



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Emília Delesderrier Franco

**Relação entre micronutrientes antioxidantes e marcadores de hemólise em
adultos com doença falciforme**

Rio de Janeiro

2019

Emília Delesderrier Franco

**Relação entre micronutrientes antioxidantes e marcadores de hemólise em adultos com
doença falciforme**

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Citelli dos Reis

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia dos Santos Cople-Rodrigues

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

F825

Franco, Emília Delesderrier.

Relação entre micronutrientes antioxidantes e marcadores de hemólise em adultos com doença falciforme / Emília Delesderrier Franco. – 2019.
55 f.

Orientadora: Marta Citelli dos Reis

Co-Orientadora: Cláudia dos Santos Cople-Rodrigues

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Micronutrientes antioxidantes – Teses. 3. Hemólise – Teses. I. Reis, Marta Citelli dos. II. Rodrigues, Cláudia dos Santos Cople. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

es

CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Emília Delesderrier Franco

Relação entre micronutrientes antioxidantes e marcadores de hemólise em adultos com doença falciforme

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Nutrição.

Aprovada 26 de junho de 2019.

Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª Marta Citelli dos Reis (Orientadora)

Instituto de Nutrição da UERJ

Prof^ª Dr^ª Cláudia dos Santos Cople-Rodrigues (Orientadora)

Instituto de Nutrição da UERJ

Prof^º Dr^º Danilo Grünig Humberto da Silva

Departamento de Biologia – UNESP/IBILCE

Prof^ª Dr^ª Danielly Cristiny Ferraz da Costa

Instituto de Nutrição – UERJ

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Angela e Danilo, e ao meu amor, Felipe.

Vocês são os pilares da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para atingir meus objetivos de vida e por colocar as melhores pessoas ao meu lado.

Agradeço imensamente aos meus pais, meus exemplos de vida. Obrigada pelo amor incondicional e incessante paciência, em todos os momentos.

Ao meu amor e eterno companheiro, Felipe, por sempre me apoiar e enxugar muitas lágrimas, nos momentos mais difíceis. Obrigada por todo carinho e compreensão.

Aos meus familiares, que apoiaram e vibraram com cada passo dado.

Às minhas queridas orientadoras, Marta Citelli e Cláudia Cople, por todo incentivo, paciência, carinho e ensinamentos. Vocês são exemplos para mim.

Às queridas professoras, Flávia Barbosa e Josely Koury, por toda ajuda e ensinamentos durante as análises estatísticas.

Às minhas queridas irmãs acadêmicas, Juliana Omena, Jéssyca Dias e Thamiris de Souza, por sempre estarem ao meu lado quando precisei, compartilhando alegrias e tristezas. Obrigada por tudo!

À minha eterna amiga e parceira de trabalho, Ana Carolina Lima, por me incentivar para o ingresso no Mestrado, me ouvir nos momentos difíceis e também por estar sempre disponível para as infinitas trocas de plantão para que eu pudesse cumprir com as atividades do Mestrado.

Ao Centro de Referência de Nutrição a Pessoa com Doença Falciforme (NUTRIFAL/MS) e a todos os componentes desta “grande família”.

Ao Ministério da Saúde, CNPq e à FAPERJ, pelo financiamento do projeto.

Ao Instituto de Nutrição da UERJ e a todas as pessoas que o compõe, fazendo com que a excelência em ensino seja mantida, apesar das dificuldades.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

FRANCO, Emília Delesderrier. **Relação entre micronutrientes antioxidantes e marcadores de hemólise em adultos com doença falciforme.** 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019

A doença falciforme caracteriza-se pela presença de hemácias falcizadas no sangue, em decorrência da desoxigenação da hemoglobina. Os efeitos da falcização, como a hemólise intravascular e a vaso-oclusão com lesão de isquemia-reperusão, ocorrem de forma cíclica e desencadeiam produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. O aumento destas espécies reativas pode resultar em depleção dos sistemas antioxidantes e causar desequilíbrio oxidativo intra e extracelular. Desta forma, pode-se induzir à instabilidade de membranas de hemácias, contribuindo para o aumento da hemólise. O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre as concentrações plasmáticas de micronutrientes antioxidantes (retinol, α -tocoferol, selênio e zinco) com indicadores de hemólise e de inflamação em indivíduos com doença falciforme. Participaram 51 adultos com doença falciforme, acompanhados em dois Centros de Referência em Hematologia do Estado do Rio de Janeiro. As concentrações séricas das vitaminas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência e a dos minerais por espectrometria de absorção atômica. Os marcadores de hemólise por analisador automático, e os de inflamação por nefelometria. Para a análise estatística foram utilizados modelos de regressão linear multivariada, por meio do *software* SPSS®. A maioria dos pacientes apresentou deficiência de selênio sérico. A análise de regressão linear demonstrou que o selênio foi o principal determinante da hemólise, dentre os nutrientes antioxidantes analisados. Dessa forma, os dados desse estudo sugerem que deve ser incluído fontes dietéticas de selênio nos protocolos de cuidado nutricional para pacientes com doença falciforme, a fim de reduzir o risco de hemólise nesses indivíduos.

Palavras-chave: Micronutrientes antioxidantes. Hemólise. Estresse oxidativo. Doença falciforme.

ABSTRACT

FRANCO, Emília Delesderrier. **Relação entre micronutrientes antioxidantes e marcadores de hemólise em adultos com doença falciforme.** 2019. 55 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019

Sickle cell disease is characterized by the presence of sickle cells in the blood, due to deoxygenation of hemoglobin. The effects of falcization, such as intravascular hemolysis and vaso-occlusion with ischemia-reperfusion injury, occur cyclically and trigger excessive production of reactive oxygen species. The increase of these reactive species can result in depletion of the antioxidant systems and cause oxidative imbalance intra and extracellular. In this way, it is possible to induce the instability of membranes of red blood cells, contributing to the increase of hemolysis. The main objective of the present study was to evaluate the relationship between plasma concentrations of antioxidant micronutrients (retinol, α -tocopherol, selenium and zinc) with hemolysis and inflammation indicators in individuals with sickle cell disease. The study consisted of 51 adults with sickle cell disease, who were followed up at two Reference Centers in Hematology in the State of Rio de Janeiro. Serum concentrations of vitamins were determined by high performance liquid chromatography and minerals by atomic absorption spectrometry. The markers of hemolysis by automatic analyzer, and those of inflammation by nephelometry. For the statistical analysis, multivariate linear regression models were used, using SPSS® software. Most patients presented selenium deficiency and consumption. Linear regression analysis showed that selenium is the main determinant of hemolysis among the antioxidant nutrients analyzed. Thus, data from this study suggest that the nutritional care protocols for patients with SCD should include dietary sources of selenium in order to reduce the risk of hemolysis.

Keywords: Antioxidant micronutrients. Hemolysis. Oxidative stress. Sickle cell disease.

LISTA DE TABELAS

Table 1 - General characteristics of adult sickle cell disease patients (n=51).....	34
Table 2 - Hematological parameters in adult sickle cell disease patients (n=51).	35
Table 3 - Serum concentrations of antioxidant nutrients and inflammation markers in sickle cell disease patients (n=51).....	35
Table 4 - Final model between nutrients and hematological parameters in adult sickle cell disease patients (n=51).....	36

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AF	Anemia falciforme
AP-1	Proteína ativadora-1 (do inglês: <i>Activator protein 1</i>)
BD	Bilirrubina direta
BT	Bilirrubina total
CAT	Catalase
DF	Doença falciforme
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FoxO3a	Fator de transcrição Forkhead box O3a (do inglês: <i>Fork head transcription factor box O3a</i>)
GPX	Glutathione peroxidase
HbA	Hemoglobina A
HbAS	Traço falciforme
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HEMORIO	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
HIF-1 α	fator de transcrição 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α , do inglês: <i>hypoxia-inducible factor1α</i>)
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1 (do inglês: <i>Intercellular adhesion molecule-1</i>)
IL-1	Interleucina 1
IL18	Interleucina 18
IL1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
LACFAR	Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFRJ
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF κ B	Fator nuclear Kappa B (do inglês: <i>nuclear factor kappa B</i>)
NLRP3	Receptor NLR (do inglês: <i>NLR family pyrin domain-containing 3</i>)
NO ₂	Dióxido de nitrogênio

NRF2	Fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2 (do inglês: <i>nuclear factor erythroid 2–related factor 2</i>)
NUTRIFAL	Centro de Referência de Nutrição à Pessoa com Doença Falciforme do Instituto de Nutrição da UERJ e Ministério da Saúde do Brasil
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ [•]	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Proteína C reativa
PCR _{us}	Proteína C reativa ultrasensível
PTN	Programa de Triagem Neonatal
SOD	Superóxido Dismutase
TLR4	Receptor do tipo <i>Toll4</i> (do inglês: <i>toll like receptor-4</i>)
TNF α	Fator de necrose tumoral- α (do inglês: <i>tumor necrosis factor-α</i>)
Trx	Sistema antioxidante tireodoxina
TrxR	Tireodoxina redutase
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VCAM-1	Molécula de adesão celularvascular-1 (do inglês: <i>vascular cell adhesion protein-1</i>)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
INTRODUÇÃO	14
1 REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1 Doença falciforme	16
1.2 Epidemiologia	17
1.3 Tratamento	17
1.4 Hemólise	18
1.5 Vaso-oclusão e lesão de isquemia-reperfusão	20
1.6 Inflamação na doença falciforme	21
1.7 Desequilíbrio oxidativo na doença falciforme	22
1.8 Sistema de defesa antioxidante	22
1.9 Micronutrientes antioxidantes na doença falciforme	24
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVO	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 RESULTADOS: ARTIGO: SELENIUM STATUS AND HEMOLYSIS IN SICKLE CELL DISEASE PATIENTS	28
4.1 Introduction	29
4.2 Materials and Methods	31
4.2.1 <u>Participants</u>	31
4.2.2 <u>Blood collection</u>	31
4.2.3 <u>Hematological parameters and hemolysis markers</u>	31
4.2.4 <u>Inflammatory markers</u>	32
4.2.5 <u>Antioxidant micronutrients</u>	32
4.2.6 <u>Cut-off values to determine micronutrient deficiency</u>	32
4.2.7 <u>Food consumption</u>	32
4.2.8 <u>Statistical analysis</u>	33
4.2.9 <u>Ethical aspects</u>	33
4.3 Results	34
4.3.1 <u>Participants' characteristics</u>	34
4.3.2 <u>Relationship between antioxidant micronutrients and hematological parameters</u>	35

4.3.3 <u>Food consumption</u>	36
4.4 Discussion	37
4.5 Conclusions	40
4.6 References	41
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto /UERJ.	54
ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio).....	55

APRESENTAÇÃO

Este estudo integra uma das linhas de pesquisa desenvolvidas pelo Centro de Referência de Nutrição à Pessoa com Doença Falciforme (NUTRIFAL). O NUTRIFAL foi criado em 2010, através de uma parceria entre o Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) com a Coordenação de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde. O NUTRIFAL tem por objetivo estudar e definir as principais necessidades nutricionais das pessoas com doença falciforme por meio de pesquisas científicas, a fim de aprimorar o cuidado nutricional a estes indivíduos.

A presente dissertação compreende um estudo aninhado ao “Estudo da relação entre estado nutricional, taxa metabólica basal e níveis séricos de antioxidantes em adultos com doença falciforme acompanhados em dois centros de referência em hematologia do Estado do Rio de Janeiro”, desenvolvidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ) e no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), nos anos de 2012 a 2014.

A hemólise é um dos principais processos fisiopatológicos na doença falciforme, e está relacionada com o aumento do estresse oxidativo que ocorre na doença. Dessa forma, o objetivo desta dissertação foi avaliar a relação entre nutrientes antioxidantes com marcadores de hemólise. Neste contexto, foi produzido um artigo, submetido à revisão na revista *Nutrition Research*, intitulado “*Selenium status and hemolysis in sickle cell disease patients*”.

Assim, este documento foi estruturado em apresentação; introdução; referencial teórico; objetivos; resultados; e conclusão e perspectivas. As sessões de ‘métodos’, ‘resultados’ e ‘discussão’ foram desenvolvidas no formato de artigo científico.

INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) engloba um grupo de doenças hereditárias autossômica recessiva, resultante de uma mutação no gene que codifica a β -globina (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Esta mutação promove uma variação da hemoglobina A (HbA), resultando na formação da hemoglobina S (HbS) (DAAK *et al.*, 2016). A hemácia contendo a HbS, em situações de desoxigenação, apresenta uma mudança de sua estrutura, passando do aspecto globular para a forma de meia lua ou foice (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A expressão clínica da homozigose do gene da Hb S (HbSS) é denominada de anemia falciforme (AF), que é a forma mais comum da DF e a que apresenta maior gravidade. Ela caracteriza-se pela presença da anemia hemolítica crônica, que origina as complicações da doença (BALLAS *et al.*, 2010)

Efeitos fisiopatológicos da DF, como a falcização, a vaso-oclusão, lesão de isquemia-reperfusão e a hemólise intravascular, com a subsequente redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (ON), ocorrem de forma cíclica, desencadeando uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) (WOOD; HSU; GLADWIN, 2008). Além disso, as hemácias falciformes são as fontes pró-oxidantes mais importantes na DF, devido à instabilidade da molécula HbS que ocasiona os processos de polimerização e despolimerização, provocando maior aumento de ERO (HEBBEL *et al.*, 1982; HEBBEL *et al.*, 1988).

A anemia hemolítica e as frequentes transfusões sanguíneas podem levar à sobrecarga de ferro na DF. A liberação do íon ferroso (Fe^{+2}) das moléculas de ferritina e hemoglobina no citoplasma celular levam à conversão deste em íon férrico (Fe^{+3}) (ESPOSITO *et al.*, 2003). O ferro livre atua como catalizador de reações oxidativas, através da reação de Fenton, com conseqüente produção de ERO (HABER; WEISS, 1934; AUST; MOREHOUSE; THOMAS, 1985). A ação pró-oxidante do ferro causa peroxidação lipídica em membranas celulares, alterando sua estrutura e desestabilizando-as (STOCKWELL *et al.*, 2017). O aumento da geração de ERO resulta em desequilíbrio dos sistemas antioxidantes, o que causa estresse oxidativo intra e extracelular e induz à instabilidade da membrana das hemácias, contribuindo para o aumento da hemólise intravascular (WALTER *et al.*, 2006). Estratégias terapêuticas antioxidantes constituem-se como uma forma de controle do estresse oxidativo que ocorre na DF, reduzindo os eventos fisiopatológicos da doença (SILVA *et al.*, 2013).

Micronutrientes antioxidantes podem atuar como co-fatores enzimáticos, neutralizando o efeito dos radicais livres reduzindo sua ação deletéria (FANG; YANG; WU, 2002). No entanto, com frequência, os indivíduos com DF apresentam deficiência destes micronutrientes

(BEHERA *et al.*, 2012; CLASTER *et al.*, 2009; HASANATO, 2006; NATTA; MACHLIN; BRIN, 1980; NATTA; CHEN; CHOW, 1990; PRASAD *et al.*, 1975; RAY *et al.*, 2007) o que pode ocasionar maior peroxidação lipídica, e, conseqüentemente, maior hemólise nestes indivíduos.

Sendo assim, é importante investigar a relação de micronutrientes antioxidantes com a hemólise a fim de ampliar o cuidado nutricional, incluindo-se novas condutas nutricionais que podem levar à melhora do quadro clínico e qualidade de vida dos indivíduos com DF. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre as concentrações dos micronutrientes antioxidantes selecionados (retinol, tocoferol, selênio e zinco) com indicadores de hemólise em adultos com DF.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Doença falciforme

A DF é um grupo de hemoglobinopatias, onde há uma alteração genética causada pela substituição de valina por ácido glutâmico na posição 6 na cadeia β da hemoglobina (KATO *et al.*, 2018). Essa mutação gera uma variante estrutural da HbA (DAAK *et al.*, 2016), resultando na formação de HbS que polimeriza em condições de baixa saturação de oxigênio (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). Esta alteração molecular predispõe as hemácias a adquirirem uma conformação em forma de foice (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

O termo DF é utilizado para se referir aos diversos tipos de genótipos, como hemoglobinopatias C, D, E e as talassemias (HbS β -talassemia e HbS β^0 -talassemia), enquanto que AF refere-se à homozigose para o alelo β^S , sendo a forma mais comum da doença (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

O principal determinante da gravidade da DF é a taxa e a extensão de polimerização da HbS, provocando os dois principais processos fisiopatológicos da doença: a vaso-oclusão e a anemia hemolítica (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Sendo assim, os genótipos com maior gravidade são os que possuem a HbS em maior concentração, sendo eles em ordem decrescente: anemia falciforme (HbSS), HbS β -talassemia, HbSC e HbSD (PIEL; STEINBERG; REES, 2017).

A vaso-oclusão é resultado da interação entre as hemácias contendo a HbS polimerizada no endotélio vascular, gerando oclusão na microcirculação e isquemia, seguido por restauração do fluxo sanguíneo, o que promove lesão tecidual mediada por reperfusão. Estes ciclos de isquemia e de reperfusão resultam em hemólise, disfunção endotelial, inflamação, hipercoagulabilidade e estresse oxidativo (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). As principais complicações associadas à vaso-oclusão são as crises álgicas, síndrome torácica aguda, osteonecrose e disfunção renal (KATO *et al.*, 2018).

A hemólise é o segundo processo fisiopatológico, que também é impulsionado pela polimerização da HbS. As principais complicações que estão relacionadas com o aumento da hemólise intravascular são colelitíase, úlceras de perna, priapismo e hipertensão pulmonar (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007). Além disso, há evidências de que a hemólise contribui para o desenvolvimento da disfunção endotelial, conseqüentemente para a vasculopatia progressiva (REITER *et al.*, 2002).

1.2 Epidemiologia

A AF foi reconhecida pela Organização das Nações Unidas (ONU) e Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema de saúde pública mundial (WHO AFRICA, 2011; UNITED NATIONS, 2014).

Estima-se que em 2010 nasceram no mundo aproximadamente 312 mil crianças homocigotas SS, e aproximadamente 5 milhões de crianças com heterocigose AS (PIEL *et al.*, 2013). A prevalência da DF é maior na África subsaariana, afetando mais de 230 mil crianças nascidas nesta região por ano (PIEL *et al.*, 2013). Em comparação, estima-se aproximadamente 13 mil recém-nascidos para as Américas e mais de 8 mil casos na Eurásia (PIEL *et al.*, 2013).

No Brasil, em 2016, foram diagnosticados aproximadamente mil recém-nascidos com DF e mais de 60 mil heterocigotos para HbS, segundo o último relatório do Programa de Triagem Neonatal (PTN), do Ministério da Saúde (informação verbal)¹. No Brasil, ainda há dificuldade para organização desses dados, pois a cobertura populacional total do PTN é muitas vezes dificultada por problemas socioeconômicos e culturais, falta de informação quanto à importância da triagem e dificuldade dos pais em levar seus filhos para a realização dos exames agendados (RODRIGUES *et al.*, 2010).

A distribuição global da HbS ocorre devido a dois fatores: seleção natural de portadores da HbS através de sua sobrevivência em regiões endêmicas de malária, e sua subsequente migração. A evidência de que a malária está relacionada a esta alteração genética foi sugerida pela primeira vez há mais de 60 anos (ALLISON, 1954). Sabe-se que os portadores da HbS possuem uma proteção contra as formas mais graves de malária provocadas pelo *Plasmodium falciparum*, que se dá através de mecanismos bioquímicos e imunológicos (MAY *et al.*, 2007).

1.3 Tratamento

O tratamento da DF baseia-se na assistência e nos cuidados dos quadros agudos e na diminuição da progressão da doença. Em casos agudos são adotadas medidas para alívio dos quadros álgicos, como hidratação intravenosa e oral, uso de medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos (BALLAS *et al.*, 2010).

Outra droga atualmente empregada no tratamento das pessoas com anemia falciforme é a hidroxiuréia, um quimioterápico capaz de induzir a produção de hemoglobina fetal (HbF), a qual

¹ Dados fornecidos via *email* pela consultora técnica do Programa Nacional de Triagem Neonatal, Paula Juliana AntoniazcoZamaro, no dia 16/03/2018 às 11:05.

não sofre o processo de falcização, ou seja, permite que haja diminuição na proporção de hemácias falciformes circulantes no sangue, diminuindo assim as crises algicas recorrentes e outros sintomas da doença (BANDEIRA *et al.*, 2004). A administração deste medicamento também reduz a expressão de moléculas de adesão (COVAS *et al.*, 2004), evitando a agregação de células e, conseqüentemente, as crises vaso-oclusivas. O uso é indicado a partir de dois anos de idade, para pessoas com histórico de três ou mais episódios de crises vaso-oclusivas com atendimento médico ou quadros clínicos graves como crise torácica aguda, acidentes vasculares encefálicos, priapismo freqüente e anemia persistente nos últimos 12 meses (BRASIL, 2014).

Devido aos eventos vaso-oclusivos e hemolíticos que ocorrem nos indivíduos com a doença, a terapia de transfusão sanguínea é, muitas vezes, o tratamento mais indicado. A transfusões podem ser realizadas com o objetivo de tratar os quadros agudos e também na prevenção de complicações ou na progressão da doença (JOSEPHSON *et al.*, 2007), como, por exemplo, em casos de acidente vascular cerebral, como mostrado nos estudos STOP 1 e STOP 2 (*Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*), realizados em 1998 e 2005, respectivamente (ADAMS, 1998; ADAMS; BRAMBILLA, 2005).

Embora seja de extrema importância em alguns casos, a terapia crônica de transfusão pode conduzir à sobrecarga de ferro nos pacientes, visto que cada unidade de sangue transfundido contém cerca de 200-250 mg deste mineral (HANKINS *et al.*, 2009; INATI *et al.*, 2011) e, fisiologicamente, o organismo não é capaz de controlar a sua eliminação (CANÇADO; JESUS, 2007). Nestes casos, em que o indivíduo apresenta sobrecarga de ferro, faz-se uso dos medicamentos quelantes (como deferasirox, deferrioxamine e deferiprone) que, ao formar um complexo insolúvel, evitam que o ferro excedente seja absorvido e armazenado (ALLALI *et al.*, 2017).

1.4 Hemólise

A hemoglobina é a principal fonte de ERO nas hemácias (RIFKIND; NAGABABU, 2013). A auto-oxidação da hemoglobina (ferro no estado ferroso Fe^{+2}) em metahemoglobina (ferro⁺³) resulta em produção intracelular contínua de íons superóxidos, que são rapidamente convertidos em peróxido de hidrogênio (MISRA; FRIDOVICH, 1972). O peróxido de hidrogênio, ao reagir com o íon superóxido, gera o radical hidroxil (OH^\bullet), através da reação de Fenton na presença de ferro (HABER; WEISS, 1934; AUST; MOREHOUSE; THOMAS, 1985).

O processo de envelhecimento das hemácias está relacionado com a exposição às ERO, que promovem a oxidação de moléculas e modulação da atividade de fatores de transcrição e canais de membranas (LEONARD; HARRIS; SHI, 2004). Uma maior exposição às ERO gera ativação da caspase-3 e alteração na homeostase de íons intracelulares (Ca^{+2} , K^{+} e Cl^{-}) afetando as proteínas citosólicas e do citoesqueleto das hemácias, comprometendo assim, a estrutura da membrana celular (MANDAL *et al.*, 2003).

O comprometimento da membrana celular é acompanhado pela exposição de fosfatidilserina em sua superfície, levando à remoção das hemácias da corrente sanguínea pelos macrófagos (MANDAL *et al.*, 2005). Este processo é conhecido como eriptose, ou seja, a morte programada da hemácia, que pode ocorrer devido ao envelhecimento ou por algum dano (LANG *et al.*, 2015). Fisiologicamente, a eriptose é considerada uma medida preventiva pelo organismo para reduzir a ocorrência de hemólise prematura das hemácias danificadas, evitando assim o aumento de hemoglobina livre, e conseqüentemente maiores danos oxidativos (QADRI *et al.*, 2017). Evidências sugerem que a eriptose pode servir como um importante mecanismo de defesa contra a hemólise na DF (LANG ET AL., 2015).

O termo ferroptose também tem sido descrito na literatura (STOCKWELL *et al.*, 2017). A ferroptose é a morte celular induzida pelo acúmulo de ferro, levando à depleção da glutatona e à inativação da glutatona peroxidase 4 (STOCKWELL *et al.*, 2017). Dessa forma, ocorre maior peroxidação lipídica e acúmulo de produtos lipídicos tóxicos, o que causa morte celular (STOCKWELL *et al.*, 2017). Esse processo pode estar associado a situações de sobrecarga de ferro na DF, mas ainda não é descrito na literatura.

Em situações com capacidade antioxidante reduzida e maior estresse oxidativo, a lesão das hemácias é tão extensa que não serão removidas pelo mecanismo de eriptose, e sim ocorrerá hemólise, com conseqüente extravazamento de hemoglobina, heme e ferro na circulação sanguínea (VAN ZWIETEN; VERHOEVEN; ROOS, 2014).

A hemólise é um dos principais processos fisiopatológicos na DF (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007), e está relacionada com o aumento do estresse oxidativo que ocorre na doença (ALAYASH, 2017). A liberação do conteúdo intracelular da hemácia (hemoglobina, ferro e heme) aumenta o processo de dano oxidativo, tendo em vista a ação pró-oxidante dessas moléculas (VOSKOU *et al.*, 2015).

Nas hemácias falciformes a auto-oxidação da hemoglobina é mais acentuada, devido à maior instabilidade da HbS, produzindo duas vezes mais ERO, e conseqüentemente promovendo maior peroxidação lipídica das membranas das hemácias (ASLAN; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

Durante a hemólise, há liberação de hemoglobina, que se liga à haptoglobina. A hemoglobina ao sofrer oxidação, libera heme no plasma, que normalmente liga-se à hemopexina (ROTHER *et al.*, 2005). Em condições normais, esses complexos são removidos da circulação para os macrófagos e parênquima hepático, onde serão degradados (ROTHER *et al.*, 2005). No entanto, em situações de hemólise intravascular exacerbada, como ocorre na DF, esses mecanismos protetores tornam-se sobrecarregados e depletados (ROTHER *et al.*, 2005), gerando um acúmulo de hemoglobina e heme livres no plasma, promovendo danos vasculares, hepáticos, renais e esplênicos (SCHAER *et al.*, 2013).

O aumento da hemólise e de ERO, promovem redução na biodisponibilidade do ON, um potente vasodilatador importante na homeostase vascular, resultando assim em disfunção endotelial e vasoconstrição. A depleção de ON ocorre devido ao aumento de radical superóxido (O_2^{\bullet}) e dos produtos da hemólise (arginase e heme livre); e pela não ativação da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (CHIRICO; PIALOUX, 2012). Na DF, o aumento exacerbado do íon superóxido, reage com o ON, resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso radical livre altamente reativo, que posteriormente pode formar dois potentes oxidantes, o OH^{\bullet} e dióxido de nitrogênio (NO_2) (CHIRICO; PIALOUX, 2012).

1.5 Vaso-oclusão e lesão de isquemia-reperfusão

A interação de leucócitos, endotélio vascular e hemácias falcizadas com sua estrutura rígida, promovem vaso-oclusão na microcirculação (KALAMBUR *et al.*, 2004), resultando em maior infarto tecidual, hemólise e inflamação, nos indivíduos com DF (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

A disfunção endotelial e obstrução vascular pode ser modulada por fatores como redução do ON, hemólise, aumento das ERO e inflamação (ASLAN; FREEMAN, 2007). A aderência das hemácias nas células endoteliais está relacionada com o aumento de moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular-vascular-1 (do inglês: *Vascular cell adhesion protein-1*, VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (do inglês: *Intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), E-selectina e P-selectina, que estão superexpressas na DF (WOOD *et al.*, 2006).

A vaso-oclusão provoca isquemia tecidual na microcirculação, no entanto, eventualmente o fluxo sanguíneo é reestabelecido, levando à lesão de reperfusão. Após a situação de hipóxia, o aumento das concentrações de oxigênio na fase de reperfusão sanguínea,

gera maiores concentrações de radicais livres, e consequentemente maior dano oxidativo (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

1.6 Inflamação na doença falciforme

A DF é reconhecida como uma doença inflamatória crônica. A liberação de ferro, grupo heme na circulação sanguínea e a formação de ERO provenientes da hemólise, promovem inflamação vascular (VOSKOU *et al.*, 2015).

A molécula de heme livre e outros produtos da hemólise intravascular são liberados após a oxidação da hemoglobina extracelular. O heme livre é um importante mediador da inflamação e da lesão vascular na DF (ROUMENINA *et al.*, 2016; SOARES; BOZZA, 2016), pois parece ativar o sistema imune inato através da sinalização do receptor do tipo *Toll4* (do inglês: *toll like receptor-4*, TLR4), produzindo citocinas e outros mediadores que aumentam a expressão de moléculas de adesão (BELCHER *et al.*, 2014).

A hemólise também atua inibindo a formação de ON, que além de ser um importante vasodilatador, é também antagonista da inflamação. O ON atua inibindo a ativação do fator nuclear kappaB (do inglês: *factor nuclear kappa B*, NFκB) (ABRAHAM, 2000), consequentemente reduzindo a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, como VCAM-1, ICAM-1, P-selectina e E-selectina (DE CATERINA *et al.*, 1995).

A ativação do NFκB e da proteína ativadora-1 (do inglês: *Activator protein 1*, AP-1) aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (do inglês: *tumor necrosis factor- α* , TNF α) e moléculas de adesão no endotélio, aumentando a adesão de hemácias, leucócitos e plaquetas ao endotélio, resultando em disfunção endotelial (WAGENER *et al.*, 1997).

A inflamação e o estresse oxidativo são processos fisiopatológicos com relação interdependente (BISWAS, 2016). Durante o processo inflamatório, as citocinas pró-inflamatórias geram ERO, enquanto que o recrutamento e a adesão dos leucócitos ao endotélio promovem um efeito adicional, aumentando o estresse oxidativo.

Assim como o processo inflamatório pode induzir ao estresse oxidativo, o inverso também ocorre (BISWAS, 2016). O estresse oxidativo intracelular está relacionado com a ativação do NFκB, resultando em expressão de genes pró-inflamatórios (FLOHÉ *et al.*, 1997). Além disso, o aumento do estresse oxidativo ativa o receptor tipo *NLR3* (do inglês: *NLR family pyrin domain-containing 3*, NLRP3), estimulando citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18) (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Diversos marcadores de inflamação estão elevados na DF, como a proteína C reativa (PCR), que é o mais amplamente usado para avaliar a inflamação crônica e aguda na DF (REES; GIBSON, 2012). Dentre os outros marcadores utilizados estão as interleucinas, como a IL-1 β e IL-6, que são pró-inflamatórias e estão aumentadas na DF (REES; GIBSON, 2012).

1.7 Desequilíbrio oxidativo na doença falciforme

Uma das fontes pró-oxidantes mais importantes na DF são as hemácias contendo a HbS. A acelerada auto-oxidação da HbS, aumenta os processos pró-oxidativos intracelulares, resultando em maior produção de íons superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, quando comparadas com hemácias contendo HbA (ASLAN, M; THORNLEY-BROWN; FREEMAN, 2000).

A HbS é uma molécula instável que sofre repetidos processos de polimerização e despolimerização, causando aumento na produção de ERO (HEBBEL *et al.*, 1988). A polimerização transforma as hemácias normais em uma célula densa e inflexível, aumentando a ocorrência de hemólise na DF (BUNN *et al.*, 1982). Essa contínua hemólise intravascular aumenta os níveis plasmáticos de hemoglobina livre, uma potente fonte de ERO (RIFKIND; MOHANTY; NAGABABU, 2015).

A hemoglobina livre na circulação sanguínea sofre auto-oxidação e transforma-se em metahemoglobina, reação que também produz o radical superóxido. O superóxido reage espontaneamente com o oxigênio molecular (O₂) e peróxido de hidrogênio, que pode então reagir com o ferro⁺² ou ferro⁺³ dentro da hemoglobina, produzindo assim a forma ferril (hemoglobina com ferro⁺⁴). Esta molécula, ao reagir com o peróxido de hidrogênio, resulta em degradação da molécula de heme, consequentemente liberando produtos de degradação do heme e ferro livre (RIFKIND *et al.*, 2004; NAGABABU *et al.*, 2008). A formação destes produtos a partir da hemólise aumenta o processo pró-oxidante na DF.

O repetido processo de polimerização da hemoglobina pode levar a um processo cíclico, que incia-se com aumento das moléculas de adesão, vaso-oclusão, e lesão de isquemia-reperfusão, aumentando o processo de falcização das hemácias e provocando hemólise (CHIRICO; PIALOUX, 2012). Essas manifestações promovem um aumento do estresse oxidativo na DF, resultando em consumo excessivo de antioxidantes, e consequentemente deficiência destes (CHAVES; LEONART; DO NASCIMENTO, 2008).

1.8 Sistema de defesa antioxidante

O sistema de defesa antioxidante atua de forma a minimizar os efeitos deletérios causados pelas ERO. Pode ser classificado como enzimático e não enzimático. Dentre as enzimas antioxidantes estão: a superóxido dismutase (SOD), que cataliza a dismutação do ânion superóxido à peróxido de hidrogênio; a catalase (CAT) que atua na decomposição de peróxido de hidrogênio a oxigênio molecular e água; a glutatona peroxidase (GPX), que age sobre íons peróxidos, utilizando a glutatona como co-fator; a glutatona redutase, responsável por manter a glutatona em sua forma reduzida; e o sistema antioxidante tireodoxina (Trx), que atua na reparação de danos em proteínas e DNA (ÇIMEN, 2008).

O sistema antioxidante não enzimático é formado por antioxidantes hidrofílicos, como urato, ascorbato, glutatona e flavonóides; e lipofílicos como tocoferol, carotenóides e ubiquinol (HE *et al.*, 2017). As vitaminas e minerais participam como co-enzimas ou co-fatores de enzimas antioxidantes, neutralizando reações oxidativas em cadeia (HE *et al.*, 2017). Esses micronutrientes são essenciais ao organismo, ou seja, devem ser obtidos exclusivamente pela dieta. exclusivamente pela dieta.

Dentre as fontes dietéticas dos micronutrientes antioxidantes, a vitamina A (retinol) pode ser encontrada em alimentos de origem animal (bife de fígado, ovos, leites e derivados). Nos alimentos de origem vegetal, como aqueles de coloração amarelo-laranja (mamão, manga, cenoura) e folhosos verdes-escuros (espinafre, couve, acelga), alguns carotenóides podem ser bioconvertidos em retinol pelo fígado humano (JEE *et al.*, 2006). A vitamina E tem como principais fontes, os óleos vegetais, cereais integrais e sementes (JIANG *et al.*, 2014). O selênio pode ser encontrado em maior concentração na castanha-do-pará, mas também em cogumelos, frutos do mar, leveduras e algumas crucíferas (mostarda, repolho, brócolis e couveflor) (RAYMAN, 2012). Em relação ao zinco, as principais fontes são alimentos protéicos, como ostras, caramarão, carnes bovina, de frango e de peixe, como também castanhas e grãos integrais (GAMMOH *et al.*, 2017).

A vitamina A pode ligar-se diretamente a radicais peroxil antes de propagarem a peroxidação lipídica (JEE *et al.*, 2006). O ubiquinol ou coenzima-Q-10 pode neutralizar o efeito oxidante do radical peroxil sobre os lipídios, além de regenerar a vitamina E (FAN *et al.*, 2017). A vitamina C atua ligando-se ao radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, e espécies reativas de nitrogênio (BARROS *et al.*, 2011). A vitamina E possui 8 isômeros, que atuam impedindo a peroxidação lipídica, através da doação de seu hidrogênio fenólico ao radical hidroxil, formando radicais não reativos e incapazes de continuar a reação oxidativa em cadeia (TRABER; ATKINSON, 2007). Além disso, a vitamina E também atua regenerando a vitamina C, sustentando seu papel antioxidante (HE *et al.*, 2017).

Dentre os minerais com função antioxidante estão o selênio e o zinco (HE *et al.*, 2017) por serem cofatores enzimáticos (TABASSUM; BRISTOW; VENKATESWARAN, 2010). O zinco é componente estrutural da SOD, induz a produção de metalotioneína que se liga ao radical hidroxil, e além disso, possui efeito antioxidante e anti-inflamatório por inibir tanto o TNF α , como a ativação do NF κ B (PRASAD *et al.*, 2004).

O selênio tem sua atividade biológica na forma do 21º aminoácido, a selenocisteína, sendo incorporada diretamente nas proteínas (GONZALEZ-FLORES *et al.*, 2013; HOFFMANN; BERRY, 2015). As selenoproteínas atuam na defesa antioxidante através da regulação da atividade de peroxidases e redutases, sinalização redox, síntese de selenocisteína e transporte de selênio (GONZALEZ-FLORES *et al.*, 2013; HOFFMANN; BERRY, 2015). O selênio é o principal componente de enzimas antioxidantes, como a GPX, que cataliza a redução do peróxido de hidrogênio a moléculas de água, impedindo o dano às membranas fosfolípídicas, mantendo sua integridade (HOFFMANN; BERRY, 2015; GONZALEZ-FLORES *et al.*, 2013). Além disso, também compõe enzimas antioxidantes como TrxR, deiodinases e outras selenoproteínas (RAYMAN, 2000; RAYMAN, 2012).

A importância do selênio também tem sido descrita no processo de ferroptose, onde ocorre morte celular programada em situações de sobrecarga de ferro (ANGELI; CONRAD, 2018). O selênio impede que a glutatona peroxidase 4 sofra inativação, estando assim relacionado com a homeostase celular, através da supressão da ferroptose na sobrecarga de ferro (ANGELI; CONRAD, 2018).

Na DF a capacidade antioxidante está reduzida (REN *et al.*, 2008) e as hemácias são prejudicadas pelo aumento das concentrações extracelulares de hemoglobina, grupamento heme e ferro livres, decorrente da hemólise. Consequentemente, o aumento da formação de ERO extracelular desencadeia danos vasculares, danos às proteínas e aos ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana da hemácia (KANIAS; ACKER, 2010).

1.9 Micronutrientes antioxidantes na doença falciforme

O exacerbado estresse oxidativo presente na DF contribui para o desequilíbrio de algumas vitaminas e minerais que desempenham um papel importante no sistema de defesa antioxidante (CHAVES; LEONART; DO NASCIMENTO, 2008).

Estudos observaram concentrações séricas reduzidas de retinol, de tocoferol, de ácido ascórbico, de selênio e de zinco em pacientes com DF (BEHERA *et al.*, 2012; CLASTER *et*

al., 2009; HASANATO, 2006; NATTA; MACHLIN; BRIN, 1980; NATTA; CHEN; CHOW, 1990; PRASAD *et al.*, 1975; RAY *et al.*, 2007).

Um estudo *in vitro* observou que o tratamento de hemácias HbS com vitamina E e vitamina C foi responsável pela redução de hemólise, sendo a vitamina E mais efetiva para o controle deste evento (CHAVES; LEONART; DO NASCIMENTO, 2008). Um estudo com suplementação de vitamina E em humanos com DF observou a redução da peroxidação lipídica e aumento da resistência das hemácias à hemólise (JAJA *et al.*, 2015). A suplementação de vitamina C inibiu a formação de hemácias densas e reduziu a peroxidação lipídica em indivíduos com DF (MARANGON *et al.*, 1999).

Em relação à vitamina A, os baixos níveis séricos de retinol em pacientes com AF associaram-se a menores concentrações de hemácias, hemoglobina, contagem de reticulócitos, e maior percentual de falcização, o que pode contribuir para o agravamento das manifestações clínicas na doença (BEHERA *et al.*, 2012).

A redução das concentrações de zinco na DF está relacionada com o prejuízo do sistema imune e aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α (PRASAD *et al.*, 1975). Um estudo com suplementação de zinco em indivíduos com DF observou a redução do estresse oxidativo, incidência de infecção e de citocinas pró-inflamatórias (BAO *et al.*, 2008).

Em relação ao selênio, somente um estudo observou que as concentrações de selênio em indivíduos com AF estão reduzidas, o que está relacionado com a redução da atividade da enzima GPX na DF, reduzindo a capacidade antioxidante e aumentando o estresse oxidativo (NATTA; CHEN; CHOW, 1990). Outro estudo avaliou as concentrações de selênio e vitamina E com marcadores de hemólise (reticulócitos e lactato desidrogenase) em crianças dependentes de transfusão sanguínea com diagnóstico de DF e β -talassemia, no entanto não foi encontrada correlação significativa (HAMDY *et al.*, 2014).

Apesar do conhecido papel antioxidante do selênio e que sua atuação pode reduzir o estresse oxidativo nas hemácias, ainda há uma lacuna na literatura sobre os efeitos do selênio na hemólise em indivíduos com DF. Um estudo com camundongos saudáveis alimentados com três tipos de dieta de selênio (adequada, suplementada ou deficiente em selênio) observou que os animais que receberam dieta deficiente deste mineral, apresentaram um aumento dos produtos de peroxidação lipídica e maior susceptibilidade das hemácias à hemólise (KAUSHAL *et al.*, 2011). Além disso, esse estudo observou que a adequação do selênio atenuou o estresse oxidativo nas hemácias através da modulação do fator de transcrição *Forkhead box O3* (do inglês: *Fork head transcription factor box O3a*, FoxO3a) e do fator de transcrição 1-alfa induzível por hipóxia (do inglês: *hypoxia-inducible factor 1 α* , HIF-1 α), durante a

eritropoiese(KAUSHAL *et al.*, 2011). Além disso, a selenoproteína W demonstrou influência no desenvolvimento eritróide em múltiplos estágios em camundongos, além de atuar no controle do estresse oxidativo que ocorre neste processo, promovendo assim, uma maturação adequada destas células, reforçando o papel do selênio na eritropoiese (LIAO *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A hemólise crônica é desencadeadora do estresse oxidativo e da inflamação na DF. De forma cíclica, estes eventos contribuem para o agravamento da hemólise.

As vitaminas A e E, o selênio e o zinco participam do sistema de defesa antioxidante celular, incluindo as hemácias. Ainda não é clara a relação entre o estado nutricional destes micronutrientes com a hemólise em indivíduos com DF. É possível que a deficiência desses micronutrientes contribua para exacerbar o desequilíbrio oxidativo e inflamação, aumentando a susceptibilidade das hemácias à hemólise.

Sendo assim, é importante investigar a relação de micronutrientes antioxidantes com a hemólise a fim de que se possa ampliar o cuidado nutricional, incluindo-se novas condutas nutricionais que podem levar a melhora do quadro clínico e qualidade de vida dos indivíduos com DF.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a relação entre as concentrações dos micronutrientes antioxidantes (retinol, tocoferol, selênio e zinco) com indicadores de hemólise em indivíduos adultos com DF.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência de deficiência dos micronutrientes dentre os indivíduos estudados;
- Avaliar as concentrações séricas dos micronutrientes antioxidantes retinol, tocoferol, selênio e zinco nos indivíduos com DF;
- Avaliar os marcadores de inflamação e sua relação com a hemólise nos indivíduos com DF.
- Avaliar o consumo dietético dos nutrientes antioxidantes nos pacientes adultos com DF.

4 RESULTADOS: ARTIGO: SELENIUM STATUS AND HEMOLYSIS IN SICKLE CELL DISEASE PATIENTS

Selenium status and hemolysis in sickle cell disease patients

Emília Delesderrier¹, Cláudia S. Cople-Rodrigues¹, Juliana Omena¹, Marcos Kneip Fleury², Flávia Barbosa Brito¹, Adriana Costa Bacelo³, Josely Correa Koury¹ and Marta Citelli^{1,*}

¹ Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³ Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil

* Correspondence: martacitelli@gmail.com (M. Citelli); Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 20550-900, Rio de Janeiro, Brazil

E-mail addresses: emiliadeles@gmail.com (E. Delesderrier), claudiacople@gmail.com (C. Cople-Rodrigues), omenaju@gmail.com (J. Omena), marcos.fleury@yahoo.com.br (M. K. Fleury), barbosafllavia@bol.com.br (F. B. Brito), adriacelo@gmail.com (A. C. Bacelo), jckoury@gmail.com (J. C. Koury), martacitelli@gmail.com (M. Citelli). Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Sickle cell disease (SCD) is a genetic hemoglobinopathy characterized by chronic hemolysis. Chronic hemolysis is promoted by increased oxidative stress. Our hypothesis was that some antioxidant micronutrients (retinol, tocopherol, selenium, and zinc) would be determinant factors of the degree of hemolysis in SCD patients. We aimed to investigate the nutritional adequacy of these antioxidants and their relationships to hemolysis. The study included 51 adult SCD patients regularly assisted in two reference centers for hematology in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Serum concentrations of retinol, alpha-tocopherol, selenium, and zinc were determined by high-performance liquid chromatography or atomic absorption spectrometry. Hematological parameters (complete blood count, reticulocyte count, hemoglobin, direct and indirect bilirubin, total bilirubin, lactate dehydrogenase) and inflammation (leukocytes and ultra-sensitive C-reactive protein) markers were analyzed. Linear regression model was used to test the associations between the variables. Most patients presented selenium deficiency and consumption. Linear regression analysis showed that selenium is the main determinant of hemolysis among the antioxidant nutrients analyzed. Thus, data from this study suggest that the nutritional care protocols for patients with SCD should include dietary sources of selenium in order to reduce the risk of hemolysis.

Keywords: selenium; sickle cell disease; human; hemolysis; antioxidant micronutrients

4.1 Introduction

Sickle cell disease (SCD) is a hereditary disorder caused by a mutation in the gene encoding the β -hemoglobin subunit (β -Hb), giving rise to the hemoglobin S (HbS) [1]. Under low oxygen concentrations, HbS loses oxygen (deoxy-HbS), changes its globular structure, and forms polymers. This also leads to alterations in the discoid morphology of erythrocytes, which

assume a sickled shape and become more rigid and more susceptible to hemolysis [2]. HbSS and HbSC are the most common genotypes in SCD. HbC is another single mutation/amino acid change at the same position in β -Hb, but with lysine replacing glutamic acid. Therefore, HbSC genotype consists by the simultaneous occurrence of mutations (Glu6 \rightarrow Val; HbS) and (Glu6 \rightarrow Lys; HbC) in each of the alleles of the gene encoding the β -Hb. The homozygous HbSS genotype is the most severe form of SCD and is named as sickle cell anemia (SCA).

Chronic hemolysis is one of the pathophysiological features of SCD, which reduces erythrocyte lifespan by approximately 70% [3]. This process is related to increased oxidative stress in SCD [4]. HbS instability and auto-oxidation reaction contribute to overproduction of intracellular reactive oxygen species (ROS), such as the hydroxyl radical (OH \bullet), generated by the Fenton reaction [5,6]. In addition, the release of heme, hemoglobin and iron in plasma due to hemolysis triggers a ROS increase in the extracellular environment. The presence of iron and heme in plasma potentiates the Fenton reaction, damaging proteins and polyunsaturated lipids, culminating in instability of the erythrocyte membrane [7]. This process is cyclical and depletes the antioxidant systems, ultimately leading to oxidative stress [4].

Some nutrients such as vitamins A, C, E, selenium, and zinc play an important role in the antioxidant defense system to minimize the deleterious effects of ROS [8]. Vitamin A acts by inhibiting the spread of lipid peroxidation and low serum vitamin A was shown to be associated with increased oxidative stress products and smaller concentrations of reduced glutathione [9]. Vitamin E prevents lipid peroxidation by hindering continuous oxidative chain reactions in membranes and lipoproteins [10], and regenerates vitamin C, preserving its antioxidant role [8]. Zinc is a cofactor of the superoxide dismutase (SOD) enzyme. It inhibits the NADPH oxidase enzyme, helps stabilize sulfhydryl proteins and antagonizes redox-active metals, such as copper and iron, which catalyze the formation of free radicals through the Fenton reaction [11]. Selenium is present at the active site of glutathione peroxidase (GPx) [12] as a constituent of the amino acid selenocysteine. It maintains the activity of this antioxidant enzyme, protecting hemoglobin against oxidation inside erythrocytes, making them less susceptible to hemolysis [13]. Additionally, selenium plays an important role during erythropoiesis, in which selenoproteins influence the multiple stages of erythroid development, in addition to controlling the oxidative stress that occurs during this process, thus promoting adequate cell maturation [14].

Considering the abovementioned functions, it is plausible that the adequate nutritional status of these micronutrients may protect erythrocytes from hemolysis, particularly in older adults [15,16], whose antioxidant defense is commonly depleted. Life expectancy of individuals with SCA has increased and, in Brazil, the current estimate is 53.3 years of life [17]. Possibly,

for this reason, this population is poorly studied. Conversely, their deficiency may contribute to increased oxidative stress and erythrocyte susceptibility to hemolysis. For this reason, we hypothesized that some antioxidant micronutrients (retinol, tocopherol, selenium, and zinc) would determine the degree of hemolysis in SCD adult patients. Therefore, we aimed to investigate the nutritional adequacy of these antioxidants and their relationships to hemolysis. The results may support the development of a better nutritional management for SCD patients, which may improve their clinical status.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Participants

This study was conducted from 2012 to 2014 and involved 51 adult SCD patients who met the following criteria: age \geq 40 years old (both sexes); presence of the HbSS and HbSC genotypes; absence of chronic use of immunosuppressive drugs, barbiturates, corticosteroids, and thyroid hormone replacement; no diagnosis of liver disease; no use of vitamin and/or mineral supplements during the last 60 days (except for folic acid); no addiction to narcotics and alcohol; absence of any cognitive impairment that could prevent the collection of the requested information. Patients who had been hospitalized and/or those who received blood transfusions 15 days prior to blood collection were not included in this study.

4.2.2 Blood collection

Whole blood was collected after 8-10 hours of fasting in tubes containing the anticoagulant agent ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), clot activator gel, or mineral-free tubes to analyze trace elements. All biochemical and laboratory analyses were performed at the Clinical Analysis Laboratory of the School of Pharmacy (LACFAR), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ).

4.2.3 Hematological parameters and hemolysis markers

The hematological parameters assessed were complete blood count, reticulocyte count (RET), hemoglobin (fetal hemoglobin (HbF) and HbS) level, serum concentrations of direct bilirubin (DB), total bilirubin (TB), indirect bilirubin (IB) and lactate dehydrogenase (LDH). The complete blood count was performed using the Horiba Pentra 60 C+ analyzer (HORIBA ABX SAS, ABX Pentra 60, São Paulo, Brazil). Reticulocytes were analyzed using the brilliant

cresyl blue staining technique. Serum DB and TB were analyzed using a colorimetric method (Labtest, LabmaxPlenno, Belo Horizonte, MG, Brazil). IB was estimated by calculation, from the subtraction of the value of DB from that found in TB. Serum LDH concentration was analyzed using the continuous ultraviolet kinetics method (Labtest, LabmaxPlenno, Belo Horizonte, MG, Brazil). Hemoglobin variants and quantifications were analyzed using cation-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC), by using the VARIANT II Hemoglobin Testing System (VARIANT®, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) [18]. Each hemoglobin variant has its characteristic retention time, in which common variants have been observed to elute using the Variant short program.

4.2.4 Inflammatory markers

Serum ultra-sensitive C-reactive protein (us-CRP) concentration was analyzed by nephelometry (Labtest, LabmaxPlenno, Belo Horizonte, MG, Brazil) and the leukocyte counting was performed using the Horiba Pentra 60 C+ analyzer (HORIBA ABX SAS, ABX Pentra 60, São Paulo, Brazil).

4.2.5 Antioxidant micronutrients

HPLC (Agilent Technologies Brazil Ltda., Agilent 1290 UHPLC System, São Paulo, Brazil) was used for retinol and α -tocopherol serum concentrations analysis. A silica column measuring 5mm, 15cm x 6mm (Shim-Pack, Shimadzu) was used in the chromatographic phase. The mobile phase consisted of 99:1 hexane/isopropanol, an isocratic elution system, and a flow of 1.8 mL/min. A UV–Vis detector (Waters 996, Eschborn, Germany) was used to detect peak and spectrum characterization. It was operated at 325 nm (retinol) and 295 nm (α -tocopherol). Standard curves were generated with external standards for retinol and α -tocopherol (Sigma-Aldrich, Germany). Serum concentrations of selenium and zinc were analyzed using atomic absorption spectrometry (Agilent, AA 240/280 Series Spectrometer, São Paulo, Brazil).

4.2.6 Cut-off values to determine micronutrient deficiency

The cut-off values used to determine antioxidant micronutrient deficiency were <0.35 $\mu\text{mol/L}$ for retinol [19], $< 5\mu\text{g/mL}$ for α -tocopherol [20], $< 80\mu\text{g/dL}$ for selenium [21], and $<70\mu\text{g/dL}$ for zinc [21].

4.2.7 Food consumption

Adequacy of vitamin A, E, zinc and selenium intake was determined according to dietary reference intake (DRI) [22]. Participants provided detailed dietary intake information for two 24-h periods spaced at least 10 days apart. Accurate descriptions and portion sizes of foods consumed were facilitated through use of food pictures and diagrams. Each participant's usual intake was obtained through averaging the two 24-hr dietary intakes. All 24-hr recalls were administered in person. The diet analysis program DietWin® Professional Plus (DietWin, Porto Alegre, Brazil, 2015) was used to determine intake of food group portions and specific nutrients.

4.2.8 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for Social Science software (IBM SPSS® Inc., version 22.0, Chicago, IL, USA). The distribution of continuous variables was analyzed using the Shapiro-Wilk test. Data were described as median, minimum and maximum values, and 25th to 75th percentile due to the asymmetric distribution of the variables.

The backward linear regression analysis was used to test the significance level in order to identify the relationship among plasma concentrations of antioxidant micronutrients (retinol, α -tocopherol, selenium, and zinc), and hematological parameters (erythrocytes, hemoglobin, reticulocytes, serum LDH, DB, IB and TB, HbF, and hemoglobin S). Multiple regression analyses were performed individually using a set of dependent variables (hematological parameters) to identify combined associations. Thus, serum antioxidant micronutrients concentrations were considered as independent variables. The control variables were sex, age, ethnicity, genotype, use of hydroxyurea, serum us-CRP concentration, and leukocyte count. Results were presented as B unstandardized coefficients, with the corresponding 95% confidence intervals (95% CI), and p values. A significance level of 5% was adopted for all statistical analyses.

4.2.9 Ethical aspects

All participants were informed about the study's objectives and provided written informed consent. The study was approved by the ethics committees of the State Institute of Hematology Arthur de SiqueiraCavalcanti (HEMORIO), technical opinion number 244/10, and of the Pedro Ernesto University Hospital (HUPE), technical opinion number 2819/2010. Therefore, the

study has been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

4.3 Results

4.3.1 Participants' characteristics

The characteristics of this study's participants are shown in Table 1. Of the 51 patients studied, 36 (70.6%) had the HbSS genotype. Mean age was 49.3 years old (± 5.6) and most patients were female (54.9%). Regarding skin color, there was a higher prevalence of black patients (52.9%). Most patients (58.8%) did not use the myelosuppressive agent, hydroxyurea.

Table 1 - General characteristics of adult sickle cell disease patients (n=51).

	n (%)
Genotype	
HbSS	36 (70.6%)
HbSC	15 (29.4%)
Sex	
female	28 (54.9%)
male	23 (45.1%)
Age (mean \pmSD^a)	49.3 \pm 6.57
Skin colour	
White	2 (3.9%)
Black	27 (52.9%)
Mixed race	22 (43.1%)
Use of hydroxyurea	
Yes	21 (41.2%)
No	30 (58.8%)

HbSS (homozygous genotype of sickle cell disease, called sickle cell anemia), HbSC (hemoglobin S and hemoglobin C heterozygous genotype of sickle cell disease, called HbSC disease).

^a Standard deviation.

Table 2 shows the descriptive data of hematological parameters, revealing the anemic characteristics of this population.

Table 2 - Hematological parameters in adult sickle cell disease patients (n=51).

	Reference value*	Median	Minimum ; maximum	P25 ; P75
ERY (10 ¹² /L)	Fem 4.0 – 5.2	2.83	1.63; 5.03	2.31 ; 3.73
	Male 4.5 – 5.9			
Hb (g/dL)	Fem 12 – 16	9.10	5.50 ; 14.70	7.50 ; 10.10
	Male 13.5 – 17.5			
HT (%)	Fem 36 – 46	27.8	16.70 ; 46.40	23.40 ; 32.10
	Male 41 – 53			
MCV (fl)	80 – 100	96.00	63.00 ; 135.00	86.00 ; 102.00
MCH (pg)	27 – 32	31.00	19.00 ; 44.10	27.30 ; 33.20
RET (% red cells)	0.5–2.5	5.50	1.60 ; 18.30	0.30 ; 9.40
RDW (%)	11.5 – 14.5	15.00	11.10 ; 20.90	13.20 ; 17.70
TB (mg/dL)	0.3 – 1.0	1.37	0.50 ; 7.28	0.94 ; 2.51
DB (mg/dL)	0.1 – 0.3	0.58	0.20 ; 1.91	0.32 ; 0.86
IB (mg/dL)	< 0.8	0.96	0.10 ; 5.97	0.62 ; 1.70
LDH (U/L)	100 – 190	818.50	119.00 ; 2594.00	541.00 ; 1127.00
HbF (%)	0 – 2.0	4.40	0.20 ; 27.40	1.20 ; 12.40
HbS (%)	–	77.35	23.50 ; 95.10	49.40 ; 88.42

ERY (erythrocytes), Hb (hemoglobin), HT (hematocrit), RET (reticulocytes), RDW (red-cell distribution width), TB (total bilirubin), DB (direct bilirubin), IB (indirect bilirubin), LDH (lactate dehydrogenase), HbF (fetal hemoglobin), HbS (hemoglobin S). *See reference [23]

Table 3 shows the descriptive data of inflammatory parameters and serum concentrations of antioxidant micronutrients. The results are in accordance with the low-grade chronic inflammation usually observed in SCD. The median concentrations of vitamin A, E and zinc were above the reference values. On the other hand, selenium median concentration was below the reference value. Accordingly, most patients had adequate serum concentrations of zinc (95.0%), vitamin E (91.8%), and vitamin A (73.5%) while a high rate (93.5%) of inadequate serum concentration of selenium was observed.

Table 3 - Serum concentrations of antioxidant nutrients and inflammation markers in sickle cell disease patients (n=51).

	Reference value*	Median	Minimum ; maximum	P25 ; P75
Vitamin A (µmol/L)	> 0.35	0.50	0.20 ; 1.30	0.30 ; 0.80
Vitamin E (µg/mL)	> 5	7.90	4.20 ; 20.6	6.70 ; 11.45
Selenium (µg/dL)	>80	33.50	15.00 ; 130.00	27.00 ; 41.00
Zinc (µg/dL)	> 70	96.00	62.80 ; 145.70	83.70 ; 117.20
Leukocytes (cells/mm ³)	4500 – 10000	8200	3500 ; 25900	6600 ; 10200
us-CRP (mg/dL)	<0.5	0.55	0.09 ; 2.79	0.25 ; 1.13

us-CRP (ultra-sensitive C-reactive protein). * See references [19-21, 23]

4.3.2 Relationship between antioxidant micronutrients and hematological parameters

Selenium is directly associated with hemolysis in SCD (Table 4). Positive associations between serum concentration of selenium and erythrocyte counts, hemoglobin level and hematocrit were observed. Serum selenium concentration was inversely associated with hemolysis markers as a result of the reticulocyte count, and serum LDH, TB, DB, IB and HbF concentrations.

Vitamin E was inversely associated with red-cell distribution width (RDW) ($p=0.005$). The other micronutrients did not present significant association with hematological parameters. There was no significant difference between antioxidant micronutrients concentration when comparing SS and SC genotypes (data not shown).

When redoing the analyzes without any adjustment (data not shown), selenium associations with the hemolysis markers (LDH, erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, TB, IB, DB, reticulocyte) were maintained, except for HbF (no association of HbF with selenium in the unadjusted model). Moreover, in this unadjusted model, new associations with other nutrients were observed. There was an indirect association between vitamin A and LDH ($p = 0.013$); indirect association between zinc ($p = 0.014$) and BD; vitamin E (0.049) and BD; indirect association between reticulocyte and vitamin A ($p = 0.021$); and indirect association between HbS and vitamin E ($p = 0.007$).

Table 4 - Final model between nutrients and hematological parameters in adult sickle cell disease patients (n=51).

Antioxidant nutrients	Hematological parameters	R²	β	CI	p value ^a
Selenium	LDH (U/L)	0.62	-13.90	-22.79 ; -5.02	0.003
	ERY (10 ¹² /L)	0.30	0.02	0.00 ; 0.04	0.010
	Hb (g/dL)	0.38	0.06	0.01 ; 0.10	0.006
	HT (%)	0.37	0.19	0.06 ; 0.32	0.006
	RET (%)	0.27	-0.09	-0.19 ; 0.00	0.040
	TB (mg/dL)	0.54	-0.05	-0.08 ; -0.02	0.001
	DB (mg/dL)	0.56	-0.01	-0.02 ; 0.00	0.007
	IB (mg/dL)	0.42	-0.04	-0.07 ; -0.01	0.007
	HbF (%)	0.41	-0.22	-0.40 ; -0.04	0.017
Vitamin E	RDW (%)	0.28	-0.26	-0.43 ; -0.08	0.005

CI (confidence interval), LDH (lactate dehydrogenase), ERY (erythrocytes), HB (hemoglobin), HT (hematocrit), RDW (red-cell distribution width), RET (reticulocytes), TB (total bilirubin), DB (direct bilirubin), IB (indirect bilirubin), HbF (fetal hemoglobin).

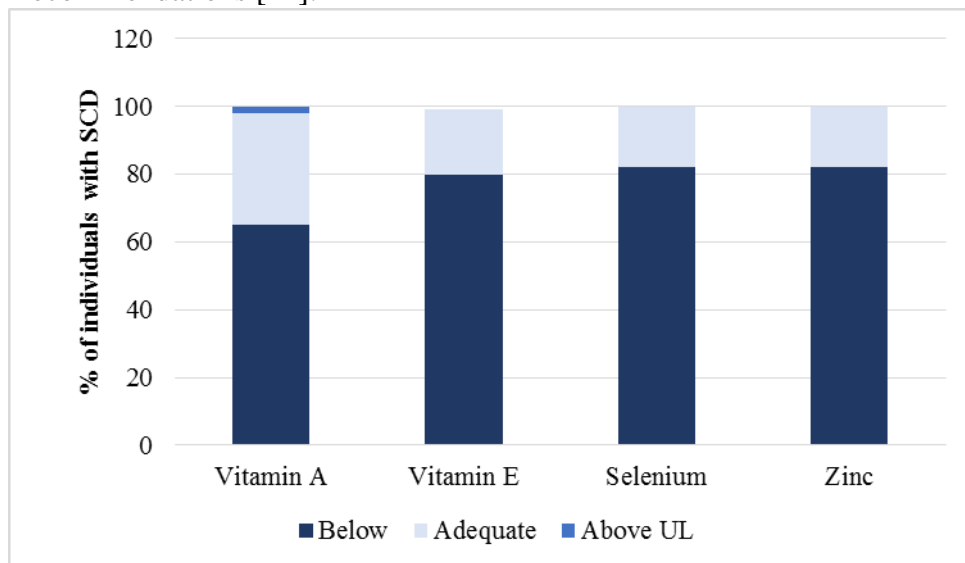
Only significant results from the backward linear regression analysis are shown in this table.

^ap values obtained from the backward linear regression analysis, considering antioxidant micronutrients (vitamin A, E, selenium, and zinc) as independent variables and hematological parameters (LDH, ERY, Hb, HT, RDW, RET, TB, DB, IB, HbF, and HbS) as dependent variables. The analysis was adjusted for the following variables: skin colour, age, sex, genotype, use of hydroxyurea, us-CRP, and leukocyte count.

4.3.3 Food consumption

Figure 1 shows the adequacy of antioxidant micronutrients consumption. Most patients consumed inadequate quantities of vitamin A (65%), vitamin E (80%), selenium (82%) and zinc (82%). Two percent (2%) of the individuals studied presented consumption above the Tolerable Upper Intake Level (UL) of vitamin A.

Figure 1 - The adequacy of antioxidant micronutrient intake was assessed by 24-hour dietary recalls, based on Dietary Reference Intake (DRI) recommendations [22].



4.4 Discussion

Oxidative stress influences hemolytic events [1], but the relationship between the levels of antioxidant micronutrients and hemolysis in SCD patients is not well explored. In this study, we identified the relationship of serum concentrations of retinol, alpha-tocopherol, selenium and zinc with hemolysis markers.

In our study, most patients had selenium deficiency and adequate nutritional status of the other analyzed antioxidants. Selenium deficiency may possibly be attributed to the selenium-poor diet contents since the food sources of selenium are expensive and, in Brazil, this population is more vulnerable to food insecurity [24]. In addition, selenium deficiency may also be attributed to the increased renal excretion present in SCD. Individuals in the age group studied are more susceptible to the development of chronic renal failure [25], which is related to lower selenium concentrations [26]. In addition, tubular reabsorption is known to be abnormal in individuals with SCD, leading to loss of nutrients due to the repeated sickling process of red blood cells [27].

Despite the low consumption of vitamins A and E, most of SCD patients were not deficient in these nutrients perhaps because these are fat-soluble vitamins and stored in the body. Thus, 24-hour dietary recalls may not directly reflect the nutritional status of these nutrients. However, the median values observed in table 3 for these vitamins are close to the cutoff point used. The mean vitamin A concentration was 0.5 $\mu\text{mol/L}$, while the cutoff point was 0.35 $\mu\text{mol/L}$, which is the lowest cutoff point used by WHO to determine vitamin A deficiency. For vitamin E, the median was 7.9 $\mu\text{g/mL}$, while the cutoff used was 5 $\mu\text{g/mL}$.

Claster et al. [28] evaluated the prevalence of vitamin and mineral deficiency in American SCD patients with iron overload and thalassemia and showed a higher percentage of abnormal low serum vitamin A (73.70%) and selenium (65.50%) concentrations in SCD patients (the author does not describe which genotypes were analyzed). In that study, different hemoglobinopathies were mixed together. We found no differences in nutrient concentration between genotypes HbSS and HbSC (data not shown).

Selenium is directly associated with hemolysis in SCD. This micronutrient is part of the structure of selenoproteins, such as GPx, which are present in the erythrocytes and help protect hemoglobin against oxidation [29]. In addition, the adequate selenium intake preserves the GPx activity [30]. Thus, we suggest that reduced serum concentrations of selenium may be associated with impaired antioxidant capacity of erythrocytes, caused by reduced activity of the GPx and other selenoenzymes, as shown by Natta and colleagues [31], who observed low serum selenium concentrations and lower GPx activity in patients with SCD. That study suggests that there is low antioxidant capacity in these individuals, making proteins and lipids of the erythrocyte membrane more susceptible to oxidation and subsequent hemolysis [31].

As far as we know, only one study has examined associations between selenium and hemolysis markers [32]. That study mixed thalassemia major and SCD children patients and analyzed only LDH and reticulocytes as hemolysis parameters. Although these patients had lower serum selenium concentrations compared to the control group, there was no significant associations between selenium and hemolysis markers.

In addition, recent studies have demonstrated the effect of selenium on erythropoiesis [14, 33]. Selenium deficiency reduces the activity of the transcription factor GATA-1 (GATA binding protein 1), responsible for the erythroid differentiation, and compromises the transport of heme in the erythroblastic islands, damaging the terminal maturation of erythroblasts [14]. This suggests that the role of selenium in erythropoiesis goes beyond the role of protective antioxidant in erythropoiesis. Animals that underwent selenium adequacy were able to recover from anemia, whereas maintenance of selenium deficiency was shown to be lethal [14], which

is in accordance with our study, where the selenium nutritional status significantly influenced erythrocyte counts, hemoglobin levels and hematocrit, pointing to a direct association between these variables and serum concentrations of selenium. Thus, in SCD patients, it is possible that selenium simultaneously contributes to increase the erythropoietic effectiveness and to decrease the hemolysis rates. Our results also raise the possibility that other hemolytic anemias may be benefited by the nutritional adequacy of selenium. As already discussed by other authors, selenium is still poorly understood in terms of its biomedical importance [34]. It is known, however, that the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) is found to be a key transcription factor binding to the antioxidant response elements (ARE) present in the promoter regions of various antioxidant enzymes. In selenium deficiency, Nrf2 expression is increased, as a compensatory mechanism [33, 35]. In sickle erythroid cells, Nrf2 induces HbF synthesis in order to inhibit hemoglobin S polymerization and protect against oxidative stress due to chronic hemolysis [35]. This may explain the inverse relationship between selenium and HbF, shown in Table 4. At the same time, selenium reduction increases inflammation, which usually reduces HbF concentrations. Therefore, when we removed the effect of inflammation (adjusted model; Table 4), we observed an inverse association between selenium and HbF. However, when the model is not adjusted for inflammation (data not shown), we no longer see this association. In addition to the HbF information in SCD, it is known that hydroxyurea enhances its production [2], which explains the elevated levels of HbF observed in the present study.

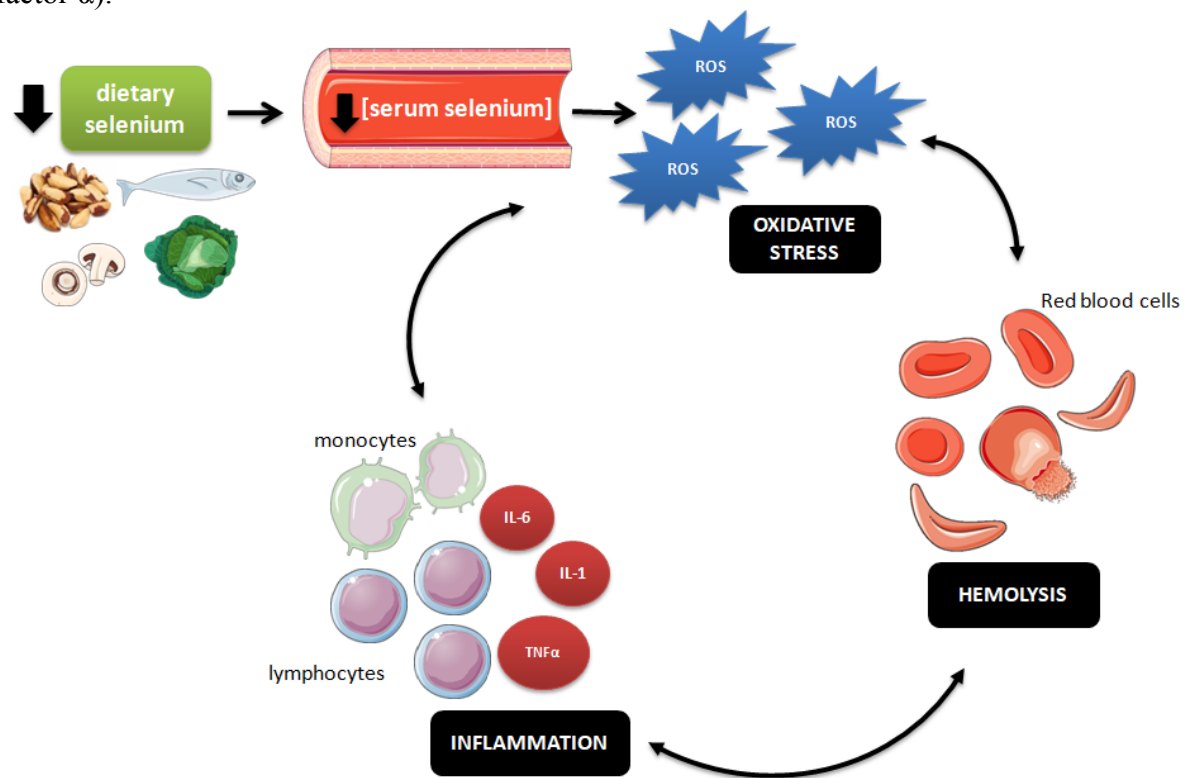
We observed an inverse relationship between vitamin E and RDW which may be possibly explained due to the vitamin E activity, which protects the fatty acids of the erythrocyte membrane, reducing the membrane susceptibility to lipid peroxidation [36], and subsequent hemolysis [37].

In our study, most patients had an adequate nutritional zinc status, possibly due to extravasation of erythrocyte zinc (10 to 20 times greater than the amount in plasma) because of hemolysis observed in SCD patients [38]. This is a limitation of the present study as well as the absence of a control group. Despite the antioxidant action of zinc, no association was observed between serum zinc concentrations and hemolysis. BAO et al. [39], showed that zinc supplementation was effective to reduce the oxidative stress in SCD patients and improved erythrocyte count, hemoglobin levels and hematocrit. The authors suggest that increased red blood cell indexes may be related to the antioxidant effect of zinc, but its influence on GATA-1, a zinc-dependent erythroid transcription factor, should be considered [39, 40].

Altogether, our results allow the proposition of the cyclical mechanism presented in Figure 2. We suggest that reduced serum concentration of selenium may impair the antioxidant

capacity, resulting in higher ROS formation and subsequent oxidative stress. Increased ROS levels may damage the erythrocyte membrane, making these cells more susceptible to hemolysis. Hemolysis products (hemoglobin, heme, iron), in turn, can stimulate leukocyte recruitment and production of proinflammatory cytokines in the vascular endothelium, triggering an inflammatory process. Therefore, inflammatory cells may produce more ROS, worsening the oxidative stress, leading to the hemolytic event [41].

Figure 2 - Representative scheme of the relationship between low dietary selenium intake, serum selenium concentration and oxidative-hemolysis-inflammation cycle in SCD. ROS (reactive oxygen species), IL-1 (interleukin 1), IL-6 (interleukin 6), TNF α (tumor necrosis factor α).



4.5 Conclusions

Among the antioxidant micronutrients studied, selenium played the most important role in hemolysis in SCD patients. Low serum concentrations of selenium were directly associated with hemolytic events, which may aggravate the condition of these patients and result in more severe complications.

An adequate selenium intake may probably improve the patients' clinical status. Thus, we recommend the inclusion of an increased amount of selenium-rich foods in their diet, in order

to increase the concentration of this micronutrient and to reduce pro-oxidant and hemolytic processes in SCD.

Author Contributions: Conceptualization, M.C., E.D., C.S.C.R.; Methodology, M.C., E.D., J.O., C.S.C.R., M.K.F., F.B.B, J.C.K.; Data Curation, C.S.C.R., M.C.; Writing – Original Draft Preparation, M.C., E.D.; Writing – Review & Editing, M.C., E.D., C.S.C.R., J.O., M.K.F., F.B.B, A.C.B., J.C.K.; Supervision, M.C., C.S.C.R.; Project Administration, M.C., C.S.C.R.; Funding Acquisition, M.C., C.S.C.R.

Funding: This study was funded by Ministry of Health (777022/2012).

Acknowledgments: The authors thank Viviane Fernandes de Meneses for excellent technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

4.6 References

1. Kato, G.J.; Piel F.B.; Reid, C.D.; Gaston, M.H.; Ohene-Frempong, K.; Krishnamurti, L.; Smith, W.R.; Panepinto, J.A.; Weatherall, D.J.; Costa, F.F.; Vichinsky, E.P. Sick cell disease. *Nat Ver Dis Primers* 2018, 4, 1–22. Available online: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.10> (accessed on 08 November 2018)
2. Ware, R.E.; Montalembert, M.; Tshilolo, L.; Abbound, M.R. Sick cell disease. *Lancet* 2017, 390, 311–323. Available online: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9) (accessed on 10 November 2018)
3. Quinn, C.T.; Smith, E.P.; Arbabi, S.; Khera, P.K.; Lindsell, C.J.; Niss, O.; Joiner, C.H.; Franco, R.S.; Cohen, R.M. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. *Am J Hematol* 2016, 91, 1195–1201. Available online: <https://doi.org/10.1002/ajh.24562> (accessed on 08 November 2018)
4. Alayash, A.I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. *Blood Cells Mol Dis* 2017, 70, 78–86. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.05.009> (accessed on 08 November 2018)
5. Hebbel, R.P.; Eaton, J.W.; Balasingam, M.; Steinberg, M.H. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J Clin Invest* 1982, 70, 1253–1259. Available online: <https://doi.org/10.1172/JCI110724> (accessed on 08 November 2018)
6. Hebbel, R.P.; Morgan, W.T.; Eaton, J.W.; Hedlund, B.E. Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc Natl AcadSci U.S.A.* 1988, 85, 237–241. Available online: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.1.237> (accessed on 08 November 2018)
7. Kanas, T.; Acker, J.P. Biopreservation of red blood cells — the struggle with haemoglobin oxidation. *FEBS J* 1988, 277, 343–356. Available online: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07472.x> (accessed on 08 November 2018)

8. He, L.; He, T.; Farrar, S.; Ji, L.; Liu, T.; Ma, X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell PhysiolBiochem* 2017, 44, 532–553. Available online: <https://doi.org/10.1159/000485089> (accessed on 08 November 2018)
9. Oliveros, L.; Veja, V.; Anzulovich, A.C.; Ramirez, D.; Giménez, M.F. Vitamin A deficiency modifies antioxidant defenses and essential element contents in rat heart. *Nutrition Research* 2000, 20, 1139–1150. Available online: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00204-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00204-9) (accessed on 08 November 2018)
10. Sun, Y.; Ma, A.; Li, Y.; Han, X.; Wang, Q.; Liang, H. Vitamin E supplementation protects erythrocyte membranes from oxidative stress in healthy Chinese middle-aged and elderly people. *Nutrition Research* 2012, 32, 328–334. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.03.012> (accessed on 08 November 2018)
11. Gammoh, N.Z.; Rink, L. Zinc in infection and inflammation. *Nutrients* 2017, 9, 624. Available online: <https://doi.org/10.3390/nu9060624> (accessed on 08 November 2018)
12. Chow, C.K.; Chen, C.J. Dietary selenium and age-related susceptibility of rat erythrocytes to oxidative damage. *J Nutr* 1980, 110, 2460–2466. Available online: <https://doi.org/10.1093/jn/110.12.2460> (accessed on 08 November 2018)
13. Nagababu, E.; Chrest, F.J.; Rifkind, J.M. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *BiochimBiophysActa* 2003, 1620, 211– 217. Available online: [http://doi:10.1016/s0304-4165\(02\)00537-8](http://doi:10.1016/s0304-4165(02)00537-8) (accessed on 08 November 2018)
14. Liao, C.; Hardison, R.C.; Kennett, M.J.; Carlson, B.A.; Paulson, R.F.; Prabhu, K.S. Selenoproteins regulate stress erythroid progenitors and spleen microenvironment during stress erythropoiesis. *Blood* 2018, 131, 2568-2580. Available online: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-800607> (accessed on 10 November 2018)
15. McKerrell, T.D.H.; Cohen, H.W.; Billett, H. H. The Older Sickle Cell Patient. *Journal of Hematology*, 2004, 76, 101-106. Available online: <https://doi.org/10.1002/ajh.20075> (accessed on 06 September 2019).
16. Khan,A.B.; Kesse-Adu,R.; Breen,C.; Murphy, P.B.; Chambers, J.; Holmes,P.; Howard, J. Descriptive study of the characteristics of older adults with sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, 2017, 93, E38-E40. Available online: <https://doi.org/10.1002/ajh.24961> (accessed on 06 September 2019).
17. Lobo, C.L.C.; Nascimento, E.M.D.; Jesus, L.J.C.; Freitas, T.G.; Lugon, J.R.; Ballas, S.K. Mortality in children, adolescents and adults with sickle cell anemia in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras HematolHemoter* 2018, 40, 37-42. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.09.006> (accessed on 10 November 2018)
18. Omena, J.; Cople-Rodrigues, C.D.S.; Cardoso, J.D.D.A.; Soares, A.R.; Fleury, M.K.; Brito, F.D.S.B.; Koury, J.C.; Citelli, M. Serum hepcidin concentration in individuals with sickle cell anemia: basis for the dietary recommendation of iron. *Nutrients*. 2018, 10, pii: E498. Available online: <https://doi.org/10.3390/nu10040498> (accessed on 10 November 2018)

19. World Health Organization – WHO. Available online: http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/vitamin_a_deficiency/WHONUT96.10.pdf?ua=1 (accessed 08 November 2018).
20. Clark, S.F. Vitamins and trace elements. In: Gottschlich, M.M. The A.S.P.E.N. Nutrition support care curriculum: a case-based approach – the adult patient. American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. Silver Spring 2007, 129-162. (accessed on 21 December 2018)
21. Langley, G. Fluid, electrolytes, and acid-base disorders. In: Gottschlich, M.M. The A.S.P.E.N. Nutrition support core curriculum: a case-based approach – the adult patient. American Society for Parenteral and Enteral Nutrition. Silver Spring 2007, 104-128. (accessed on 21 December 2018)
22. Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes (DRI) for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington DC: National Academy Press; 2001.
23. Kratz, A.; Ferraro, M.; Sluss, P.M.; Lewandrowski, K.B. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Laboratory reference values. *N Engl J Med* 2004, 351, 1548-1563. Available online: <https://doi.org/10.1056/NEJMcp049016> (accessed on 21 December 2018)
24. Santos, I.N.; Damião, J.J.; Fonseca, M.J.M.; Cople-Rodrigues, C.S.; Aguiar, O.B. Food insecurity and social support in families of children with sickle-cell disease. *J Pediatr*, 2019, 95, 306-313. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.01.005> (accessed on 06 September 2019).
25. Thein, M.S.; Igbineweka, N.E.; Thein, S.L. Sickle cell disease in the older adult. *Pathology*, 2017, 49, 1-9. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.002>. (accessed on 06 September 2019).
26. Zachara, B.A. Selenium and selenium-dependent antioxidants in chronic kidney disease. *Adv Clin Chem*, 2015, 68, 131-51. Available online: <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.006>. (accessed on 06 September 2019).
27. Yuzbasiyan-Gurkan, V.A.1, Brewer, G.J., Vander, A.J., Guenther, M.J., Prasad, A.S. Net renal tubular reabsorption of zinc in healthy man and impaired handling in sickle cell anemia. *Am J Hematol*, 1989, 31, 87-90. Available online: <https://doi.org/10.1002/ajh.2830310203> (accessed on 06 September 2019).
28. Claster, S.; Wood, J.C.; Noetzli, L.; Carson, S.M.; Hofstra, T.C.; Khanna, R.; Coates, T.D. Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with hemoglobinopathies. *Am J Hematol* 2009, 84, 344–348. Available online: <https://doi.org/10.1002/ajh.21416> (accessed on 10 November 2018)
29. Rotruck, J.T.; Pope, A.L.; Ganther, H.E.; Swanson, A.B.; Hafeman, D.G.; Hoekstra, W.G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973, 179, 588-590. Available online: <https://doi.org/10.1126/science.179.4073.588> (accessed on 08 November 2018)

30. Jablonska, E.; Gromadzinska, J.; Reszka, E.; Wasowicz, W.; Sobala, W.; Szeszenia-Dabrowska, N.; Boffetta, P. Association between GPx1 Pro198Leu polymorphism, GPx1 activity and plasma selenium concentration in humans. *Eur J Nutr* 2009, 48, 383–386. Available online: <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0023-0> (accessed on 08 November 2018)
31. Natta C.L.; Chen L.C.; Chow C.K. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematol*, 1990, 83, 130–132. Available online: <https://doi.org/10.1159/000205188> (accessed on 06 September 2019).
32. Hamdy, M.M.; Mosallam, D.S.; Jamal, A.M.; Rabie, W.A. Selenium and Vitamin E as antioxidants in chronic hemolytic anemia: Are they deficient? A case-control study in a group of Egyptian children. *J Adv Res*, 2015, 6, 1071–1077. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.01.002> (accessed on 06 September 2019).
33. Liao, C.; Carlson, B.A.; Paulson, R.F.; Prabhu, K.S. The intricate role of selenium and selenoproteins in erythropoiesis. *Free Rad Biol Med* 2018, 127, 165–171. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.578> (accessed on 10 January 2019)
34. Schomburg, L. Dietary Selenium and Human Health. *Nutrients* 2016, 9, 22. Available online: <https://doi.org/10.3390/nu9010022> (accessed on 10 January 2019)
35. Zhu, X.; Oseghale, A.R.; Nicole, L.H.; Li, B.; Pace, B.S. Mechanisms of NRF2 activation to mediate fetal hemoglobin induction and protection against oxidative stress in sickle cell disease. *Exp Biol Med*, 2019, 244, 171–182. Available online: <https://doi.org/10.1177/1535370219825859> (accessed on 06 September 2019).
36. Niki, E. Role of vitamin E as a lipid-solubleperoxyl radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Rad Biol Med* 2014, 66, 3–12. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022> (accessed on 08 November 2018)
37. Iyer, M.K.; Nayak, R.; Colah, R.; Chattopadhyay, S. Attenuation of oxidative hemolysis of human red blood cells by the natural phenolic compound, allylpyrocatechol. *Free Radic Res* 2013, 47, 710–717. Available online: <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.816847> (accessed on 08 November 2018)
38. Whitehouse, R.C.; Prasad, A.S.; Rabbani, P.I.; Cossack, Z.T. Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry. *ClinChem* 1982, 28, 475–480. Available online: <http://clinchem.aaccjnl.org/content/28/3/475.long> (accessed on 08 November 2018)
39. Bao, B.; Prasad, A.S.; Beck, F.W.J.; Snell, D.; Suneja, A.; Sarkar, F.H.; Doshi, N.; Fitzgerald, J.T.; Swerdlow, P. Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl Res* 2008, 152, 67–80. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2008.06.001> (accessed on 08 November 2018)
40. Cantor, A.B.; Orkin, S.H. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002, 21, 3368–3376. Available online: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205326> (accessed on 08 November 2018)

41. Voskou, S.; Aslanb, M.; Fanis, P.; Phylactides, M.; Kleanthous, M. Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biol* 2015, 6, 226–239. Available online: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.018> (accessed on 08 November 2018)

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nossos resultados mostram que 93,5% dos participantes apresentavam deficiência de selênio, considerando as concentrações séricas. Além disso, as baixas concentrações de selênio estão relacionadas com maior ocorrência de eventos hemolíticos, o que pode agravar o quadro clínico desses indivíduos com DF, refletindo em maiores complicações da doença.

A adequação do estado nutricional destes micronutrientes pode melhorar o estado clínico desses indivíduos. Sendo assim, sugere-se incluir no cuidado nutricional destes pacientes o aumento do aporte de alimentos fontes de selênio, principalmente, a fim de aumentar as concentrações destes micronutrientes, reduzindo processos pró-inflamatórios, pró-oxidantes e de hemólise na DF.

Como desdobramento do presente estudo, está em construção uma revisão sistemática sobre antioxidantes e hemólise, em indivíduos com doenças hemolíticas, tendo como objetivo elucidar se os antioxidantes impactam na redução da hemólise. Durante a busca bibliográfica, foi detectado somente um ensaio clínico randomizado que avaliou o efeito da suplementação com o selênio, que em conjunto com a vitamina E, potencializou os efeitos positivos nos parâmetros hematológicos e aumentou a meia-vida das hemácias.

Considerando o papel que o selênio parece desempenhar na defesa antioxidante em hemácias e que nenhum ensaio clínico avaliou seu efeito de forma isolada, o desenvolvimento de um ensaio clínico randomizado controlado com placebo poderá contribuir para traçar novas condutas nutricionais para essa população.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. NF-kappaB activation. *Critical care medicine*, v. 28, n. 4, p. 100-104, 2000.
- ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D. Discontinuing Prophylactic Transfusions Used to Prevent Stroke in Sickle Cell Disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 26, p. 2769-2778, 2005.
- ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 70, p.78-86, 2017.
- ALLALI, S. et al. Management of iron overload in hemoglobinopathies. *Transfusion Clinique et Biologique*, 2017.
- ALLISON, A. C. Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British Medical Journal*, v. 1, n. 4857, p. 290–294, 1954.
- ANGELI, J.P.F; CONRAD, M. Selenium and GPX4, a vital symbiosis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 127, p. 153-159, 2018.
- ASLAN, M.; FREEMAN, B. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 1, n. 11, p. 1469-1483, 2007.
- ASLAN, M.; THORNLEY-BROWN, D.; FREEMAN, B. Reactive species in sickle cell disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 899, p. 375–391, 2000.
- AUST, S. D.; MOREHOUSE, L. A.; THOMAS, C. E. Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, v. 1, n. 1, p. 3–25, 1985.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of phenotypic manifestations of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, v. 85, n. 1, p. 6-13, 2010.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, v. 85, n. 1, p. 6-13, 2010.
- BANDEIRA, F. M. G. C. et al. Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital Hemope, Recife-PE. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, n. 3, p. 189-94, 2004.
- BARROS, A. et al. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry*, v. 128, n. 1, p. 165–172, 2011.
- BEHERA, S. et al. Vitamin a status and hematological values in sickle cell disorder cases. *Indian Journal of Medical Sciences*, v. 66, n. 7, p. 169, 2012.
- BELCHER, J. D. et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*, v. 123, n. 3, p. 377–390, 2014.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation

- Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1-9, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Hidroxiureia: Uso e Acesso*. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.
- BUNN, H. F. *et al.* Molecular and cellular pathogenesis of hemoglobin SC disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 79, n. 23, p. 7527–7531, 1982.
- CANÇADO, R. D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.
- CHAVES, M. A. F.; LEONART, M. S. S.; DO NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. *Hematology*, v. 13, n. 3, p. 187–192, 2008.
- CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*, v. 64, n. 1, p.72-80, 2012.
- ÇIMEN, M. Y. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, v. 390, n. 1–2, p. 1–11, 2008.
- CLASTER, S. *et al.* Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with hemoglobinopathies. *American Journal of Hematology*, v. 84, n. 6, p. 344–348, 2009.
- COVAS, D. T. *et al.* Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. *Haematologica*, v. 89, n. 3, p. 273-280, 2004.
- DAAK, A. A. *et al.* Sickle cell disease in western Sudan: genetic epidemiology and predictors of knowledge attitude and practices. *Tropical medicine & international health*, v. 21, n. 5, p. 642-53, 2016.
- DE CATERINA, R. *et al.* Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *Journal of Clinical Investigation*, v. 96, n. 1, p. 60–68, 1995.
- ESPOSITO, B.P. *et al.* Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*, v.102, p. 2670-7, 2003.
- FAN, P. *et al.* Supplemental lipoic acid relieves post-weaning diarrhoea by decreasing intestinal permeability in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 101, n. 1, p. 136–146, 2017.
- FANG, Y.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, v. 18, n. 10, p. 872–879, 2002.
- FLOHÉ, L. *et al.* Redox regulation of NF-kappa B activation. *Free radical biology & medicine*, v. 22, n. 6, p. 1115–1126, 1997.
- GAMMOH, N.Z.; RINK L. Zinc in infection and inflammation. *Nutrients*, v. 9, n.6, p. 624.

GONZALEZ-FLORES, J.N *et al.* The molecular biology of selenocysteine. *Biomolecular Concepts*, v. 4, n. 4, p. 349-65, 2013.

HABER, F.; WEISS, J. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 147, n. 861, p. 332–351, 1934.

HAMDY, M. M. *et al.* Selenium and Vitamin E as antioxidants in chronic hemolytic anemia: Are they deficient? A case-control study in a group of Egyptian children. *Journal of Advanced Research*, v. 6, n. 6, p. 1071–1077, 2014.

HANKINS, J. S. *et al.* R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood*, v. 113, n. 20, p. 4853-4855, 2009.

HASANATO, R. M. W. Zinc and antioxidant vitamin deficiency in patients with severe sickle cell anemia. *Annals of Saudi Medicine*, v. 26, n. 1, p. 17–21, 2006.

HE, L. *et al.* Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 44, n. 2, p. 532-553, 2017.

HEBBEL, R. P. *et al.* Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 85, n. 1, p. 237–41, 1988.

HEBBEL, R. P. *et al.* Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *Journal of Clinical Investigation*, v. 70, n. 6, p. 1253–1259, 1982.

HOFFMANN, P.R.; BERRY, M.J. Selenoprotein synthesis: a unique translational mechanism used by a diverse family of proteins. *Thyroid*, v.15, n. 8, p. 769-75, 2005.

INATI, A.; KHORIATY, E.; MUSALLAM, K. M. Iron in Sickle-Cell Disease: What Have We Learned Over the Years? *Pediatric Blood Cancer*, v.56, n.2, p. 182-190, 2011.

JAJA, S. I. *et al.* Changes in erythrocytes following supplementation with alpha-tocopherol in children suffering from sickle cell anaemia. *The Nigerian postgraduate medical journal*, v. 12, n. 2, p. 110–114, 2005.

JEE, J. P. *et al.* Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 63, n. 2, p. 134–139, 2006.

JIANG, Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant and anti-inflammatory activities and the role in disease prevention and therapy. *Advances in Nutrition*, v. 15; n. 8, p. 850-867.

JOSEPHSON, C. D. *et al.* Transfusion in the Patient with Sickle Cell Disease: A Critical Review of the Literature and Transfusion Guidelines. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 21, n. 2, p. 118-133, 2007.

KANIAS, T.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells - The struggle with

hemoglobin oxidation. *FEBS Journal*, v. 277, n. 2, p. 343-356, 2010.

KATO, G. J. *et al.* Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 18010, p. 1–22, 2018.

KATO, G.J.; GLADWIN, M.T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood Reviews*, v. 21, n. 1, p. 37–47, 2007.

KAUSHAL, N. *et al.* The Regulation of Erythropoiesis by Selenium in Mice. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 14, n. 8, p. 1403–1412, 2011.

LANG, E.; LANG, F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 39, p. 35-42, 2015.

LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 15, n. 37, p. 1921-1942, 2004.

LIAO, C. *et al.* Selenoproteins regulate stress erythroid progenitors and spleen microenvironment during stress erythropoiesis. *Blood*, v. 131, p. 2568-2580, 2018.

MANDAL, D. *et al.* Caspase 3-mediated Proteolysis of the N-terminal Cytoplasmic Domain of the Human Erythroid Anion Exchanger 1 (Band 3). *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 52, p. 52551–52558, 2003.

MANDAL, D. *et al.* Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 47, p. 39460–39467, 2005.

MARANGON, K. *et al.* Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, n. 9–10, p. 1114–1121, 1999.

MAY, J. *et al.* Hemoglobin variants and disease manifestations in severe falciparum malaria. *JAMA*, v. 297, n. 20, p. 2220–2226, 2007.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 247, n. 21, p. 6960–6962, 1972.

MOHER, D. *et al.* Reprint-preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Physical Therapy*, v. 89, n. 9, p. 873-880, 2009.

NAGABABU, E. *et al.* Heme degradation and oxidative stress in murine models for hemoglobinopathies: Thalassemia, sickle cell disease and hemoglobin C disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 41, n. 1, p. 60–66, 2008.

NATTA, C.; CHEN, L. C.; CHOW, C. K. Selenium and glutathione peroxidase levels in sickle cell anemia. *Acta Haematologica*, v. 83, n. 3, p. 130–132, 1990.

NATTA, C.; MACHLIN, L. J.; BRIN, M. A decrease in irreversibly sickled erythrocytes in

- sickle cell anemia patients given vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 33, n. 5, p. 968–971, 1980.
- PIEL, F. B. *et al.* Global epidemiology of Sickle haemoglobin in neonates: A contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet*, v. 381, n. 9861, p. 142–151, 2013.
- PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 2017.
- PRASAD, A. S. *et al.* Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 8, p. 1182–1190, 2004.
- PRASAD, A. S. *et al.* Zinc deficiency in sickle cell disease. *Clinical Chemistry*, v. 21, n. 4, p. 582–587, 1975.
- QADRI, S.M. *et al.* Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes. *Blood Reviews*, v. 31, n. 6, p. 349-361, 2017.
- RAY, D. *et al.* Antioxidant vitamin levels in sickle cell disorders. *National Medical Journal of India*, v. 20, n. 1, 2007.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. *Lancet*, v. 379, n. 9822, p. 1256-68, 2012.
- RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. *Lancet*, v. 15, n. 9225, p. 233-241, 2000.
- REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, v. 156, n. 4, p. 433-45, 2012.
- REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. *Lancet*, v. 11, n. 9757, p. 2018-31, 2010.
- REITER, C. D. *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nature Medicine*, v. 8, n. 12, p. 1383–1389, 2002.
- REN, H. *et al.* Patients with sickle cell disease have reduced blood antioxidant protection. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v. 78, n. 3, p. 139-147, 2008.
- RIFKIND, J. M. *et al.* Redox Reactions of Hemoglobin. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 6, n. 3, p. 657–666, 2004.
- RIFKIND, J. M.; MOHANTY, J. G.; NAGABABU, E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Frontiers in Physiology*, v. 5, p. 500, 2015.
- RODRIGUES, D.O.W. *et al.* Diagnóstico histórico da triagem neonatal para doença falciforme. *Atenção Primária à Saúde*, v. 13, n. 1, p. 34-45, 2010.

ROTHER, R. P. *et al.* The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *Journal of the American Medical Association*, v. 6, n 13, p. 1653-1662, 2005.

ROUMENINA, L. T. *et al.* Heme: Modulator of Plasma Systems in Hemolytic Diseases. *Trends in Molecular Medicine*, v. 22, n. 3, p. 200-213, 2016.

SCHAER, D. J. *et al.* Hemolysis and free hemoglobin revisited: Exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, v. 21, n. 8, p. 1276-1284, 2013.

SCHRODER, K.; TSCHOPE, J. The Inflammasomes. *Cell*, v. 19, n. 6, p. 821-832, 2010.

SILVA, D. G. H. *et al.* Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 65, p. 1101-1109, 2013.

SOARES, M. P.; BOZZA, M. T. Red alert: Labile heme is an alarmin. *Current Opinion in Immunology*, v. 38, p. 94-100, 2016.

STOCKWELL, B.; ANGELI, J.P.F; BAYIR, H. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*, v. 171, n. 2, p. 273–285, 2017.

TABASSUM, A.; BRISTOW, R. G.; VENKATESWARAN, V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? *Cancer Treatment Reviews*, v. 36, n. 3, p. 230-234, 2010.

TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 43, n. 1, p. 4-15, 2007.

UNITED NATIONS. NEW YORK, 2014. Demographic Yearbook Annuaire démographique, p. 634 (Annex I). Disponível em: <<https://unstats.un.org/unsd/demographic-social/products/dyb/dybsets/2013.pdf>>. Acesso em 15 de maio de 2019.

VAN ZWIETEN, R.; VERHOEVEN, A. J.; ROOS, D. Inborn defects in the antioxidant systems of human red blood cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 67, p. 377–386, 2014.

VOSKOU, S. *et al.* Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biology*, v. 6, p. 226-239, 2015.

WAGENER, F. A. *et al.* Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. *Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 216, n. 3, p. 456–63, 1997.

WALTER, P. B. *et al.* Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *British journal of haematology*, v. 135, n. 2, p. 254–63, 2006.

WHO AFRICA, Regional Committee for Africa. Sickle Cell Disease: A Strategy for the WHO African. Malabo, equatorial guinea, v. 60, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/1682>>. Acesso em 15 de maio de 2019.

WOOD, K. C *et al.* Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction. *Free radical biology & medicine*, v. 40, n. 8, p. 1443–53, 2006.

WOOD, K. C.; HSU, L. L.; GLADWIN, M. T. Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 15, n. 8, p. 1506-1528, 2008.

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto /UERJ.

	<p align="center">UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</p>	
<p align="right">Rio de Janeiro, 16 de março de 2011</p>		
<p>Do: Comitê de Ética em Pesquisa Prof.: Wille Oigman Para: Coord. Nutricionista Cláudia dos Santos Cople</p>		
<p>Registro CEP/HUPE: 2819/2010 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto) CAAE: 0265.0.228.325-10</p>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE ESTADO NUTRICIONAL, TAXA METABÓLICA BASAL E NÍVEIS SÉRICOS DE ANTIOXIDANTES EM ADULTOS COM ANEMIA FALCIFORME ACOMPANHADOS EM DOIS CENTROS DE REFERÊNCIA EM HEMATOLOGIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO" APROVADO, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o termo de consentimento livre e esclarecido.</p>		
<p>O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.</p>		
<p>O Comitê de Ética solicita a V. Sã., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.</p>		
<p align="right"> Prof. Wille Oigman Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa </p>		
<p align="right"> </p>		
<p align="center"> CEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA AV. VINTE E OITO DE SETEMBRO, 27 TERREÇO MARIA ISABEL CEP: 20551-030 </p>		

ANEXO B – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio)



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE

HEMORIO
INSTITUTO ESTADUAL DE HEMATOLOGIA
ARTHUR DE SIQUEIRA CAVALCANTI

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 16 de fevereiro de 2012.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Prezada Pesquisadora,

O projeto, ***“Estudo da Relação entre Estado Nutricional, Taxa Metabólica Basal e Níveis Séricos de Antioxidantes em Adultos com Anemia Falciforme Acompanhados em Dois Centros de Referência em Hematologia do Estado do Rio de Janeiro”***, cadastrado no CEP HEMORIO sob o nº 244/10, foi **APROVADO** pelo Comitê desta Instituição, conforme a Resolução CNS 196, de 10/outubro de 1996, após análise das respostas às pendências.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até **15/08/2012** e ao término do estudo.

Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Daniele Galindo, Márcia Villa Nova ou Thaís Oliveira) pelo telefone 2332-8611, ramal 2212, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,

Márcia Villa Nova
Coordenadora do CEP HEMORIO