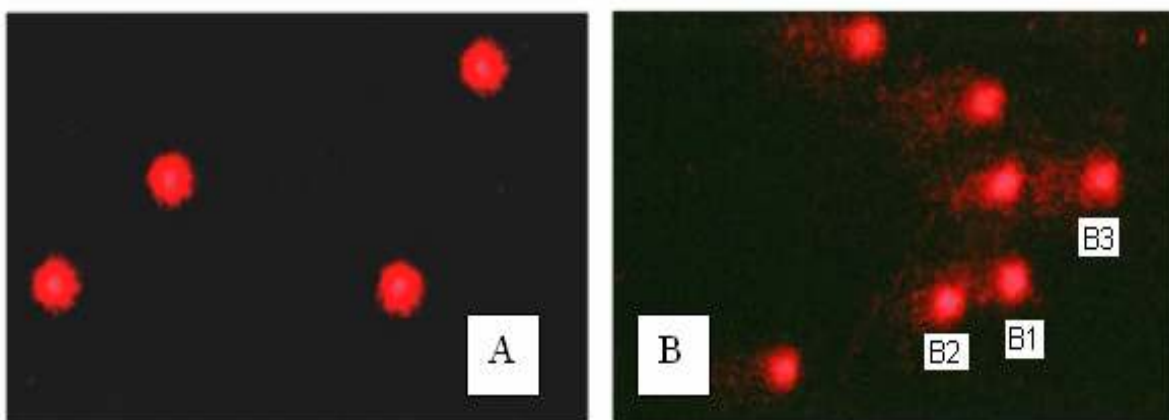


**Figura 13:** Distribuição dos indivíduos em estudo quanto ao fenótipo da haptoglobina, separados por sexo.

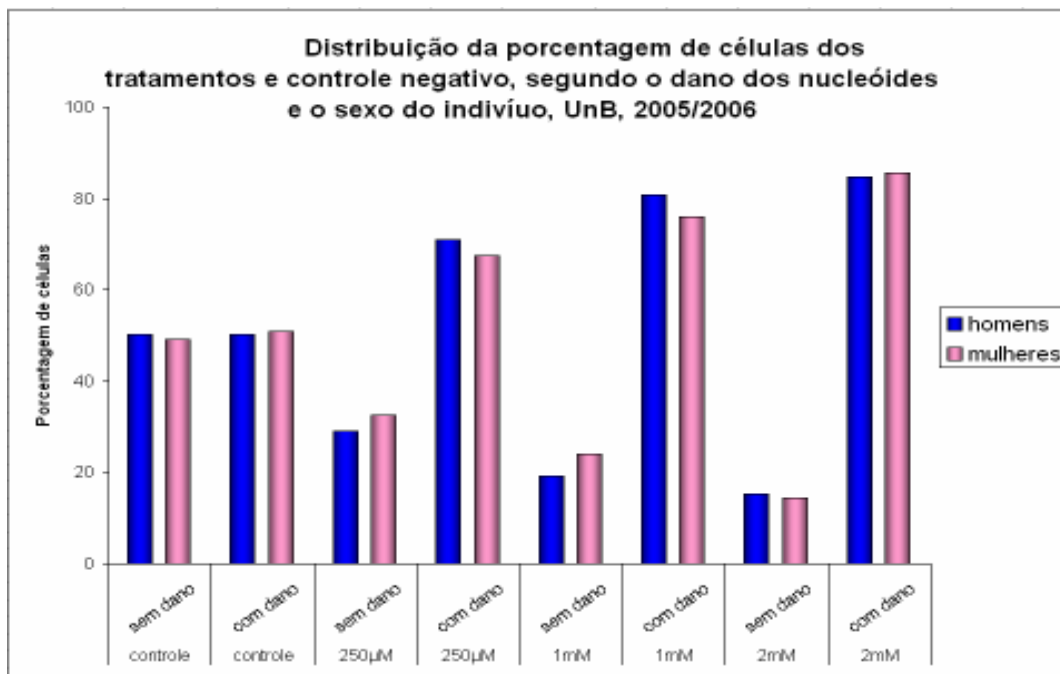


### 5.3. AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE DANO PELO TESTE DO COMETA

Após a realização do teste do cometa (Figura 14) nos indivíduos da amostra, observou-se que em nenhum dos tratamentos, assim como no controle, a diferença entre os sexos e o índice de dano observado, difere estatisticamente (ANOVA,  $P = 0,452$ ), como mostrado na figura 15. Por não haver diferença, as demais análises estatísticas foram feitas considerando-se mulheres e homens num mesmo grupo.

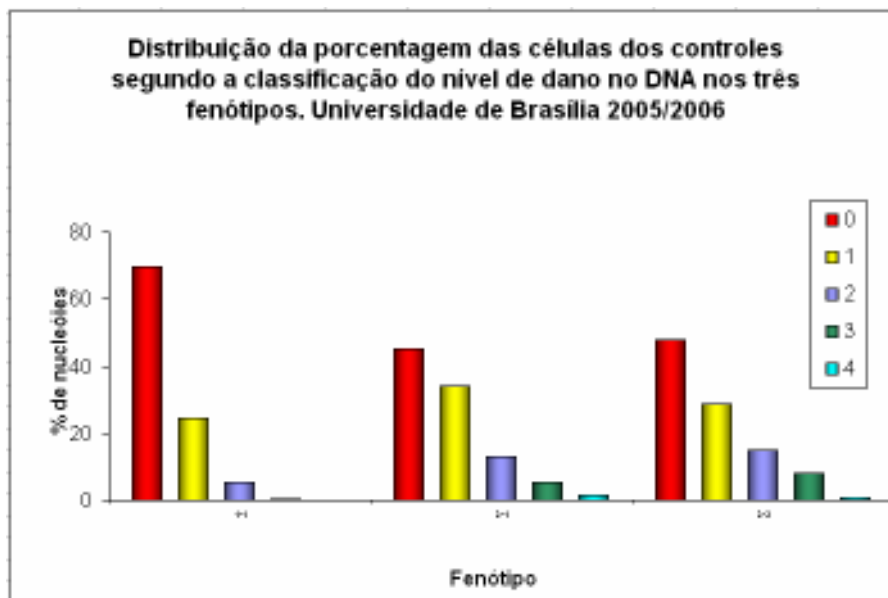


**Figura 14:** Teste do cometa: Onde **A** representa o controle negativo com nucleóides classificados como nível zero de dano. **B** representa tratamento com  $H_2O_2$  onde se observam nucleóides classificados como dano nível 1 (B1), dano nível 2 (B2) e nível 3 (B3). Fotos das amostras obtidas no Laboratório de Genética da UnB.



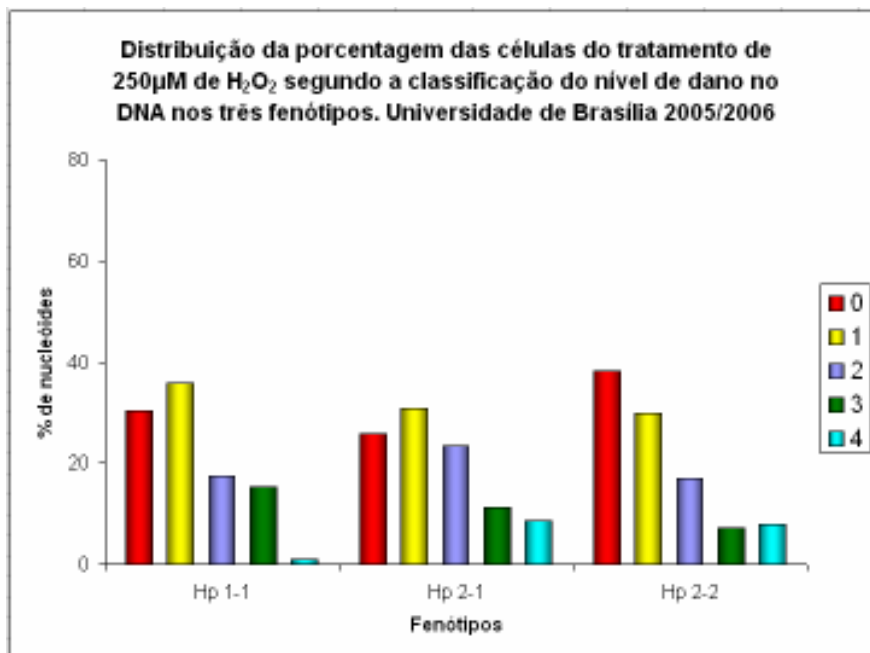
**Figura 15:** Distribuição da porcentagem das células do controle e dos tratamentos com  $H_2O_2$  dos indivíduos participantes do estudo segundo o sexo e o dano dos nucleóides no teste do cometa.

A figura 16 mostra o padrão de dano celular agrupado por fenótipo presente nos controles, ou seja, danos naturais de cada fenótipo. Observa-se nos fenótipos Hp 2-1 e Hp 2-2, menor proporção de nucleóides com dano zero em relação ao fenótipo Hp 1-1. É possível ainda notar ainda que os nucleóides com alto dano no DNA (classificados como níveis 3 e 4 no teste do cometa) estão presentes em maior proporção nos fenótipos Hp 2-1 e Hp 2-2, que no fenótipo Hp 1-1. Esses dois dados (maior quantidade de células com nível zero de dano e menor quantidade de células com níveis altos de dano) evidenciam um nível basal de danos menor neste último fenótipo. Entretanto, a ANOVA revelou que não há diferença estatisticamente significativa entre os diversos fenótipos no controle ( $P = 0,180$ ).

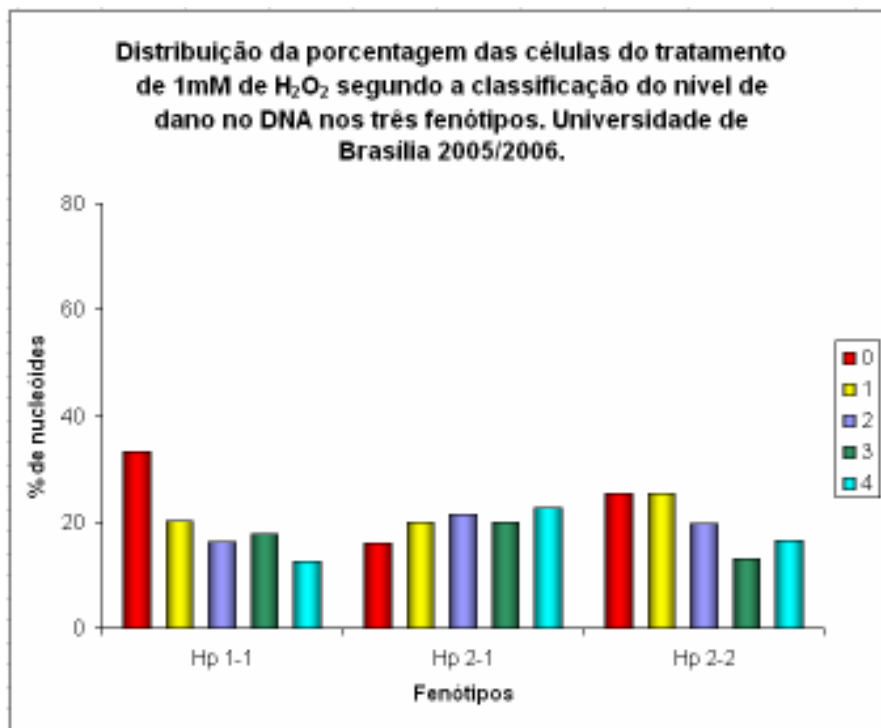


**Figura 16:** Distribuição da porcentagem das células dos controles, agrupadas pelo fenótipo, segundo a classificação do nível de dano no DNA no teste do cometa (0, 1, 2, 3, 4).

A partir da análise das figuras 17 e 18 pode-se notar que o fenótipo Hp 1-1 apresenta, assim como no controle, um padrão diferenciado de proporção de nucleóides classificados nas diversas classes do teste do cometa. No tratamento com 250 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 16) observa-se uma proporção maior de nucleóides com alto dano no DNA (classe 4) nos fenótipos Hp 2-1 e Hp 2-2 em relação ao fenótipo Hp 1-1. No tratamento com 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 17) nota-se maior porcentagem de nucleóides classificados como nível zero de dano em Hp 1-1 que nos outros dois fenótipos de Hp. Esses dados, assim como o controle, mostram que o fenótipo Hp 1-1 apresenta menores proporções de dano no DNA quando tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

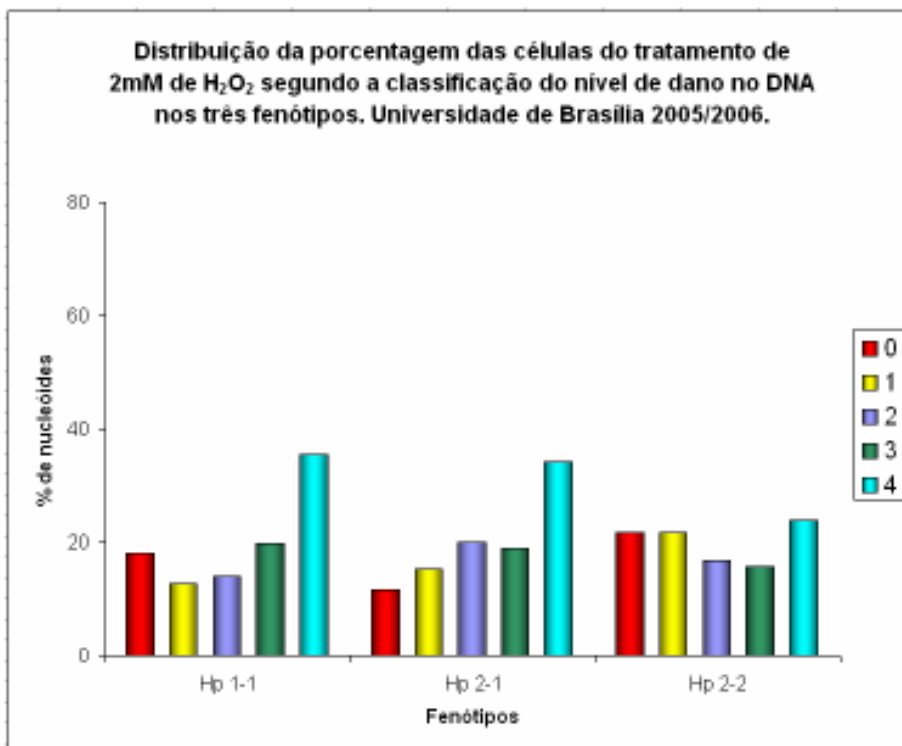


**Figura 17:** Distribuição da porcentagem das células do tratamento de 250 $\mu$ M, agrupadas pelo fenótipo, segundo a classificação do nível de dano no DNA no teste do cometa (0, 1, 2, 3, 4).



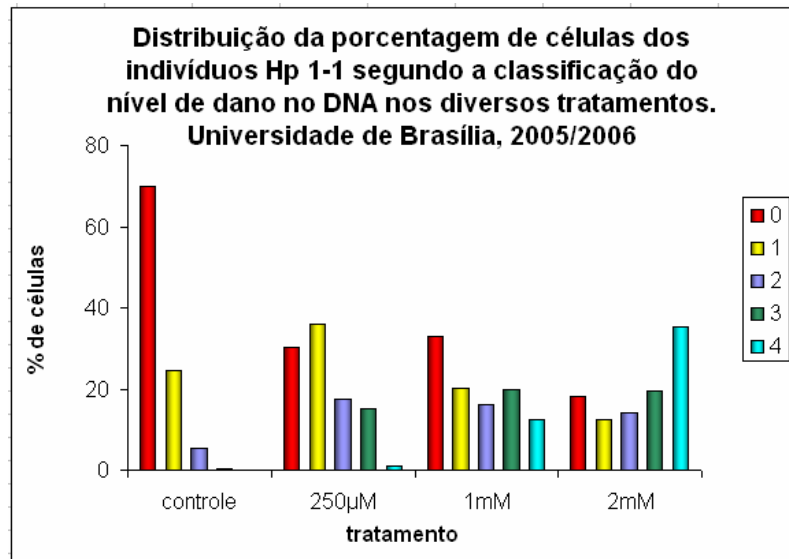
**Figura 18:** Distribuição da porcentagem das células do tratamento de 1mM, agrupadas pelo fenótipo, segundo a classificação do nível de dano no DNA no teste do cometa (0, 1, 2, 3, 4).

O tratamento com 2mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está representado na figura 19. Neste tratamento, entretanto, não é mais notada diferença entre o fenótipo Hp 1-1 e os demais fenótipos. Os três fenótipos apresentam aproximadamente as mesmas proporções de nucleóides nas diversas classificações do cometa. Possivelmente esta concentração muito alta de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é muito tóxica para as células causando muitos danos independente do fenótipo de Hp.

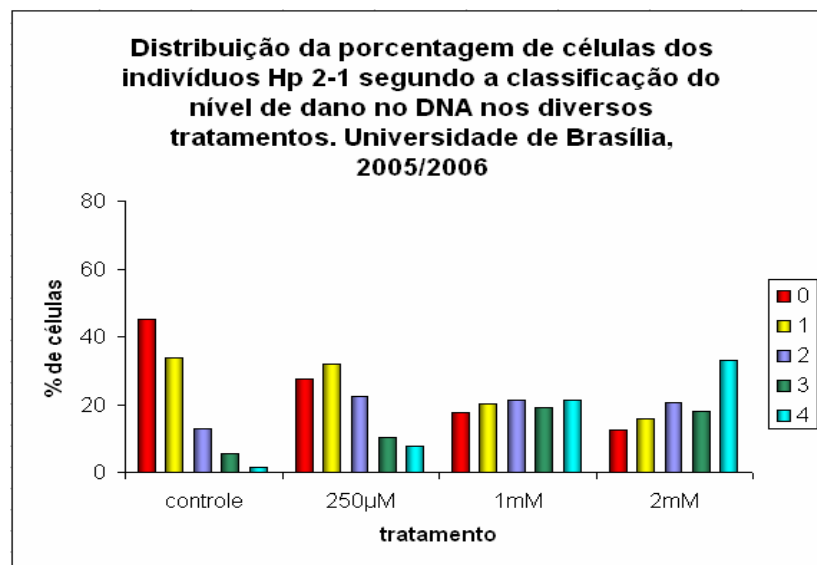


**Figura 19:** Distribuição da porcentagem das células do tratamento de 2mM, agrupadas pelo fenótipo, segundo a classificação do nível de dano no DNA no teste do cometa (0, 1, 2, 3, 4).

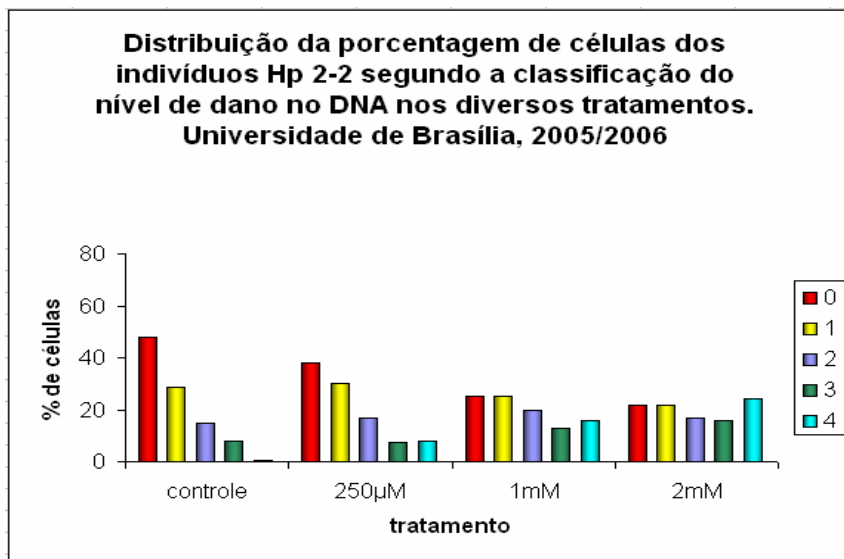
Para completar a análise de estatística descritiva, os dados foram agrupados por fenótipo, de acordo com os diversos tratamentos aos quais as células foram submetidas. As figuras 20, 21 e 22 mostram as distribuições dos nucleóides dos indivíduos fenotipados como Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2, respectivamente. Nas três figuras, representativas dos três diferentes fenótipos, nota-se um aumento de nucleóides com maior quantidade de dano no DNA com o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como era esperado.



**Figura 20:** Distribuição da porcentagem das células dos indivíduos de fenótipo Hp1-1 agrupadas pelos tratamentos aos quais as células foram submetidas.



**Figura 21:** Distribuição da porcentagem das células dos indivíduos de fenótipo Hp 2-1 agrupadas pelos tratamentos aos quais as células foram submetidas.



**Figura 22:** Distribuição da porcentagem das células dos indivíduos de fenótipo Hp 2-2 agrupadas pelos tratamentos aos quais as células foram submetidas.

#### 5.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

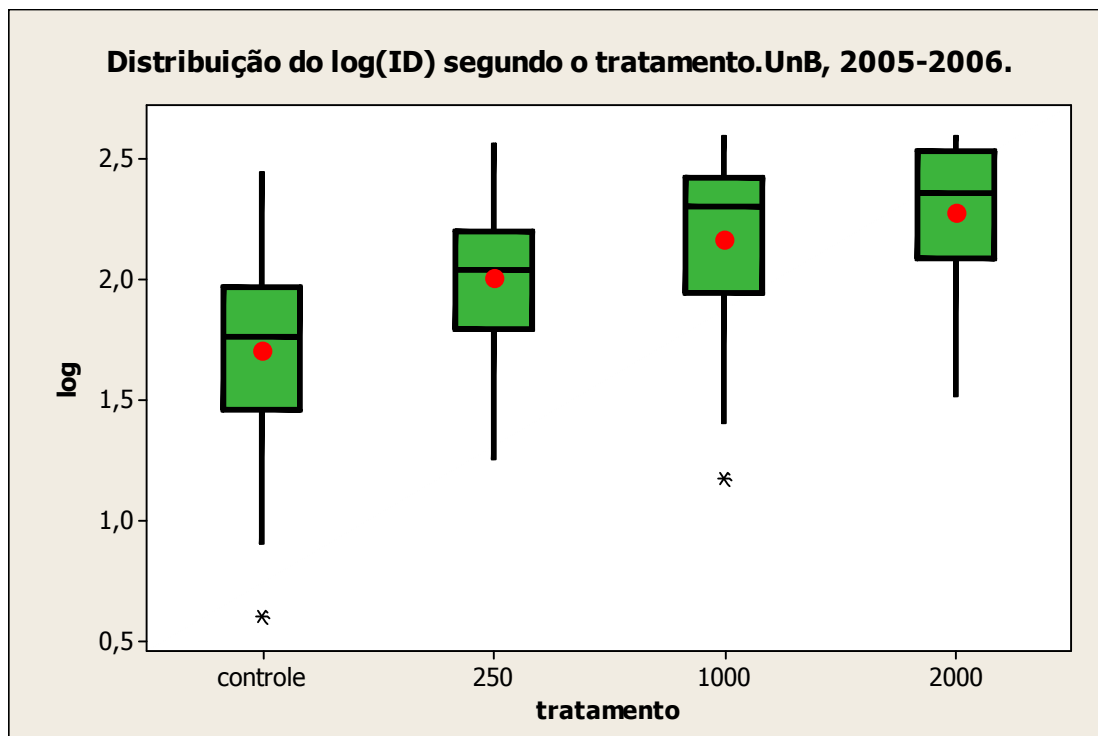
O teste de ANOVA com transformação logarítmica mostrou que existe diferença entre os diversos tratamentos ( $P = 0,0000$ ). Mediante comparação múltipla de Tukey (5%), verifica-se que o controle difere dos demais grupos, o tratamento de 250µM de  $H_2O_2$  difere dos tratamentos de 1mM e 2mM, enquanto que os tratamentos de 1mM e 2mM não diferem entre si (figura 23). Os intervalos de confiança obtidos no teste de Tukey são mostrados a seguir:

- Controle X 250µM de  $H_2O_2$  [0,145; 0,462]
- Controle X 1mM de  $H_2O_2$  [0,302; 0,619]
- Controle X 2mM de  $H_2O_2$  [0,417; 0,735]
- 250µM de  $H_2O_2$  X 1mM de  $H_2O_2$  [0,017; 0,315]
- 250µM de  $H_2O_2$  X 2mM de  $H_2O_2$  [0,113; 0,431]



- 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> X 2mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [-0,043;0,274]

A média do ID do controle é 1,6 vezes menor que a média dos IDs dos tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evidenciando o efeito genotóxico do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre o DNA.



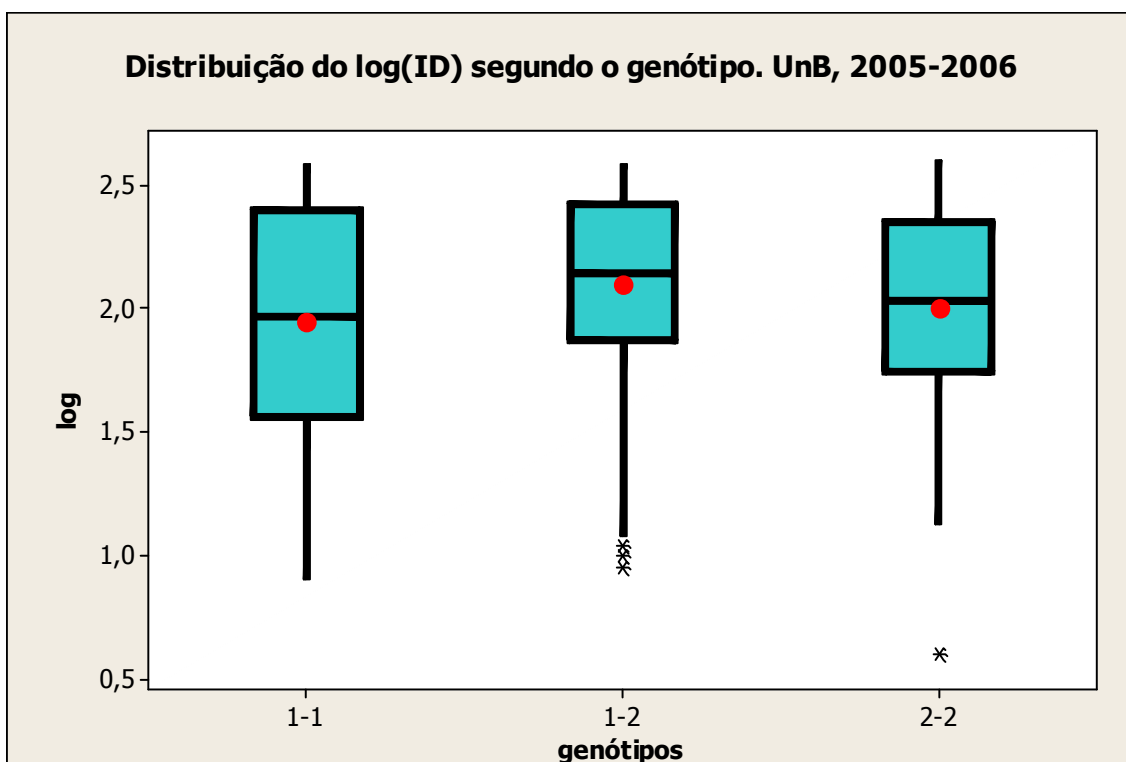
**Figura 23:** Distribuição do log do índice de dano de acordo com o tratamento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que as células foram submetidas. Controle sem adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os tratamentos de 250, 1000 e 2000 indicam a concentração do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em  $\mu$ M.

Para comparação entre os fenótipos e os índices de dano observados, a ANOVA mostra diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,028$ ). Por meio do teste pareado de Fischer (5%) para diferença de intervalos, constatou-se que o fenótipo Hp 1-1 difere apenas do fenótipo Hp 2-1 (figura 24). Os de confiança obtidos no teste de Fisher são mostrados abaixo:

- $Hp^{1-1} \times Hp^{2-1}$  [0,0003; 0,2957]

- $Hp^{1-1} \times Hp^{2-2}$  [-0,2001; 0,0101]
- $Hp^{2-1} \times Hp^{2-2}$  [-0,1001; 0,2100]

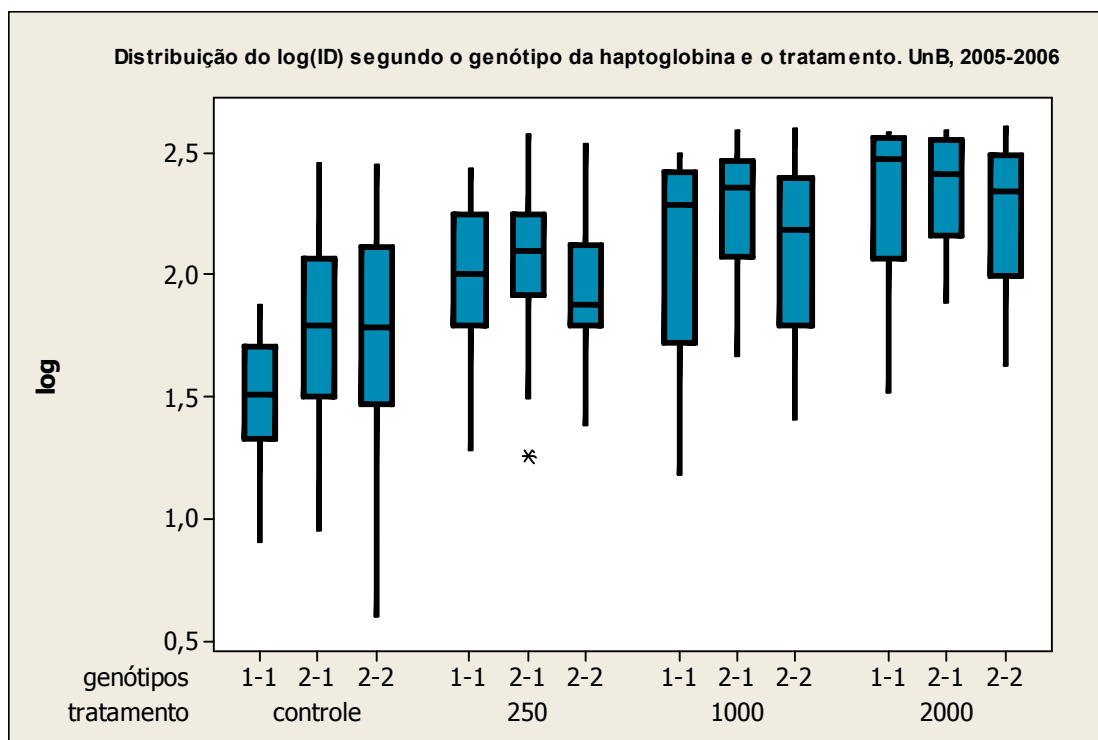
Apesar de haver diferença estatisticamente significativa apenas entre Hp 1-1 e Hp 2-1, nota-se que o fenótipo Hp 1-1 apresenta média de ID 1,2 vez menor que o fenótipo Hp 2-1; e média de ID 1,08 vez menor que o fenótipo Hp 2-2, sugerindo uma atividade antioxidante maior na proteína monomérica.



**Figura 24:** Distribuição do log do índice de dano de acordo com o fenótipo de Hb

Apesar de haver diferenças estatísticas entre os tratamentos e também entre determinados fenótipos de Hp, a análise da interação entre os tratamentos e os fenótipos com relação ao log do ID não difere estatisticamente ( $P = 0,674$ ). É

possível que o pequeno tamanho amostral interfira no teste, não indicando diferença entre os fatores e o log do ID (figura 25).



**Figura 25:** Distribuição do log do índice de dano de acordo com o tratamento de  $H_2O_2$  que as células foram submetidas e o fenótipo de Hp.

## 6. DISCUSSÃO

Para a avaliação dos níveis de dano no DNA, existem algumas técnicas disponíveis. A eletroforese de células isoladas (teste do cometa), por exemplo, de linfócitos humanos, nos permite avaliar o índice de danos no DNA. É uma técnica simples, rápida e não requer altos investimentos com equipamentos analíticos. Existe uma grande correlação entre a análise de imagem por computador (% de DNA na cauda) e contagem visual (unidades arbitrárias) na mesma amostra de linfócitos humanos (Collins, 2004). Os cometas são classificados visualmente em diversas categorias, com base no comprimento de migração e na proporção relativa de DNA na cauda, atribuindo-se valor numérico a cada classe de migração (Tice *et al.*, 2000). Índices de dano similares foram observados por Heaton *et al.*, (2002), em linfócitos de felinos e caninos quando comparadas as duas análises de cometas: visual e computadorizada. Neste trabalho, optou-se pela a contagem visual dos cometas, pois na análise computadorizada pode haver interferências na interpretação, uma vez que o dano observado no nucleóide de classe 4 (núcleo apoptótico) passa a ser interpretado como de nível zero, pois devido à grande quantidade de DNA na cauda do núcleo apoptótico, este passa a ser classificado como nucleóide sem dano.

O dano ao DNA, no ensaio do cometa pode ser induzido por drogas, radiações e substâncias inorgânicas. A exposição do DNA ao estresse oxidativo leva a mais de 20 diferentes tipos de dano a bases produzindo bases nitrogenadas oxidadas ou com danos ao anel aromático. O dano mais comum às purinas é o 8-oxo-dG que é usado para avaliação de ensaios de danos ao DNA. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um

metabólito extremamente deletério, tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas e pode reagir com a membrana dos eritrócitos e proteínas ligadas ao ferro. O  $H_2O_2$  causa quebra de fita de DNA devido à geração de radicais hidroxila próximos à molécula de DNA, pela reação de Fenton. Desta forma, os danos causados ao DNA pelo  $H_2O_2$  são indiretos, causados por meio da geração de um radical por uma reação catalisada por íons metálicos. O  $H_2O_2$  causa ainda quebra de fita simples e dupla. Por estas razões é extremamente tóxico para as células (Ferreira e Matsubara, 1997; Sluppang *et al.*, 2003; Cireszko *et al.*, 2005). Por esta razão, o  $H_2O_2$  é comumente utilizado como controle positivo para causar danos oxidativos ao DNA (Singh *et al.*, 1988; Horváthová *et al.*, 1998; Heaton *et al.*, 2002; García *et al.*, 2004; Guéye *et al.*, 2006). Com tratamento de  $200\mu M$  de  $H_2O_2$ , os linfócitos sofrem poucos danos ao DNA se comparados com outras células humanas (Collins *et al.*, 1995). Em estudos genotóxicos *in vitro*, as concentrações ideais devem ser suficientes para causar dano ao DNA, porém com mínima toxicidade às células. Durante este estudo, observou-se que concentrações de  $H_2O_2$  acima de  $2mM$ , o índice de dano observado é o mesmo para as diversas concentrações, possivelmente as doses mais altas de  $H_2O_2$  são muito tóxicas para as células.

Os testes estatísticos mostraram que os índices de dano dos diversos tratamentos diferem estatisticamente do controle, o tratamento de  $250\mu M$  de  $H_2O_2$  difere estatisticamente dos demais tratamentos, entretanto os tratamentos de  $1mM$  e  $2mM$  não diferem entre si. Provavelmente doses acima de  $1mM$  de  $H_2O_2$  saturam a célula, por isso concentrações cada vez mais altas de  $H_2O_2$  não

aumentam o índice de dano observado para as células, causando muitos danos independente do fenótipo de Hp.

A haptoglobina é uma proteína produzida principalmente pelos hepatócitos, cuja principal função é fixar a hemoglobina livre e desta forma promover sua remoção pelo sistema monocítico fagocitário. Além disso a haptoglobina tem papel angiogênico, antioxidante e está associada a fatores anti-inflamatórios (Arrendouani *et al.*, 2003; Sauerwein *et al.*, 2005; Zvi e Levi, 2006).

Os níveis aumentados de haptoglobina são observados em inflamações, em queimaduras e em tumores, enquanto sua diminuição é observada durante a hemólise, estados de má-nutrição, desordens hepatocelulares e estágios tardios de gestação (Sadzadeh e Bozorgmehr, 2004).

A associação entre os fenótipos da Hp com diferentes propriedades funcionais tem se tornado de grande interesse para os pesquisadores nos últimos anos.

O fenótipo Hp 1-1 é mais eficiente na inibição da síntese de prostaglandina (atividade antiinflamatória), além de apresentar maior frequência em pacientes com malignidades hematológicas. Clinicamente, pacientes com diabetes e fenótipo Hp1-1 são resistentes ao desenvolvimento de retinopatia, nefropatia e problemas cardiovasculares associados à doença. Além destas consequências diretas, as diferenças são ainda acentuadas pela maior concentração plasmática de Hp 1-1 (Tseng *et al.*, 2004). Já o fenótipo Hp 2-2 é mais eficiente na atividade angiogênica, maior frequência em pacientes com desordens auto-imunes e baixa

frequência em casos de câncer de bexiga, pulmão e mama. O alelo  $Hp^2$  possui atividade antibacteriana, pelo menos *in vitro* (Wassel, 2000).

Na Europa, o fenótipo Hp 2-2 é encontrado em 37% dos indivíduos, o fenótipo Hp 1-1, em 13% e o Hp 2-1 em 50% da população (Wassel, 2000). Neste estudo, apesar do pequeno tamanho amostral, foram observadas proporções semelhantes às descritas para os três fenótipos da haptoglobina.

Para avaliar as funções antioxidantes da haptoglobina, Lim *et al.*, (1998) criaram camundongos *knock-out* para o gene da haptoglobina (-/-). Estes camundongos sobreviveram, mas tiveram uma significativa redução na viabilidade pós-natal. A falta da haptoglobina, entretanto não impediu a retirada da hemoglobina livre no plasma dos camundongos -/-. A indução de hemólise severa por drogas causou uma precipitação intensiva de hemoglobina nas células tubulares renais, entretanto, a precipitação de hemoglobina não sofreu aumento nos rins dos camundongos -/- (Lim, 2001).

Sabe-se que existem diferenças funcionais na capacidade antioxidante das diferentes proteínas da haptoglobina devido à diferente capacidade de ligação à hemoglobina livre, sugerindo que o fenótipo Hp 1-1 tem ligação mais forte à hemoglobina e conseqüentemente maior proteção antioxidante que os demais fenótipos. (Melamed-Frank *et al.*, 2001; Zvi e Levi, 2006).

A haptoglobina é um bom antioxidante mesmo em concentrações menores que as observadas no plasma de adultos saudáveis, porém este efeito antioxidante se mostrou dependente do fenótipo. Estudos *in vitro* foram conduzidos para determinar se os fenótipos da haptoglobina diferem quanto à proteção contra estresse oxidativo induzido pelo  $Fe^{++}$  presente na hemoglobina

livre. O tipo Hp 1-1 foi mais ativo enquanto que o tipo Hp 2-2 foi menos ativo (Guéye *et al.*, 2006).

Tseng *et al.*, (2004) mostraram que a haptoglobina é um potente antioxidante contra o LDL e atua de forma dose-dependente. Hp mostrou-se um antioxidante cerca de 20 vezes mais potente que a vitamina E. A atividade antioxidante da haptoglobina monomérica, Hp 1-1, foi moderadamente maior que a atividade das formas poliméricas Hp 2-1 e Hp 2-2.

Estudos mostram que o fenótipo Hp 1-1 foi mais eficiente na inibição das oxidações tanto de LDL como de ácido linoleico que o fenótipo Hp 2-2. As inibições de ambas as oxidações ocorrem de forma linearmente associadas à concentração de haptoglobina utilizada, entretanto há um determinado limiar em que a inibição dos dois fenótipos homocigotos de haptoglobina apresentam o mesmo percentual. Não há diferença significativa entre a inibição oxidativa da haptoglobina livre e da ultrafiltrada (purificada) (Melamed-Frank *et al.*, 2001). Sabe-se que os *loci* da haptoglobina (16q22.1) estão localizados próximos de dois outros *loci* envolvidos no metabolismo de lipídeos (Braeckman *et al.*, 1999). Há suspeitas de um desequilíbrio de ligação entre os *loci* da haptoglobina e um dos *loci* do metabolismo de lipídeos, gerando uma maior frequência de fenótipos Hp 2-2 entre os indivíduos com moderada hipercolesterolemia (Borresen *et al.*, 1987), entretanto, em outro estudo com os mesmos *loci* essa associação não foi confirmada (Braeckman *et al.*, 1999).

A absorção de vitamina C *in vitro* no plasma de pessoas com fenótipo Hp 2-2 ocorre mais rapidamente que no plasma de pessoas Hp 1-1, por isto os níveis plasmáticos desta vitamina são significativamente menores em pessoas com



fenótipo Hp 2-2 (Langlois *et al.*, 1997), contribuindo, desta forma, para uma maior atividade antioxidante no fenótipo Hp 1-1.

O presente estudo avaliou a diferença entre os indivíduos sob o ponto de vista fenotípico e a extensão do índice de dano pelo teste do cometa. Observou-se que a diferença encontrada na ANOVA está entre os fenótipos Hp 1-1 e Hp 2-1. Provavelmente, pelo fato ad amostra estudada ter sido pequena, os testes estatísticos não puderam observar diferenças entre os demais fenótipos de Hp. Embora a diferença estatística esteja apenas entre o fenótipo Hp 1-1 e Hp 2-1, nota-se diferença biológica entre os três fenótipos, tendo o fenótipo Hp 1-1, menores índices de dano que os demais fenótipos, evidenciando a maior atividade antioxidante deste fenótipo em relação aos demais.

Os polimorfismos da haptoglobina levam a alterações estruturais importantes nas proteínas. Devido a um grupo tiol extra na cadeia  $\alpha_2$ , as proteínas codificadas tanto pelo fenótipo Hp 2-1 quanto pelo Hp 2-2, formam grandes polímeros. Já os indivíduos com fenótipo Hp 1-1, formam proteínas monoméricas e desta forma, menores. A atividade antioxidante da forma monomérica é maior que das formas poliméricas, pois a ligação da proteína monomérica com a hemoglobina livre é mais efetiva que a ligação entre a hemoglobina e as duas formas poliméricas da haptoglobina já que nas proteínas poliméricas ocorre o bloqueio do acesso da ligação da ponte dissulfeto da haptoglobina o que resulta na perda da habilidade de formar complexo com a hemoglobina livre (Langlois e Delanghe 1996; Tseng *et al.*, 2004). Por esta razão o índice de dano observado foi menor na forma Hp 1-1 que nas demais formas desta proteína, corroborando com os dados descritos na literatura.

O teste do cometa procurou ainda avaliar se existem diferenças entre os índices de dano observados nos dois sexos, não tendo encontrado diferença. Este dado, entretanto diverge da literatura que relata diferenças consistentes entre os sexos, quando comparados indivíduos de países diferentes ou de um mesmo país de origem (Irlanda), em linfócitos de homens e mulheres com idades variando de 25 a 35 anos de idade. Entretanto, os pesquisadores não souberam explicar a origem desta diferença, já que todas amostras receberam o mesmo tipo de tratamento (Collins *et al.*, 1998).

Neste estudo não se observou diferença com significância estatística com relação ao nível de dano observado pelo teste do cometa entre o grupo de mulheres que fazem uso de anticoncepcional hormonal e o grupo das que não fazem. Entretanto, a literatura relata que o estrógeno pode lesar o DNA de várias maneiras. Ligações diretas de estrógeno e DNA ou formas indiretas de alterações covalentes podem ser induzidas em sistemas experimentais *in vitro* ou células em cultura, ou podem ainda ser detectadas em humanos. Dados preliminares sugerem que estrógenos podem induzir mutações gênicas, pois podem ser capazes de produzir alterações numéricas nos cromossomos (mutações no genoma ou aneuploidias) com ou sem dano aparente no DNA. Alguns estrógenos são potentes estimulantes de mitose causando mutações em células em cultura (Cavalieri *et al.*, 2000). Para se ter maiores evidências da influência hormonal seria necessário uma amostra muito maior do que a estava disponível para este estudo.

Santos *et al.* (2005), constatou que os técnicos dos laboratórios de pesquisa da Universidade de Brasília apresentam maiores índices de aberrações cromossômicas, comparado a uma população controle. Na população em estudo, observou-se diferença estatística entre os indivíduos exposto à substâncias químicas e o grupo de indivíduos não expostos.

Radiações ionizantes estão sabidamente envolvidas em processos de mutagênese e carcinogênese. Foi observado por Pouget *et al.*, (2000) que danos no DNA detectados no teste do cometa são proporcionais à dose de radiação que as células sofreram. Na amostra em estudo, as diferenças entre os índices de danos observados nas células das pessoas expostas à radiação e aquelas não expostas, não foi significativa. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que os indivíduos desta amostra sofreram exposições esporádicas a radiações, além das doses de radiação terem sido pequenas se comparadas a pessoas que têm exposição ocupacional à radiação. Sabe-se que a exposição esporádica a baixas doses de radiação não afetam significativamente o DNA. Entretanto, a exposição a radiações deve sempre ser investigada no histórico de indivíduos que cedem amostras de sangue para esse tipo de estudo.

## 7. CONCLUSÕES:

1. Nossos estudos demonstraram que os indivíduos que possuem fenótipo Hp 1-1 apresentam maior proteção contra o estresse oxidativo induzidos pelo  $H_2O_2$ , em relação aos indivíduos portadores dos fenótipos Hp 1-2 e Hp 2-2
2. As concentrações de  $H_2O_2$  induziram danos ao DNA de modo dose-dependente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKYOL, O.; YANIK, M.; ELYAS, H.; NAMLI, M.; CANATAN, H.; AKIN, H.; YUCE, H.; YILMAZ, H. R.; TUTKUN, H.; SOGUT, S.; HERKEN, H.; ÖZYURT, H.; SAVAS, H. A.; ZORUGLU, S. S. Association between Ala-9-Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.**, v. 29, p. 123-131, 2005.
2. ARREDOUANI, M.; MATTHIJS, P.; VAN HOEYVELD, E.; KASRAN, A.; BAUMANN, H.; CEUPPENS, L.; STEVENS, E. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. **Immunology.**, v. 108, p. 144-151, 2003.
3. ASAKAWA, J. I.; KODAIRA, M.; NAKAMURA, N.; SATOH, C.; FUJITA, M. Chimerism in humans after intragenic recombination at the haptoglobin locus during early embryogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 96, p. 10314-10319, 1999.
4. BARREIROS, A. L. B. S.; DAVI, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre a geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim nova.**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
5. BERNARD, D.; CHRISTOPHE, A.; DELANGHE, J.; LANGLOIS, M.; DE BUYZERE, M.; COMHAIRE, F. The effect of supplementation with an antioxidant preparation on LDL-oxidation is determined by haptoglobin polymorphism. **Redox Report.**, v. 8, n. 1, p. 41-46, 2003.

6. BRAECKMAN, L.; DE BACQUER, D.; DELANGHE, J.; CLAEYS, L.; DE BACKER, G. Associations between haptoglobin polymorphism, lipids, lipoproteins and inflammatory variables. **Atherosclerosis.**, v. 143, p. 383-388, 1999.
7. BORRESEN, A. L.; LEREN, T.; BERG, K.; SOLAAS, M. H. Effect of haptoglobin subtypes on serum lipid levels. **Hum. Hered.**, v. 37, n. 3, p. 150-156, 1987.
8. BREEN, A. P.; MURPHY, J. A. Reactions of oxyl radicals with DNA. **Free radic. Biol. Med.**, v. 18, n.6, p. 1033-1077, 1995.
9. BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis.**, v. 20, n.4, p. 245-254, 2005.
10. CAVALIERI, E.; FRENKEL, K.; LIEHR, J. G.; ROGAN, E.; ROY, D. Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents—DNA Adducts and Mutations. **Journal of the National Cancer Institute Monographs.**, n. 27, p. 75-93, 2000.
11. **CHROMOSOME 16. Map Viewer. (Online). Disponível em:**  
**<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=16>**  
(acessado em 10 de Outubro, 2006).
12. CIERESZKO, A.; WOLFE, T. D.; DABROWSKI, K. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide and the toxicant bisazir. **Aquatic Toxicology.**, v. 73, p. 128-138, 2005.

13. COLLINS, A. R.; GEDIK, C. M.; OLMEDILLA, B.; SOUTHON, S.; BELLIZZI, M. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. **FASEB J.**, v. 12, p.1397-1400, 1998.
14. COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology.**, v. 26, p. 249-261, 2004.
15. COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research.**, v. 336, p. 69-77, 1995.
16. COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. **FASEB J.**, v. 17, p. 1195-1214, 2003.
17. DIZDAROGLU, M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. **Mut Res.**, v. 275, n. 3, p. 331-342, 1992.
18. DOBRYSZYCKA, W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. **Eur J Clin Chem Clin Biochem.**, v. 35, n.9, p. 647-654, 1997.
19. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Méd. Brasil.**, v. 43 p. 63-68, 1997.
20. FLORY, L. L. Serum Factors of Australian Aborigines from North Queensland. [Letter] **Nature.**, v. 201, p. 508-509, 1964.
21. GARCÍA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J. E.; ALVAREZ, A. Sensivity and

- variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mut Res.**, v. 556, p. 25-34, 2004.
22. GUÉYE, P. M.; GLASSER, N.; FÉRARD, G.; LESSINGER, J. M. Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. **Clin Chem Lab Med.**, v. 44, n. 5, p. 542-547, 2006.
23. **HAPTOGLOBIN. (Online). Disponível em:**  
<http://160.114.99.91/astrojan/protein/pictures/gtpch.jpg> (acessado em 10 de Outubro, 2006)
24. HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.**, v. 11, p. 298-300, 1956.
25. HARRIS, H. **The principle of Human Biochemical Genetics**. 3ª Edição. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, 1980. Cap 3. Unequal Crossovers, deletions, chain elongation, partial duplication and other rearrangements.
26. HARTMANN, A.; PLAPPERT, U.; POETTER, F.; SUTER, W. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. **Mutation Research.**, v. 536, p. 27-38, 2003.
27. HARTMANN, A.; SHUMACHER, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; LOWE, P.; SUTER, W.; MUELLER, L. Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis.**, v. 19, n. 1, p. 51-59, 2004.



28. HEATON, P. R.; RANSLEY, R.; CHARLTON, C. J.; MANN, S. J.; STEVENSON, J.; SMITH, B. H. E.; RAWLINGS, J. M.; HARPER, J. Application of Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes. **J. Nutr.**, v. 132, p. 1598S – 1603S, 2002. Suplemento.
29. HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C. and WINDEBANK, S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. **Mutagenesis.**, v. 13, p. 89-94, 1998.
30. HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radic Biol Med.**, v. 28, n. 10, p. 1456-1462, 2000.
31. HERMES-LIMA, M. Oxigen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: STOREY, K. B. (Org) **Funcional Metabolism: Regulation and Adaptation** . Hoboken, New Jersey, 2004. p. 319-368.
32. HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMENOVÁ, D.; HLINCIKOVÁ, L.; MANDAL, T. K.; GÁBELOVÁ, A.; COLLINS A. R. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. **Mutation Research.**, v. 409, p. 163-171, 1998.
33. HU, Y. J.; DIAMOND, A. M. Role of Glutathione Peroxidase 1 in Breast Cancer. **Cancer Research.**, v. 63, p. 3347-3351, 2003.
34. **INTELLECTUAL PROPERTY DIGITAL LIBRARY: The Function of a Haptoglobin-Haemoglobin Receptor and the Uses Thereof. (Online).** Disponível em: [www.wipo.org/.../getbykey5?KEY=02/32941.020725](http://www.wipo.org/.../getbykey5?KEY=02/32941.020725) (acessado em 10 de Outubro, 2006).

35. JALOSZYNSKI, P.; KUJAWSKI, M.; CZUB-SWIERCZEK, M.; MARKOWSKA, J.; SZYFTER, K. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. **Mutation Research.**, v. 385, p. 223-233, 1997.
36. JANAYDEH, M.; HAMAD, M.; AEADALLAH, S. The relationship between haptoglobin polymorphism and serum ceruloplasmin ferroxidase activity. **Clin. Exp. Med.**, v. 3, n. 4, p. 219- 223, 2004.
37. JOSEPHY, P. **Molecular Toxicology**. 1.ed. New York, Oxford University Press, 1997. p. 105-123. Oxidative stress in erythrocyte.
38. KOCH, W.; LATZ, W.; EICHINGER, M.; ROGUIN, A.; LEVY, A. P.; SCHÖMIG, A.; KASTRATI, A. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. **Clinical Chemistry.**, v. 48, n. 9 p. 1377-1382, 2002.
39. LANGLOIS, M. R.; DELANGHE, J. R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. **Clinical Chemistry.**, v. 42, n.10, p. 1589-1600, 1996.
40. LANGLOIS, M. R.; DELANGHE, J. R.; DE BUYZERE, M. L.; BERNARD, D. R.; OUYANG, F. Effect of haptoglobin on the metabolism of vitamin C. **Am J Clin Nutr.**, v. 66, p.606-610, 1997.
41. LAVIE, L.; LOTAN, R.; HOCHBERG, I.; HERER, P.; LAVIE, P.; LEVI, A. P. Haptoglobin polymorphism is a risk factor for cardiovascular disease in patients with obstructive sleep apnea syndrome. **Sleep.**, v. 26, n. 5, p. 592-595, 2003.

42. LIM, S. K. Consequences of haemolysis without haptoglobin. **Redox Report.**, v. 6, n.6, p. 375-378, 2001.
43. LIM, S. K.; HONGKYUN, K.; LIM, S. K.; ALI, A.; LIM, Y. K.; WANG, S. Y.; CHONG, S. M.; COSTANTINI, F.; BAUMMAN, H. Increased Susceptibility in *Hp* Knockout Mice During Acute Hemolysis. **Blood.**, v. 92, n. 6, p.1870-1877, 1998.
44. MAEDA, N.; YANG, F.; BARNETT, D. R.; BOWMAN, B. H.; SMITHIES, O. Duplication within the haptoglobin *Hp2* gene. **Nature.**, v. 309, p. 131-135, 1984.
45. MALCHY, B.; RORSTAD, O.; DIXON, G. H. The half-molecule of haptoglobin: studies on the product obtained by the selective cleavage of a haptoglobin disulfide. **Can J Biochem.**, v. 51, n. 3, p. 265-273, 1973.
46. MELAMED-FRANK, M.; LACHE, O.; ENAV, B. O.; SZAFRANEK, T.; LEVI, N. S.; RICKLIS, R. M.; LEVY, A. P. Structure function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood.**, v. 98, n. 13, p. 3693-3698, 2001.
47. MOREIRA, H. W. **Eletrofose – Técnicas e Diagnósticos** 1<sup>a</sup> edição. Livraria Santos editora, 1990, p 117-140: Haptoglobinas
48. NAGEL, R.; ETCHEVERRY, R.; GUZMAN, C. Haptoglobin types in inhabitants of Easter Island. [Letter] **Nature.**, v. 201, p. 508-509, 1964.
49. NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e Talassemias** 1 ed. Ed Sarvier. São Paulo 1997 p. 11-15: Eritrócitos: Metabolismo e estresse oxidativo.

50. NAKAJIMA, M.; TAKEUCHI, T.; MORIMOTO, K. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. **Carcinogenesis.**, v.17, n.4, p. 787-791, 1996.
51. OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the 'comet' assay. **Radiat. Res.**, v. 122, p. 86-94. 1990.
52. POUGET, J. P.; DOUKI, T.; RICHARD, M. J.; CADET, J. DNA Damage Induced in Cells by and UVA Radiation As Measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and Comet Assay. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, n. 7, p. 541-549, 2000.
53. ROSA, J. G. V.; PROKOPCZYK, B.; DESAI, D. H.; AMIN, S. G.; EL-BAYOUMY, K. Elevated 8-hydroxy-2-deoxyguanosine in lung DNA of A/J mice and F344 rats treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and inhibition by dietary 1,4-phenylenebis (methylene) selenocyanate. **Carcinogenesis.**, v. 19, n. 10, p. 1783-1788, 1998.
54. SADRZADEH, S, M, H.; BOZORGMEHR, J. Haptoglobin phenotypes in health disorders. **Am J Clin Pathol.**, v. 121, p.97-104, 2004. Supplemento 1.
55. SANTOS, M. F. M. A.; FERRARI, I.; LUNA, H. Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories. **Environmental Research.**, v. 97, p. 330-338, 2005.
56. SAUERWEIN, H.; SCHMITZ, S.; HISS, S. Acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. **Redox Report.**, v. 10, n. 6, p. 1-8, 2005.

57. SHINDO, S. Haptoglobin subtyping with anti-haptoglobin alpha chain antibodies. **Electrophoresis.**, v. 11, n. 6, p. 483-488, 1990.
58. SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; MARINHO, J. R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. An alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with naive rodents. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 23, n.1, p. 241-245, 2000.
59. SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHENEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research.**, v. 175, p. 184-191, 1988.
60. SIMÕES, A. L. **O polimorfismo da esterase D em indígenas sul-americanos.** Ribeirão Preto, 1980. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP/RIB PRETO).
61. SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. **Biochem J.**, v. 61, n. 4 p. 629-641, 1955
62. SMITHIES, O.; CONNELL, G. E.; DIXON, G. H. Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. **Nature.**, v. 196, p. 232-236, 1962.
63. SMITHIES, O.; WALKER, N. F. Notation for Serum-Protein Groups and the Genes controlling their Inheritance. [Letter] **Nature.**, v. 178, p. 694-695, 1956.
64. SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research.**, v. 531, p.231-251, 2003

65. TAUFER, M.; PERES, A.; ANDRADE, V. M.; OLIVEIRA, G.; SÁ, G.; CANTO, M. E. P.; SANTOS, A. R.; BAUER, M.; CRUZ, I. B. M. Is the Val16Ala Manganese Superoxide Dismutase Polimorphism Associated with the Aging Process. **Journal of Gerontology: Biological Sciences.**, v. 60A, n. 4, p. 432-438, 2005.
66. TICE, R. R.; AGURELL, D.; ANDERSON D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, v. 35, p. 206-221, 2000.
67. TSENG, C. F.; LIN, C. C.; HUANG, H. Y.; LIU, H. C.; MAO, S. J. Antioxidant role of human haptoglobin. **Proteomics.**, v. 4, p. 2221-2228, 2004.
68. WASSEL, J. Haptoglobin: Function and polymorphism. **Clin. Lab.**, v. 46, p. 547-552, 2000.
69. YANO, A.; YAMAMOTO, Y.; MIYAISHI, S.; ISHIZU, H. Haptoglobin genotyping by allele-specific polymerase chain reaction amplification. **Acta Med Okayama.**, v. 52, n. 4, p. 173-181, 1998.
70. ZVY, B.; LEVY, A. P. Haptoglobin Phenotypes, Which One is Better and When? **Clin Lab.**, v. 52, p. 29-35, 2006.
71. ZHAO, H.; LIANG, D.; GROSSMAN, B.; WU, X. Glutathione Peroxidase 1 Gene Polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. **Urology.**, v. 66, p. 769-774. 2005.

## 9. ANEXOS:

### ANEXO 1: Termo de consentimento



LABORATÓRIO DE GENÉTICA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

#### Questionário

Este questionário visa o conhecimento sobre alguns aspectos do estilo de vida e condições de saúde, que podem influenciar nos resultados do nosso estudo. As informações aqui presentes serão mantidas em sigilo e visam unicamente o suporte para a metodologia empregada no estudo e para a análise dos resultados obtidos. Estas informações não serão, em hipótese nenhuma, usadas com outros objetivos, além daqueles mencionados no projeto, ficando a sua guarda sob inteira responsabilidade do coordenador.

#### IDENTIFICAÇÃO:

- Nome: \_\_\_\_\_
- Idade: \_\_\_\_\_
- Sexo:  Masc.  Fem.
- Telefone para contato: \_\_\_\_\_

#### DADOS CLÍNICOS:

- Tabagismo:  Não  
 Sim    N° de cigarros/dia: \_\_\_\_    Tempo: \_\_\_\_ (anos)  
 Parou de fumar há \_\_\_\_ anos

- Etilismo: Freqüência:
  - Menos de uma vez por semana
  - Até 2 vezes por semana
  - Mais de duas vezes por semana
  
- Uso de medicamentos:
  - Não
  - Sim Especificar quando possível: \_\_\_\_\_ Freqüência e dose: \_\_\_\_\_
  - Anticoncepcional
  
- Submeteu-se a algum exame radiológico nos últimos 6 meses? (raio-X, radioterapias ou exames com isótopo radioativo, ressonância)
  - Não
  - Sim Freqüência: \_\_\_\_\_
  
- Episódio de exposição acidental à substâncias químicas?
  - Não
  - Sim Freqüência: \_\_\_\_\_
  
- Exposição ocupacional à substâncias químicas:
  - Não
  - Sim Especificar: \_\_\_\_\_
  
- Antecedentes familiares de doenças cardiovasculares ou algum outro tipo de doença crônico-degenerativa.
  - Não
  - Sim Especificar: \_\_\_\_\_
  
- Pratica exercícios físicos?
  - Não
  - Sim Frequencia: \_\_\_\_\_



## ANEXO 2: DADOS BRUTOS

GRUPO	INDIVÍDUO						ID
		0	1	2	3	4	
Controle							
Hp 1-1	4	65	29	6	0	0	41
	11	49	40	11	0	0	62
	13	77	13	8	1	0	32
	18	92	8	0	0	0	8
	21	81	13	2	0	0	17
	41	33	56	9	0	0	74
	50	72	20	6	1	0	35
	57	74	11	6	0	0	23
	59	73	26	1	0	0	28
	$\mu \pm D.P.$	68,44±16,65	24±14,88	5,44±3,53	0,22±0,41	0±0	35,56±19,83
Hp 2-1	2	83	18	0	0	0	18
	3	89	11	0	0	0	11
	8	65	22	11	2	0	50
	10	50	33	13	3	0	68
	14	59	33	8	0	0	49
	16	60	31	9	0	0	49
	17	90	10	0	0	0	10
	22	68	23	7	0	0	37
	23	45	49	5	1	0	62
	24	29	52	18	1	0	91
	25	81	19	0	0	0	19
	27	51	44	4	0	0	52
	29	20	34	19	18	9	126,0036
	30	5	37	29	16	12	143,0048485
	36	91	9	0	0	0	9
	40	50	42	8	0	0	58
	43	18	46	36	0	0	118
	44	17	41	27	15	0	140
	46	0	12	23	35	30	163,012
	48	0	11	33	55	1	242,0004
	49	88	12	0	0	0	12
	52	35	65	0	0	0	65
	54	20	70	10	0	0	90
	55	60	18	21	0	0	60
	56	70	30	0	0	0	30
	58	47	53	0	0	0	53
	60	4	36	55	5	0	161
63	23	45	16	16	0	125	
64	14	67	14	2	1	101,0004082	
65	33	67	0	0	0	67	
67	50	30	15	5	0	75	
	$\mu \pm D.P.$	45,65	34,52	12,29	5,61 ±11,92	1,70 ±5078	75,94 ±54,00

**±28,40****±18,05****±13,10**

Hp 2-2	1	96	4	0	0	0	4
	5	85	12	4	0	0	20
	6	75	20	5	0	0	30
	7	83	14	3	0	0	20
	9	14	27	29	20	11	145,0043564
	12	13	39	40	9	0	146
	20	47	41	2	0	0	45
	26	30	57	12	0	1	81,0004
	28	63	32	5	0	0	42
	31	66	24	10	0	0	44
	34	69	29	0	0	0	29
	37	7	15	32	46	0	217
	38	43	56	1	0	0	58
	39	34	35	31	0	0	97
	47	0	3	14	82	1	277,0004
	51	87	7	3	0	0	13
	53	11	37	52	0	0	141
	61	58	21	21	0	0	63
	62	47	34	16	1	0	69
	66	25	60	14	0	0	88
	$\mu \pm D.P.$	<b>47,65 ±29,19</b>	<b>28,35 ±16,60</b>	<b>14,7 ±14,54</b>	<b>7,9 ±20,09</b>	<b>0,65 ±2,39</b>	<b>81,45 ±69,87</b>

GRUPO	INDIVÍDUO						ID
250µMH2O2		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	
	Hp1-1	4	31	6	6	0	61
		11	16	36	35	9	193,0036
		13	40	25	1	0	93
		18	15	2	0	0	19
		21	42	8	1	0	61
		41	49	39	0	0	127
		50	57	13	6	0	101
		57	59	19	2	0	103
		59	6	7	83	0	269
	$\mu \pm D.P.$	<b>29,78±26,27</b>	<b>35±18,10</b>	<b>17,22±12,71</b>	<b>14,88±26,24</b>	<b>1±2,82</b>	<b>114,11±71,31</b>

Hp2-1	<b>2</b>	55	36	7	2	0	56
	<b>3</b>	61	34	6	0	0	46
	<b>8</b>	38	23	20	11	8	96,0032
	<b>10</b>	24	30	34	12	0	134
	<b>14</b>	26	47	18	9	0	110
	<b>16</b>	32	31	27	8	2	109,0008
	<b>17</b>	14	29	47	9	1	150,0004
	<b>22</b>	44	36	18	2	0	78
	<b>23</b>	40	46	7	7	0	81
	<b>24</b>	20	28	24	26	2	154,0008
	<b>25</b>	69	31	0	0	0	31
	<b>27</b>	40	43	8	7	2	80,0008
	<b>29</b>	20	26	23	16	15	120,006
	<b>30</b>	0	12	34	28	26	164,0104
	<b>36</b>	82	18	0	0	0	18
	<b>40</b>	0	63	31	6	0	143
	<b>43</b>	12	54	33	0	0	120
	<b>44</b>	12	21	26	23	18	142,0072
	<b>46</b>	0	0	7	13	80	53,032
	<b>48</b>	0	0	26	72	2	268,0008
	<b>49</b>	15	50	32	2	0	120
	<b>52</b>	16	28	56	0	0	140
	<b>54</b>	12	69	18	0	0	105
	<b>55</b>	47	19	19	15	0	102
	<b>56</b>	56	40	4	0	0	48
	<b>58</b>	15	38	34	2	0	112
	<b>60</b>	13	8	8	6	65	42,026
	<b>63</b>	9	30	30	23	8	159,0032
	<b>64</b>	7	7	75	8	6	181,0023301
	<b>65</b>	28	51	12	9	0	102
	<b>67</b>	19	32	28	12	10	124,0039604
	<b><math>\mu \pm D.P.</math></b>	<b>26,65<math>\pm</math>21,25</b>	<b>31,61<math>\pm</math>16,54</b>	<b>22,97<math>\pm</math>16,30</b>	<b>10,58<math>\pm</math>13,74</b>	<b>7,90<math>\pm</math>18,13</b>	<b>109,29<math>\pm</math>50,63</b>

Hp2-2	1	80	16	4	0	0	24
	5	30	53	13	4	0	91
	6	62	38	1	0	0	40
	7	57	26	16	1	0	61
	9	0	3	7	36	54	125,0216
	12	72	26	3	0	0	32
	20	50	37	11	1	0	62
	26	69	13	3	5	9	34,00363636
	28	40	37	13	0	0	63
	31	1	5	29	20	47	123,0184314
	34	51	42	8	0	0	58
	37	32	36	27	4	0	102
	38	35	55	10	0	0	75
	39	49	40	11	0	0	62
	47	0	0	3	52	43	162,017551
	51	10	69	21	0	0	111
	53	14	16	69	0	0	154
	61	56	23	14	8	0	75
	62	23	32	31	4	0	106
	66	24	26	41	8	1	132,0004
	$\mu \pm D.P.$	37,75±24,21	29,65±17,54	16,75±15,96	7,15±13,38	7,7±17,13	84,60±39,74

GRUPO	INDIVÍDUO						ID
1mMH2O2		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	
Hp1-1	4	59	34	6	1	0	49
	11	4	17	22	31	26	154,0104
	13	59	20	10	7	4	61,0016
	18	89	7	4	0	0	15
	21	55	36	7	2	0	56
	41	0	12	39	19	30	147,012
	50	2	19	29	23	6	146,003038
	57	0	17	8	14	0	75
	59	3	3	8	49	37	166,0148
	$\mu \pm D.P.$	30,11±32,96	18,33±10,37	14,78±11,60	16,22±15,40	11,44±14,21	96,56±53,12

Hp2-1	<b>2</b>	59	16	18	6	0	70
	<b>3</b>	63	27	8	1	0	46
	<b>8</b>	21	12	30	18	19	126,0076
	<b>10</b>	0	1	10	21	68	84,0272
	<b>14</b>	38	25	17	14	6	101,0024
	<b>16</b>	25	44	21	10	0	116
	<b>17</b>	1	39	28	29	3	182,0012
	<b>22</b>	43	20	22	15	0	109
	<b>23</b>	6	20	25	35	14	175,0056
	<b>24</b>	0	2	16	51	32	187,0126733
	<b>25</b>	55	42	1	1	0	47
	<b>27</b>	20	42	25	13	0	131
	<b>29</b>	9	22	17	15	37	101,0148
	<b>30</b>	5	12	28	27	28	149,0112
	<b>36</b>	56	41	4	0	0	49
	<b>40</b>	0	8	32	16	42	120,0171429
	<b>43</b>	2	23	25	1	49	76,0196
	<b>44</b>	1	6	2	36	54	118,0218182
	<b>46</b>	0	0	2	11	87	37,0348
	<b>48</b>	0	0	0	84	16	252,0064
	<b>49</b>	0	4	34	53	8	231,0032323
	<b>52</b>	31	47	22	0	0	91
	<b>54</b>	11	33	46	9	0	152
	<b>55</b>	24	22	38	16	0	146
	<b>56</b>	23	29	26	21	0	144
	<b>58</b>	7	7	30	23	33	136,0132
	<b>60</b>	9	5	7	10	70	49,02772277
	<b>63</b>	0	20	43	20	21	166,0080769
	<b>64</b>	1	22	46	17	14	165,0056
	<b>65</b>	6	25	21	8	30	91,01333333
	<b>67</b>	0	2	17	31	50	129,02
	<b><math>\mu \pm D.P.</math></b>	<b>16,65±19,60</b>	<b>19,94±14,12</b>	<b>21,32±12,58</b>	<b>19,74±17,40</b>	<b>21,97±24</b>	<b>121,82±51,48</b>

Hp2-2	1	66	28	4	0	0	36
	5	0	21	35	22	22	157,0088
	6	70	27	3	0	0	33
	7	34	21	19	13	13	98,0052
	9	0	0	17	21	62	97,0248
	12	19	29	37	15	0	148
	20	58	27	14	0	0	55
	26	82	18	0	0	2	18,00078431
	28	8	26	22	35	19	175,0069091
	31	2	4	32	24	38	140,0152
	34	35	43	20	1	0	86
	37	10	41	31	17	0	154
	38	10	73	18	0	1	109,0003922
	39	75	16	9	0	0	34
	47	0	0	0	4	96	12,0384
	51	8	68	24	0	0	116
	53	6	7	26	38	23	173,0092
	61	15	20	27	14	24	116,0096
	62	10	27	21	31	11	162,0044
	66	3	16	39	26	23	172,0085981
$\mu \pm D.P.$	<b>25,55±27,71</b>	<b>25,6±18,78</b>	<b>19,9±11,75</b>	<b>13,05±12,84</b>	<b>16,7±24,18</b>	<b>104,56±54,71</b>	

GRUPO	INDIVÍDUO	ID					
2mMH2O2		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	
Hp1-1	4	39	35	21	4	1	89,0004
	11	1	2	6	39	52	131,0208
	13	25	16	30	22	7	142,0028
	18	80	11	5	4	0	33
	21	18	37	29	16	0	143
	41	0	0	13	30	57	116,0228
	50	0	11	20	33	36	150,0144
	57	0	0	1	16	83	50,0332
	59	1	2	1	13	83	43,0332
$\mu \pm D.P.$	<b>18,22±25,57</b>	<b>12,66±13,56</b>	<b>14±10,80</b>	<b>19,67±11,67</b>	<b>35,44±32,95</b>	<b>99,69±44,32</b>	

Hp2-1	<b>2</b>	43	22	18	11	0	91
	<b>3</b>	52	22	24	2	0	76
	<b>8</b>	13	26	20	18	14	120,0061538
	<b>10</b>	0	0	11	16	73	70,0292
	<b>14</b>	23	27	23	22	5	139,002
	<b>16</b>	28	34	31	6	1	114,0004
	<b>17</b>	5	33	19	26	18	149,0071287
	<b>22</b>	23	30	31	15	0	137
	<b>23</b>	7	12	38	20	23	148,0092
	<b>24</b>	1	0	15	14	70	72,028
	<b>25</b>	36	46	16	2	1	84,00039604
	<b>27</b>	23	40	22	4	11	96,0044
	<b>29</b>	9	8	21	21	40	113,0161616
	<b>30</b>	0	9	24	32	35	153,014
	<b>36</b>	41	43	14	2	0	77
	<b>40</b>	0	23	24	14	39	113,0156
	<b>43</b>	0	2	6	31	61	107,0244
	<b>44</b>	0	5	5	21	79	78,02872727
	<b>46</b>	0	0	1	12	87	38,0348
	<b>48</b>	0	0	0	13	87	39,0348
	<b>49</b>	0	0	20	49	31	187,0124
	<b>52</b>	5	28	51	16	0	178
	<b>54</b>	5	28	51	16	0	178
	<b>55</b>	23	8	36	33	0	179
	<b>56</b>	20	29	30	21	0	152
	<b>58</b>	4	4	13	26	43	108,0191111
	<b>60</b>	0	0	2	28	70	88,028
	<b>63</b>	0	0	8	21	71	79,0284
	<b>64</b>	1	6	12	24	57	102,0228
	<b>65</b>	0	0	16	20	76	92,02714286
	<b>67</b>	1	3	11	24	65	97,025

**$\mu \pm D.P.$  11,70 $\pm$ 14,98 15,74 $\pm$ 14,80 19,77 $\pm$ 12,60 18,70 $\pm$ 10,10 34,09 $\pm$ 31,53 111,43 $\pm$ 39,31**



Hp2-2	1	63	32	5	0	0	42
	5	0	5	23	31	41	144,0164
	6	66	25	5	3	1	44,0004
	7	16	13	5	18	39	77,01714286
	9	0	0	5	17	78	61,0312
	12	34	40	24	3	0	97
	20	50	27	19	4	0	77
	26	57	39	17	15	13	118,0036879
	28	2	42	18	17	21	129,0084
	31	0	0	8	23	69	85,0276
	34	70	19	10	1	0	42
	37	7	17	30	41	5	200,002
	38	16	42	24	8	0	114
	39	24	49	27	0	0	103
	47	0	0	0	1	99	3,0396
	51	3	10	39	37	11	199,0044
	53	2	2	14	43	39	159,0156
	61	8	14	1	21	46	79,02044444
	62	20	51	8	12	9	103,0036
	66	1	9	56	23	10	190,0040404
	<b><math>\mu \pm D.P.</math></b>	<b>21,95<math>\pm</math>24,60</b>	<b>21,8<math>\pm</math>16,95</b>	<b>16,90<math>\pm</math>13,70</b>	<b>15,90<math>\pm</math>13,55</b>	<b>21,05<math>\pm</math>29,03</b>	<b>103,30<math>\pm</math>53,38</b>

