



Universidade de Brasília - UnB  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde

Estudos dos polimorfismos genéticos de enzimas  
antioxidantes associados à suscetibilidade aos danos no  
DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

Penha Cristina Zaidan Alves

2009



Estudos dos polimorfismos genéticos de enzimas  
antioxidantes associados à susceptibilidade aos danos no  
DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

Aluna: Penha Cristina Zaidan Alves

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Nazaré Klautau Guimarães Grisolia

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós Graduação em  
Ciências da Saúde da UnB,  
como requisito para obtenção  
do título de mestre.

Penha Cristina Zaidan Alves

Estudos dos polimorfismos genéticos de enzimas antioxidantes associados à susceptibilidade aos danos no DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio.

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisólia  
(Orientadora)

---

Prof. Dr Cesar Koppe Grisolia  
(Examinador Externo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zulmira Guerrero Marques Lacava  
(Examinador Externo)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Silviene Fabiana de Oliveira  
(Examinador Suplente)

**Agradeço a Deus por permitir a  
realização de um sonho**

**Dedico este trabalho ao meu querido,  
pai Antonio José *in memória*.  
Que me ensinou o valor dos estudos  
e da perseverança.**

**A minha mãe e irmã Terezinha e Carla  
por todo amor, compreensão e incentivo**

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Maria de Nazaré Klautau, pelas oportunidades e generosidade em compartilhar seus conhecimentos na área de genética molecular.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>a</sup> Carlos Alberto Gonçalves, pela valiosa contribuição com a análise estatística.

Aos membros da banca Prof. Dr Cesar Koppe Grisolia, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Zulmira Guerrero Marques Laçava e Prof<sup>a</sup>. Dra Silviene Fabiana de Oliveira, cujas contribuições serão bastante enriquecedoras .

Aos amigos de bancada Mila, Arthur, Ana Luisa, Cassinha, Leonora, Graciana, Bélin, Ana Elizabeth, Carol, Dudu, Neda, Luciana, Lane, Ricardo, Flavinha, por todos os momentos especiais no laboratório de Genética

Especialmente a Ana Luisa, Arthur, Mila e Eliza pelo companheirismo, e momentos de muito aprendizado e descontração.

A todos que colaboraram nas coletas de material biológico, Ornil, Graciana, Neda, Mila, Neide.

Ao Prof<sup>o</sup> Cesar pelo seu interesse e incentivo durante todo processo.

A Adriana Felix, professora e tradutora, pela revisão do *abstract*

A todos os voluntários, que permitiram a realização deste trabalho.

A minha mãe, Terezinha, e irmã ,Carla, minhas preciosidades, por todo apoio e compreensão.

A todos que participaram deste trabalho.

**Muito Obrigada!**

## Resumo

Organismos aeróbicos estão sujeitos aos intermediários reativos gerados durante a respiração celular. Esses são caracterizados como EROS (Espécies Reativas ao Oxigênio) responsável pelo aumento do estresse oxidativo e conseqüentes danos ao DNA.

O organismo desenvolveu um mecanismo de detoxificação no qual as enzimas antioxidantes endógenas, catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, e haptoglobina agem sobre os EROS reduzindo possíveis danos no DNA. Diversos estudos associam o polimorfismo dessas enzimas ao risco do desenvolvimento de patologias.

O presente estudo observou se a variabilidade genética da região promotora da catalase (21A/T), hGPX1 (Pro198Leu), SOD2(Val-9Ala) e haptoglobina confere diferença na proteção ao estresse oxidativo promovido pelo peróxido de hidrogênio nas concentrações de 250 $\mu$ M e 1mM em indivíduos jovens e saudáveis de Brasília.

A variação das enzimas antioxidantes endógenas avaliadas, sugere conferir diferentes graus de proteção ao DNA contra o estresse oxidativo, induzido *in vitro* pelo peróxido de hidrogênio em indivíduos jovens e saudáveis da população de Brasília.

Palavras chave: catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, haptoglobina, estresse oxidativo, ensaio cometa.

## Abstract

Aerobic organisms are subjected to reactive intermediaries that are generated during cell breathing. They are characterized as ROS (Reactive Oxygen Species), which are responsible for oxidative stress increase and damages to DNA.

The organism developed a detoxification mechanism in which the endogenous anti-oxidant enzymes catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and haptoglobin act on ROS reducing possible damages to DNA. Many studies have associated these enzyme polymorphisms and the development of pathologies.

The present study observed if the genetic variability of the promoting catalase region (21A/T), hGPX1 (Pro/Leu), SOD2 ( Val/9Ala) and haptoglobin concede difference in the protection of oxidative stress, by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> within concentrations of 250µM and 1mM in healthy, young subjects from Brasilia.

The variation by endogenous anti-oxidants enzymes avaliated in this study, suggest confer levels differents the DNA protection to oxidative stress, in vitro, by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Key words: catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, haptoglobin, oxidative stress, comet assay.

## Sumário de Figuras

- Figura 1: Redução tetravalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria resultando na formação de água. Observa-se a formação de EROS durante o processo (Adaptado de COHEN,1989). 01
- Figura 2: O complexo Hp-Hb liga-se e receptor CD163 do macrófago. (Adaptada de DENNIS, 2001). 09
- Figura 3: Padrão de bandas observado na eletroforese em gel de amido dos fenótipos Hp1-1, Hp2-1e Hp2-2.(LANGLOIS & DELANGE,1996). 10
- Figura 4: Estrutura molecular da haptoglobina, composta por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ , ligadas covalentemente por pontes dissulfeto( $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ ). (LANGLOIS& DELANGHE, 1996). 10
- Figura 5: Representação esquemática da estrutura dos genes da Hp. (Adaptada de YANO et al.,1998). 12
- Figura 5.1-Delineamento experimental do ensaio cometa 20
- Figura 6: Ensaio cometa:(a) nucleóide grande e ausência de cauda, caracterizando dano zero no DNA;(b) Nucleóide grande e cauda pequena, logo há pouco DNA degradado constituindo dano grau 2; (C) Nucleóide médio e grande quantidade de DNA degradado formando uma grande cauda caracterizando, dano 3;(D) Nucleóide pequeno, DNA degradado disposto de forma difusa, caracterizando apoptose. 20
- Figura7 : Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, no qual observa-se o polimorfismo da região promotora da catalase 21 A/T. O poço 2 contém o homocigoto TT de 250 pb, no poço 2 observa-se o heterocigoto A/T(250, 177 e 73 pb) e poço 4 A/A (177 e 73 pb). Os poços 6- GPX 1-1- (Pro/Pro),7- GPX1-2 (Pro/Leu),8- GPX2-2(Leu/Leu) compreendem o polimorfismo da hGPX1(PRO198LEU),aplicado em gel de poliacrilamida a 10%. 26
- Figura 8: Polimorfismo da MNSOD (Val/9Ala), em gel de poliacrilamida 6%. 1-SOD1-1 (Val/Val) ; 2- SOD1-2 (Val/Ala); 3- (Ala/Ala). 27
- Figura 9:Polimorfismo da haptoglobina, em gel de poliacrilamida 6% 27
- Figura 10: Distribuição dos ID(CTRL, 250  $\mu$ M e 1 mM), em unidades arbitrárias, em cada genótipos (CAT 1-1, n=24; CAT 1-2, n= 14; CAT 2-2, n=14). 31

Figura 11: Distribuição dos ID (CTRL, 250 $\mu$ M e 1mM), em unidades 33  
arbitrárias, em cada genótipo (hGPX1-1, n=24; hGPX1-2, n=19;  
hGPX2-2, n=9).

Figura 12: Distribuição dos ID (CTRL, 250  $\mu$ M e 1 mM), em unidades 35  
arbitrárias, em cada fenótipo (HP 1-1, n=14; HP 1-2, n= 21; HP 2-2,  
n=17).

Figura 13: Distribuição dos ID (CTRL, 250  $\mu$ M e 1 mM), em unidades 36  
arbitrárias nos diferentes genótipos da Hp (HP 1F-1F, n=3; HP 1F1S,  
n= 4; HP 1F-2, n=8, HP 1S-1S n=7, HP1S-2 n=13, HP 2-2 n=17)

Figura 14: Distribuição dos ID (CTRL, 250  $\mu$ M e 1 mM), em unidades 38  
arbitrárias nos diferentes genótipos da SOD2 (SOD 1-1, n=4; SOD 1-2,  
n=48).

## Sumário de Tabelas

Tabela 01. Seqüência dos iniciadores e enzimas de restrição utilizadas para análise dos loci MN- SOD, hGPX1, CAT .	23
Tabela 02. Programação do termociclador (PTC-100 MJ (MJ Research PTC 100 Thermal Cycler) para realização da Reação em Cadeia Polimerase- PCR CAT, SOD2, GPX1, Hp.	24
Tabela 3: Distribuição dos genótipos dos sistemas enzimáticos e protéico na amostra deste estudo.	29
Tabela 4: Análise da distribuição de ID nos genótipos da CAT (teste de Friedman). *diferença significativa e ** diferença altamente significativa.	30
Tabela 5: Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos genótipos da CAT. *diferença significativa e ** diferença altamente significativa.	31
Tabela 6: Análise da distribuição de ID nos genótipos da CAT (teste de Friedman). *diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e ** diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).	32
Tabela 7: Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos genótipos da hGPX1 (*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e ** diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).	32
Tabela 8: Análise da distribuição de ID nos fenótipos da Hp (teste de Friedman). *diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e ** diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).	34
Tabela 9: Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos fenótipos da Hp (*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e ** diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).	34
Tabela 10: Análise da distribuição de ID nos genótipos da Hp (teste de Friedman). *diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e ** diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).	36
Tabela 11: Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos genótipos HP 1S-2 e HP 2-2, (*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e ** diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).	36

Tabela 12: Análise da distribuição de ID nos genótipos da SOD2 (teste de Friedman). \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ). 37

Tabela 13 : Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos genótipos da SOD2 (\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\*diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ )). 37

## Lista de Abreviaturas

µg	Micrograma
µl	Microlitro
8-OH-dG	8-hdroxideoguanosina
Fe	Ferro
ID	Índice de Dano
GPX	Glutaciona Peroxidase
CAT	Catalase
SOD	Superóxido Dismutase
Hp	Haptoglogina
Hb	Hemoglobina
EROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
TBE	Tris EDTA borato
Val	Valina
Ala	Alanina
Pro	Prolina
Leu	Leucina
mM	Millimol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
mA	Miliamper
SSCGE	Single cell gel electroforesis
PCR	Reação em cadeia Polimerase
O <sub>2</sub> •-	Radical superóxido

HO•	Radical hidroxila
CTRL	Controle
GL	Grau de liberdade
UA	Unidades Arbitrárias

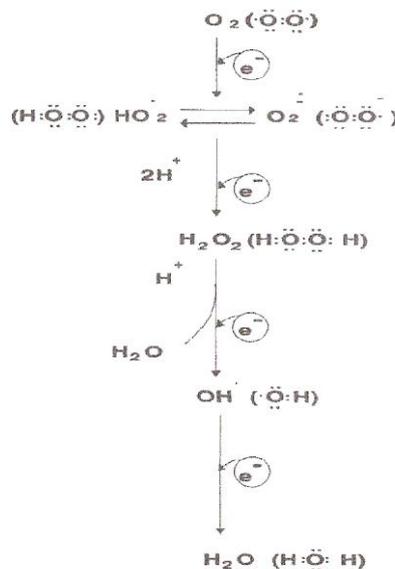
# Sumário

1.	Introdução .....	1
1.1.	Espécies Reativas ao Oxigênio- EROS .....	1
1.2.	Enzimas Antioxidantes endógenas e haptoglobina .....	3
1.2.1.	Superóxido Dismutase (SOD) .....	3
1.2.2.	Glutathiona Peroxidase ( hGPX) .....	5
1.2.3.	Catalase (CAT).....	6
1.2.4.	Haptoglobina .....	8
1.3.	Sistema de Avaliação de Danos no DNA: Eletroforese de Células Isoladas (Single cell gel electrophoresis)- Ensaio Cometa .....	14
2.	Hipótese .....	15
2.1.	Justificativa.....	16
3.	Objetivos .....	18
3.1.	Objetivo Geral .....	18
3.2.	Objetivos Específicos .....	18
4.	Material e Métodos.....	19
4.1.	Critérios para seleção da amostra.....	19
4.2.	Tipo de Estudo .....	19
4.2.1.	Coleta e Processamento das Amostras .....	19
4.3.	Ensaio do cometa.....	20
4.4.	Genotipagem das enzimas antioxidantes endógenas .....	22
4.4	Análise Estatística.....	28
5.	Resultados .....	29
5.1.	Distribuição dos índices de danos no controle e tratamentos nos diferentes genótipos dos sistemas enzimáticos e protéico estudados.....	30
5.2.	Análise dos dados nos genótipos da CAT.....	30
5.3.	Análise dos dados nos Genótipos da hGPX1.....	32
5.4.	Análise dos dados nos Fenótipos e Genótipos da HP .....	33
5.5.	Análise dos dados nos Genótipos da SOD2 ou MnSOD.....	37
6.	Discussão.....	39
7.	Conclusão .....	46
8.	Referências Bibliográficas.....	47
9.	Anexos .....	54

# 1. Introdução

## 1.1. Espécies Reativas ao Oxigênio- EROS

Nas últimas décadas, vêm sendo realizadas pesquisas que buscam esclarecer o papel dos “radicais livres” em processos patológicos. Esse termo refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo que apresenta número ímpar de elétrons na última camada eletrônica. Artigos recentes têm adotado o termo EROs (espécies reativas de oxigênio), pelo fato de que alguns reagentes altamente reativos não apresentarem o elétron desemparelhado na última camada eletrônica (SAEED *et al.* 2005).



**Fig:01-Redução tetraeletrônica do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) na mitocôndria resultando na formação de água. Observa-se a formação de EROS durante o processo. (Adaptado de COHEN,1989).**

No metabolismo aeróbico fisiológico, o oxigênio é reduzido, recebendo quatro elétrons, resultando na formação de água. Entretanto, nesse processo são formados intermediários reativos tais como radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>),

hidroperoxila ( $\text{H}_2\text{O}^\bullet$ ), radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (LIGHTFOOT, *et al.* 2006; VELLOSA, *et al.* 2007).

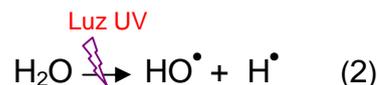
O radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) é formado após a primeira redução do  $\text{O}_2$ . Ocorre em quase todas as células aeróbicas, sendo produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos, participando no combate de infecções por vírus, bactérias e fungos. *In vivo* é produzido pelos linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, a fim de combater corpos estranhos (SAEED *et al.*, 2005; BARREIROS & DAVID, 2006; VELLOSA *et al.*, 2007 ).

Age como bactericida fraco, inativando as proteínas ferro-sulfurosas das bactérias; entretanto, gera produtos com forte atividade antimicrobiana como o ácido hipocloroso (HOCL) e, em meio aquoso, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )(equação 1) (BARREIROS & DAVID, 2006) .



O radical hidroperoxila ( $\text{H}_2\text{O}^\bullet$ ) é a forma protonada do radical superóxido. Apresenta-se mais reativo que esse, atuando na destruição de membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

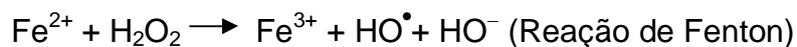
O radical hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ) é formado pela reação do peróxido de hidrogênio com metais de transição (equação<sub>3</sub>) ou pela homólise da água mediante a exposição à radiação ionizante (equação<sub>2</sub>).



É considerado o mais deletério ao organismo devido à sua meia vida ser muito curta, sendo dificilmente seqüestrado *in vivo*. Age atacando moléculas através da abstração de hidrogênio e por adição de insaturações (BARREIROS

& DAVID, 2006); se ligado a metais e estando próximo ao DNA, é capaz de ocasionar modificações das bases nitrogenadas, acarretando na inativação de genes ou em mutações no DNA (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), apesar de não ser um radical, é altamente tóxico. Atravessa camadas lipídicas, reage com a membrana eritrocitária e com o Fe<sup>2+</sup> e participa da reação que produz o (OH<sup>•</sup>), sendo considerado deletério (HERMES-LIMA, 2004; BARREIROS & DAVID, 2006).



A ação detoxificadora é um mecanismo que atua no combate ao agente oxidante, antes que esse cause lesão à célula, sendo constituído pelas enzimas: glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-PX ou GPX), catalase (CAT) ( HERMES-LIMA, 2004; VELLOSA *et al.*,2007).

## **1.2. Enzimas Antioxidantes endógenas e haptoglobina**

Mediante o estresse oxidativo, as células desenvolveram um mecanismo de homeostase, por meio da ação de enzimas antioxidantes endógenas: superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (hGPX) e catalase (CAT) (SAEED *et al.*,2005).

### **1.2.1. Superóxido Dismutase (SOD)**

Primeira enzima descoberta em 1960, constituída por quatro isoformas: SOD<sub>1</sub> (21q22.11) intracelular( CuSOD), SOD<sub>2</sub> (6q25.3) mitocondrial (MnSOD), SOD<sub>3</sub> (4p15.3) extracelular (ZnSOD), e no citossol de células ausentes em mamíferos (FeSOD) (SAEED *et al.*, 2005).

A enzima catalisa a reação de destruição do radical superóxido  $O_2^-$ ; favorecendo sua dismutação, resultando na formação de oxigênio e peróxido de hidrogênio (BARREIROS & DAVID, 2006; VELLOSA *et al.*, 2007). Uma das ações é proteger o DNA das lesões provocadas pela sobrecarga de  $Fe^{2+}$ . (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HERMES-LIMA, 2004).

#### **1.2.1.1. Patologias associadas à variação da enzima Superóxido Dismutase (SOD)**

O polimorfismo da Val-9Ala do Mn-SOD apresenta variação na frequência entre os grupos étnicos, onde o alelo alanina está presente em 12% dos Japoneses e 40-50% em brancos. A variante alanina no Mn-SOD está associada ao aumento do risco de câncer de mama, antes da menopausa, doenças neuromotoras esporádicas, nefropatia diabética, hepatopatia induzida pelo álcool e associação com Parkinson (STEWART *et al.*, 2002).

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é consequência da exposição crônica ao cigarro. Entretanto, variantes genéticas influenciam na capacidade de remodelamento do processo inflamatório e a defesa contra o estresse oxidativo pelo pulmão. Um estudo caso-controle, observou o polimorfismo das enzimas  $SOD_1$  (CuZnSOD),  $SOD_2$  (MnSOD),  $SOD_3$  (SOD extracelular), catalase (CAT) e a função pulmonar de indivíduos com resistência aos efeitos do tabagismo e portadores da DPOC. Concluiu-se que a variante 213Gly do gene  $SOD_3$ , em ratos transgênicos, apresentou maior efeito anti inflamatório conferindo alto grau de resistência, de alguns fumantes, ao desenvolvimento de doença pulmonar obstrutiva crônica (YUONG *et al.* 2006).

No câncer de mama foi observada associação ao polimorfismo Val-9Ala Mn-SOD em homens e mulheres, no sul do Brasil. Indivíduos com o genótipo AA apresentaram risco 2 vezes maior de desenvolver a patologia quando comparados aos demais genótipos AV e VV ( BICA *et al.*, 2007).

### **1.2.2. Glutathione Peroxidase ( hGPX)**

hGpx localiza-se no cromossomo 3p13-q12, é selênio dependente, possui 4 formas, GPX<sub>1</sub> (oxidoreductora extra celular), GPX<sub>2</sub> (gastrointestinal), GPX<sub>3</sub> ( presente no plasma) e GPX<sub>4</sub> (hidroperóxido fosfolipídico) (Reddy *et al.*, 2001).

A glutathione peroxidase (GPX) catalisa o peróxido de hidrogênio e demais peróxidos orgânicos em álcool por meio da conversão do GSH em GSSG, possuindo ação antioxidante, tanto no citossol, quanto na membrana citoplasmática (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Foi identificada uma variação no gene hGPX<sub>1</sub>, devido a uma mutação de ponto, na qual houve a troca de uma citosina por uma timina na posição 593, resultando na substituição do aminoácido prolina-198 por leucina (FORSBERG *et al.*, 1999, BASTAKI *et al.*, 2006).

#### **1.2.2.1. Patologias associadas à variação da Glutathione Peroxidase**

A variação na substituição do aminoácido prolina por leucina, resultado da mutação de ponto no códon 198 (C/T) da hGPX<sub>1</sub>, apresenta frequência polimórfica (p=0,066), revelou o potencial preditivo deste marcador molecular, no que se refere a recorrência do câncer superficial de bexiga. Indivíduos com o alelo variante T(Leu) apresentaram uma associação protetora quanto à recorrência do tumor (ZHAO *et al.*, 2005).

O estudo de associação entre o polimorfismo das enzimas antioxidantes SOD<sub>2</sub>, GPX e CAT e a relação entre inflamação e o linfoma não-Hodgkin's (NHL) permitiu observar que a homozigose do alelo 16Ala do gene SOD<sub>2</sub>, está associado com a redução do risco do NHL em indivíduos do Reino Unido. O alelo 197Leu do gene GPX1 foi fracamente associado com NHL e linfoma folicular. A conclusão do estudo sugere que estresse oxidativo representa um risco para o desenvolvimento do linfoma não-Hodgkin's (LIGHTFOOT *et al.*, 2006).

### **1.2.3. Catalase (CAT)**

O peróxido de hidrogênio é reconhecido como intermediário tóxico em uma grande variedade de doenças. A catalase é uma hemoproteína citoplasmática, produzida pelos peroxissomos, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água (H<sub>2</sub>O) e oxigênio (O<sub>2</sub>), sua presença exógena inibe lesões oxidativas do DNA submetidos a sobrecarga de Fe<sup>++</sup> (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O gene que codifica a enzima catalase localiza-se no cromossomo 11p13, possui 13 éxons, 12 íntrons, sua região promotora possui 527 pb. (GOTH & PAY, 2004). Algumas variações neste gene foram relatadas, tais como os SNPs presentes na região promotora da catalase C/T -262 e o 21 A/T, que também foram associadas com a acatalasemia e a hipocatalasemia (GOTH & VITAI, 1997; BASTAKI *et al.*, 2006).

O estudo da variação genética da região promotora da catalase, demonstrou maior frequência do alelo T (28%), indicando ser uma variante

genética fundamental na proteção do estresse oxidativo na população sueca (FORSBERG *et al.*, 2001).

#### **1.2.3.4. Polimorfismo da Catalase e patologias associadas**

As variações da CAT tem sido consideradas um fator importante ao aumento da susceptibilidade ao vitiligo. Essa hipótese foi levantada após detecção da baixa atividade da catalase e o concomitante acúmulo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na epiderme de pacientes com essa patologia. Após o estudo das variações tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) T/C 5'UTR; T/C éxon 9 e T/C éxon 10, observou-se associação do SNP do éxon 9 (Asp-389) com a susceptibilidade ao vitiligo, onde o alelo C é mais frequente nos pacientes, sugerindo uma alta contribuição para o déficit dessa enzima na epiderme e no acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (COURTNEY, *et al.* 2002).

A exposição crônica ao excesso de EROS pode ser a causa de dano vascular. Um estudo em indivíduos chineses demonstrou que o polimorfismo da região promotora NP773C/T (p<0.02) apresenta maior susceptibilidade para o desenvolvimento da hipertensão essencial (JIANG, *et al.*,2001).

A variação do SNP -262-C/T, presente na região promotora da Cat, foi analisada para a associação com Alzheimer sem, entretanto, terem sido encontrados resultados significativos (GOULAS *et al.*, 2002).

#### 1.2.4. Haptoglobina

Haptoglobina (do grego: *haptein-* ligar) foi descrita, por Polonovski e Jayle em 1940, como uma proteína que possuía a propriedade de ligar-se à hemoglobina livre (CARTER & WORWOOD, 2007).

A haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína do plasma que possui meia vida de 2 a 4 dias. É sintetizada pelos hepatócitos mediante a ocorrência de processos infecciosos ou inflamatórios agudos (GARBY&NOYES, 1959).

A haptoglobina tem alta afinidade pela hemoglobina livre, ligando-se à essa de forma irreversível e exercendo assim uma importante ação antioxidante mediante o potencial oxidativo da hemoglobina livre (OKAZAKI *et al.*, 1997) A hemoglobina (Hb) livre pode ser prejudicial ao organismo, pois promove o acúmulo do radical hidroxil resultante da reação de Fenton, ocasionando danos oxidativos nos tecidos (SADRZADEH, *et al.*, 1984).

O complexo Hp-Hb é removido por meio da ligação com o receptor CD163 encontrado em monócitos ou por fagocitose de macrófagos (LEVY, 2004; KRISTIANSEN *et al.*, 2001;). O ferro é liberado pela heme oxigenase e transportado pela transferrina para a medula óssea a fim de que haja nova síntese de hemoglobina. Entretanto, a haptoglobina não é reciclada e seu nível no plasma recupera-se após 5 a 7 dias (KRISTIANSEN *et al.*, 2001).

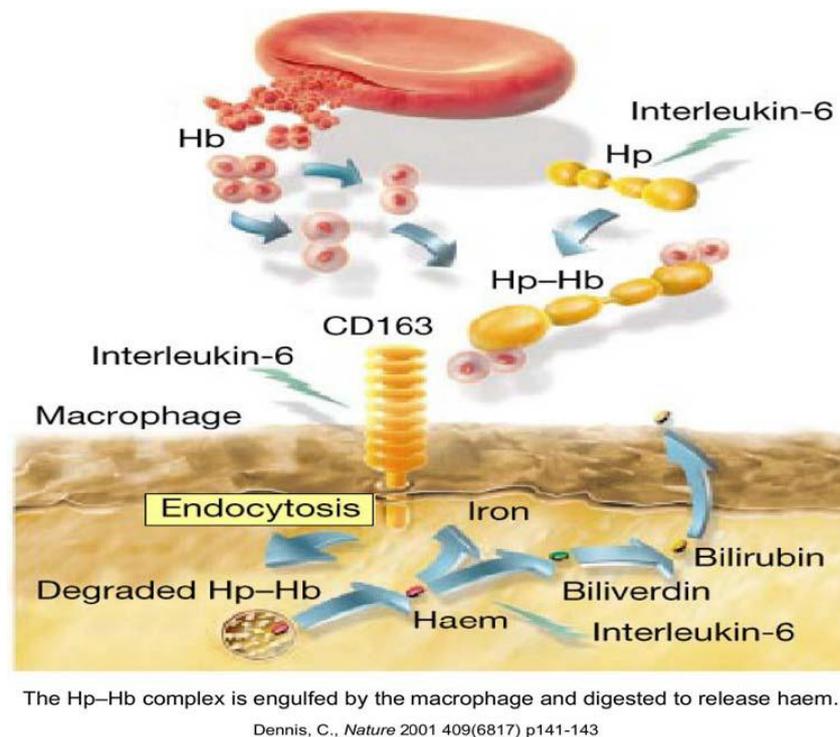


Figura 2: O complexo Hp-Hb liga-se ao receptor CD163 e sendo endocitado pelo macrófago. A IL-6 exerce um papel regulatório muito importante: assim como estimula a produção de Hp, ela também aumenta a expressão do receptor CD163 na superfície dos macrófagos e eleva a eficiência da degradação do grupo heme da Hb. Representação esquemática da endocitose do complexo Hp-Hb pelo macrófago (Adaptada de DENNIS, 2001).

A variação genética do gene da haptoglobina foi descrita por Smith em 1955, por meio de eletroforese em gel de amido. Essa variação é devida a dois alelos codominantes ( $Hp^{*1}$  e  $Hp^{*2}$ ), originando os fenótipos Hp1-1, Hp1-2 e Hp2-2. A concentração total da Hp no plasma varia de acordo com o fenótipo, sendo os valores detectados em indivíduos com fenótipo Hp 2-2 menores do que os fenótipos Hp 2-1 e Hp 1-1 (LANGLOIS & DELANGHE, 1996).



Figura 3 : Padrão de bandas observado na eletroforese em gel de amido dos fenótipos Hp1-1, Hp2-1e Hp2-2. (LANGLOIS & DELANGE, 1996).

A haptoglobina é uma proteína tetramérica formada por duas cadeias  $\alpha$  ligadas covalentemente por pontes dissulfeto a duas cadeias  $\beta$ . A proteína codificada pela cadeia  $\beta$  possui cerca de 40 KDa e é idêntica em todas as moléculas da haptoglobina, as variações descritas são encontradas na cadeia  $\alpha$  (CARTER & WORWOOD, 2007).

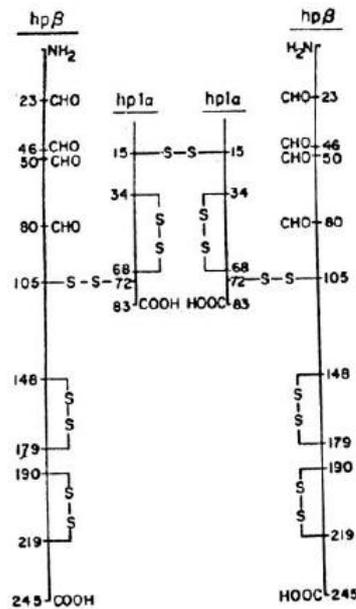


Figura 4: Estrutura molecular da haptoglobina, composta por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ , ligadas covalentemente por pontes dissulfeto ( $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ ). (LANGLOIS & DELANGHE, 1996)

O alelo  $Hp^{*1}$  é constituído por 5 éxons e codifica uma proteína de 347 aminoácidos cujo peso molecular é de 38KDa. O primeiro éxon codifica cadeia  $\alpha_1$  e os outros 4 éxons codificam a cadeia  $\beta$  (Maeda, 1991). O alelo  $Hp^{*1}$  é dividido em dois subtipos de cadeia  $\alpha_1$ , classificados conforme a velocidade de migração das bandas durante a eletroforese denominados  $Hp^{*1F}$  e  $Hp^{*1S}$ . As diferenças estruturais entre esses dois alelos estão representados na tabela 1 (CARTER & WORWOOD, 2007).

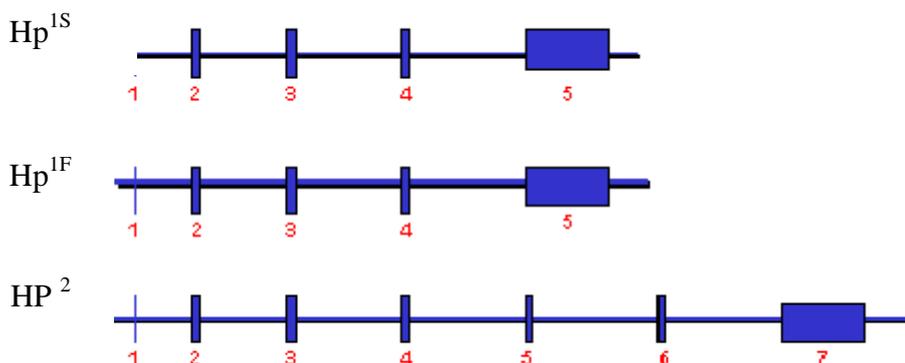
Tabela 1: Diferenças estruturais entre os alelos  $Hp^{*1F}$  e  $Hp^{*1S}$

<b>Diferenças entre <math>Hp^{*1F}</math> e <math>Hp^{*1S}</math></b>		
	$HP^{*1F}$	$HP^{*1S}$
Aminoácido 47	Valina (GTA)	Valina (GTG)
Aminoácido 51	Asparagina (AAT)	Asparagina(AAC)
Aminoácido 52	Ácido aspártico	Asparagina
Aminoácido 53	Lisina	Ácido glutâmico

(CARTER& WORWOOD, 2007)

O gene  $HP^{*2}$  possui 7 éxons que codificam uma proteína de 406 aminoácidos com massa molecular de 46KDa. Os seis primeiros éxons codificam a cadeia  $\alpha_2$  (83 aminoácidos) e o sétimo éxon codifica a subunidade  $\beta$  (MAEDA, 1991).

Foi proposto (MAEDA *et al.*, 1984; BOWMAN e KUROSKY, 1982; BLACK e DIXON 1968 ) que a cadeia  $\alpha_2$  originou-se como resultado de um “*crossing-over*” desigual ocorrido na meiose entre os éxons 3 e 4 dos genes  $Hp^{*1F}$  e  $Hp^{*1S}$ . Dessa forma, o gene  $Hp^{*2}$  apresenta 7 éxons, e não os 5 que constituem o alelo  $HP^{*1}$  (KOCH *et al.*, 2003; RAUGEI *et al.*, 1983).



**Figura 5: Representação esquemática da estrutura dos genes da Hp. Os boxes indicam os éxons (Adaptada de YANO *et al.*, 1998).**

As combinações entre esses alelos constituem 6 possíveis genótipos distintos: Hp1S-1S, Hp1S-1F, Hp1F-1F, Hp2-1S, Hp2-1F e Hp2-2 (YANO *et al.*, 1998).

#### 1.2.4.1. Haptoglobina e associação com patologias

Os estudos *in vitro* demonstraram efeito protetor do fenótipo Hp1-1 em relação ao Hp 2-2, mediante o estresse oxidativo, pois liga-se mais rapidamente à Hb livre, devido ao seu menor tamanho e acesso mais rápido aos tecidos orgânicos (GUEYE *et al.*, 2006).

A análise do polimorfismo da haptoglobina em 49 indivíduos jovens e saudáveis portugueses demonstrou a associação dos genótipos Hp2-2 com o aumento da susceptibilidade a lesões oxidantes, em uma idade mais precoce e conseqüente aterosclerose na vida adulta (COELHO *et al.*, 2006).

A associação entre haptoglobina e cardiopatias tem demonstrado que o fenótipo Hp2-2 está associado ao aumento do risco de doenças cardíacas se comparados com grupo controle (GOGISHVILI *et al.*, 1985). O dano após o

infarto agudo do miocárdio é muito maior em indivíduos com fenótipo Hp 2-2, em relação aos indivíduos que apresentam os outros fenótipos, sugerindo ser um fator de risco genético para aterosclerose coronariana, independentemente da exposição aos outros fatores de risco para essa patologia, como tabagismo, diabetes, hipercolesterolemia (STEIN & MCBRIDE, 1998; VAN VLIERBERGHE *et al.*, 2004). O fenótipo Hp2-2 confere menor proteção ao estresse oxidativo nas artérias de pacientes portadores de placas ateroscleróticas, sugerindo também ser um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão refratária (DELANGHE *et al.*, 1995).

Os estudos das propriedades antioxidantes da Hp em pacientes com Diabetes Mellitus (DM), concluíram que pacientes com fenótipo Hp1-1 possuíam maior proteção contra o estresse oxidativo seguido dos fenótipos Hp1-2 e Hp2-2 (LEVY *et al.*, 2000; NAKHOUL *et al.*, 2001; ASLEH *et al.*, 2003; LEVY *et al.*, 2004).

Essa proteína apresenta grande interesse em estudos de populações e de associações com doenças, pois a distribuição dos alelos da Hp apresentam diferenças geográficas marcantes, como também, as propriedades funcionais são dependentes dos fenótipos (LANGLOIS & DELANGHE, 1996) .

### **1.3. Sistema de Avaliação de Danos no DNA: Eletroforese de Células Isoladas (*Single cell gel electrophoresis*)-Ensaio Cometa**

Uma maneira de se observar alterações no DNA, em função do desbalanço entre agentes oxidantes e a defesa antioxidante, foi através do ensaio cometa, (*Single Cell Gel Electrophoresis* -SCGE). Trata-se de uma metodologia simples e muito difundida nos estudos genotoxicológicos para avaliar danos e reparos no DNA em células eucarióticas individuais (MONTEITH e VANSTONE,1995; COLLINS, 2004; MOLLER, 2005). É rápida, muito sensível e de baixo custo (HENERDERSON *et al.*,1998; GARCIA *et al.*, 2004), além de requerer pequeno número de células por amostra, pouco tempo necessário para completar o estudo e relativo baixo custo (BRENDLER-SCHWAAB, *et al.* 2005).

O ensaio cometa pode ser utilizado para avaliar quebras de fita simples e dupla do DNA, tanto nas células em divisão celular quanto em células não proliferativas (HARTMAN *et al.*, 2003).

Neste teste, células embebidas em agarose têm suas membranas lisadas pela ação detergente do tampão e suas proteínas histonas são extraídas através da ação de altas concentrações de sal (NaCl). Proteínas da matriz nuclear resistem a esse tipo de extração, havendo a formação de um resíduo chamado nucleóide. Conforme o grau de quebras no DNA, esse sofrerá alterações na sua conformação, que após a eletroforese em meio básico, (PH>13) pode ser visualizado em microscópio de fluorescência (COLLINS, 2004).

## **2. Hipótese**

As variações genéticas das enzimas antioxidantes endógenas e da haptoglobina, determinam diferenças na suscetibilidade a danos no DNA causados pelo estresse oxidativo.

## **2.1. Justificativa**

A variabilidade genética de enzimas antioxidantes e a relação com a fisiopatologia de diversas doenças têm sido descritas de forma constante na literatura científica.

O mecanismo antioxidante celular tem ação protetora no sentido de reparar e ou evitar os danos no material genético (HERMES-LIMA, 2004). A variação genética das enzimas que participam deste mecanismo, leva à sugestão de diferenças individuais quanto ao grau de proteção antioxidante. O teste do cometa é uma metodologia adequada para o estudo de danos no DNA, muito utilizada na literatura científica, tendo como controle positivo o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). O grupo de pesquisa do laboratório de Genética –UnB, após padronização do teste do cometa, vem estudando o estresse oxidativo em indivíduos sadios, através da avaliação do polimorfismo da haptoglobina, onde observou-se que os homozigotos Hp1-1 apresentaram menor dano no DNA após exposição ao peróxido de hidrogênio, seguido de uma proteção intermediária dos heterozigotos (Hp2-1) e por último do homozigotos do alelo 2 (Hp2-2) ( MOREIRA, 2006).

No intuito de abranger o estudo sobre a variabilidade individual aos agentes oxidantes, em indivíduos jovens e sadios, tornou-se relevante pesquisar a variação genética das principais enzimas antioxidantes endógenas: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e haptoglobina. A principal finalidade foi observar o grau de suscetibilidade de dano no DNA conferido pelos genótipos do indivíduo e sua ação protetora

mediante o estresse oxidativo, causado por diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, tendo como metodologia o teste do cometa.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Analisar a suscetibilidade ao dano no DNA causado pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e associar com a variação genética das enzimas oxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e haptoglobina (Hp) em indivíduos jovens saudáveis.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Determinar os genótipos dos indivíduos e estimar as frequências dos diferentes genótipos das enzimas: catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e haptoglobina.
- Analisar o dano ao DNA submetido à ação do peróxido de hidrogênio.
- Analisar a relação da variação das enzimas antioxidantes com o dano ao DNA.

## **4. Material e Métodos**

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília ( UnB), registro no CEP nº 092/2008 , processo nº:0056.0.012.000-07

### **4.1. Critérios para seleção da amostra**

A amostra constitui-se de 52 indivíduos voluntários, saudáveis, de ambos os sexos na faixa etária de 17 a 32 anos, não aparentados, residentes no Distrito Federal.

### **4.2. Tipo de Estudo**

Trata-se de um estudo Quase-Experimental, método quantitativo, amostra por conveniência, no qual o voluntário, após autorização escrita do uso de material biológico na pesquisa, respondeu a um questionário, presente no anexo I.

#### **4.2.1. Coleta e Processamento das Amostras**

Foram coletados 5 ml de sangue periférico de 52 indivíduos jovens e saudáveis, na Universidade de Brasília, entre os meses de julho e dezembro de 2007. O sistema de coleta foi por sistema a vácuo, com material estéril e descartável. Parte desse material (360µL) foi destinado a realização do teste do cometa e o restante foi centrifugado para a separação do sangue total em 03 alíquotas: plasma, hemácias e leucócitos- *buffy coat* – sendo cada um desses dispostos em tubos de polipropileno de 2ml com numeração adequada para manter a privacidade do doador e armazenados em freezer 4°C. A

extração de DNA, da porção leucocitária, foi processada com o kit GFX™ da *Amersham Biociences*, de acordo com as especificações do fabricante. O material biológico encontra-se estocado no Laboratório de Genética da Universidade de Brasília, responsável pela guarda das amostras, sendo o local de acesso restrito somente aos pesquisadores envolvidos no projeto.

### **4.3. Ensaio do cometa**

O ensaio cometa foi realizado com sangue total fresco. O controle positivo foi constituído de lâminas submetidas à exposição com água oxigenada nas concentrações de 250 µM e 1mM por 5 minutos a 0°C. Para o controle negativo, as lâminas não foram submetidas á exposição da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após o preparo, as lâminas ficaram em uma solução de lise (2,5M NaCl; 100mM EDTA; 10mM Tris; pH 10,0 e 1% lauroyl sarcosine), 1 mL de Triton X-100 e 10 mL DMSO) a 4°C, protegidas da luz, por um tempo mínimo de 1 hora. Após esse tempo, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese totalmente cobertas com tampão (0,2M EDTA; 10M NaOH pH > 13,0) a 4°C , por 30 minutos antes do início da eletroforese a 250V, 350 mA, por 40 minutos. Após a eletroforese, as lâminas ficaram imersas em um tampão de neutralização (Tris, pH:7,5) por 30 minutos, secaram à temperatura ambiente por 1 hora e foram fixadas com etanol 100% por 5 minutos. O processo de coloração foi feito com brometo de etídio. A visualização foi realizada em microscópio de fluorescência Zeis Axiohop 2 com filtro de barreira verde de 510-560nm e aumento de 400x.

## Ensaio Cometa

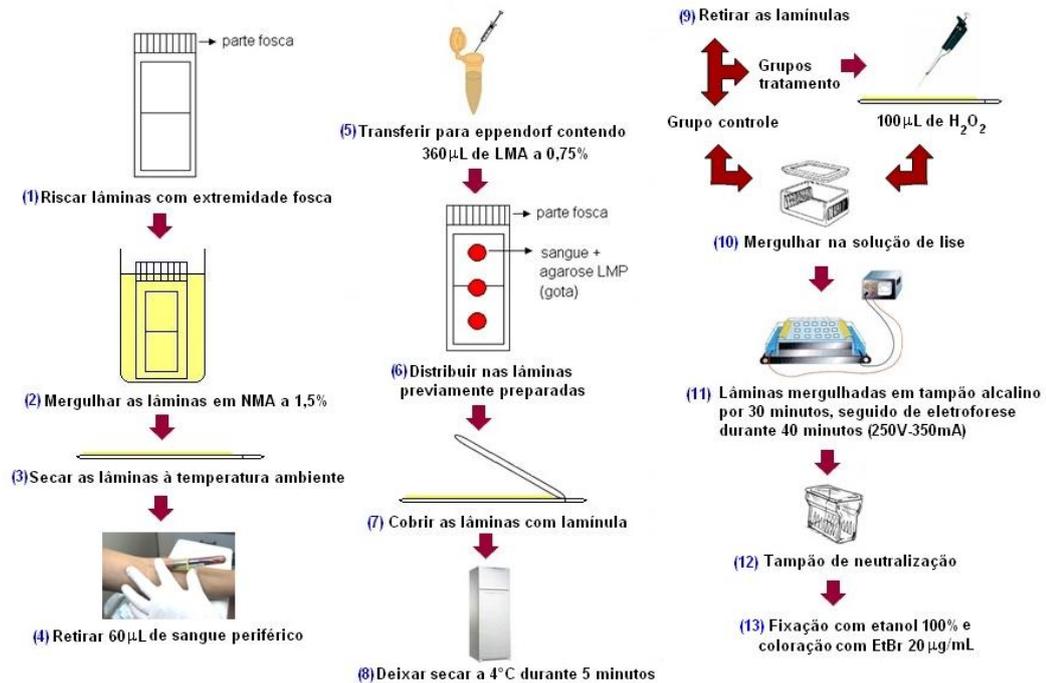


Figura 5.1-Delineamento experimental do ensaio cometa

Os níveis de dano no DNA foram classificados em cinco categorias diferentes (0,1,2,3,4) de acordo com os padrões estabelecidos na literatura descritos na figura 6 (COLLINS *et al.*, 1995).

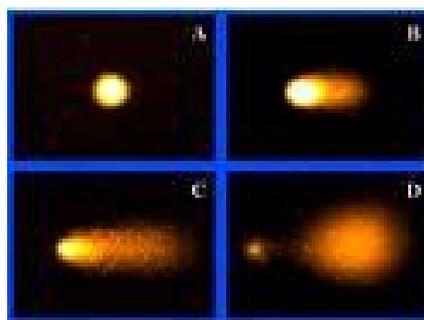


Fig 6: Ensaio cometa: (a) nucleóide grande e ausência de cauda, caracterizando dano zero no DNA; (b) Nucleóide grande e cauda pequena, logo há pouco DNA degradado constituindo dano grau 2; (C) Nucleóide médio e grande quantidade de DNA degradado formando uma grande cauda caracterizando, dano 3; (D) Nucleóide pequeno, DNA degradado disposto de forma difusa, caracterizando apoptose.

<b>Classificação</b>	<b>Características do cometa</b>	<b>Descrição do dano no DNA</b>
<b>0</b>	❖ Ausência de cauda ❖ Núcleo grande	Nenhum dano
<b>1</b>	❖ Cauda pequena ❖ Nucleóide grande	Pouco Dano
<b>2</b>	❖ Nucleóide e cauda de tamanhos médios	Dano médio
<b>3</b>	❖ Nucleóide de tamanho médio ❖ Cauda grande	Dano grande
<b>4</b>	❖ Nucleóide pequeno ❖ Cauda longa e difusa	Núcleo apoptótico

Os danos oxidativos causados nos linfócitos foram, classificados conforme na fig 06 e o índice de dano foi calculado pela fórmula:

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

No qual n1, n2, n3 e n4 são o nº de células classificadas nas categorias de 0 a 4, podendo o ID variar de zero, ausência de dano a 400, todas as células com o máximo de dano ao DNA ( COLLINS *et al.*, 1995).

#### **4.4. Genotipagem das enzimas antioxidantes endógenas**

Após a extração do DNA e conservação em freezer a 4°C, cerca de 1 µL, foi adicionado a um MIX (contendo a enzima Taq polimerase, Primer/iniciador específico para cada região de interesse do gene que codifica

cada uma das enzimas, descrito na tabela 02 e solução tampão) com a finalidade de submeter à reação de polimerase em cadeia (PCR).

O produto da PCR foi submetido à ação da enzima de restrição, descrito na tabela 02, e posteriormente ao processo de separação de fragmentos por meio de corrente elétrica e peso molecular - eletroforese em gel de acrilamida 6% e 10%, sendo esses submetidos à coloração com nitrato de prata 1%.

Tabela 01. Seqüência dos iniciadores e enzimas de restrição utilizadas para análise dos loci MN- SOD, hGPX1, CAT .

Marcadores	Seqüência do Primer ou Iniciador	Enzima de Restrição
<b>Mn-SOD2</b>	Sense	<i>Ngo IV</i>
	(5'ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCGG3')	
(MITRUNEN <i>et al.</i> , 2001)	Antisense	
	(5'GCGTTGATGTGAGGTTCCAG 3')	
<b>hGPX1</b>	Sense	<i>Apa I</i>
	(5'-AGCCCAACTTCATGCTCTTC-3')	
(ZHAO <i>et al.</i> , 2005)	Antisense	
	(5'-CAGGTGTTCCCTCGTAG-3')	
<b>CAT</b>	Sense	<i>Hinf I</i>
	(5'-AATCAGAAGGCAGTCCTCCC-3')	
(UKKOTA <i>et al.</i> , 2001)	Antisense	
	(5'-TCGGGGAGCACAGAGTGTAC-3')	

<b>Haptoglobina</b>	Seqüência de oligonucleotídeos (5'-3')
(YANO <i>et al.</i> , 1998)	F3- CAGGAGTATACACCTTAAATG
	S2- TTATCCACTGCTTCTCATTG
	C42- TTACTGGTAGCGAACCGA
	C72- AATTTAAAATTGGCATTTCGCC
	C51- GCAATGATGTCACGGATATC

Tabela 02. Programação do termociclador (PTC-100 MJ (MJ Research PTC 100 Thermal Cycler) para realização da Reação em Cadeia Polimerase-PCR

### Mn-SOD

MIX	Programa do Termociclador
<i>Tris-Hcl 50mM</i>	Denaturação do DNA a 95°C por 5 min
<i>Nacl 100 mM</i>	35 ciclos de amplificação 95°C por 1 min ( <i>melting</i> )
<i>EDTA 0,1mM</i>	61°C por 1 min (temperatura de anelamento)
<i>DTT 1mM</i>	72°C por 2 min
<i>Glicerol 50%</i>	72°C por 7 min (final da extensão do fragmento de DNA)
<i>Triton 1%</i>	Produto da PCR: 107 pb
<i>dNTP 2mM</i>	O produto da PCR foi submetido ao processo de digestão,
<i>Mgcl<sub>2</sub> 2mM</i>	utilizando-se a enzima de restrição <i>NgoM IV</i> a 37°C por 16
<i>Primer 20 pmol/μL</i>	horas. O resultado da digestão será: fragmentos com
<i>Taq polymerase 1,25 μL</i>	Alelo 1 (Val) não tem sítio de restrição: 107 pb
<i>DNA 50ng</i>	Alelo 2 (Ala) gera 2 fragmentos: 89 pb e 18 pb
<i>Volume total: 50 μL</i>	

## hGPX1

MIX	Programa do Termociclador
<i>Tris-Hcl 1mM</i>	Denaturação do DNA a 94°C por 5 min
<i>kcl 500 mM</i>	35 ciclos de amplificação 94°C por 30 segundos
<i>EDTA 0,1mM</i>	55°C por 30 segundos
<i>Glicerol 50%</i>	72°C por 45 segundos
<i>Triton X-100-1%</i>	72°C por 7 min (final da extensão do fragmento de
<i>dNTP 0,25mM</i>	DNA)
<i>Mgcl<sub>2</sub> 2,5mM</i>	Posteriormente, 15µL do produto da PCR será digerido pela
<i>Primer 0,5µM</i>	enzima de restrição ApaEI - <i>overnight</i> a 37°C
<i>Taq polymerase 2 U</i>	Genótipos: 1-1 ou CC-195, 117 e 88 pb ( fragmentos)
<i>DNA 50ng</i>	1-2 ou CT- 205,195,117 e 88pb
	2-2 ou TT- 205 e 195 pb

## CAT

MIX	Programa do Termociclador
<i>dNTP 0,2mM</i>	Denaturação do DNA a 94°C por 5 min
<i>Mgcl<sub>2</sub> 15mM</i>	32-35 ciclos de amplificação 94°C por 1min
<i>Primer 10pmol</i>	60°C por 1 min
<i>Taq polymerase 1 U</i>	72°C por 1 min
<i>DNA 50ng</i>	72°C por 7- 10 min (final da extensão do fragmento de DNA)
	Posteriormente, 15µL do produto da PCR foi digerido por 5-10U
	da enzima de restrição Hinf I, durante 2hs.O polimorfismo
	observado da região promotora da 21 A/Tcatalase :
	AA: 2 fragmentos: 177 pb e 73 pb
	AT: 3 fragmentos: 250 pb, 177pb e 73 pb
	TT: 1 fragmento de 250 pb

## Haptoglobina

MIX	Programa do Termociclador
<i>dNTP</i> 0,2mM	Denaturação do DNA a 95°C por 3 min
<i>MgCl<sub>2</sub></i> 15mM	35 ciclos de amplificação
Primer 10pmol	94°C por 40segundos
<i>Taq polymerase</i> 1 U	58°C por 1 min
DNA 50ng	72°C por 2 min (final da extensão do fragmento de DNA)

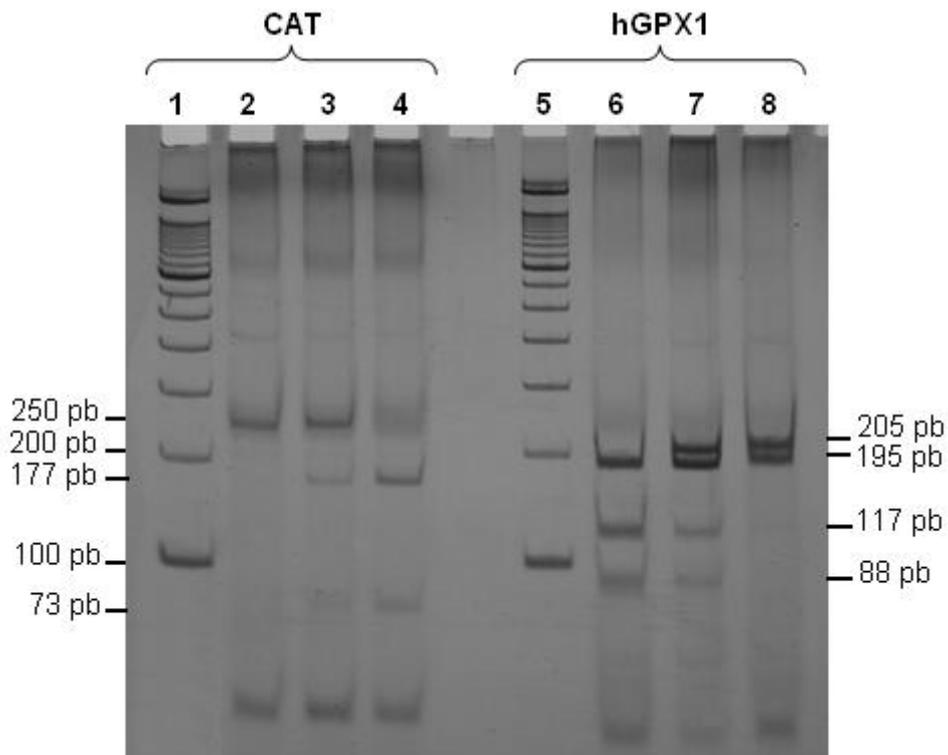


Figura7 : Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, no qual observa-se o polimorfismo da região promotora da catalase 21 A/T. O poço 2 contém o homozigoto TT de 250 pb, no poço 3 observa-se o heterozigoto A/T(250, 177 e 73 pb) e poço 4 A/A (177 e 73 pb). Os poços 6- GPX 1-1- (Pro/Pro),7- GPX1-2 (Pro/Leu),8- GPX2-2 (Leu/Leu) compreendem o polimorfismo da hGPX1(PRO198LEU), Aplicado em gel de poliacrilamida a 10%.

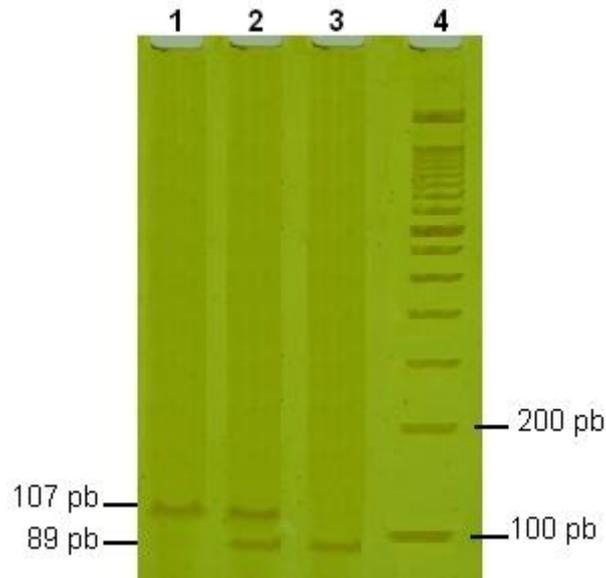


Figura 8: Polimorfismo da MNSOD (Val/9Ala), em gel de poliacrilamida 6%.  
1-SOD1-1 (Val/Val) ; 2- SOD1-2 (Val/Ala); 3-SOD 2-2 (Ala/Ala).

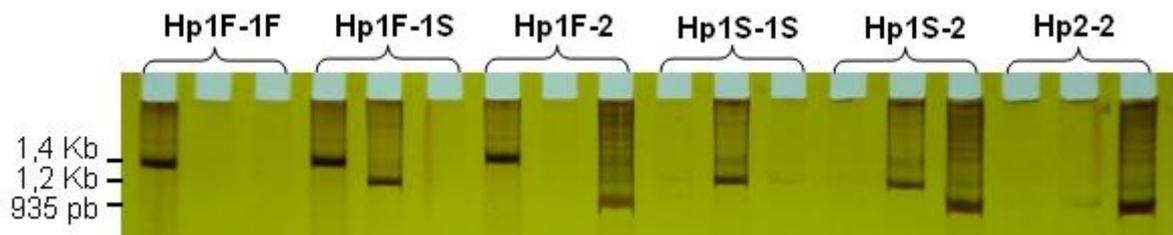


Figura 9: Polimorfismo da haptoglobina, em gel de poliacrilamida 6%

#### 4.4 Análise Estatística

Os dados foram submetidos ao Teste de normalidade de Shapiro-Wilk- $\alpha = 5\%$ . Após constatação que esses não apresentavam uma distribuição normal, foram utilizados os Testes não-paramétricos de Friedman e de Wilcoxon.

## 5. Resultados

A tabela 3 apresenta os dados das freqüências gênicas e genotípicas dos sistemas enzimáticos e protéico analisados. A única distribuição fenotípica que se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg é da haptoglobina.

Tabela 3: Distribuição dos genótipos dos sistemas enzimáticos e protéico na amostra deste estudo.

MARCADOR	FREQUÊNCIA GENOTÍPICA	FREQUENCIA ALÉLICA	$\chi^2$	p
<b>Catalase</b>				
1-1 (T-T)	0,46	$Cat^{*1}$ -0,6	12,36	p<0,05
1-2 (A-T)	0,27	$Cat^{*2}$ -0,4		
2-2 (A-A)	0,27			
<b>SOD2</b>				
1-1 (Val/Val)	0,08	$SOD2^{*1}$ -0,53	37,64	p< 0,05
1-2 (Val/Ala)	0,92	$SOD2^{*2}$ -0,46		
2-2 (Ala/Ala)	0			
<b>GPX1</b>				
1-1 (Pro/Pro)	0,46	$GPX1^{*1}$ -0,64	16,59	p<0,05
1-2(Pro/Leu)	0,36	$GPX1^{*2}$ -0,36		
2-2 Leu/Leu)	0,17			
<b>Hp fenótipo</b>				
1-1	0,27	$Hp^{*1}$ -0,47	1,93	p>0,05
1-2	0,40	$Hp^{*2}$ -0,53		
2-2	0,33			
<b>Hp genótipo</b>				
1F-1F	0,05	$Hp^{*1F}$ -0,16	19,86	p<0,05
1F-1S	0,07			
1F-2	0,13	$HP^{*1S}$ -0,32		
1S-1S	0,15			
1S-2	0,25	$Hp^{*2}$ -0,52		
2- 2	0,32			

Valor significati vo  $\alpha=0,05$ .

### 5.1. Distribuição dos índices de danos no controle e tratamentos nos diferentes genótipos dos sistemas enzimáticos e protéico estudados.

Inicialmente foi realizada a análise dos dados da distribuição dos índices de danos nos genótipos, considerando controle e tratamentos. A distribuição dos índices de danos em alguma dessas classes não apresentaram distribuição normal (teste de normalidade de Shapiro-Wilk, nível de significância de 5%). Diante desses resultados foram utilizados para as análises estatísticas os testes não-paramétricos de Friedman e de Wilcoxon.

Para cada enzima/proteína foi utilizada a mesma série de análises: i) análise da distribuição dos índices de danos dos controles e tratamentos (250mM e 1mM) dentro de cada genótipo; ii) se apresentaram diferenças significativas, análise par a par com cada controle e tratamento dentro de cada genótipo.

### 5.2. Análise dos dados nos genótipos da CAT

Os resultados da distribuição dos índices de danos em cada genótipo da enzima catalase (Tabela 4 e 5) indicam haver diferenças significativas entre os três grupos analisados (controle, 250mM e 1mM).

Tabela 4: Análise da distribuição de ID nos genótipos da CAT (teste de Friedman). \*diferença significativa e \*\* diferença altamente significativa.

Genótipo	N	GL	Chi-quadrado	p
CAT 1-1	24	2	8,77	0,012**
CAT 1-2	14	2	14,51	0,0007**
CAT 2-2	14	2	9,93	0,007**

Tabela 5: Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos genótipos da CAT. \*diferença significativa e \*\* diferença altamente significativa.

Genótipo	N	Comparação	T	Z	p
CAT 1-1	24	CTRL x 250	85,50	1,84	0,07
		CTRL x 1	55,50	2,70	0,007**
CAT 1-2	14	CTRL x 250	4,00	3,04	0,002**
		CTRL x 1	2,00	3,04	0,002**
CAT 2-2	14	CTRL x 250	29,0	1,48	0,140
		CTRL x 1	13,0	2,48	0,013**

A Figura 10 apresenta a distribuição dos ID em gráfico de barras. Nos grupos controles o genótipo CAT 1-2 apresentou menor ID seguido dos genótipos CAT 1-1 e CAT 2-2. A distribuição dos ID entre controles e os dois grupos de tratamentos apresentaram diferenças significativas no genótipo CAT 1-2. Nos genótipos CAT 1-1 e CAT 2-2 a distribuição dos ID apresentou diferença significativa somente entre os controles e a maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observa-se também que em todos os genótipos os valores mais elevados dos ID são detectados no grupo de tratamento de maior concentração.

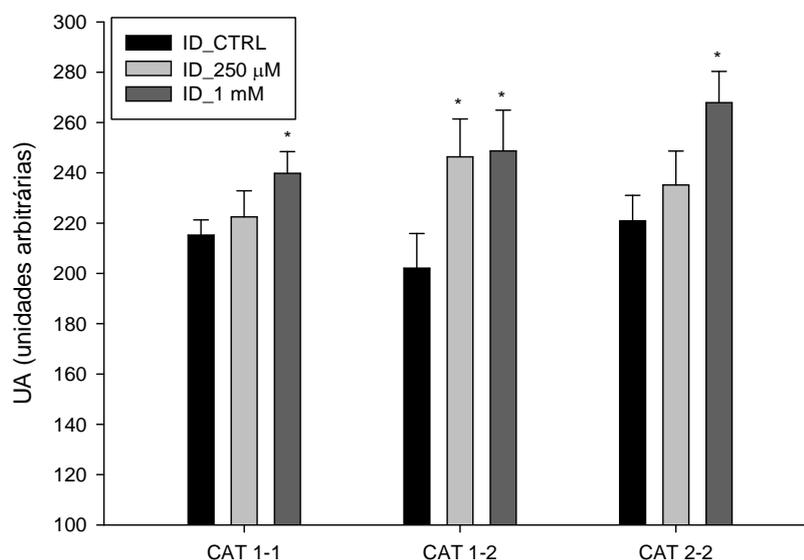


Figura 10: Distribuição dos ID (CTRL, 250 µM e 1 mM), em unidades arbitrárias, em cada genótipos (CAT 1-1, n=24; CAT 1-2, n= 14; CAT 2-2, n=14). As barras representam os valores médios de cada grupo e o Erro Padrão da Média. Os asteriscos indicam os grupos que são significativamente diferentes do controle.

### 5.3. Análise dos dados nos Genótipos da hGPX1

A distribuição dos ID entre os 3 grupos (controle e de tratamentos) apresentam diferenças significativas para os 3 genótipos da hGPX1 (Tabela 6). Para todos os genótipos, os valores do ID apresentam diferenças significativas quando comparados os grupos controle e cada um dos tratamentos (Tabela 7).

Tabela 6: Análise da distribuição de ID nos genótipos da CAT (teste de Friedman). \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

Genótipo	N	GL	Chi-quadrado	p
hGPX 1-1	24	2	9,74	<b>0,008**</b>
hGPX 1-2	19	2	16,53	<b>0,0003**</b>
hGPX 2-2	9	2	6,23	<b>0,044*</b>

Tabela 7: Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos genótipos da hGPX1(\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ )).

Genótipo	N	Comparação	T	Z	p
hGPX 1-1	24	CTRL x 250	78,00	2,06	<b>0,040*</b>
		CTRL x 1	42,00	2,92	<b>0,004**</b>
hGPX 1-2	19	CTRL x 250	42,00	2,13	<b>0,033*</b>
		CTRL x 1	15,00	3,22	<b>0,001**</b>
hGPX 2-2	9	CTRL x 250	3,00	2,31	<b>0,021*</b>
		CTRL x 1	5,50	2,01	<b>0,044*</b>

A Figura 11 apresenta a distribuição dos ID em gráfico de barras. Os indivíduos do genótipo hGPX2-2 apresentaram menores ID no controle, quando comparados aos controles dos outros dois genótipos. Observa-se a existência de uma gradação no sentido de maiores valores dos ID na ordem controles, tratamento 250mM e 1mM, principalmente nos genótipos hGPX1 1-1 e hGPX1 1-2.

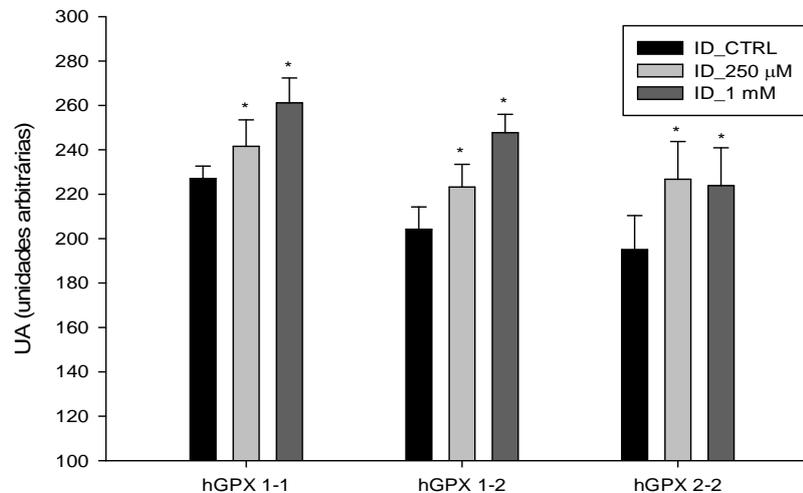


Figura 11: Distribuição do ID (CTRL, 250  $\mu$ M e 1 mM), em unidades arbitrárias, em cada genótipo (hGPX1-1, n=24; hGPX1-2, n=19; hGPX2-2, n=9). As barras representam os valores médios de cada grupo e o Erro Padrão da Média. Os asteriscos indicam os grupos que são significativamente diferentes do controle.

#### 5.4. Análise dos dados nos Fenótipos e Genótipos da HP

As análises da distribuição dos ID para a haptoglobina foram realizadas utilizando os 3 principais fenótipos da haptoglobina e também considerando os 6 genótipos, apesar do pequeno tamanho amostral em cada classe genotípica.

Os valores de ID são diferentes entre os grupos (controle, 25mM e 1mM) em todos os fenótipos da haptoglobina (Tabela 8). Na análise do ID entre o controle e cada um dos tratamentos foi observado que somente o fenótipo Hp 2-2 apresenta diferenças significativas entre todos os grupos. Os fenótipos Hp 1-1 e Hp 2-1 apresentam valores de ID significativamente maiores somente no grupo de tratamento de 1mM ( tabela 9).

Tabela 8: Análise da distribuição de ID nos fenótipos da Hp (teste de Friedman). \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

Fenótipo	N	GL	Chi-quadrado	p
HP FEN 1-1	14	2	6,87	0,032*
HP FEN 1-2	21	2	10,67	0,005**
HP FEN 2-2	17	2	15,12	0,0005**

Tabela 9: Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos fenótipos da Hp (\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ )).

Genótipo	N	Comparação	T	Z	p
HP FEN 1-1	14	CTRL x 250	23,00	1,85	0,064
		CTRL x 1	11,00	2,61	0,009**
HP FEN 1-2	21	CTRL x 250	61,00	1,89	0,058
		CTRL x 1	24,50	3,16	0,0016**
HP FEN 2-2	17	CTRL x 250	20,00	2,67	0,007**
		CTRL x 1	19,00	2,53	0,011**

Os dados apresentados em gráfico de barras na Figura 12 observa-se que entre os controles, os menores valores do ID foram detectados no fenótipo HP 1-2 , seguido do HP 1-1 e Hp2-2.

Observa-se a existência de uma gradação no sentido de maiores valores dos ID na ordem: controles, tratamento 250mM e 1mM, em todos os fenótipos da haptoglobina, apesar das diferenças não serem significativas entre os controles e o tratamento 250 $\mu$ M dos fenótipos Hp 1-1 e Hp 2-1.

Também observa-se que o fenótipo Hp2-2 apresentou maiores valores de ID, tanto no controle quanto nas concentrações de 250  $\mu$ M e 1 mM de peróxido, em relação aos diferentes grupos dos fenótipos Hp 2-1 e Hp 1-1.

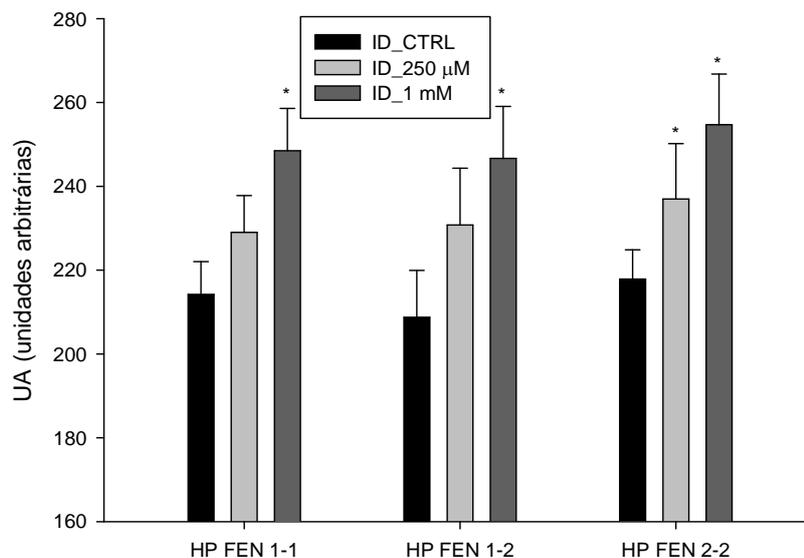


Figura 12: Distribuição dos ID (CTRL, 250  $\mu$ M e 1 mM), em unidades arbitrárias, em cada fenótipo (HP 1-1, n=14; HP 1-2, n= 21; HP 2-2, n=17). As barras representam os valores médios de cada grupo e o Erro Padrão da Média. Os asteriscos indicam os grupos que são significativamente diferentes do controle.

As análise dos ID nos diferentes genótipos da Hp estão apresentadas na tabela 10, onde observa-se que somente nos genótipos Hp1S-2 e Hp 2-2, os que apresentam maior número amostral, detecta-se diferenças significativas entre os grupos estudados (controle, 25mM e 1mM). Observa-se que no genótipo Hp 2-2 há diferença significativa entre os ID do controle e dos 2 tratamentos, enquanto que no genótipo Hp1S-2 encontrou-se variação significativa dos ID, somente do controle e o tratamento de maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Tabela 11).

Tabela10: Análise da distribuição de ID nos genótipos da Hp (teste de Friedman). \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

Genótipo	N	GL	Chi-quadrado	p
HP 1F-1F	3	2	0,67	0,72
HP 1F-1S	4	2	2,00	0,37
HP 1F-2	8	2	3,25	0,20
HP 1S-1S	7	2	4,67	0,10
HP 1S-2	13	2	8,51	0,01*
HP 2-2	17	2	15,12	0,0005**

Tabela 11: Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos genótipos HP 1S-2 e HP 2-2, (\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ )).

Genótipo	N	Comparação	T	Z	p
HP 1S-2	13	CTRL x 250	1,29	0,20	0,20
		CTRL x 1	10,00	2,48	0,013**
HP 2-2	17	CTRL x 250	20,00	2,67	0,007**
		CTRL x 1	19,00	2,53	0,014**

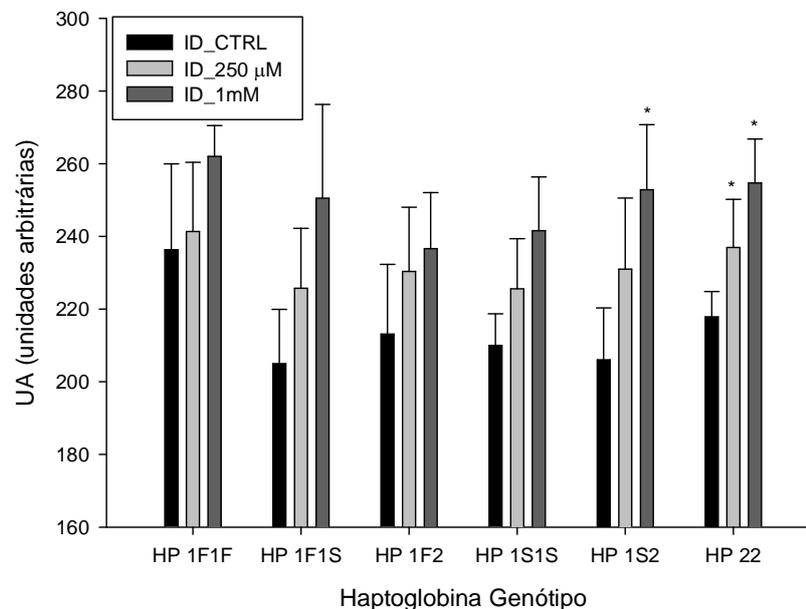


Figura 13: Distribuição dos ID (CTRL, 250 µM e 1 mM), em unidades arbitrárias nos diferentes genótipos da Hp (HP 1F-1F, n=3; HP 1F1S, n= 4; HP 1F-2, n=8, HP 1S-1S n=7, HP1S-2 n=13, HP 2-2 n=17). As barras representam os valores médios de cada grupo e o Erro Padrão da Média. Os asteriscos indicam os grupos que são significativamente diferentes do controle

A distribuição dos ID nas classes genótípicas (Figura 13) apresenta os números amostrais dentro de cada classe genotípica muito pequeno, assim não é adequado fazer-se comparações com esses dados, como foi feito em relação aos fenótipos da Hp.

### 5.5. Análise dos dados nos Genótipos da SOD2 ou MnSOD

A distribuição dos ID entre os 3 grupos (controle e de tratamentos) apresentam diferenças significativas somente para o genótipos SOD2-1 (Tabela 12). Neste genótipo, os valores dos ID apresentaram diferenças significativas dos grupos controles com cada um dos tratamentos (Tabela 13). É importante ressaltar que o número de indivíduos heterozigotos é muito maior que o esperado e a ausência de indivíduos do genótipo SOD 2-2 detectados nesta amostra.

Tabela 12: Análise da distribuição de ID nos genótipos da SOD2 (teste de Friedman). \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ).

Genótipo	N	GL	Chi-quadrado	p
SOD 1-1	4	2	1,50	0,47
SOD 1-2	48	2	30,01	0,0000**

Tabela 13 : Resultados da análise da distribuição dos ID (Teste de Wilcoxon pareado), entre controle e tratamentos nos genótipos da SOD2 (\*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) e \*\* diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ )).

Genótipo	N	Comparação	T	Z	p
SOD 1-1	4	CTRL x 250	4,00	0,37	0,72
		CTRL x 1	3,00	0,73	0,47
SOD 1-2	48	CTRL x 250	228,00	3,69	0,0002**
		CTRL x 1	119,50	4,70	0,0000**

Os dados apresentados em gráfico de barras na Figura 14 observa-se que entre os controles, os menores valores do ID foram detectados no genótipo

SOD1-2, onde observa-se um aumento significativo de ID em relação à maior concentração. Essa mesma relação não foi verificada no genótipo SOD 1-1.

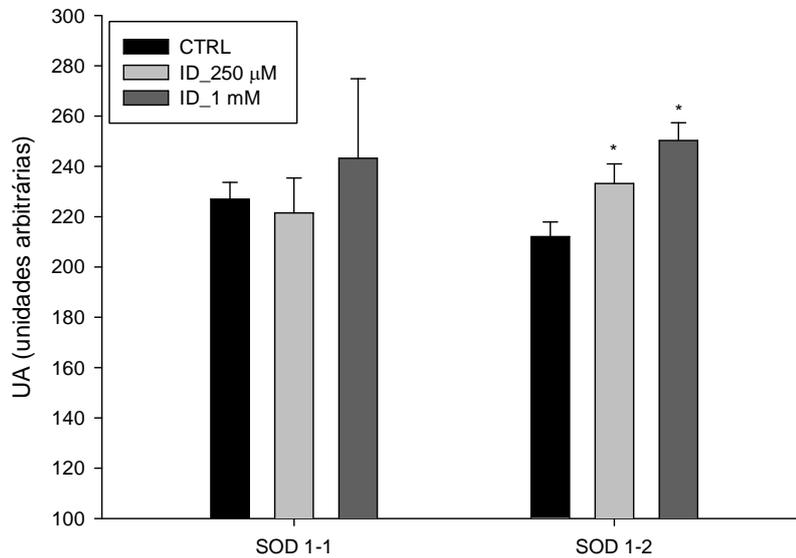


Figura 14: Distribuição dos ID (CTRL, 250  $\mu$ M e 1 mM), em unidades arbitrárias nos diferentes genótipos da SOD2 (SOD 1-1, n=4; SOD 1-2, n=48). As barras representam os valores médios de cada grupo e o Erro Padrão da Média. Os asteriscos indicam os grupos que são significativamente diferentes do controle

## 6. Discussão

No processo de respiração celular há produção de intermediários metabólicos reativos tais como radicais superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidroperoxila ( $H_2O^{\cdot}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esses são caracterizados como EROS (Espécies Reativas ao Oxigênio), responsáveis pelo estresse oxidativo cuja ação sobre o DNA pode levar a mais de 20 tipos de danos nas bases nitrogenadas (COOKE *et al.*, 2003).

As enzimas antioxidantes endógenas, catalase, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, por meio da ação detoxificadora, agem sobre os EROS, reduzindo possíveis danos no DNA. Como o estresse oxidativo vem sendo associado ao envelhecimento, a inflamação, e está envolvido na etiologia do câncer e em diversas patologias, a literatura apresenta estudos que avaliam a influência da variação das enzimas antioxidantes na suscetibilidade a essas patologias (CHOI *et al.*, 2007, ZANGH *et al.*, 2008).

O presente trabalho estudou a variabilidade genética da região promotora da catalase (21A/T), hGPX<sub>1</sub> (Pro198Leu), SOD<sub>2</sub>(Val-9Ala) e haptoglobina em relação à indução de EROS, *in vitro*, em indivíduos jovens e saudáveis.

### 1- Catalase

As freqüências alélicas encontradas nesta amostra da população de Brasília foram de  $CAT^{*1}$  (T)-60% e  $CAT^{*2}$  (A)-40%) e a distribuição dos genótipos não está de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A literatura relata o alelo  $CAT^{*2}$  (A) como o mais freqüente na população asiática (koreanos) A – 69,3% e T – 30,7% ( MAK *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2006). O

alelo  $CAT^{*1}$  (T) é o mais frequente em uma população da Finlândia (UKKOLA *et al.*,2001) A – 42% e T- 58% com frequência semelhante à detectada neste estudo entretanto, com distribuições genóticas diferentes (AA – 17,62%; AT – 47,95%; TT – 34,43% e AA-46%;AT-27% e TT-27% respectivamente). Para este SNP existem poucos dados sobre os aspectos populacionais deste polimorfismo.

O marcador SNP da região promotora 21A /T da catalase, sugere-se na literatura, estar associado com a acatalasemia e hipocatalasemia. O alelo  $CAT^{*1}$  é o mais freqüente nos pacientes húngaros e japoneses (GOTH& VITAI,1997). Diante da relação do alelo  $CAT^{*1}$  com a redução da atividade enzimática, neste estudo, os ID observados nos controles, em condições fisiológicas de estresse oxidativo, foi maior nos homozigotos CAT1-1 e nos indivíduos homozigotos CAT 2-2, sendo o menor ID encontrado nos indivíduos heterozigotos. Mediante a indução ao estresse oxidativo, o genótipo CAT 2-2 apresentou os maiores ID. Como o alelo  $CAT^{*1}$  é o mais freqüente na amostra deste estudo, em indivíduos jovens e saudáveis, não foi possível relacionar dano no DNA devido a menor atividade, pois não há informações na população brasileira e a associação deste alelo com a acatalasemia e hipocatalasemia.

Em estudo com pacientes com vitiligo, onde a atividade enzimática da catalase é reduzida, levando ao acúmulo do  $H_2O_2$ , não foi verificada associação deste polimorfismo com a patologia. Entretanto, houve associação do haplótipo (da região promotora da CAT 21A /T e o SNP do éxon 9 T/C ), sugerindo a possível associação do gene da CAT com a susceptibilidade com vitiligo ( PARK *et al*,2006).

---

Em um outro loco, BASTAKI *et al.*, (2006) constataram que o polimorfismo da (-262C>T) catalase influencia sua atividade enzimática, em indivíduos jovens e não fumantes. A atividade da catalase nos indivíduos com genótipo TT é menor que nos indivíduos de genótipo CC, permitindo inferir que há diferença na atividade enzimática relacionada ao polimorfismo e associada a fatores de ancestralidade e hábitos de vida.

## 2- Glutathiona peroxidase

Na GPX1 as frequências dos alelos 1  $GPX1^{*1}$  (Pro – 64,0%) e  $GPX^{*2}$  (Leu–36,0%) nesta amostra são diferentes das encontradas por RATNASINGHE *et al.*, 2000; (Pro-42% e Leu- 58%) na população finlandesa. As frequências genótípicas do presente estudo (Pro/Pro- 46%; Pro/Leu-36 Leu/Leu-17%) foram semelhantes às encontradas por KNIGHT *et al.*, 2004 (Pro/Pro 45%, Pro/Leu-44%; Leu/Leu 10%) em uma amostra da população de Ontário, Canadá.

Estudos *in vitro* reportam a redução da atividade enzimática quando há a substituição da Prolina por Leucina na posição 197 da GPX1 (HAMANISHI *et al.*, 2004). Na combinação dos polimorfismos (Ala6/198 Leu), em japoneses, foi observada a redução em 40 % da atividade enzimática da GPX1. Demonstrando que a variante (198Leu) da GPX1 está associada com elevados níveis de estresse oxidativo (HAMANISHI, *et al.*,2004).

FORSBERG *et al.*, 2000 observaram nas populações sueca e finlandesa que não há diferença significativa entre genótipo e atividade enzimática da (Pro/Leu 197) GPX1 nos eritrócitos, como também não detectou associação deste polimorfismo com acidente vascular cerebral.

O alelo GPX1\*2 variante em homozigose (Leu/Leu) da hGPX1 na posição 198, foi associado ao aumento da prevalência do câncer de pulmão em caucasianos, relacionado ao aumento do estresse oxidativo (RATNASINGHE *et al*, 2000).

A variante (Leu) da GPX1\*2 está associada com elevados níveis de estresse oxidativo acarretando nos aumentos da parede vascular da carótida, do risco cardiovascular e de danos da vascularização periférica em pacientes com diabetes tipo 2 (HAMANISH, *et al.*,2004).

Neste estudo, hGPX1 2-2 (Leu/Leu) apresentou menor ID ao DNA, tanto no controle, como nos tratamentos. Esses dados não corroboram com os da literatura, no sentido do alelo GPX1\*2 (Leu) estar associado com aumento do estresse oxidativo. Esse fato pode ser devido ao tamanho amostral, à população estudada e outras variáveis fisiológicas.

### 3- SOD2 (Val/9Ala)

Neste estudo, as freqüências do alelo SOD2\*1(Val) foi de 53% e do alelo 2 (Ala) de 46%. Outros estudos também descreveram as freqüências desses alelos nas populações de italianos (Val – 52%; Ala – 48%) (VENTRIGLIA *et al.*, 2006) e do Rio Grande do Sul Val – 59%; Ala – 41% (BICA *et al.*, 2007).

Um excesso de heterozigotos é relatado nesses estudos e também no presente trabalho, que demonstra não estar em equilíbrio HW.

AMBROSONE *et al.*,(1999) encontraram maior associação do homozigoto SOD2 1-1 (Ala/Ala) com aumento do câncer de mama familiar em mulheres na prémenopausa quando comparado ao heterozigoto SOD2 1-2 (Val/Ala). Pacientes de ambos os sexos apresentaram freqüência significativa

da SOD2 (Ala/Ala) com o câncer de mama no Sul do Brasil (BICA *et al.*, 2007). MITRUNEM *et al.*,(2001), concluíram que na população finlandesa, indivíduos com alelo SOD2<sup>\*1</sup>(Ala) possuíam quinze vezes mais chances do desenvolvimento do câncer de mama em mulheres antes da menopausa, se comparados aos homozigotos (Val/Val).

Na septicemia ocorre estresse oxidativo e dano mitocondrial e a SOD2 é a principal defesa dentro da mitocôndria. O SNP Ala/9Val é um fator importante no transporte intra-mitocondrial da enzima. ELSAKA *et al.*, (2007) detectaram diferenças significativas nas freqüências dos genótipos entre indivíduos saudáveis e pacientes com septicemia.

Este estudo mostrou diferença altamente significativa dos ID em indivíduos heterozigotos SOD2 1-2(Val/Ala) quando controle é comparado com os tratamentos, o que está dentro do esperado devido a indução crescente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este aspecto não foi observado nos homozigotos SOD2(Val/Val) provavelmente devido ao pequeno número de indivíduos com este genótipo nesta amostra.

#### 4- Haptoglobina

A variação polimórfica da haptoglobina tem sido amplamente estudada e as freqüências dos alelos  $Hp^{*1}$  e  $Hp^{*2}$  variam nas diferentes populações do mundo dependendo da origem racial (CARTER & WORWOOD, 2007). Nesta amostra da população de Brasília as freqüências detectadas foram  $HP^{*1} = 47\%$  e  $Hp^{*2} = 53\%$  e a distribuição dos fenótipos estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. MOREIRA, *et al* (2008), em outra amostra de Brasília detectou as freqüências  $HP^{*1} = 40\%$  e  $HP^{*2} = 60\%$ . Essas freqüências estão

entre as variações descritas para outras populações da América do Sul e do Brasil (CARTER & WORWOOD, 2007, MIRANDA-VILELA, *et al* 2009).

A função antioxidante da haptoglobina é bem caracterizada, demonstrando ser um antioxidante extremamente potente. Em testes *in vitro*, uma elevada tolerância contra o estresse oxidativo foi detectada com o fenótipo Hp 1-1 em células CHO transfectadas (TSENG *et al.*,2004). Diferenças significativas na capacidade antioxidante foram detectadas em purificados protéicos dos 2 diferentes alelos (MELAMED-FRANK *et al*, 2001). A função antioxidante da Hp dependente do fenótipo também foi descrita pela indução com hemoglobina livre, sendo o fenótipo Hp 1-1 o mais ativo e o Hp 2-2 o menos ativo (GUÉYE *et al*, 2006).

MOREIRA *et al.*, (2009) avaliaram a diferença entre indivíduos de diferentes fenótipos da Hp e o índice de dano ao DNA avaliado pelo teste do cometa. Uma variação significativa foi detectada entre os fenótipos Hp1-1 e Hp1-2, tendo o fenótipo Hp1-1 apresentado os menores índices de dano em indivíduos jovens e saudáveis. As diferenças na variação dos ID nos indivíduos com fenótipo Hp 2-2 não foram estatisticamente diferentes.

Neste estudo, na avaliação dos ID entre os controles dos fenótipos, o fenótipo Hp1-2 apresentou menor ID seguido dos Hp 1-1 e Hp 2-2. Entretanto, mediante à indução do estresse pela H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o fenótipo Hp 2-2 apresentou aumentos significativos do ID nas duas concentrações, enquanto os fenótipos Hp 1-1 e Hp 2-1 só apresentaram danos significativos na maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o que pode sugerir uma menor proteção à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do fenótipo Hp 2-2.

Esses dados não corroboram com os dados da literatura de maior proteção ao estresse oxidativo do fenótipo Hp 1-1, o que pode ser devido aos

diferentes números de indivíduos dentro de cada fenótipo e outras variáveis fisiológicas intrínsecas, como níveis de hemólise, mesmo em indivíduos jovens e saudáveis.

Outros fatores que devem ser considerados são: a capacidade variável dos três fenótipos na prevenção do estresse oxidativo, induzido pela Hb livre, pode estar relacionada a diferenças na afinidade dos três fenótipos à hemoglobina; as diferenças entre os fenótipos foram maiores na presença de concentrações equimolares da Hp e Hb; (GUÉYE *et al.*, 2006); em contraste ASLEH *et al.*, (2005) demonstraram que a afinidade constante dos três fenótipos da Hp pela Hb não são significativamente diferentes apesar das proteínas codificadas pelos genótipos HP1-2 e HP2-2 serem polímeros maiores a concentração total da Hp no plasma varia de acordo com o fenótipo, sendo os menores valores detectados em indivíduos com fenótipo Hp 2-2 do que com fenótipos Hp 2-1 e Hp 1-1 (LANGLOIS & DELANGHE, 1996).

Assim, os mecanismos de efeitos protetores da Hp e sua dependência fenotípica ainda não estão elucidados. Os dados da primeira descrição molecular detalhada da haptoglobina (POLTICELLI *et al.*, 2008) com seus monômeros e polímeros podem ser úteis para explicar algumas das propriedades das variantes multifuncional da haptoglobina.

## 7. Conclusão

1. A variação das enzimas antioxidantes endógenas avaliadas no presente estudo, sugere conferir diferentes graus de proteção ao DNA contra o estresse oxidativo, induzido *in vitro* pelo peróxido de hidrogênio, em indivíduos jovens e saudáveis da população de Brasília. Entretanto, devido aos diferentes números de indivíduos de cada genótipo é necessário ampliar o número amostral para que se possa fazer comparações com maior rigor estatístico.

## 8. Referências Bibliográficas

1. AMBROSONE, C. B., FREUDENHEIM, J. L., THOMPSON, P. A., BOWMAN, E., VENA, J. E., MARCHALL, J. R., GRAHAM, S., Laughlin, R., NEMOTO, T., Shields, P. G. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) and genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. **Cancer Res.**, 59: 602–606, 1999.
2. AKYOL, O., CANATAN, H.; YILMAZ, H.R.; YUCE, H.; OZYURT, H.; SOGUT, S.; GULEC, M.; ELYAS, H. PCR/RFLP based cost- effective identification of SOD2 signal (leader) sequence polymorphism (Ala-9Val) using NgoMIV: a detailed methodological approach. **Clin. Chim. Acta** 345,151-159, 2004.
3. AKYOL, O.; YANIK, M.; ELYAS, H.; NAMLI, M.; CANATAN, H.; AKIN, H.; YUCE, H.; YILMAZ, H.R.; TUTKUN, H.; SOGUT, S.; HERKEN, H.; OZYURT, H.; SAVAS, H.A.; ZOROGLU, S.S. Association between ALA-9Val polymorphism of Mn-SOD gene and schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 29, 123-131, 2005.
4. ASLEH, R. MARSH, S. SHILKRUT, M. BINAH, O. GUETTA, J. LEJBKOWICZ, F. ENAV, B. SHEHADEH, N. KANTER, Y. LACHE, O. *et al.* Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. **Circ Res** 92:1193-1200, 2003.
5. ASLEH R., GUETTA J., KALET-LITMAN S., MILLER-LOTAN R. & LEVY A.P. Haptoglobin genotype- and diabetes dependent differences in iron-mediated oxidative stress in vitro and in vivo. **Circulation Research** 96, 435–441, 2005.
6. BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova.** vol 29, nº1, 113-123, 2006.
7. BASTAKI, M. HUEN, K. MANZANILLO, P. CHANDE, N. CHEN, C. BALMES, J. TAGER, I. HOLLAND, N. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. **Pharmacogenetics and genomics.** vol. 16, nº4, pp. 279-286, 2006.
8. BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis.** 20:245-254, 2005.

9. BICA, C. G.; CRUZ, I. B. M.; SILVA, L. L. M.; TOSCANI, N. V.; ZETTLER, C. G.; GRAUDENZ, M. S. (2007). Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (Ala-9Val) and breast cancer in males and females. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 43(3): 219-225
10. CARTER K, WORWOOD M.. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int. J. Lab. Hem.* 29, 92–110, 2007.
11. COHEN, MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann Intern Med** . 11:918-31, 1989.
12. COLLINS, A.R.; AI-GUI, M.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage 9strand breaks and oxidized pyrimidines in human cells. **Mutation Research**. v.336,p 69-77,1995.
13. COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. **FASEB J** 17:1195-1214, 2003.
14. COURTNEY, B.; JING-XIONG, S.; WAYNE, T. Genetic Association of catalase gene (CAT) with Vitiligo Susceptibility. **Pigment Cell Res** 15, FL-USA, 62-66, 2002.
15. DELANGHE, JR.; DUPREZ, DA.; De BUYZERE, ML.; BERGEEZ, BM.; CLAEYS, R.; LEROUX-ROELS, GG.; CLEMEMENT, DL. Refractory hypertension is associated with the haptoglobin 2-2 phenotype. **J Cardiovasc Risk** 2:131-136, 1995.
16. FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARAL, S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estress oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasil**, Botucatu- SP, 1997.
17. FLEKAC, M. SKRHA, J. HILGERTOVA, J. LACINOVA, Z. JAROLIMKOVA, M. Gene polymorphisms of superóxido dismutases and catalase in diabetes mellitus. **BMC Medical Genetics** 471-2350-9-30, 2008.
18. FORSBERG, L.; FAIRE, U.; MARKLUND, P.P.; STEGMAYRE, B.S.; MORGENSTERN, R. Phenotype Determination of a Common Pro-Leu Polymorphism in Human Glutathione Peroxidase 1\*1;\*2. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, vol26, issue 5, pg: 423-426, 2000.
19. FORSBERG, L.; LYRENÄS, L.; FAIRE, U.; MORGENSTERN, R. A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels. **Free Radical Biology & Medicine**, vol.30, nº5, 500-505, 2001.

20. GARBY, L.; & Noyes W.D. Studies on hemoglobin metabolism.1. The kinetic properties of the plasma hemoglobin pool in normal man. **Journal of Clinical Investigation** 38, 1479–1483, 1959.
21. GARCIA, O.; MANDINA, T.; LAMADRID, A. I.; DIAZ, A.; REMIGIO, A.; GONZALEZ, Y.; PILOTO, J.; GONZALEZ, J.E.; ALVAREZ, A. Sensivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutagenesis Res.** 556:25-34, 2004.
22. GOGISHVILI, AV.; KAVTARADZE, VG.; MAMALADZE, GT.; ARUTIUNOVA, MS.; TAKADZE, GSH. Haptoglobin phenotype distribution in patients at high risk of developing myocardial infarct. **Kardiologia** 25:55-58, 1985.
23. GÓTH L, RASS P, PÁY A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. **Mol Diagn.**; 8(3):141-149, 2004.
24. GOTTLIEB, M, G, V.; TAUFER, M.; CRUZ, A, M.; OLIVEIRA, L, A.; JOBIM, P.; OLIVEIRA, P.; CRUZ, I, M. Associação entre o polimorfismo da apolipoproteína E (APOE) e superóxido dismutase dependente de manganês (SOD2) sobre os níveis de LDL-Col oxidado. Resumo. In: **49º Congresso de Genética**, Águas de Lindóia-SP, 2003.
25. GOULAS, A. FIDANI, L. KOTSIS, A. *et al.* An association study of a functional gene polymorphism, -262C>T, and patients with Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**; 330:210-2, 2002.
26. GUEYE P.M., GLASSER N., FERARD G. & LESSINGER J.M. Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**; 44, 542–547.32, 2006.
27. GUTTERIDGE J.M.C. The antioxidant activity of haptoglobin towards hemoglobin-stimulated lipid-peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta** 917,219, 1987.
28. HAMANISHU, T.; FURUTA, H.; KATO, H.; DIO, A.; TAMAI, M.; SHIMOMURA, H.; *et al.* Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPx-1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. **Diabetes**; 53:2455–2460, 2004.
29. HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C. WINDEBANK, S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. **Mutagenesis** 13: 89-94, 1998.

30. HERMES-LIMA, M. Oxigen in biology and biochemistry: Role of free radicals. **Edited by Kenneth B. Storey** . Copyright, 2004.
31. JANAYDEH, M.; HAMAD, M.; AEDALLAH, S. The relationship between haptoglobin polymorphism and serum ceruloplasmin ferroxidase activity. **Clin. Exp. Med.** 3: 219- 223, 2004.
32. JIANG, Z.; AKEY, J.; XIONG, J.; WANG, Y.; SHEN, Y.; XU, X.; CHEN, H.; WU, H.; LU, J.; HUANG, W.; JIN, L. A polymorphism in the promoter region of catalase is associate with blood pressure levels. **Human Genet**, 109: 95-98, 2001.
33. KRISTIANSEN M., GRAVERSEN J.H., JACOBSEN C., SONNE O., HOFFMAN H.J., LAW S.K.A. & MOESTRUP S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature** 409, 198–201, 2001.
34. LANGLOIS, M. R. and DELANGHE, J. R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. **Clinical Chemistry** 42: 1589-1600, 1996.
35. LEVY AP, ROGUIN A, HOCHBERG I, HERER P, MARSH S, NAKHOUL FM AND SKORECKI K. Haptoglobin phenotype and vascular complications in patients with diabetes. **New England Journal Medicine**. 343:969-970, 2000.
36. LEVY A.P., LARSON M.G., COREY D., LOTAN R., VITA J.A. & BENJAMIN E.J. Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. **Atherosclerosis** 172, 361–365, 2004.
37. LIGHTFOOT, T.; SKIOLA, C.F.; FORREST, M.S.; ADAMSON, P.J.; MORGAN, G.J.; BRACCI, P.M.; ROMAN, E.; SMITH, M.T.; HOLLY, E.A. Polymorphism in the oxidative stress genes, superóxide dismutase, glutationa peroxidase and catalase and risk of non-Hodgkin's lymphoma. **The hematology journal**, 91 (9), 1222-1226, 2006.
38. MAK, J. C. W.; LEUNG, H. C. M.; HO, S. P.; KO, F. W. S.; CHEUNG, A. H. K.; IP, M. S.M.; CHAN-YEUNG, M. M. W.. Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. **Clin. Exp. Allergy** 36: 440-447, 2006.
39. MAEDA N. DNA polymorphisms in the controlling region of the human haptoglobin genes: a molecular explanation for the haptoglobin 2-1 modified phenotype. **American Journal of Human Genetics** 49, 158–166, 1991.

40. MELAMED-FRANK, M.; LANCHE, O.; ENAV, BI.; SZAFRANEK, T., LEVY, NS.; RICKLIS, RM.; LEVY, AP. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood** 98 (13): 3693-3698, 2001.
41. MITRUNEN, K., SILLANPÄÄ, P., KATAJA, V., ESKELINEN, M., KOSMA, V.-M., BENHAMOU, S., UUSITUPA, M., HIRVONEN, A. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. **Carcinogenesis** (Lond.), 22: 827–829, 2001.
42. MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 96, 1742-7835, 2005.
43. MONTEITH, D.K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. **Mutation Research**, 345:97-103, 1995.
44. MOREIRA, L.R.S. Avaliação da variação da genotoxicidade do peróxido de hidrogênio em associação com o polimorfismo da haptoglobina. .Resumo. In: **52º Congresso de Genética**, Foz do Iguaçu-Paraná, 2006.
45. MOREIRA, L. R. S.; MIRANDA-VILELA, A. L.; SILVA, I. C. R.; AKIMOTO, A. K.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N.; GRISOLIA, C. K. Antioxidant effect of haptoglobin phenotypes against DNA damage induced by hydrogen peroxide in human leukocytes. **Gen. Mole. Res.** In press (REF.: GMR 569), 2009.
46. NAKHOUL, FM.; ZOABI, R.; KANTER, Y.; ZOABI, M.; SKORECKI, K.; HOCHBERG, I.; LEIBU, R.; MILLER, B.; LEVY, AP. Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. **Diabetologia** 44:602-604, 2001.
47. OKAZAKI, T., YANAGISAWA, Y.; NAGAI, T. Analysis of the affinity of each haptoglobin polymer for hemoglobin by two-dimensional affinity electrophoresis. **Clinica Chimica Acta** 258, 137–144, 1997.
48. PARK, H. H.; HA, E.; UHM, Y. K.; JIN, S. Y.; KIM, Y. J.; CHUNG, J. H.; LEE, M. H. Association study between catalase gene polymorphisms and the susceptibility to vitiligo in Korean population. **Experim. Dermatol.** 15: 377-380, 2006.
49. POLTICELLI, F.; BOCEDI, A.; MINERVINI, G.; ASCENZI, P. Human haptoglobin structure and function – a molecular modelling study. **FEBS Journal** 5648-5656, 2008.

50. RATNASINGHE, D.; TANGREA, J. A.; ANDERSEN, M. R.; BARRETT, M. J.; VIRTAMO, J.; TAYLOR, P. R.; ALBANES, D.. Glutathione Peroxidase Codon 198 Polymorphism Variant Increases Lung Cancer Risk. **Cancer Res.** **60**: 6381-6383, 2000.
51. TSENG, CF.; LIN, CC.; HUANG, HY.; LIU, HC.; MAO, SJT. Antioxidant role of human haptoglobin. **Proteomics** **4**, 2221-2228, 2004.
52. SADRZADEH, S, M, H. and BOZORGMEHR, J. Haptoglobin phenotypes in health disorders. **Am J Clin Pathol.** **121** (suppl 1): S 97-S104, 2004.
53. SADRZADEH S.M., GRAF E., PANTER S.S., HALLAWAY P.E. & EATON J.W. Hemoglobin: A biologic Fenton reagent. **Journal of Biological Chemistry** **259**, 14354-14355, 1984.
54. SAEED, S.A.; SAJADEEN, U.; ALI, T.M.; KHIMANI, F.W.; GILANI, A.H.. Antioxidants: Their role in health and disease. **International Journal of Pharmacology**, **1**(3):226-233, 2005.
55. STEIN JH.; MCBRIDE P. Hyperhomocysteinemia and Atherosclerotic vascular disease: Pathophysiology, screening and treatment of. **Arch Intern Med** **158**:1301-1306, 1998.
56. STEWART, S.S.; LEATHART, J.B.; CHEN, Y.; DALY, A.K.; ROLLA, R.; AY, D.; MOTTARAN, E.; VIDALI, M.; ALBANO, E.; DAY, C.D. Valine-alanine manganese superoxide dismutase polymorphism is not associated with alcohol-induced oxidative stress or liver fibrosis. **Hepatology**, vol: **36** nº: **6** pg: 1355-1360, 2002.
57. SULEIMAN, M.; ARONSON, D.; ASLEH, R.; KAPELIOVICH, M.R.; ROGUIN, R.; MEISEL, S.R.; SHOCHAT, M.; SULIEMAN, A.; REISNER, S.A.; MARKIEWICZ, W.; HAMMERMAN, H.; LOTAN, R.; LEVY, N.S.; LEVY, A.P. Haptoglobin Polymorphism Predicts 30-Day Mortality and Heart Failure in Patients With Diabetes and Acute Myocardial Infarction. **Diabetes** **54**: 2802-2806, 2005.
58. TSENG, C. F.; LIN, C. C.; HUANG, H. Y.; LIU, H. C.; MAO, S. J. T. Antioxidant role of human haptoglobin. **Proteomics**. **4**: 2221-2228, 2004.
59. TONDO, C. V.; MUNDT, C.; SALZANO, F. M.. Haptoglobin types in Brazilian Negroes. **Ann. Hum. Genet.** **26**: 325-331, 1963.
60. UKKOLA O, ERKKILÄ PH, SAVOLAINEN MJ, KESÄNIEMI YA. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper/zinc superoxide

- dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Internal Medicine**; 249: 451-459, 2001.
61. VAN VLIERBERGHE H, LANGLOIS M AND DELANGHE J. Haptoglobin polymorphism and iron homeostasis in health and in disease. **Clin Chim Acta** 345:35-42, 2004.
62. VENTRIGLIA, M.; SCASSELLATI, C.; BONVICINI, C.; SQUITTI, R.; BEVACQUA, M. G.; FORESTI, G.; TURA, G. B.; GENNARELLI, M. No association between Ala9Val functional polymorphism of MnSOD gene and schizophrenia in a representative Italian sample. **Neurosci. Lett.** 410: 208-211, 2006.
63. VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; OLIVEIRA, O.M.M. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, vol IV (2), 119-130, 2007.
64. WANG, LI. MILLER, D.P.; SAI, Y.; LIU, G, SU, L.; WAIN, J.C. et al. Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 lung cancer risk. **J Natl Câncer Inst**, 1;93:1818-21, 2001.
65. WASSEL, J. Haptoglobin: Function and polymorphism. **Clin. Lab.** 46: 547-552, 2000.
66. WOBETO, V. P; ZACCARIOTTO, T.. R.; SONATI, M. F. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. **Genet. Mol. Biol.** [online]., v. 31, n. 3, pp. 602-620. ISSN 1415-4757, 2008.
67. YOUNG, R. P.; HOPKINS, R.; BLACK, P. N.; EDDY, C.; WU, L.; GAMBLE, . D.; MILLS, G. D.; GARRETT, J. E.; EATON, T. E.; REES, M. Functional variants of antioxidant genes in smokers with COPD and in those with normal lung function. **Thorax** 61: 394-399, 2006.
68. ZHAO, H.; LIANG, D, H., GROSSMAN, B., WU, X. Glutathione Peroxidase 1 gene polymorphism and risk of recurrence in patients with superficial bladder cancer. **Adult Urology** 66(4), 769-774, 2005.

## 9. Anexos



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

### PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: 092/2008

CAAE: 0056.0.012.000-07

Título do Projeto: Avaliação do efeito genotóxico do peróxido de hidrogênio: estudo comparativo da variação genética de enzimas antioxidantes endógenas

Pesquisador Responsável: Penha Cristina Zaidan Alves

Data de Entrada: 31/08/2007

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 092/2007 com o título: Avaliação do efeito genotóxico do peróxido de hidrogênio: estudo comparativo da variação genética de enzimas antioxidantes endógenas. Analisado na 3ª Reunião Ordinária, realizada no dia 08 de Abril de 2008.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 09 de Abril de 2008.

Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Cep: 70.910-900

---

### Questionário

Amostra nº: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo:  feminino  masculino

Local de nascimento: \_\_\_\_\_

Local onde reside: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

1-Exposição aos efeitos de radiações ionizantes (RX) há menos de 6 meses:

- a) 1 exposição ao RX ( )                      b) 2 exposições ao RX ( )  
c) acima de 2 exposições ao RX ( )      d) nenhuma exposição nos últimos 6 meses ( )

2- Uso de medicamentos e tratamentos:

2.1- Já fez uso de quimioterápicos ?

( ) não

( ) sim . Número de ciclos realizados \_\_\_\_\_ Tempo de tratamento \_\_\_\_\_

2.2- Foi exposto ao tratamento radioterápico?

( ) não

( ) Sim. Tempo de tratamento \_\_\_\_\_

2.3- Faz uso de suplementos vitamínicos como vitamina C e E ?

( ) Sim.    ( ) Não

3- Quanto Alimentação:

3.1- Consome verduras, frutas e legumes com que frequência?

( ) todos os dias

( ) 2 vezes por semana

( ) 1 vez por mês

( ) nunca

3.2- Qual a frequência do consumo de alimentos ricos em gorduras ?

diariamente

2 vezes por semana

eventualmente ( 1 vez por mês)

nunca

4- Nas atividades laborais , estudo ou trabalho, você se expõe a produtos tóxicos?

Não

Sim (Quais?\_\_\_\_\_)

5-Você é tabagista ?

Não

Sim ( Quantos cigarros por dia?\_\_\_\_\_ Há quanto tempo fuma?\_\_\_\_\_)

Parou de Fumar há\_\_\_\_\_ anos

6- Você consome bebida alcoólica?

Frequentemente (Há quanto tempo?\_\_\_\_\_ ) ( mais de 02 vezes por semana)

Até 02 vezes por semana

Menos de 02 vezes por semana

Nunca

7- Antecedentes familiares de doenças cardiovasculares ou algum outro tipo de doença crônico degenerativa ( diabetes, câncer,Alzheimer, Parkinson, pressão alta)

Não  Sim Especificar :\_\_\_\_\_

8-Pratica Exercícios físicos:

Não  Sim frequência:\_\_\_\_\_

9-De um modo geral, em comparação a pessoas de sua idade, como você considera seu estado de saúde?

Excelente  Muito Bom  Bom  Regular  Ruim  Péssimo

N

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, PÓS-INFORMAÇÃO

O(a) senhor(a) \_\_\_\_\_, está sendo convidado(a) para participar da pesquisa: " Estudos dos polimorfismos genéticos de enzimas antioxidantes associados á susceptibilidade aos danos no DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio." executado por pesquisadores do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília.

A pesquisa tem como objetivo analisar a susceptibilidade ao dano no DNA, causado pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), por meio do teste do cometa, e a associação com a variação genética das enzimas oxidantes; superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e haptoglobina em indivíduos jovens saudáveis.

Sua participação no projeto é totalmente voluntária, não acarretando despesa a qualquer uma das partes, em qualquer tempo e implicará na retirada de 1 tubo de 5ml de sangue de uma das veias da circulação periférica e no preenchimento de um questionário, no qual será coletado dados pessoais (idade, sexo, hábitos de vida) visando a obtenção de informações sobre a condição geral de saúde e exposição a agentes mutagênicos (Ex: RX, quimioterápicos, radioterapia).

A coleta do sangue será feita utilizando o sistema à vácuo, cuja agulha é estéril, isto é, sem contaminação por bactérias, vírus e outros microrganismos, e descartável. Esses procedimentos são usuais nas pesquisas genéticas e nas análises laboratoriais, não implicando em risco para a saúde, podendo, porém, provocar um pouco de dor no local de penetração da agulha no momento da coleta;

O material coletado será utilizado em análises do material genético, o DNA, e em outros componentes do sangue, como proteínas, enzimas e grupos sanguíneos, visando traçar um perfil individual que irá auxiliar na reconstrução perfil genotípico das enzimas antioxidantes endógenas ( catalase, peróxido dismutase e glutathione peroxidase) .

O material genético a ser utilizado nas análises será estocado em freezer, em Banco de Amostras localizado no Laboratório de Genética do Departamento de Genética e Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade de Brasília de forma codificada.

Mediante interesse, poderá ter acesso, em qualquer tempo, aos resultados globais obtidos a partir da análise da sua amostra, porém não aos dados relativos a outros indivíduos da pesquisa, garantindo a privacidade dos mesmos. Os resultados das análises genéticas do seu material serão divulgados exclusivamente para você se solicitado ao coordenador da pesquisa.

Somente os pesquisadores envolvidos diretamente no projeto terão acesso ao material coletado e aos dados fornecidos, garantindo assim, o sigilo e a privacidade dos seus dados.

Cabe reforçar que os resultados somente serão divulgados a você, voluntário, sendo garantido o total sigilo. Quanto aos benefícios desta pesquisa aos participantes, cabe somente o resultado da genotipagem e a informação segundo a literatura, das possíveis associações relacionadas ao genótipo encontrado. Sendo o voluntário esclarecido os processos patológicos associados estão sujeitos a exposição a fatores de risco e não exclusivamente a expressão genotípica.

Que qualquer nova pesquisa que for realizada utilizando o material doado será submetida, antes, à aprovação ao Conselho de Ética em Pesquisa.

---

O senhor (a) poderá recusar participar do projeto a qualquer tempo, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, estando livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento bastando a comunicação ao responsável pelo projeto, identificado neste termo, sendo que esse procedimento não implica em nenhuma despesa para qualquer pessoa.

Os dados gerados pela pesquisa serão utilizados para a elaboração de artigos científicos, resumos e painéis de congressos e farão parte de uma dissertação de mestrado.

Que, em caso de dúvidas ou esclarecimentos adicionais poderei entrar em contato com a Coordenadora do Projeto, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nazaré Klautau Guimarães Grisolia (UnB – IB – GEM – telefone (61) 3307-2161) ou no endereço Laboratório de Genética, Módulo 06, Subsolo ICC-Sul.

Para aceitar este convite é preciso que você assine este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que se encontra redigido em duas vias, sendo uma para o participante e outra para o pesquisador responsável.

Aceito o convite para participar da pesquisa “*Avaliação do efeito genotóxico do peróxido de hidrogênio: estudo comparativo da variação genética de enzimas antioxidantes endógenas*” executada por pesquisadores do Laboratório de Genética da Universidade de Brasília e os termos aqui presentes

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Documento de identidade: \_\_\_\_\_

Responsável pela pesquisa: \_\_\_\_\_