



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**MESTRADO EM PATOLOGIA**

**IZABEL CRISTINA JUSTINO BANDEIRA**

**ESTUDO DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO: ASSOCIAÇÃO COM OS  
HAPLÓTIPOS DO *CLUSTER* DA  $\beta$ -GLOBINA NA ANEMIA FALCIFORME**

**FORTALEZA**  
**2013**

IZABEL CRISTINA JUSTINO BANDEIRA

ESTUDO DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO: ASSOCIAÇÃO COM OS  
HAPLÓTIPOS DO *CLUSTER* DA  $\beta$ -GLOBINA NA ANEMIA FALCIFORME

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-graduação em Patologia da  
Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal do Ceará para obtenção do título  
de Mestre em Patologia.

Orientador: Profa. Dra. Romélia Pinheiro  
Gonçalves.

Co-orientador: Prof. Dr. Max Vítor Carioca  
Freitas.

FORTALEZA

2013

IZABEL CRISTINA JUSTINO BANDEIRA

ESTUDO DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO: ASSOCIAÇÃO COM OS  
HAPLÓTIPOS DO *CLUSTER* DA  $\beta$ -GLOBINA NA ANEMIA FALCIFORME

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-graduação em Patologia da  
Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal do Ceará para obtenção do título  
de Mestre em Patologia.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves. (UFC)  
Orientadora

---

Prof. Dr. Herivaldo Ferreira da Silva (UFC)  
Membro da Banca Examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre Moraes (UNIFOR)  
Membro da Banca Examinadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Helena Pitombeira (UFC)  
Membro da Banca Examinadora

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- B165e      Bandeira, Izabel Cristina Justino.  
              Estudo dos marcadores de inflamação: associação com os haplótipos do *cluster* da  $\beta$ -globina na anemia falciforme. / Izabel Cristina Justino Bandeira. – 2013.  
              85 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2013.  
              Área de Concentração: Patologia.  
              Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves.
1. Anemia Falciforme. 2. Haplotipos. 3. Inflamação. I. Título.

---

CDD 616.1527

À Deus, pelas inúmeras bênçãos, por nunca ter desistido de mim e pelo amor infinito.

À painho e mainha que além de me apoiar em tudo e me amar, me ensinam com exemplos e me fazem querer ser como eles.

Ao meu namorado e companheiro de todas as horas por fazer parte não só dessa etapa, mas da minha vida - Tiago.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família pelo suporte, paciência, desprendimento e amor de sempre.

À minha orientadora e companheira Prof. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves pela oportunidade, confiança em mim depositada e pelos valiosos ensinamentos que, certamente, seguirão comigo daqui pra frente.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas, pelo apoio técnico em muitas etapas deste trabalho.

Aos meus QUERIDOS AMIGOS do laboratório de Hematologia e Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas que fizeram o meu caminho muito mais fácil.

Aos meus professores e mestres da UNIFOR que estiveram comigo durante toda a graduação e, certamente, contribuíram significativamente para essa conquista com ensinamentos e exemplos.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e pelas contribuições para melhoria deste trabalho.

Aos meus amigos que também trilham essa caminhada árdua, mas gratificante, da pesquisa em outros programas de pós-graduação ou em companhia de outros orientadores.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Infantil Albert Sabin (Dra. Vânia Feijó e Dr. Pedro Wilson), pela parceria firmada para que parte deste trabalho fosse realizada no HIAS.

## RESUMO

A Anemia Falciforme (AF) é uma doença hereditária homozigótica caracterizada por anemia hemolítica grave e manifestações clínicas variáveis, considerada uma doença inflamatória crônica. A AF resulta de uma mutação pontual em uma base nitrogenada no sexto códon do gene da beta globina, levando a substituição do nucleotídeo adenina por timina (GAG → GTG), o que resulta na produção do aminoácido valina no lugar do ácido glutâmico. A fisiopatologia inflamatória da AF está centralizada na capacidade de polimerização da HbS que leva à hemólise crônica e à vaso-occlusão. Os pacientes com AF encontram-se em um estado inflamatório crônico de origem multifatorial, que envolve células endoteliais, eritrócitos, leucócitos e plaquetas através do aumento nas interações entre célula-célula e célula-endotélio iniciando uma lesão endotelial. O estudo foi do tipo transversal prospectivo com a finalidade de investigar a associação dos haplótipos com o perfil inflamatório de pacientes com AF. Foi realizada a confirmação da HbSS e em seguida o estudo dos haplótipos da mutação BS no gene da cadeia beta globínica. Foram dosados os marcadores IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-17, PCR-us, IL-10 e TGF- $\beta$  em 67 pacientes com AF e em 26 indivíduos saudáveis. Observou-se a prevalência do haplótipo Bantu (67,1%) na população de pacientes estudada, seguido do haplótipo Benin (28,3%). O estudo confirma que os pacientes com AF encontram-se em um estado inflamatório crônico, pois apresentaram valores elevados de marcadores pró-inflamatórios e antiinflamatório, quando comparadas à indivíduos saudáveis. O haplótipo Bantu obteve mais elevados índices das citocinas pró-inflamatórias e da PCR-us quando comparados aos valores para o Haplótipo Benin. Para o perfil antiinflamatório, o haplótipo Bantu também apresentou valores elevados dos marcadores, quando comparados aos pacientes de haplótipo Benin. Então, o perfil inflamatório dos pacientes com AF está associado à polimorfismos genéticos.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme. Haplótipos. Inflamação.

## ABSTRACT

The Sickle Cell Anemia (SCA) is an inherited disease characterized by homozygous severe hemolytic anemia and clinical variables, considered a chronic inflammatory disease. SCA results from a mutation in a nitrogenous base in the sixth codon of the beta globin gene, leading to substitution of adenine for thymine nucleotide (GAG → GTG), which results in the production of the amino acid valine in place of glutamic acid. The inflammatory pathophysiology of SCA is centered on the ability of HbS polymerization that leads to chronic hemolysis and vaso-occlusion. SCA patients are a chronic inflammatory state of multifactorial origin that involves endothelial cells, erythrocytes, leukocytes and platelets by increasing the interactions between cell-cell and cell-endothelium starting an endothelial injury. The study was a cross-sectional prospective in order to investigate the association of haplotypes with the inflammatory profile of patients with AF. Was performed to confirm the HbSS and then study the haplotypes BS mutation in the gene for beta globin chain. We measured markers IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-17, CRP, IL-10 and TGF- $\beta$  on 67 patients with SCA and 26 healthy subjects. We observed the prevalence of Bantu haplotype (67.1%) in the patient population studied, followed by the Benin haplotype (28.3%). The study confirms that SCA patients are in a chronic inflammatory state, as had elevated markers of proinflammatory and anti-inflammatory when compared to healthy subjects. The Bantu achieved higher levels of proinflammatory cytokines and CRP compared to the values for Haplotype Benin. For the anti-inflammatory profile, Bantu haplotype also showed high levels of the markers when compared to patients Benin haplotype. Then, the inflammatory profile of patients with SCA is associated with genetic polymorphisms.

**Keywords:** Sickle cell anemia. Haplotypes. Inflammation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação dos sítios polimórficos do cluster $\beta^s$ e o padrão de clivagem das enzimas de restrição.....	23
Figura 2 – Efeito da HU induzindo a síntese da HbF em detrimento da síntese de HbS ...	26
Figura 3 – Eficácia e da Toxicidade da HU no tratamento da AF.....	27
Figura 4 – Modelo evidenciando dois subfenótipos da AF que associam o perfil inflamatório crônico com as manifestações clínicas da doença.....	28
Figura 5 – Mecanismos de consumo do NO devido à hemólise intravascular. ....	36
Figura 6 – Participação das células e moléculas na instauração e manutenção de um ciclo inflamatório crônico a partir de interações entre célula-célula e célula-endotélio .....	37
Figura 7 – Restrição H2H3: (1) homozigoto normal, (2) homozigoto mutante- Bantu/Bantu, (3) heterozigoto .....	48
Figura 8 – Restrição H7H8: (1) heterozigoto (2) homozigoto normal (3) homozigoto mutante- Benin/Benin.....	48
Figura 9 - Box-plot da distribuição dos marcadores pró-inflamatórios nos pacientes com AF (n=67) e no grupo controle (n=26) .....	52
Figura 10 - Box-plot da distribuição dos marcadores antiinflamatórios nos pacientes com AF (n=67) e em indivíduos saudáveis (n=26).....	52
Figura 11 – Diagrama de dispersão da concentração de HbF versus marcadores pró-inflamatórios em pacientes com AF (n=67).....	54
Figura 12 – Diagrama de dispersão da concentração de HbF versus marcadores antiinflamatórios em pacientes com AF (n=67).....	55
Figura 13 - Diagrama de dispersão da concentração de HbS versus marcadores pró-inflamatórios em pacientes com AF (n=67).....	56
Figura 14- Diagrama de dispersão da concentração de HbS versus marcadores pró-inflamatórios em pacientes com AF (n=67).....	57
Figura 15 - Box-plot da distribuição dos marcadores inflamatórios dos pacientes com AF (n=67) de acordo com o tempo de tratamento com HU.....	58
Figura 16 - Box-plot da distribuição dos marcadores inflamatórios dos pacientes com AF (n=67) de acordo com a dose diária de HU.....	59

Figura 17 - Box-plot da distribuição dos pacientes com AF (n=67) por haplótipo do cluster $\beta$ S segundo os parâmetros hematológicos (Hb, Ht, HCM, VCM, CHCM, Leucócitos e Plquetas).....	61
Figura 18 - Box-plot da distribuição dos pacientes com AF (n=67) por haplótipo do cluster $\beta$ S segundo as concentrações de HbS e HbF.....	62
Figura 19 - Box-plot dos marcadores pró-nflamatórios nos pacientes com AF (n=67) de acordo com os haplótipos do cluster $\beta$ S.....	64
Figura 20 - Box-plot dos marcadores antinflamatórios nos pacientes com AF (n=67) de acordo com seus haplótipos do cluster $\beta$ S.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição e frequência das cadeias de Hb durante os diferentes períodos do desenvolvimento humano.....	15
Tabela 2 – Diagnóstico, genótipo, principais sintomas e frações das principais formas de Hb variantes .....	17
Tabela 3 – Enzimas de restrição utilizados para a detecção de haplótipos do cluster do gene beta S, regiões de sítios polimórficos, tamanho dos fragmentos de DNA antes e após a clivagem e o padrão de polimorfismo para cada haplótipo.....	45
Tabela 4 – Distribuição dos valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos pacientes com AF (n=67) de acordo com as características laboratoriais.....	51
Tabela 5 - Níveis descritivos (valores p) para os testes de igualdade entre médias dos marcadores inflamatórios para os grupos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis. Os dados foram analisados utilizando o teste de Welch, com valores-p obtidos via bootstrap .....	53
Tabela 6 - Níveis descritivos dos testes para avaliar efeito do tempo de tratamento com HU nos marcadores inflamatórios de pacientes com AF (n=67).....	58
Tabela 7 - Níveis descritivos (valores p) dos testes para avaliar efeito da dose diária de HU nos marcadores inflamatórios dos pacientes com AF (n=67).....	59
Tabela 8 - Distribuição dos haplótipos, cromossomos e genótipos nos pacientes com AF (n = 67).....	60
Tabela 9 - Níveis descritivos (valores p) dos testes para igualdade entre medianas dos parâmetros hematológicos para cada tipo de haplótipo do cluster $\beta$ S no grupo de pacientes AF.....	62
Tabela 10 - Níveis descritivos (valores p) dos testes para igualdade entre médias dos perfis inflamatórios para os grupos de haplótipos dos pacientes com AF. Os valores p foram obtidos utilizando o teste de Kruskal-Wallis.....	65

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Hemoglobina.....	14
1.2 Hemoglobinopatias.....	156
1.3 Doença Falciforme - Hemoglobina S .....	18
1.4 Anemia Falciforme .....	19
1.4.1 Moduladores clínicos da AF .....	21
1.4.2 Tratamento .....	24
1.4.3 O processo inflamatório na AF .....	27
2. OBJETIVOS .....	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos .....	39
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	40
3.1 Desenho do estudo.....	40
3.2 Casuística .....	40
Caracterização da população estudada .....	41
3.3 Local de estudo .....	422
3.4 Coleta das Amostras biológicas.....	42
3.5 Coleta dos dados laboratoriais .....	42
3.6 Testes Realizados .....	43
3.6.1 Análise molecular .....	43
3.6.2 Dosagem das Citocinas .....	49
3.6.3 Dosagem da PCR-us .....	50
3.7 Descarte do material biológico.....	50
3.8 Análise Estatística .....	50
3.9 Comitê de Ética .....	50

4. RESULTADOS.....	51
4.1 Características hematológicas dos pacientes com AF .....	51
4.2 Perfil inflamatório dos pacientes com AF .....	51
4.4 Correlação entre a concentração de HbF e o perfil inflamatório nos pacientes com AF .....	53
4.5 Correlação entre a concentração de HbS e o perfil inflamatório nos pacientes com AF .....	55
4.6 Efeito da terapia com HU nos níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios nos pacientes com AF .....	57
4.7 Distribuição dos haplótipos do <i>cluster</i> $\beta$ S .....	60
4.8 Distribuição dos pacientes com AF por tipo de haplótipo do <i>cluster</i> $\beta$ S segundo os parâmetros hematológicos e perfil de Hb.....	60
4.9 Marcadores de inflamação e associação com os haplótipos do <i>cluster</i> da $\beta$ -globina .....	63
5. DISCUSSÃO .....	67
6. CONCLUSÃO .....	76
7. REFERÊNCIAS.....	78
8. APÊNDICES .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Hemoglobina

A Hemoglobina (Hb) tem como principal função o transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos e está presente no interior dos eritrócitos na forma de uma proteína globular esferoide. Estruturalmente a molécula de Hb é composta por dois pares de cadeias globínicas: as cadeias alfa e as cadeias não alfa (cadeias beta, delta, gama e epsilon). Cada uma dessas cadeias está ligada a um grupo prostético de ferro, denominado heme ou ferroprotoporfirina IX. O grupo heme é responsável por ligar-se e/ou liberar o oxigênio nos tecidos, além de conferir a cor vermelha ao sangue. (BAIN, 2006; PERUTZ *et al.*, 1960)

Cada cadeia de globina é composta por uma sequência de aminoácidos. As cadeias alfa possuem 141 aminoácidos, enquanto as cadeias não-alfa contém 146. A diversidade de combinações entre as cadeias originam diferentes formas de hemoglobinas. As diferentes cadeias globínicas são sintetizadas em diferentes estágios da vida e, como consequência, geram diferentes tipos de hemoglobinas que estarão presentes nos eritrócitos durante os períodos embrionários, fetal ou na vida adulta de um indivíduo. (STAMATOYANNOPOLUS; GROSVELD, 2001).

A Hb Gower1 (constituída pelas cadeias globínicas  $\zeta_2$  e  $\epsilon_2$ ) é a primeira hemoglobina sintetizada durante as quatro semanas iniciais do embrião. A partir daí até a décima segunda semana inicia-se a síntese das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  originando duas outras hemoglobinas embrionárias: a Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) e a Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ). Após essa semana de gestação, o fígado torna-se o principal órgão hematopoético, substituindo o saco vitelínico que até então desempenhava esta função. Há, nessa fase, um aumento na síntese das cadeias  $\alpha$  e  $\gamma$  iniciando, então, a produção da hemoglobina Fetal (HbF) ( $\alpha_2\gamma_2$ ) que será a principal Hb durante a fase intrauterina e ao longo dos primeiros meses de vida do indivíduo. (MANCA; MASALA, 2008; STAMATOYANNOPOLUS; GROSVELD, 2001; GROSVELD; DILLON; HIGGS 1993).

Ainda na fase intrauterina a Hb A ( $\alpha_2\beta_2$ ), que será a principal Hb do indivíduo adulto, começa a ser sintetizada. A partir da vigésima semana de gestação o baço e a medula óssea (MO) tornam-se os órgãos hematopoéticos até o nascimento, quando a MO assume a função definitivamente. Ainda antes do nascimento a MO inicia a produção das cadeias globínicas  $\delta$  que originarão a HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ). Após o nascimento, com um aumento acentuado da síntese de cadeias  $\beta$  acompanhada da diminuição progressiva das cadeias  $\gamma$ , a HbA estabiliza-se até o sexto mês de vida do recém-nascido. (MANCA; MASALA, 2008; STAMATOYANNOPOLUS; GROSVELD, 2001; GROSVELD; DILLON; HIGGS 1993) (tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição e frequência das cadeias de Hb durante os diferentes períodos do desenvolvimento humano.

Período do desenvolvimento	Hb	Cadeias globínicas	Concentrações
<b>Embrionário</b>	Grower 1	$\zeta_2\epsilon_2$	20-40%
	Portland	$\zeta_2\gamma_2$	5-20%
	Grower 2	$\alpha_2\epsilon_2$	10-20%
<b>Fetal</b>	Fetal	$\alpha_2\gamma_2$	90-100%
<b>Adulto</b>	A	$\alpha_2\beta_2$	96-98%
	A <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$	2,5-3,5%
	Fetal	$\alpha_2\gamma_2$	0,1%

Fonte: adaptada de Fonte - adaptada de KOHNE, 2011.

## 1.2 Hemoglobinopatias

As hemoglobinopatias são mutações hereditárias nos genes globínicos que podem resultar na produção de uma molécula com estrutura anormal ou na síntese insuficiente das cadeias globina normal (KOHNE, 2011; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

As Hemoglobinopatias podem ser classificadas em:

- Mutações estruturais das hemoglobinas: ocorre quando há a modificação de nucleotídeos em genes estruturais da Hb, resultando na síntese de uma cadeia globínicas anormal (HbS, HbC, HbD, HbE) (KOHNE, 2011; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004);
- Talassemias: ocasionada pela diminuição ou ausência na síntese das cadeias globínicas  $\alpha$  ou  $\beta$  (originando as talassemias  $\alpha$  e  $\beta$ ) (KOHNE, 2011; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004);
- Persistência hereditária de HbF: caracteriza-se pela elevação de HbF mesmo em indivíduos adultos (KOHNE, 2011; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

As hemoglobinopatias são as doenças monogênicas mais importantes do mundo, afetando cerca de 7% da população mundial. Apesar de mais de 700 variantes estruturais da Hb já terem sido descritas, as mutações estruturais da HbS, HbE, HbC e HbD são as mais prevalentes no mundo. A maior parte dessas hemoglobinas variantes não provoca alterações fisiopatológicas e a grande maioria foi descoberta em associação com talassemias ou com a HbS. (WEATHERALL; CLEGG, 2001) (tabela 2).

A Hemoglobina E não provoca alteração fisiopatológica na forma heterozigota ou homozigótica devido ao fato de ser sintetizada em taxa reduzida. Porém, pode interagir com a talassemia  $\beta$  para produzir uma condição chamada HbE-talassemia, que agrava o quadro do paciente. (VICHINSKY, 2007).

A hemoglobina C, por sua vez, é uma hemoglobina variante que resulta da substituição do aminoácido ácido glutâmico pela lisina na posição 6 da cadeia de  $\beta$  globina. A homozigose da HbC, também conhecida como doença da HbC, evolui de forma semelhante à anemia falciforme, porém com curso clínico menos grave. Já indivíduos heterozigotos para a hemoglobinopatia não apresentam quadro clínico relevante. (KOHNE, 2011).



A Hb D (ou Hb de Punjab) afeta o gene 121 da cadeia da  $\beta$  globina, promovendo uma substituição do ácido glutâmico pela glutamina. Portadores dessa mutação estão mais propensos a sofrer hemólises, pois apresentam maior facilidade de polimerização das hemácias. Portanto, pacientes que apresentem associação entre as hemoglobinas S e D (condição conhecida como doença de HbSD) desenvolvem condições clínicas mais severas semelhantes aos pacientes com anemia falciforme. Já o estado homozigoto, é comum por apresentar anemia hemolítica branda, diminuição da fragilidade osmótica e presença de células em alvo (KOHNE, 2011).

A Hemoglobina S resulta de uma mutação estrutural no cromossomo 11 da cadeia da  $\beta$  globina, acarretando uma substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina no sexto códon. Tal alteração estrutural na molécula de Hb ( $\beta$ S) é originária da África tropical e subtropical, Arábia Saudita e Índia (YANG; OLNEY, 2000; PAULING *et al.*, 1949).

Tabela 2 - Diagnóstico, genótipo, concentração e principais sintomas associados à Hb variantes

Diagnóstico	Genótipo	Fração de Hb	Principais Sintomas
<b>Anemia Falciforme</b>	HbSS	HbS: 55-90% HbA <sub>2</sub> : > 3,5% HbF: 10-20%	Crises de dor Anemia hemolítica crônica Lesão de órgãos Crises Falciformes
<b>Traço Falciforme</b>	HbAS	HbS: 35-40% HbA <sub>2</sub> : $\geq$ 3,5%	Nenhum sintoma aparente
<b>Doença da HbSC</b>	HbSC	HbS: ~ 50% HbC: ~ 50% HbF: <5%	Sintomas moderados da doença falciforme Anemia hemolítica crônica

<b>Doença da HbC</b>	HbCC	HbC: >95% HbA <sub>2</sub> : ~2.5% HbF: ~0.5%	Crises de dor  Lesão de órgãos  Anemia hemolítica crônica
<b>Diagnóstico</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Fração de Hb</b>	<b>Principais Sintomas</b>
<b>Heterozigose de HbC</b>	HbAC	HbC: ~50% HbA: ~47% HbA <sub>2</sub> : 3%	Nenhum sintoma aparente
<b>Heterozigose de HbE</b>	HbAE	HbE: 25-35%	Anemia hipocrômica leve
<b>Doença da HbE</b>	HbEE	HbE: >95% HbA <sub>2</sub> : ~2.5% HbF: <3%	Anemia leve  Hemólise causada por infecções/ medicamentos

Fonte - adaptada de KOHNE, 2011.

### 1.3 Doença Falciforme - Hemoglobina S

As doenças Falciformes (DF) são o grupo de alterações genéticas que se caracterizam pela presença da hemoglobina variante S (HbS). Pode haver a homozigose da HbS ou sua associação com outra alteração de Hb. Dentre as DF mais comuns estão a hemoglobinopatia SC (indivíduos heterozigotos para os genes da HbS e HbC); a S-β talassemia (indivíduos com heterozigose para o gene da HbS e para talassemia β) e a anemia falciforme (AF) que é a DF mais prevalente sendo caracterizada pela homozigose da HbS. (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

O gene falciforme resulta de uma mutação pontual que causa a substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina na sexta posição do cromossomo 11 da cadeia da β globina (PAULING *et al.*, 1949). Tal mutação acarreta a polimerização das moléculas dessa hemoglobina anormal (HbS) quando submetidas à baixas tensões de oxigênio, conferindo à hemácia uma forma alongada conhecida por "hemácia em foice" e reduzindo drasticamente seu tempo de vida média para 7 a 25 dias (WEATHERALL; PROVAN, 2000; CHANG *et al.*, 1997).

Os indivíduos heterozigotos para o gene  $\beta S$  possuem hemácias com aproximadamente 20 a 45% de hemoglobina variante e são geralmente assintomáticos, pois suas hemácias apresentam mais resistência à falcização; já os indivíduos que são homozigotos para a mutação (SS) possuem hemácias contendo 80% ou mais de HbS, e são portadores de anemia hemolítica crônica grave, acompanhada por manifestações clínicas variáveis – Anemia Falciforme (AF) (WEATHERALL; PROVAN, 2000; CHANG *et al.*, 1997).

Epidemiologicamente, o grupo de doenças falciformes (DF) é um dos distúrbios genéticos mais frequentes no mundo e no Brasil, onde estima-se a existência de 25 mil a 30 mil portadores de DF e o surgimento anual de 3.500 novos casos (CANÇADO; JESUS, 2007). A estimativa mundial é que aproximadamente 7% da população seja acometida por alterações da hemoglobina, representados, na sua maioria, pelas talassemias e pela doença falciforme com incidência anual de cerca de 300.000 a 400.000 novos casos (WHO, 1989). Em Fortaleza, Pinheiro e colaboradores (2006) observaram a prevalência de 4,1% de portadores de HbS na população estudada de 389 recém-nascidos. Tais dados corroboram com dados do Ministério da Saúde onde a prevalência do gene falciforme para a região Nordeste varia entre 4 e 6%. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2006).

#### **1.4 Anemia Falciforme**

A Anemia Falciforme (AF) é uma doença hereditária homozigótica caracterizada por uma doença inflamatória crônica com anemia hemolítica grave e manifestações clínicas variáveis (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004; PATHARE *et al.*, 2003).

A AF resulta de uma mutação pontual em uma base nitrogenada no sexto códon do gene da beta globina, levando a substituição do nucleotídeo adenina por timina (GAG  $\rightarrow$  GTG), o que resulta na produção do aminoácido valina no lugar do ácido glutâmico (PAULING *et al.*, 1949). Tal mutação da hemoglobina faz com que a mesma polimerize em tensões diminuídas de oxigênio, formando estruturas filamentosas que se depositam nas hemácias modificando sua forma. O fenômeno, que é conhecido como falcização pode ser revertido desde que níveis mais elevados

de oxigênio sejam atingidos. Porém, falcizações sucessivas tornam-se irreversíveis (WEATHERALL; PROVAN, 2000; CHANG et al. 1997).

Os glóbulos vermelhos depois de assumirem forma de foice não circulam adequadamente na microcirculação, acarretando em obstrução do fluxo sanguíneo capilar e destruição precoce dessas hemácias. O mecanismo fisiopatológico resulta em graves manifestações clínicas (WEATHERALL; PROVAN, 2000).

A formação dos polímeros de HbS no interior das hemácias gera importantes alterações celulares, dentre elas o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e a exposição de moléculas de adesão na membrana eritrocitária. Essas modificações provocam: (I) aumento na adesão das hemácias ao endotélio que desencadeia fenômenos inflamatórios; (II) enrijecimento da membrana das hemácias promovendo o encurtando da sua sobrevivência na circulação; (III) lesões microvasculares; (IV) depleção de óxido nítrico (NO) que contribui para vasoconstrição e (V) ativação da coagulação. (ZAGO; PINTO 2007).

Zago e Pinto (2007) classificam em três níveis as alterações que correlacionam o defeito molecular da anemia falciforme com as manifestações clínicas da doença. As primeiras alterações ocorrem a nível molecular e celular, quando há mutação da hemoglobina, polimerização da Hb foicizada e alterações na membrana da hemácia. Alterações subsequentes acontecem em órgãos e tecidos com adesão celular ao endotélio, hipóxia, isquemia e posterior inflamação seguida de lesão microvascular. As últimas alterações seriam a nível sistêmico com crises dolorosas, anemia hemolítica e insuficiência de órgãos (ZAGO; PINTO 2007).

As dolorosas crises vaso-oclusivas (CVO) são o evento mais comum nos pacientes com anemia falciforme e caracterizam-se por febre e leucocitose, manifestando-se em até 50% desses pacientes pelo menos uma vez durante a vida (REES; GIBSON, 2011). São também as responsáveis pela maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes: úlceras de membros inferiores, síndrome torácica aguda (STA), seqüestro esplênico, priapismo, necrose asséptica do fêmur, acidente vascular encefálico (AVE), retinopatia, insuficiência renal crônica (REES; GIBSON, 2011; ZAGO; PINTO, 2007).

Um dos mecanismos fisiopatológicos da vaso-oclusão é a adesão anormal de hemácias falciformes, granulócitos e plaquetas ao endotélio vascular seguido de fenômenos inflamatórios com produção de intermediários inflamatórios, como citocinas que estimulam a produção de moléculas de adesão endotelial (ZAGO; PINTO 2007; STUART; NAGEL, 2004).

Além disso, as próprias características das doenças hemolíticas promovem a vaso-oclusão. Nesse grupo de doenças a destruição dos eritrócitos eleva os níveis de Hb livre no plasma, diminuindo a atividade vasodilatadora do NO, o que contribui para o fenômeno vaso-oclusivo. (STEINBER, 2005; STUART; NAGEL, 2004).

#### **1.4.1 Moduladores clínicos da AF**

Apesar de todos os pacientes com AF possuírem a mesma mutação genética, a doença apresenta grande variabilidade fenotípica além de fisiopatologia bastante complexa que parece ser influenciada geneticamente. Concentração de HbF, associação com a  $\alpha$ -talassemia e com polimorfismos genéticos, têm sido utilizados como subfenótipos em estudos que associam a heterogeneidade clínica da doença com moduladores genéticos na AF (STEINBERG, 2009; STEINBERG, 2005; SEBASTIANI *et al*, 1999).

##### **Hemoglobina Fetal como modulador da AF**

A HbF ( $\alpha^2\gamma^2$ ), é o modulador genético mais conhecido da anemia falciforme. Elevadas concentrações de HbF, em geral, reduzem a gravidade da AF pois diluem a HbS circulante. A HbF inibe a polimerização da HbS devido a formação de um híbrido composto pelas duas cadeias de hemoglobinas ( $\alpha^2\beta^s\gamma$ ). O híbrido formado entre a HbS/HbF possui maior estabilidade e não é incorporada ao polímero de HbS interrompendo assim, a polimerização das hemácias quando em baixas tensões de oxigênio (STUART; NAGEL, 2004). Tal atributo não é compartilhado pelas hemoglobinas A, C, E, que apenas diluem a quantidade de HbS, porém podem ser incorporadas ao polímero. (STEINBERG, 2009).

Powars et al. (1984) sugeriram que a concentração de HbF necessária para a prevenção de eventos agudos clínicos é de cerca de 20%, enquanto que para evitar danos em órgãos o limiar recomendado seria de 10%.

A concentração e a expressão da HbF é regulada por interações entre fatores genéticos e ambientais. A região controladora do locus (LCR) que controla a síntese dos genes da  $\beta$ -globina, tem um papel importante na expressão da HbF (STEINBERG, 2009). Sebastiani e cols. (1999) analisaram a influência que os polimorfismos do gene promotor da beta-globina exerciam nos níveis de HbF. O estudo examinou 100 pacientes com AF entre 1-18 anos e comprovou que pacientes com o haplótipo Senegal/Benin tiveram níveis de HbF moderados quando comparados com haplótipo Benin/Benin que estavam duas vezes mais elevados. No Brasil, Silva e Gonçalves (2009) observaram, em um estudo realizado com 47 pacientes adultos com AF, que a concentração de HbF fetal é haplótipo dependente e correlaciona-se diretamente ao curso clínico da doença. No estudo, o haplótipo Benin/Benin apresentou níveis mais elevados de HbF e curso clínico mais brando quando comparados ao haplótipo Bantu/Bantu com níveis menores da HbF e pior prognóstico.

### **Associação com a $\alpha$ -talassemia**

A presença concomitante da alfa talassemia está associada a um efeito inibitório sobre a formação de polímeros de HbS, diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM) e diminuição na taxa de hemólise resultando em aumento da concentração de hemoglobina, do número de eritrócitos, do volume de globular que resulta em diminuição na gravidade clínica da doença (ADORNO, 2008).

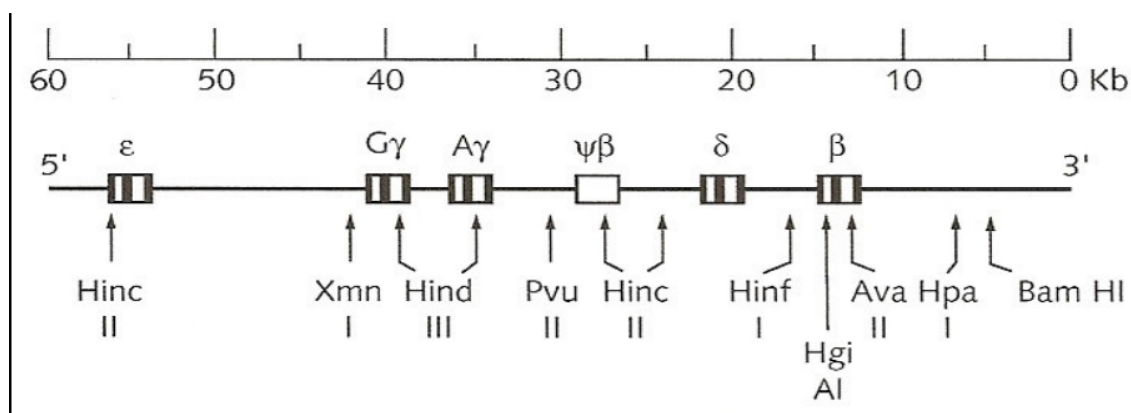
### **Efeito modulador dos Haplótipos da beta-globina**

Os haplótipos da  $\beta$ -globina são padrões de polimorfismos do DNA, localizados no cromossomo 11 de indivíduos que são portadores do gene  $\beta^S$ . São caracterizados por produzir variações de sequência na fita de DNA que alteram o sítio de reconhecimento de uma enzima de restrição, dando origem a fragmentos de diferentes tamanhos (ANTONARAKIS; KAZAZIAN; ORKIN, 1985) (figura 1). Usando

uma série de enzimas de restrição para identificar as alterações específicas no DNA, é possível identificar como se constitui as regiões adjacentes ao locus beta. O padrão de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é chamado de haplótipo (ANTONARAKIS; KAZAZIAN; ORKIN, 1985).

Os haplótipos são classificados de acordo com a região geográfica onde foram identificados: Benin, originário da África ocidental; Bantu (ou Central Africano República), proveniente da África oriental e centro-sul; Senegal, oriundo da África atlântico-ocidental; Árabe-Indiano, encontrado na Índia e Península Arábica e Camarões localizado na costa Africana ocidental (SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989; NAGEL, 1984). Outros haplótipos menos comuns são denominados Atípicos e podem ser gerados por recombinações, substituições pontuais ou através de transferência de uma sequência entre os haplótipos pré-existent (ZAGO *et al.*, 2000).

Figura 1 - representação dos sítios polimórficos do cluster  $\beta^s$  e o padrão de clivagem das enzimas de restrição.



Fonte - Adaptada de NAGEL; START, 2004.

Portadores do haplótipo Senegal e Árabe-Indiano normalmente têm o mais alto nível de HbF e o curso clínico mais brando. Indivíduos com haplótipo Bantu apresentam o menor nível de HbF e curso clínico mais grave. Portadores do haplótipo Benin apresentam características intermediárias (NAGEL, 1984; NAGEL; STEINBERG, 2001). Além de influenciar a concentração da HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), Steinberg (2009) conclui que os haplótipos também podem modificar a gravidade clínica da AF através da presença de SNPs (polimorfismos de nucleotídeos simples) que teriam influência reguladora nos genes da  $\gamma$ -globina.

Estudos realizados com diferentes grupos étnicos de pacientes com AF sugerem que o haplótipo da  $\beta$ -globina pode ser útil como um preditor de gravidade da doença e como marcador para a heterogeneidade fenotípica da AF. (STEINBERG, 2009; ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992; POWARS, 1991).

#### **1.4.2 Tratamento**

Apesar dos recentes avanços na compreensão da Anemia Falciforme, as opções terapêuticas para a doença ainda permanecem limitadas. Os tratamentos disponíveis incluem terapias sintomáticas, transfusões sanguíneas regulares, terapia medicamentosa com hidroxiuréia e transplante de células-tronco hematopoéticas (IANNONE *et al.*, 2005).

##### **Tratamentos sintomáticos**

Analgésicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina e antibióticos são os medicamentos mais utilizados para tratar crises álgicas, para inibir a progressão de glomerulonefrite e durante infecções recorrentes. A terapia transfusional também é indicada durante seqüestros esplênicos, crises aplásticas, síndrome torácica aguda, com a intenção de reduzir a proporção de HbS (KOHNE, 2011).

##### **Tratamento curativo**

Atualmente, o transplante alógeno de células-tronco é a única opção de cura para os pacientes com AF (IANNONE *et al.*, 2005). Em 2010, Simões e cols. elaboraram o Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas (TCTH), onde elegeram os seguintes critérios para a indicação de um TCTH em pacientes com AF:

- Crises vaso-oclusivas recorrentes e/ou priapismo, mesmo após uso de hidroxiuréia por seis meses sem resposta ou contraindicação ao uso da mesma;
- Presença de vasculopatia cerebral;
- Doença pulmonar falciforme graus I e II;



- Nefropatia falciforme;

A idade inicial recomendada para a realização do transplante é de 16 anos. O TCTH não é indicado para pacientes em idade mais avançada, devido à falta de doadores e aos riscos elevados durante o procedimento (SIMÕES *et al.*, 2010; IANNONE *et al.*, 2005).

### **Hidroxiuréia (HU)**

É, no momento, o único tratamento preventivo para a AF que pode reduzir o número e a severidade das crises dolorosas (em até 75% dos pacientes); diminuir o número de episódios de síndrome torácica aguda e a mortalidade (KOHNE, 2011).

A Hidroxiuréia pertence a uma classe de compostos denominados ácidos hidroxâmicos que possuem a capacidade de se ligar aos metais pesados e inativar uma série de enzimas. O efeito citotóxico primário da HU consiste em inibir a enzima ribonucleotídeo redutase que contém duas moléculas de ferro. A partir desse mecanismo é possível (i) reduzir a produção de glóbulos vermelhos contendo um elevado nível de hemoglobina falciforme (HbS), que se originam a partir de precursores que se dividem muito rapidamente durante a hematopoese e (ii) favorecer a produção de eritrócitos contendo um elevado nível de hemoglobina fetal (HbF), que tendem a ser formados a partir de progenitores que dividem mais lentamente (PLATT, 2008) (Figura 2).

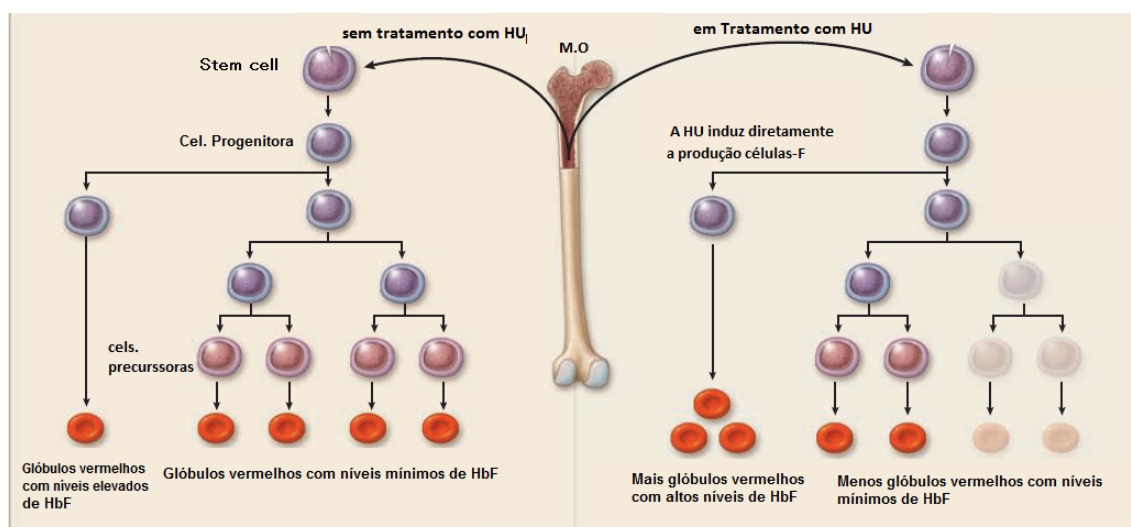
Outro efeito potencialmente importante de hidroxiuréia é o resultado do metabolismo da droga. A HU pode ser oxidada por grupos heme produzindo óxido nítrico (NO). O NO, por sua vez, estimula a enzima guanilato ciclase solúvel que aumenta a expressão do gene da HbF. Sugerindo, portanto, que um dos mecanismos de indução de HbF pelo uso da HU se dá através da síntese de NO como metabólito do medicamento (PLATT, 2008; DAVIES; GILMORE, 2003; IKUTA; AUSENDA; CAPPELLINI, 2001).

Outros efeitos associados à HU foram observados, apesar de terem mecanismos ainda desconhecidos: aumento do volume corpuscular médio, melhora da hidratação celular, reticulocitopenia, redução da expressão de moléculas de adesão na membrana eritrocitária e da contagem de neutrófilos, aumento da

eritropoetina e do fator de necrose tumoral alfa e redução do número de glóbulos brancos e plaquetas, amenizando assim as lesões vasculares e a disfunção endotelial nos pacientes com AF (PLATT, 2008; DAVIES; GILMOREM, 2003).

A dose inicial preconizada do medicamento é de 15 mg/kg/dia podendo ser aumentada para 35 mg/kg/dia de acordo com as necessidades individuais de cada paciente, tendo em vista que uma concentração de 20% de HbF seria necessária para a prevenção de eventos agudos clínicos, enquanto uma concentração de 10% evitaria danos em órgãos. (KOHNE, 2011 POWARS *et al.*, 1984).

Figura 2 - Efeito da HU induzindo a síntese da HbF em detrimento da síntese de HbS.



Fonte - PLATT, 2008.

Charache *et al.* (1995) demonstraram a eficácia de hidroxiuréia na redução da morbimortalidade em adultos com AF em um estudo realizado com 299 pacientes que foram divididos aleatoriamente e tratados com hidroxiuréia ou placebo. Como resultado, observaram a diminuição da incidência de crises dolorosas de 4,5 por ano para 2,5 por ano nos pacientes tratados com o medicamento. Steinberg e cols. (2003) observaram após 9 anos de seguimento, que pacientes em tratamento com HU apresentaram uma redução do número de crises dolorosas, dos eventos vaso-oclusivos, dos episódios de síndrome torácica aguda e de internações, além de uma redução na taxa de mortalidade de 40% quando comparados aos pacientes em uso de placebo.

Outro estudo multicêntrico realizado por Moore e colaboradores (2000) com 299 pacientes analisou a relação de custo-benefício associado à HU. O grupo de pacientes em tratamento com HU foi associado aos menores custos com hospitalizações, serviços de emergência, transfusões sanguíneas e síndromes torácicas agudas. Ao final do acompanhamento, o custo médio anual por paciente recebendo hidroxiuréia foi de \$16.81 enquanto os custos médios anuais por paciente que receberam placebo foi de \$22,02. O estudo também revelou que mesmo com o aumento dos custos de monitoramento que se fazem necessário para o tratamento com essa droga a redução total de custos com assistência médica ainda é favorável à HU.

Como efeitos adversos da HU, principalmente a curto prazo estão a mielossupressão e o surgimento de citopenias que devem ser monitoradas cuidadosamente nos pacientes em tratamento. Outras toxicidades relacionadas com os agentes quimioterápicos, como perda de cabelo, erupções cutâneas, distúrbios gastrointestinais e febre também foram relatadas. A figura 3 avalia a eficácia e a toxicidade da HU no tratamento da AF (SIMÕES *et al.*, 2010; DAVIES; GILMOREM, 2003).

Figura 3 - Eficácia e Toxicidade da HU no tratamento da AF.

Citação	Resultado	Grau de Evidência
Eficácia/efetividade	Aumento Hb fetal	Alto
	Redução de crises dolorosas	Alto
	Redução de hospitalização	Alto
	Redução de eventos neurológicos	Insuficiente
	Redução de transfusão	Alto
	Mortalidade	Alto
Toxicidade	Leucemia, SMD ou alterações citogenéticas	Baixo (suporta ausência de risco aumentado)
	Úlceras de perna	Alto (suporta ausência de risco aumentado)
	Neoplasias de pele	Insuficiente
	Neoplasias secundárias	Insuficiente
	Defeitos de espermatogênese	Baixo

Fonte - DAVIES; GILMOREM, 2003.

### 1.4.3 O processo inflamatório na AF

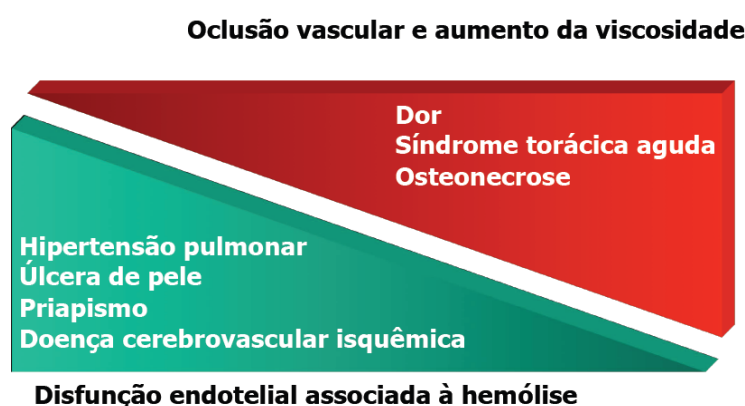
Os pacientes com AF encontram-se em um estado inflamatório crônico de origem multifatorial, que envolve células endoteliais, eritrócitos, leucócitos e

plaquetas através do aumento nas interações entre célula-célula e célula-endotélio iniciando uma lesão endotelial (ZAGO; PINTO,2007).

Kato, Gladwin e Steinberg (2007) descrevem um modelo de sobreposição de dois subfenótipos associados ao quadro inflamatório crônico dos pacientes com AF: (i) fenômenos vaso-oclusivos e (ii) disfunção endotelial causada por hemólises. No modelo proposto, pacientes com níveis mais elevados de hemoglobina S apresentam maiores chances de desencadear complicações vaso-oclusivas, devido maior polimerização da HbS que resulta em falcização de eritrócitos e adesão endotelial. Tais complicações clínicas associadas à esse fenótipo seriam osteonecrose, síndrome torácica aguda e episódios dolorosos (KATO *et al.*, 2009; KATO; GLADWIN; STEINBERG , 2007).

Por outro lado, pacientes com concentração diminuída de HbS e níveis elevados de marcadores de hemólise, como contagem de reticulócitos, desidrogenase láctica sérica (LDH), hemoglobina livre, arginase e aumento do NO apresentam um conjunto distinto de complicações provenientes de hemólises que envolvem também a disfunção endotelial. Há então, nesses pacientes, maiores chances de desencadeamento dos subfenótipos de hipertensão pulmonar, derrame cerebral, úlceras de perna e priapismo (KATO *et al.*, 2009; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007) (Figura 4).

Figura 4 - Modelo evidenciando dois subfenótipos da AF que associam o perfil inflamatório crônico com as manifestações clínicas da doença.



Níveis diminuídos de HbS estão associados às manifestações provenientes de hemólises intravascular e lesão endotelial como hipertensão pulmonar, úlcera de pele, priapismo e doença cerebrovascular isquêmica. Com o aumento da HbS e decréscimo da HbF os pacientes tendem a apresentar pior curso clínico da doença associado à vaso-oclusão, com crises dolorosas, síndrome torácica aguda e osteonecroses.

Fonte - adaptada de KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007.

A fisiopatologia inflamatória da AF está centralizada na capacidade de polimerização da HbS que leva à hemólise crônica e à vaso-oclusão (STEINBERG, 2006).

A hemólise dos eritrócitos causa a depleção do NO que é vasodilatador, liberação de endotelina 1 que é um potente vasoconstritor e maior exposição de moléculas de adesão endotelial como VCAM-1 e ICAM-1. Ocorre então a migração de leucócitos e plaquetas para esse micro ambiente pró-inflamatório com consequente produção de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) e de superóxidos que irão lesar mais ainda o endotélio e recrutar maior quantidade de células ativadas para o sítio da injúria, instalando-se, portanto, um estado inflamatório crônico (KATO *et al.*, 2009).

Já a vaso-oclusão, processo pelo qual a perfusão normal dos tecidos é interrompida por hemácias falciformes (STEINBERG, 2008), é o resultado de interações de diferentes tipos celulares, como células falcizadas, reticulócitos, leucócitos ativados, células endoteliais ativadas, plaquetas e proteínas plasmáticas (CHIANG; FRENETTE, 2005).

Então, vaso-oclusões recorrentes, crises hemolíticas e consequente ativação do endotélio vascular, induzem respostas inflamatórias contínuas na AF, que se manifestam por elevação nos níveis de citocinas inflamatórias, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e *stress* oxidativo (CONRAN; COSTA, 2009a). Os principais marcadores de inflamação, que encontram-se elevados nos pacientes com AF, incluem leucócitos, plaquetas, proteína C-reativa,  $\alpha$ -2 macroglobulina, transferrina e interleucinas pró-inflamatórias (IL -2 , IL-4, IL-6, IL-8) (OKPALA, 2006).

#### **1.4.3.1 Moléculas e Células envolvidas no estado inflamatório da AF**

##### **Citocinas e proteínas de fase aguda**

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares do sistema imune e que atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imunológica. A síntese de citocinas

é desencadeada por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. Frequentemente apresentam ação pleiotrópica e redundante. Isto significa que a mesma citocina pode apresentar diferentes atividades, dependendo das condições do microambiente celular e que diferentes citocinas podem exercer a mesma função efetora. Podem ainda potencializar ou inibir o efeito de outras citocinas, provocando efeito cascata. Dentre as principais funções exercidas por essas células, vale ressaltar: indução da inflamação, regulação da fase de resposta aguda, ativação de linfócitos, controle da síntese de anticorpos, entre outros. (BILATE, 2007).

As citocinas determinam o perfil de resposta imune a ser produzido no indivíduo, pois exercem influência direta na ativação e diferenciação das subpopulações linfócitos T. A presença de IL-12 e IFN- $\gamma$ , por exemplo, determinam um perfil inflamatório onde células T CD4<sup>+</sup> se diferenciam em linfócitos T helper tipo 1 (Th1). Altos níveis de IL-4, por sua vez, determinam um perfil anti-inflamatório, pois ocorre a diferenciação em linfócitos T helper tipo 2 (Th2). Atualmente, outras subpopulações de linfócitos T foram descritas de acordo, também, com o padrão de citocinas produzidas e sua atividade, como é o caso da IL-10 e TGF que determinam um perfil de linfócitos chamados de células T reguladoras (Treg), devido sua capacidade de supressão da resposta imune; a produção de IL-17, por sua vez, está associada a um perfil inflamatório com diferenciação nas células Th17 (BILATE; 2007).

A seguir uma breve revisão sobre as principais citocinas envolvidas na AF:

- Fator de Necrose Tumoral (TNF)

Sintetizado principalmente por fagócitos mononucleares ativados, a principal atividade biológica do TNF- $\alpha$  é como principal mediador da resposta inflamatória aguda recrutando neutrófilos e monócitos para o local da inflamação através de diversos mecanismos:

- Induz no endotélio a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos, monócitos e linfócitos, principalmente selectinas e integrinas;
- Estimula as células endoteliais a secretarem quimiocinas que acentuam a afinidade entre as integrinas expressas e seus ligantes leucocitários;

- Induzem a quimiotaxia e o recrutamento de mais leucócitos para o foco inflamatório.

Elevadas concentrações de TNF estimulam a produção de IL-6, que por sua vez induzem a liberação de proteínas de fase aguda de inflamação pelos hepatócitos (BILATE, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000).

- Interleucina -6

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que atua tanto na imunidade natural quanto adquirida, influenciando respostas imunes antígeno-específicas e reações inflamatórias. É sintetizada principalmente por fagócitos mononucleares, células endoteliais e fibroblastos em resposta a outras citocinas, como IL-1 e TNF- $\alpha$ . Na imunidade inata a IL-6 estimula a síntese de mediadores da fase aguda da inflamação nos hepatócitos e, portanto, está envolvida na resposta inflamatória aguda. Participa também da resposta imune mediada por células, uma vez que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-17) e inibe a ação das células T reguladoras. Tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (BILATE, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000).

- Interleucina -17

As células T CD4<sup>+</sup> são as principais produtoras da IL-17, que pertence ao grupo de citocinas que medeiam e regulam a imunidade adquirida. Porém, há uma relação estreita entre a interleucina 17 e as citocinas produzidas durante reações imunes naturais, como a IL-6, que é responsável pela diferenciação e manutenção das células Th17 produtoras de IL-17. Como principal atividade, a IL-17 estimula células endoteliais e macrófagos a produzirem IL-1, TNF e quimiocinas que promovem o recrutamento de neutrófilos para o local do estresse inflamatório. A IL-17 aumenta também a expressão de ICAM-1 no endotélio (BILATE, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000).

- Interleucina-8

É produzida principalmente por células endoteliais em regiões de injúria e leucócitos ativados, a partir de estímulos, como elevadas concentrações plasmáticas

de IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A IL-8 é uma quimiocina, ou seja, faz parte de um subgrupo de citocinas que controlam a adesão, a quimiotaxia e a ativação dos leucócitos. A principal ação da IL-8 é exatamente o estímulo migratório para o recrutamento das células inflamatórias e o aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais. Na AF a IL-8 promove o aumento na aderência das hemácias falciformes ao endotélio vascular via ativação da integrina  $\alpha 4\beta 1$  (ou VLA-4) e através do aumento da fibronectina endotelial. Os receptores de VLA-4 nos reticulócitos falciformes são ativados através da IL-8 (BILATE, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000).

- Interleucina -10

A IL-10 é um potente inibidor de macrófagos e células dendríticas e, portanto, está envolvida no controle das respostas imunes natural e mediada por células. É sintetizada, primordialmente, por células T reguladoras e macrófagos ativados. A principal função da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 e TNF. Inibe ainda a proliferação e a função de células do perfil Th1, favorecendo, então, o desenvolvimento de respostas do perfil anti-inflamatório Th2 (BILATE, 2007; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000).

Na AF, as citocinas estão envolvidas no processo de vaso-oclusão, através dos seguintes mecanismos (BILATE, 2007; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000):

1. Ativação endotelial;
2. Indução da interação entre eritrócitos e células endoteliais;
3. Indução da adesão de neutrófilos ao endotélio e à fibronectina plasmática;
4. Ativação plaquetária;
5. Hiperplasia vascular.

A Proteína C-reativa (PCR) é uma proteína inflamatória de fase aguda, sintetizada principalmente no fígado, e regulada por citocinas como IL-6 e TNF. A PCR está envolvida na disfunção endotelial, pois penetra na parede arterial através do fluxo sanguíneo e dirige-se aos locais de disfunção endotelial favorecendo um



estado pró-inflamatório. Os níveis de PCR estão inversamente relacionados à síntese de óxido nítrico endotelial. Além disso, induz o aumento da liberação da endotelina-1, da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais; eleva também a adesão de leucócitos e a liberação, pelos monócitos, de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF (SZMITKO *et al.*, 2003; BLAKE; RIDKER, 2001).

A fibronectina plasmática também é uma proteína de fase aguda de inflamação e sua síntese é regulada pelas interleucinas 1 e 6. Sua principal atividade é mediar a ligação entre células endoteliais e eritrócitos falciformes através dos receptores CD-36 (MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000).

### **Eritrócitos e Reticulócitos**

Os eritrócitos que assumem forma de foice na AF contribuem diretamente para o quadro inflamatório. A polimerização das moléculas de HbS leva a uma alteração na conformação e na estrutura de membrana da hemácia falciforme promovendo uma exposição extracelular de glicolipídeos que, normalmente só seriam encontrados no interior dos eritrócitos, como a fosfatidilserina. Há ainda no eritrócito falcizado a expressão anormal de moléculas de adesão, tais com a CD47 e BCAM que propiciam uma maior adesão dessas células ao endotélio. Portanto, durante o estresse inflamatório, a adesão de hemácias SS às células endoteliais encontra-se aumentada. (FRENETTE; ATWEH, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

Por se tratar de uma das células com maior capacidade de aderência endotelial, os reticulócitos são de grande importância para a vaso-oclusão e encontram-se em maior número nos pacientes com AF, devido à anemia hemolítica crônica. Os reticulócitos dos pacientes com AF apresentam em sua superfície, o complexo de integrinas  $\alpha 4\beta 1$  que se liga à fibronectina e à VCAM-1; e o receptor CD-36 que interage com o receptor CD-36 presente nas células endoteliais, através da ligação da trombospondina. (KASSCHAU; BARABINO, 1996; KUMAR, *et al.*, 1996).

### **Células endoteliais, Plaquetas e Leucócitos**

O endotélio vascular encontra-se em estado ativado na AF devido a várias condições da doença: hipóxia, infecções e aumento das concentrações plasmáticas

de citocinas pró-inflamatórias, como TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. (CONRAN; COSTA, 2009b). A ativação endotelial ocorre na presença de mediadores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), PCR e endotelina-1 (ET-1) que induzem a expressão de moléculas adesivas. A hemoglobina plasmática livre, proveniente das hemólises também tem um efeito lesivo direto nas células do endotélio (CONRAN; COSTA, 2009 (b)).

Como resultado da elevação da concentração dessas citocinas, há um aumento na expressão das moléculas de adesão endotelial (VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, trombospondina, fibronectina e integrinas) que interagem com moléculas de adesão presentes em eritrócitos falcizados, reticulócitos, leucócitos e plaquetas (JOHNSON; TELEN, 2008; FRENETTE; ATWEH, 2007).

O endotélio ativado é capaz de estimular a agregação de plaquetas através da liberação de ADP, fator tecidual, fator de Von Willebrand e de moléculas de adesão plaquetária (GPIb, PSGL-1 e ICAM) evidenciando que, durante os processos inflamatórios, a adesão de plaquetas à parede do vaso está frequentemente aumentada quando comparados ao endotélio saudável (ou não ativado) que em geral, inibe a adesão de plaquetas devido produção de fatores anti-trombóticos, como o NO<sub>2</sub> (CONRAN; COSTA, 2009(b)).

Estudos sugerem ainda que as plaquetas dos pacientes com AF circulam em um estado ativado, pois apresentam aumento das propriedades adesivas, da expressão de P-selectina e de marcadores de ativação plaquetária (CANALLI *et al.*, 2008). Ataga e Key (2007) associaram o aumento do número de plaquetas ao estado de hipercoagulabilidade sanguínea desses pacientes. Portanto, as plaquetas que se encontram em maior número e em estado ativado na AF, expressarão maior quantidade de moléculas de adesão, produzirão maior número de citocinas inflamatórias (IL-1 e IL-8) e de proteínas de fase aguda (trombospondina) e recrutarão mais células para o sítio da lesão endotelial, culminando com o fenômeno vaso-oclusivo (ATAGA; KEY 2007).

Com a ativação endotelial, ocorre também o recrutamento, ativação e a adesão dos leucócitos, sendo as selectinas L e P responsáveis pelo rolamento dos leucócitos sobre a parede do endotélio, enquanto a adesão é mediada pelas integrinas (Mac-1 e LFA-1) (CANALLI *et al.* 2008).

Nesse microambiente inflamatório que se instaura nos pacientes com AF, os leucócitos desempenham um papel fundamental. Por se tratarem de células grandes e que não se deformam com facilidade são capazes de obstruir o lúmen vascular. Durante o fluxo sanguíneo normal, os eritrócitos circulantes podem interagir com os leucócitos aderidos, sofrer desoxigenação e posterior falcização (FRENETTE; ATWEH, 2007; CANALLI, *et. al.*, 2008). Então, ao aderirem ao endotélio vascular e obstruírem o lúmen, os leucócitos promovem agregação de outras células sanguíneas, aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão, dano e injúria tecidual o que exacerba ainda mais o processo inflamatório local (CONRAN; COSTA, 2009(b)).

Os Neutrófilos dos pacientes com AF apresentam maior capacidade de adesão à fibronectina e à endotelina quando comparados aos neutrófilos de indivíduos saudáveis e, portanto, estabelecem uma relação direta com a severidade da doença (JOHNSON; TELEN, 2008). Canalli e colaboradores (2008) confirmaram o aumento da capacidade dos neutrófilos de indivíduos com AF de aderir à fibronectina, um componente da matriz extracelular, e ainda demonstram uma capacidade aumentada destas células para aderir a ICAM-1, uma molécula de adesão que é expressa em células endoteliais ativadas. Canalli e cols. (2004) demonstraram que os eosinófilos dos pacientes com AF também se encontram mais elevados e apresentam propriedades adesivas aumentadas.

### **Óxido Nítrico (NO)**

O NO participa ativamente do quadro inflamatório da AF. Por ser um potente vasodilatador, a depleção crônica NO pode contribuir para vasculopatia, vasoconstrição e hipertensão pulmonar (ROTHER *et al.*, 2005). A redução local de NO, causa vasoconstrição e por sua vez, retarda o fluxo sanguíneo, favorece o processo de falcização dos eritrócitos, aumenta a ativação plaquetária e a expressão das moléculas de adesão nos leucócitos e nas células endoteliais (ZAGO; PINTO 2007).

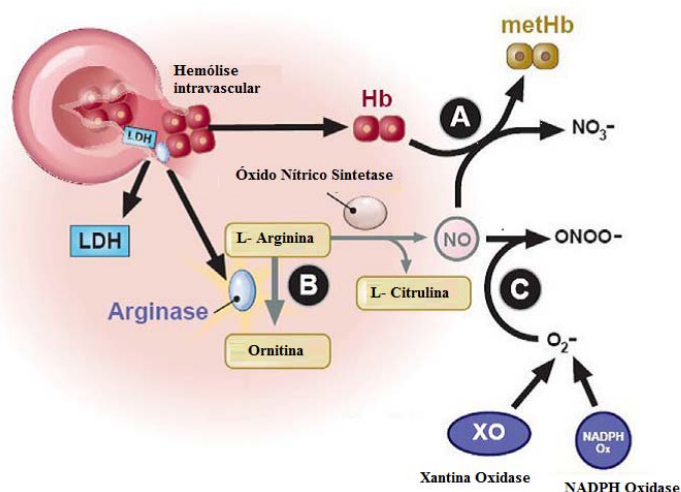
O óxido nítrico é produzido pela enzima óxido nítrico sintase que utiliza L-arginina como substrato e liga-se a guanilato ciclase solúvel, convertendo GTP em

cGMP e promovendo relaxamento do músculo liso vascular e vasodilatação (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

Com a hemólise intravascular dos eritrócitos falciformes, ocorre liberação de hemoglobina livre, arginase, e lactato desidrogenase (LDH) no plasma sanguíneo. A partir daí há uma depleção acentuada do NO por dois mecanismos diferentes. No primeiro deles, moléculas de hemoglobina livre reagem com NO formando meta hemoglobina e nitrato inerte. Através de um segundo mecanismo, a arginase plasmática consome a L-arginina originando ornitina (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

O NO também é consumido através das reações com espécies reativas de oxigênio ( $O_2^-$ ) que são produzidas devido aos elevados níveis da enzima xantina oxidase e da atividade do NADPH-oxidase, como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que é lesivo às células (Figura 5) (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007).

Figura 5 - Mecanismos de consumo do NO devido à hemólise intravascular.



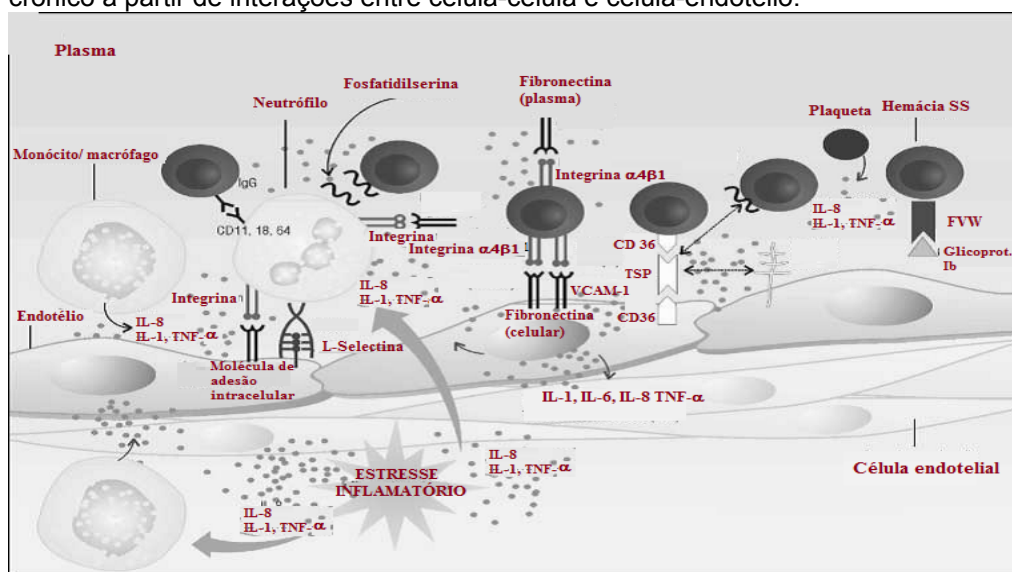
No processo fisiológico normal, a L-arginina atua como substrato da enzima óxido nítrico sintase para a síntese de NO. Com a hemólise dos eritrócitos falciformes há a liberação plasmática de hemoglobina livre que reage com NO formando meta hemoglobina e nitrato inerte (A) e arginase que consome a L-arginina originando ornitina (B). Ambos os mecanismos contribuem para a depleção acentuada do NO, proveniente da hemólise intravascular na AF.

Fonte - Adaptado de KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007.

#### 1.4.3.2 Instauração e manutenção do quadro inflamatório

Diante do ambiente inflamatório que foi exposto, interações moleculares promovem a manutenção de um estado de estresse inflamatório que culmina na vaso-occlusão. Mesmo durante a fase de estado estacionário da doença, pacientes com AF produzem constantemente citocinas inflamatórias, expressam VCAM em células endoteliais, sintetizam fibronectina e quimiocinas e expressam VLA-4 nas hemácias falciformes (STUART; NAGEL, 2004; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000). O aumento das interações dessas células ao endotélio durante o estado estacionário leva à ativação e ao dano endotelial crônico e a produção de mais citocinas e mediadores inflamatórios o que ocasiona vaso-occlusões subclínicas. Citocinas secretadas (i) pela ativação endotelial (IL-1, IL-6, IL-8, TNF) (ii) pela ativação de plaquetas (IL-1 e TNF) (iii) e por monócitos e macrófagos (IL-1 e TNF) ativam ainda mais o endotélio e criam um círculo inflamatório crônico que é característico da AF (Figura 6) (STUART; NAGEL, 2004; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000).

Figura 6 - Participação das células e moléculas na instauração e manutenção de um ciclo inflamatório crônico a partir de interações entre célula-célula e célula-endotélio.



A integrina  $\alpha 4 \beta 1$  presente no eritrócito liga-se à VCAM-1 e à fibronectinas endotelial e plasmática. A trobospondina (TSP), produzida pela ativação das plaquetas liga as células endoteliais aos eritrócitos falciformes através dos receptores CD-36, enquanto o Fator de von-Willebrand (FVW) liga o endotélio à células falciformes. Os neutrófilos ativados apresentam aumento da capacidade adesiva tanto ao endotélio, quanto à hemácias falcizadas e à fibronectina plasmática. O aumento das interações entre essas células, leva a ativação e ao dano endotelial crônico com produção de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), expressão de mais moléculas de VCAM no endotélio e aumento de VLA-4 nas hemácias falcizadas. As interleucinas que foram sintetizadas também induzem a produção de proteínas hepáticas de fase aguda, culminando com uma crise vaso-occlusiva e um quadro inflamatório marcante e vicioso.

Fonte - MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000.

Na prática, estudos comprovam os níveis elevados desses marcadores. Lanaro *et al.*(2009) avaliaram os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10 em pacientes com AF que se encontravam em tratamento ou não com HU e compararam esses valores com os de indivíduos saudáveis. Nos resultados, observaram que os níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$  e da IL-8 mostraram-se significativamente em pacientes quando comparados com indivíduos saudáveis. Para a IL-10, porém não foi observada diferença significativa entre os grupos. Acerca da influência da HU no perfil inflamatório, os pacientes em terapia com HU apresentaram níveis plasmáticos significativamente inferiores de TNF- $\alpha$  quando comparado com aos pacientes sem o uso do medicamento. Outro achado inportate foi o aumento da IL-10 no plasma de pacientes em uso de HU, confirmando a participação da citocina no papel antiinflmatório.

Makis e cols. (2006) descrevem a PCR e VCAM-1 como marcadores de severidade na AF. No estudo os autores avaliaram os níveis de IL-1; IL-2; IL-6; IL-8; IL-12; VCAM-1; ICAM-1 e PCR em 35 pacientes com AF e comparam com um grupo de indivíduos saudáveis. Como resultado, encontraram um aumento significativo nos valores de VCAM-1, ICAM-1, PCR e IL-8 dos pacientes com AF se comparado aos controles de indivíduos saudáveis e níveis equivalentes de IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 entre os grupos em estudo.

Um estudo recente avaliou a influência dos polimorfismos nos genes da IL-8 e do TNF- $\alpha$  na clínica dos pacientes e obteve como resultado que a elevação nos níveis de IL-8 é um fator de mal prognostico, pois diminui a quantidade de HbF e aumenta a HbS nos pacientes. Os mesmos autores também avaliaram a influência dos haplótipos da  $\beta$ -globina nos eventos clínicos dos pacientes e apontaram o haplótipo Bantu como fator de prognóstico, pois há um amento no risco de sequestro esplênico nos pacientes desse haplótipo (CAJADO *et al.*, 2011). Estudos recentes buscam associar a participação dos mediadores inflamatórios às características clínicas ou aos moduladores genéticos da doença, como é o caso do presente trabalho.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O estudo teve como objetivo principal avaliar a associação dos haplótipos do *cluster*  $\beta$ S no perfil inflamatório de pacientes com AF acompanhados no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza (CE), região nordeste do Brasil.

### 2.2 Objetivos específicos

- Traçar o perfil inflamatório dos pacientes com AF frente à população saudável através das dosagens de IL-6, IL-8 IL-17, TNF- $\alpha$ , PCR-us, IL-10 e TGF- $\beta$ ;
- Avaliar a correlação entre as concentrações de HbF e o perfil inflamatório dos pacientes com AF;
- Avaliar a correlação entre as concentrações de HbS e o perfil inflamatório dos pacientes com AF;
- Avaliar o efeito da terapia com HU nos níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios nos pacientes com AF.
- Determinar os haplótipos do *cluster*  $\beta$ S de pacientes com AF em Fortaleza;
- Avaliar a associação dos haplótipos da beta globina nos parâmetros hematológicos e na concentração de HbS dos pacientes com AF;

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho do estudo**

O estudo foi do tipo transversal com a finalidade de investigar a associação dos haplótipos do gene da beta globina com o perfil inflamatório de pacientes com anemia falciforme.

No período entre agosto de 2011 e junho de 2012, foram convidados a participar da pesquisa, de forma voluntária pacientes adultos com diagnóstico clínico e laboratorial de AF, atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e em acompanhamento ambulatorial no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará-HEMOCE e indivíduos saudáveis.

#### **3.2 Casuística**

O estudo foi composto por dois grupos:

- Grupo I: constituído por 67 pacientes com AF;
- Grupo II: formado por 26 indivíduos saudáveis;

##### **3.2.1 Grupo de pacientes com AF**

Foram convidados a participar do estudo, pacientes adultos, de ambos os sexos, com diagnóstico clínico e laboratorial de anemia falciforme que foi confirmado posteriormente através da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase e polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

#### **Critérios de Inclusão e Exclusão:**

Os pacientes que foram selecionados a participar do estudo encontravam-se durante fase estacionária da doença, de acordo com os critérios de Ballas (2011):

- Ausência de crises dolorosas por quatro semanas consecutivas;
- Nenhuma admissão hospitalar nos últimos 2-3 dias;
- Histórico negativo de transfusão sanguínea durante os 4 meses anteriores;



- Nenhuma intercorrência de infecção ou inflamação nas últimas 4 semanas;
- Nenhum tratamento com medicamentos que possam afetar o hemograma (antibióticos, imunossupressores, entre outros) durante as últimas 3 semanas.

Os seguintes critérios de exclusão também foram aplicados:

- Pacientes que não faziam uso de HU;
- Pacientes em uso de HU, por um período de tratamento menor que 6 meses;
- Pacientes em uso de HU em uma dose inferior a 500mg/dia ou superior a 1,5mg/dia;
- Quando se recusaram a participar do estudo não assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

### **Caracterização da população estudada**

Dos 67 pacientes selecionados, 30 (44,8%) eram do sexo masculino e 37 (55,2%) do sexo feminino, a idade da população variou entre 21 e 66 anos com média 34,9 ( $\pm 11,3$ ) anos. Os pacientes se encontravam em tratamento com HU em uma dose que variava entre 15 e 25mg/kg/dia, com média diária de 20 ( $\pm 0,6$ ) mg/kg e por um período de tempo compreendido entre 6 e 60 meses, em média 18 ( $\pm 3,4$ ) meses.

Os pacientes foram estratificados quanto aos haplótipos do gene  $\beta S$  em: Bantu/Bantu (n=31); Bantu/Benin (n=22); Benin/Benin (n=8) e Bantu/Atípico (n=6) e também quanto ao tempo de tratamento e à dose administrada de HU (SILVA *et al.*, 2012; FRIEDRISCH, J.R. *et al*, 2008).

- Quanto à dose diária: 67 pacientes, 38 (56,7%) recebiam uma dose menor que 20mg/kg/dia de HU, enquanto 29 (43,3%) pacientes recebiam dose  $\geq$  20mg/kg/dia de HU;

- Quanto ao tempo de tratamento: 41 (61,2%) pacientes faziam uso da HU por um tempo inferior a 20 meses e 26 (38,8%) permaneciam no tratamento por um período  $\geq 20$  meses.

### **3.2.2 Grupo Controle**

Foram incluídos na pesquisa 26 indivíduos saudáveis para compor o grupo controle, sendo 11 do sexo masculino (42,2%) e 15 (57,7%) do sexo feminino. A idade média da população foi de 31 ( $\pm 2,1$ ) anos e variou dentro do intervalo entre 22 e 53 anos. Os indivíduos apresentavam perfil eletroforético (HbAA), com ausência de doença infecciosa ou inflamatória em um período inferior a 4 semanas, captados na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

### **3.3 Local de estudo**

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológica (LHGDH) do Curso de Farmácia da UFC e no ambulatório do HUWC da Universidade Federal do Ceará.

### **3.4 Coleta das Amostras biológicas**

Foram coletados 8mL de sangue venoso em EDTA para a extração de DNA genômico, dosagem das citocinas e de PCR-us. O DNA genômico e o plasma foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a sua utilização.

### **3.5 Coleta dos dados laboratoriais**

Os dados laboratoriais (Hb, Ht, HCM, VCM, CHCM, Leucócitos, Plaquetas, HbF e HbS) dos pacientes com AF foram obtidos através de consulta aos prontuários médicos no mesmo momento da coleta das amostras biológicas.

### 3.6 Testes Realizados

**3.6.1 Análise molecular:** Primeiramente foi realizada a confirmação da HbSS e em seguida o estudo dos haplótipos da mutação  $\beta$ S no gene da cadeia beta globínica. Os dois procedimentos foram realizados através da extração do DNA de leucócitos, seguida da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase e polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP).

- **Extração do DNA genômico:** O DNA foi isolado de leucócitos, a partir de amostras de sangue total, colhidas em tubos contendo o anticoagulante EDTA, seguindo o seguinte protocolo: (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1992).

#### PARTE I (Obtenção do buffy-coat):

1. Centrifuga-se o sangue total de 5 a 10 minutos a 2000 rpm;
2. O plasma é descartado e a suspensão remanescente (hemácias e leucócitos) é invertida em um tubo;
3. Adiciona-se 2,5 vezes da suspensão contida no tubo de solução de lise (9 partes de  $\text{NH}_4\text{CL}$  para 1 parte de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), a nova suspensão é deixada em repouso por 15 minutos, sendo homogeneizada a cada 30 segundos e após centrifugada a 2.000 rpm por 20 minutos;
4. A suspensão centrifugada contida no tubo é invertida em um tubo Eppendorf e, em seguida, é adicionado 1.200  $\mu\text{L}$  da solução de lise;
5. O Eppendorf é centrifugado a 4000 rpm por 5 min;
6. Após centrifugação, o Eppendorf é invertido, sendo descartado o sobrenadante, para posterior adição de 1.200  $\mu\text{L}$  da solução de lise, soltando o botão do precipitado. A suspensão é centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos;
7. O Eppendorf é novamente invertido, sendo descartado o sobrenadante, para posterior adição de 1.200  $\mu\text{L}$  da solução de TKM-1, soltando o botão do precipitado. A suspensão é centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos e congelada a uma temperatura de  $-20^\circ\text{C}$  até a realização da segunda parte do protocolo.

#### PARTE II (Precipitação de proteínas e obtenção do DNA):

1. A amostra é descongelada;

2. Adiciona-se 1 mL da solução de TKM-1, soltando o botão (esta etapa é repetida mais uma vez), em seguida, o Eppendorf é centrifugado a 11.000 rpm por 5 minutos;
3. O sobrenadante é descartado e é adicionado ao tubo 800 uL de TKM-2 + 50 uL de SDS, soltando o botão (O TKM-2 é para lavagem de hemácias e o SDS é um detergente que remove as células existentes, pois dilui as membranas). A suspensão é deixada em repouso no banho-maria por 1 hora a 55°C;
4. Após a etapa do banho-maria, é adicionado ao tubo 360 uL de NaCl, soltando o botão (NaCl precipita as proteínas e restos celulares). A suspensão é centrifugada a 11.000 rpm por 10 minutos;
5. O sobrenadante é transferido para um tubo, sendo adicionado 2 mL de etanol a 100% (O DNA é insolúvel no álcool). Sucessivas agitações são feitas no tubo até o aparecimento da nuvem de DNA. Transfere-se 200 uL da suspensão para outro eppendorf. O tubo e o Eppendorf são deixados overnight no freezer a uma temperatura de 0°C;
6. O tubo é centrifugado a 4.400 rpm por 30 minutos e o Eppendorf a 11.000 rpm por 10 minutos;
7. O sobrenadante é descartado (o DNA está no precipitado). Os tubos são deixados em repouso a temperatura ambiente para secagem por aproximadamente 6 horas;
8. É adicionado 200 uL de água-miliq, lavando bem o tubo e transferindo para o eppendorf correspondente.
9. Após a realização do protocolo de extração, todas as amostras de DNA extraído são quantificadas no aparelho Nanodrop, para posterior amplificação gênica. As amostras são armazenadas a -20° C até o momento da utilização.

#### **- PCR-RFLP**

A confirmação da HbSS e a análise dos haplótipos da mutação  $\beta$ S foi realizada por meio da técnica da reação em cadeia mediada pela polimerase e polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (CLARK; THEIN, 2004).

#### **- Confirmação da HbSS**

A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 11 µL de água para injeção; 12,5 µL de PCR Master Mix; 0,25 µL do oligonucleotídeo P277; 0,25 µL do oligonucleotídeo P278; e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima Dde I (3,3 µL de água para injeção; 0,2 µL da enzima Dde I; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas (SAIKI *et al.*, 1985).

#### - Análise dos haplótipos da mutação $\beta S$

Foram analisados seis sítios polimórficos de restrição, seguindo a metodologia de Sutton; Bouhassira e Nagel (1989): 1. XmnI 5'γG, 2. Hind III γG, 3. Hind III γA, 4. Hinc II ψβ, 5. Hinc II 3'ψβ, 6. Hinf I 5'β.

As informações sobre as enzimas de restrição utilizadas, as região de clivagem no DNA, o tamanho dos fragmentos após amplificação e após a clivagem com seus respectivos padrões de haplótipos estão representadas na tabela 3

Tabela 3 - Enzimas de restrição utilizados para a detecção de haplótipos do cluster do gene beta S, regiões de sítios polimórficos, tamanho dos fragmentos de DNA antes e após a clivagem e o padrão de polimorfismo para cada haplótipo.

Enzima	Região	Tamanho do fragmento de DNA	Fragmento de DNA após a clivagem	Haplótipo				
				Senegal	Benin	Bantu	Camarões	Arabe-Indiano
<i>Xmn I</i>	5'γ <sup>G</sup>	650pb	450pb +200pb	+	-	-	-	+
<i>HindIII</i>	γ <sup>G</sup>	780pb	430pb+340pb +10pb	+	-	+	+	+
<i>Hind III</i>	γ <sup>A</sup>	760pb	400pb +360pb	-	-	-	+	-
<i>Hinc II</i>	ψβ	701pb	360pb +340pb +1pb	+	-	-	-	+
<i>Hinc II</i>	3'ψβ	590pb	470pb+120pb	+	+	-	+	+
<i>Hinf I</i>	5'β	380pb	240pb +140pb	+	-	-	+	-

Fonte - Sutton; Bouhassira; Nagel, 1989.

Todas as amostras foram analisadas para os seis sítios polimórficos seguindo os seguintes protocolos:

**H0 e H1:** A reação foi realizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . No eppendorf foram adicionados 11  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix; 0,25  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H0; 0,25  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H1; e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5  $\mu\text{L}$  do mix da enzima Xmn I (3,3  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima Xmn I; 1,5  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima) a 10  $\mu\text{L}$  do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H2 e H3:** A reação foi realizada para um volume final de 33  $\mu\text{L}$ . No eppendorf foram adicionados 18,5  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix; 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H2; 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H3; e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5  $\mu\text{L}$  do mix da enzima Hind III (3,3  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 0,2  $\mu\text{L}$  da enzima Hind III; 1,5  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima) a 10  $\mu\text{L}$  do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H3 e H4:** A reação foi realizada para um volume final de 33  $\mu\text{L}$ . No eppendorf foram adicionados 18,5  $\mu\text{L}$  de água para injeção; 12,5  $\mu\text{L}$  de PCR Master Mix; 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H3; 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo H4; e 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a

digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima Hind III (3,3 µL de água para injeção; 0,5 µL da enzima Hind III; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H5 e H6:** A reação foi realizada para um volume final de 33 µL. No eppendorf foram adicionados 18,5 µL de água para injeção; 12,5 µL de PCR Master Mix; 0,5 µL do oligonucleotídeo H5; 0,5 µL do oligonucleotídeo H6; e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima Hinc II (3,3 µL de água para injeção; 0,5 µL da enzima Hinc II; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

**H7 e H8:** A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 10,5 µL de água para injeção; 12,5 µL de PCR Master Mix; 0,5 µL do oligonucleotídeo H7; 0,5 µL do oligonucleotídeo H8; e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 57°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima Hinc II (3,3 µL de água para injeção; 0,2 µL da enzima Hinc II; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

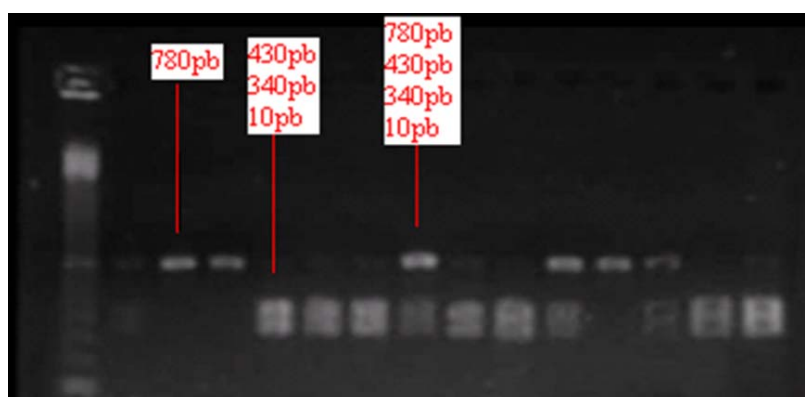
**H9 e H10:** A reação foi realizada para um volume final de 25 µL. No eppendorf foram adicionados 10,5 µL de água para injeção; 12,5 µL de PCR Master Mix; 0,5 µL do oligonucleotídeo H9; 0,5 µL do oligonucleotídeo H10; e 1 µL de DNA genômico. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 94°C por 5 minutos; acrescida de 35 ciclos compreendendo desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento dos oligonucleotídeos a 57°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos; e mais um último ciclo de extensão a 72°C por 10

minutos, mantido a 4 °C por até no máximo 6 horas. Após amplificação, foi realizada a digestão enzimática adicionando-se 5 µL do mix da enzima Hinf I (3,3 µL de água para injeção; 0,2 µL da enzima Hinf I; 1,5 µL do tampão da enzima) a 10 µL do produto amplificado, deixando em banho-maria a 37°C por 3 horas.

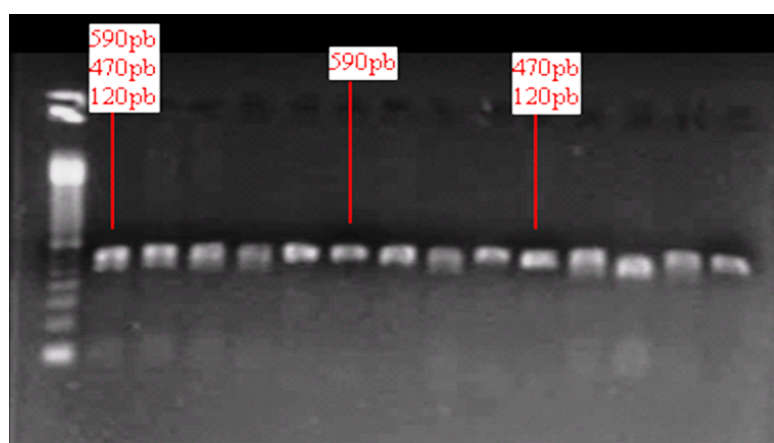
O PCR Master Mix utilizado nos protocolos foi da marca Fermentas (0,025 de Taq DNA Polimerase; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP) e as reações de amplificação foram desenvolvidas no termociclador Eppendorf.

Os resultados da amplificação foram verificados pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%, sob corrente constante de 80 V por 30 minutos, e visualizados em câmara de UV (ultravioleta) após coloração com brometo de etídio (figuras 7 e 8).

**Figura 7** - Restrição H2H3: (1) homozigoto normal, (2) homozigoto mutante- Bantu/Bantu, (3) heterozigoto.



**Figura 8** - Restrição H7H8: (1) heterozigoto (2) homozigoto normal (3) homozigoto mutante- Benin/Benin





### 3.6.2 Dosagem das Citocinas

As citocinas IL-6, IL-8, IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$  foram dosadas por Elisa através de kits específicos da e-Bioscience®, seguindo o seguinte protocolo:

1. Colocar 100 uL/poço de anticorpo de captura em tampão de revestimento. Selar a placa e incubar durante a noite a 4 ° C.
2. Aspirar cada poço e lavar 5 vezes com 250uL/poço. Esperar 1 minuto durante cada passo de lavagem. Bater a placa sobre papel absorvente para remover qualquer tampão residual.
3. Colocar 200 uL/poço do diluente de ensaio 1x. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Aspirar / lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.
5. Adicionar 100 uL/poço do padrão aos poços apropriados. Executar duas diluições em série das normas de topo para fazer a curva padrão.
6. Adicionar 100 uL/poço das amostras aos poços apropriados. Cobrir ou selar a placa e incubar à temperatura ambiente durante 2 horas (ou durante a noite a 4 ° C para a sensibilidade máxima).
7. Aspirar / lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.
8. Adicionar 100 ul / poço de anticorpo de detecção. Selar a placa e incubar à temperatura ambiente durante 1 hora.
9. Aspirar / lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.
10. Adicionar 100 uL/poço de avidina-HRP. Selar a placa e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
11. Aspirar e lavar como no passo 2. Repetir um total de 7 lavagens.
12. Adicionar 100 uL/poço de solução de substrato a cada poço. Incubar placa à temperatura ambiente durante 15 minutos.
13. Adicionar 50 ul de solução de parada em cada poço.
14. Realizar a leitura da placa em 450 nm.

### 3.6.3 Dosagem da PCR-us

A PCR-us foi dosada por imunoturbidimetria, através de kit específico da Wiener lab. utilizando o aparelho Konelab. O experimento foi realizado no Hospital Infantil Albert Sabin.

### 3.7 Descarte do material biológico

O descarte do material biológico foi realizado segundo a resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

### 3.8 Análise Estatística

a análise estatística foi realizada usando o *software livre* R. A versão utilizada foi a 2.12.0.

O teste de Welch foi utilizado para a comparação entre o perfil inflamatório dos pacientes com AF e do grupo controle. Para a análise da associação entre os haplótipos com os parâmetros hematológicos e com os haplótipos dos pacientes com AF, foi realizado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Por conseguinte, realizou-se os testes não-paramétricos de comparações múltiplas via bootstrap para os parâmetros significativos, com o objetivo de se detectar as diferenças existentes entre os grupos. O teste não-paramétricos de Kruskal-Wallis também foi utilizado na análise do efeito da terapia com HU no perfil inflamatório de pacientes com AF e para a relação entre o perfil de Hb e os marcadores de inflamação.

### 3.9 Comitê de Ética

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o número de protocolo 013.03.12.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características hematológicas dos pacientes com AF

A tabela 4 apresenta os parâmetros hematológicos (Hb, Ht, HCM, VCM, CHCM, Leucócitos, Plaquetas, HbF e HbS) dos pacientes com AF.

**Tabela 4** - Distribuição dos valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação dos pacientes com AF (n=67) de acordo com as características laboratoriais.

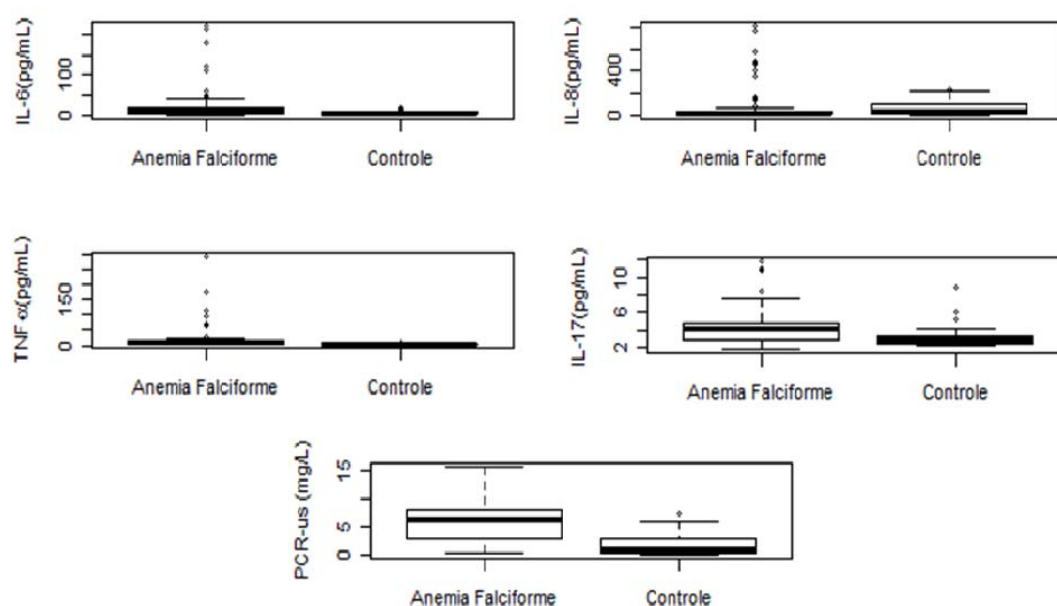
	Média	Desvio- padrão	CV (%)
Hb (g/dL)	8,7	1,4	15,7
Ht ( %)	25,2	3,9	15,5
VCM (fl)	99,6	10,5	10,5
HCM (pg)	34,6	4,3	12,4
CHCM (g/dL)	34,3	1,40	4,1
Leucócitos	12.630	15757,5	124,7
Plaquetas	314.000	17,4	55,4
HbF ( %)	12,6	7,3	57,8
HbS (%)	81,13	8	9,6

HbF: Hemoglobina Fetal; HbS: Hemoglobina S; Hb: Hemoglobina; Ht: Hematócrito; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; CV: Coeficiente de Variação

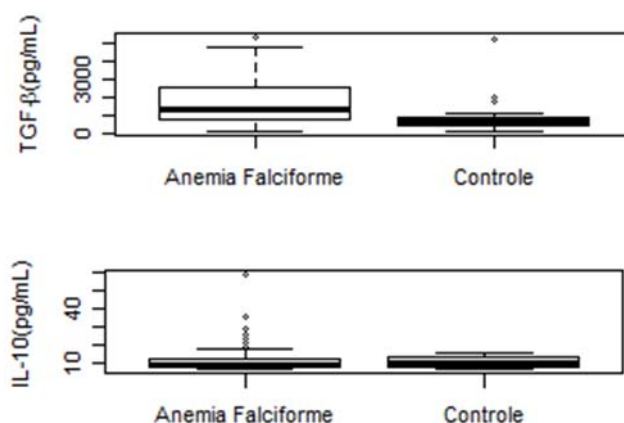
### 4.2 Perfil inflamatório dos pacientes com AF

Com o objetivo de estabelecer o perfil inflamatório dos pacientes com AF frente à população saudável, foram dosadas as citocinas IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-17 que compõem o perfil pró-inflamatório e as citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  de caráter regulatório da resposta imune e ainda a PCR-us nos 67 pacientes com AF e em 26 indivíduos saudáveis - grupo controle (figuras 9 e 10).

**Figura 9** - Box-plot da distribuição dos marcadores pró-inflamatórios nos pacientes com AF (n=67) e no grupo controle (n=26).



**Figura 10** - Box-plot da distribuição dos marcadores antinflamatórios nos pacientes com AF (n=67) e em indivíduos saudáveis (n=26).



A Tabela 5 evidencia os valores p dos testes de igualdade entre as médias, na qual se observa que as citocinas IL-8 e IL-10 não discriminam os pacientes dos controles, ao nível de 5%. Para todos os demais marcadores, os pacientes apresentam um valor médio do perfil superior aos indivíduos sadios (controles).

**Tabela 5** - Níveis descritivos (valores p) para os testes de igualdade entre médias dos marcadores inflamatórios para os grupos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis. Os dados foram analisados utilizando o teste de Welch, com valores-p obtidos via bootstrap.

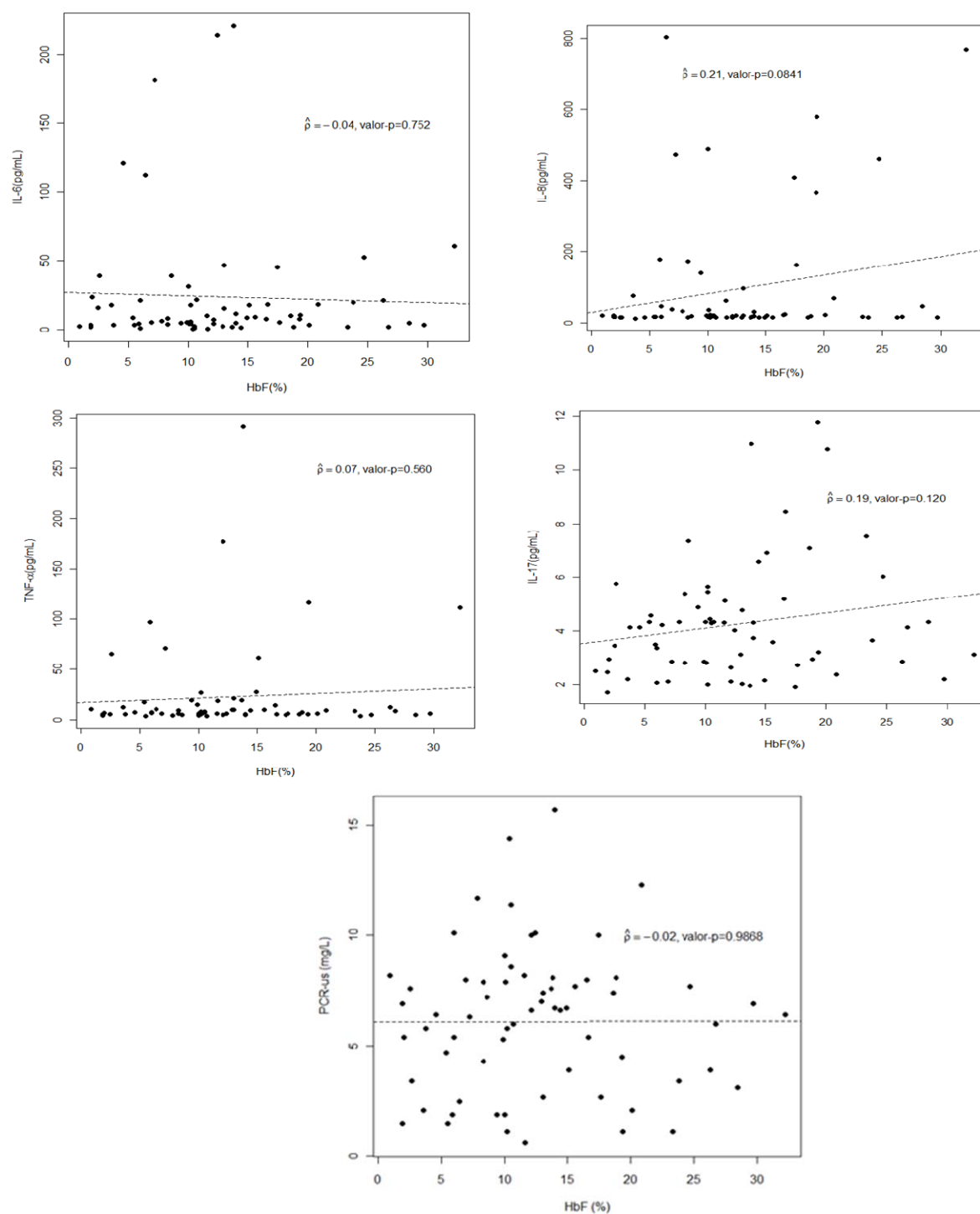
Marcador	Valor p
IL-6(pg/mL)	<b>0,003*</b>
IL-8(pg/mL)	0,324
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	<b>0,002*</b>
IL-17(pg/mL)	<b>0,015*</b>
PCR-us (mg/L)	<b>&lt;0,001*</b>
TGF- $\beta$ (pg/mL)	<b>0,001*</b>
IL-10(pg/mL)	0,264

\* p<0,05

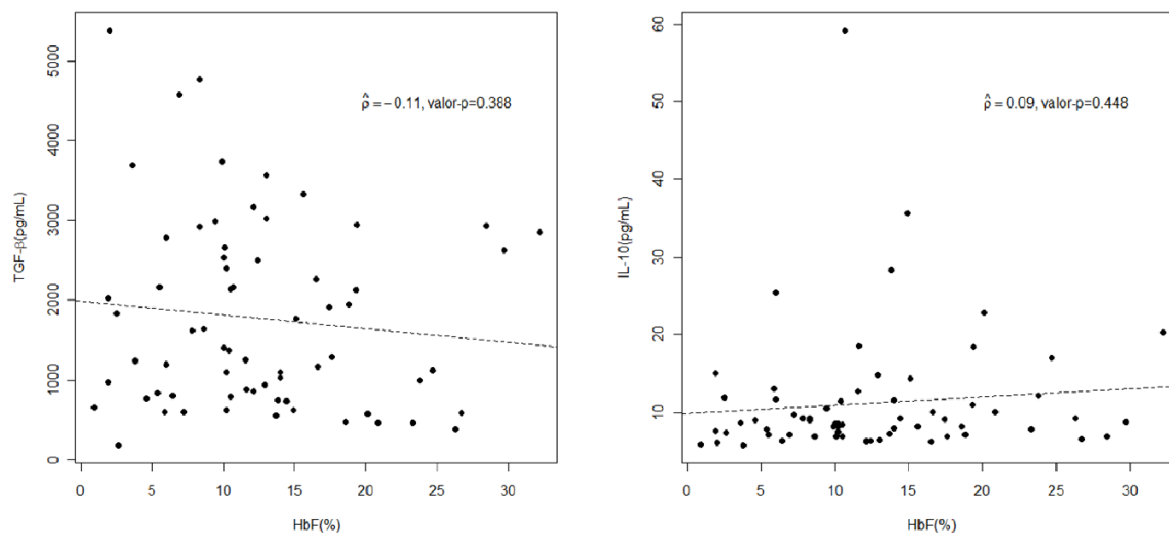
#### 4.4 Correlação entre a concentração de HbF e o perfil inflamatório nos pacientes com AF

As figuras 11 e 12 apresentam os respectivos diagramas de dispersão, em conjunto com os coeficientes de correlação de Pearson amostrais e o valor-p, com objetivo de avaliar a correlação entre a HbF com os marcadores inflamatórios nos pacientes. Verifica-se que ao nível de 5%, não houve relação linear entre HbF e HbS com os valores dos marcadores de inflamação.

**Figura 11** – Diagrama de dispersão da concentração de HbF versus marcadores pró-inflamatórios em pacientes com AF (n=67).



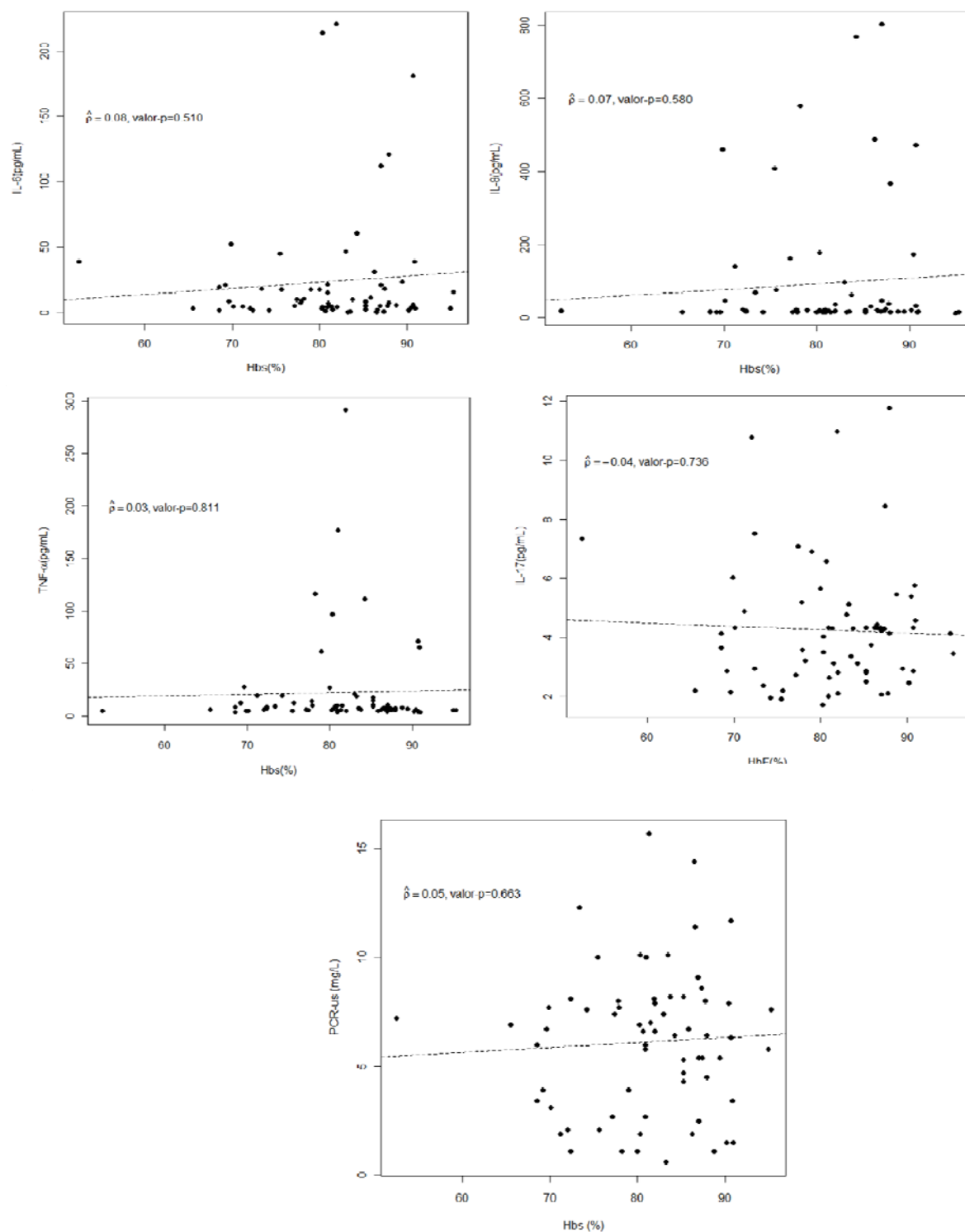
**Figura 12** – Diagrama de dispersão da concentração de HbF versus marcadores antiinflamatórios em pacientes com AF (n=67).



#### 4.5 Correlação entre a concentração de HbS e o perfil inflamatório nos pacientes com AF

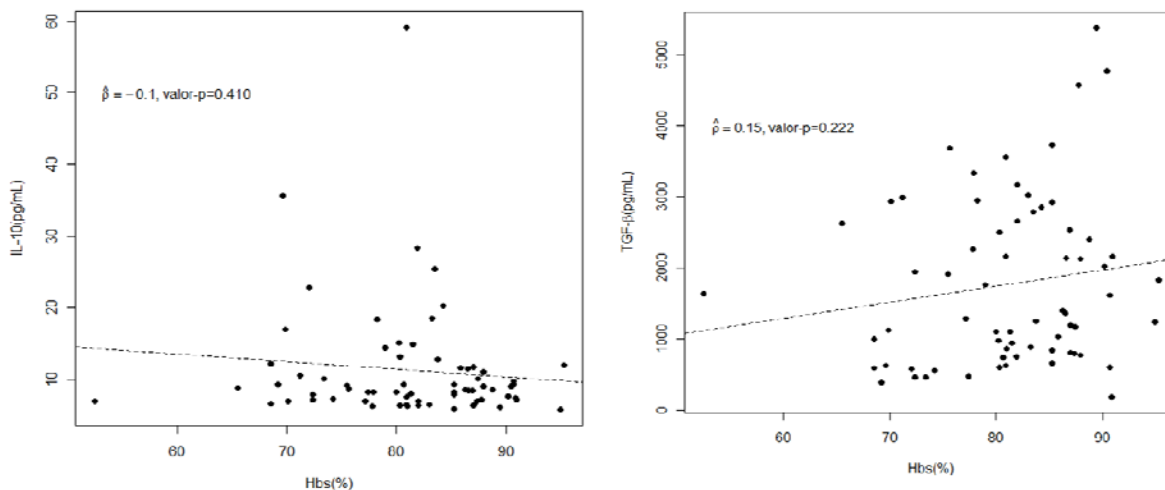
Com objetivo de avaliar correlação existente entre a concentração de Hemoglobina S (HbS) com os marcadores inflamatórios foram realizados os diagramas de dispersão, em conjunto com os coeficientes de correlação de Pearson amostrais e o valor-p relacionado ao teste (figuras 13 e 14).

**Figura 13** - Diagrama de dispersão da concentração de HbS versus marcadores pró-inflamatórios em pacientes com AF (n=67).





**Figura 14-** Diagrama de dispersão da concentração de HbS versus marcadores pró-inflamatórios em pacientes com AF (n=67).

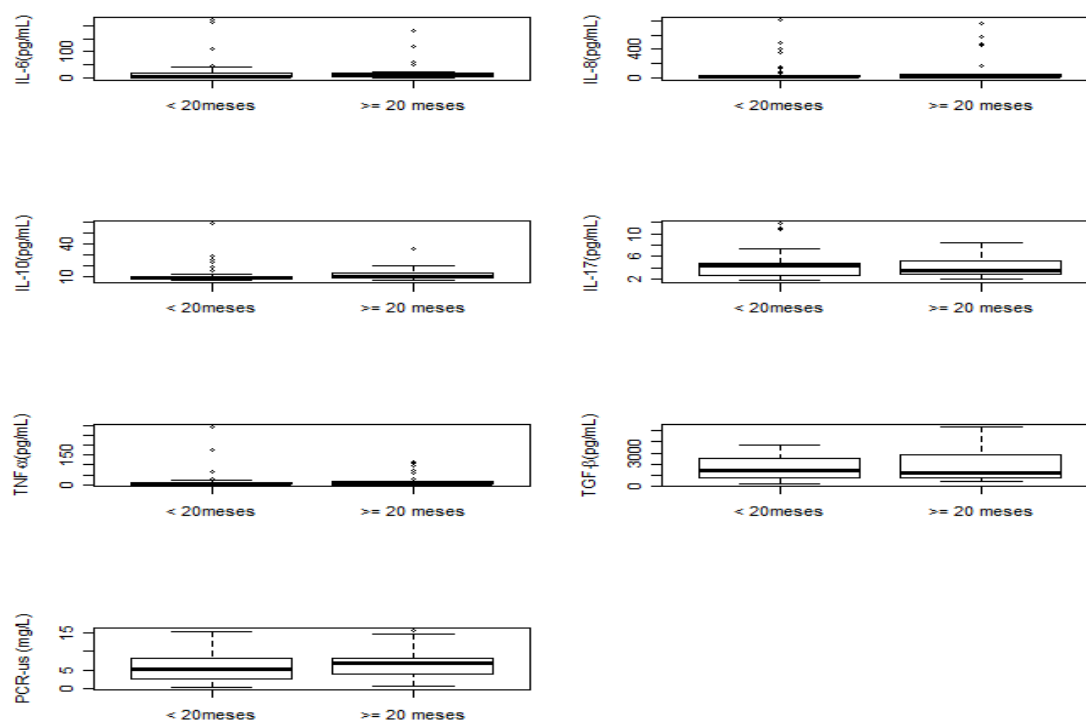


#### 4.6 Efeito da terapia com HU nos níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios nos pacientes com AF

Com a finalidade de avaliar o efeito da HU no perfil inflamatório dos pacientes com AF foi realizada a estratificação de acordo com o tempo de tratamento (<20meses ou  $\geq$  20meses de uso do medicamento) e com a dose diária de HU (<20mg/kg/dia ou  $\geq$ 20mg/kg/dia) (SILVA *et al.*, 2012; FRIEDRISCH, J.R. *et al*, 2008) (figuras 15 e 16).

##### 4.6.1. Perfil inflamatório dos pacientes com AF de acordo com tempo de tratamento com HU

**Figura 15** - Box-plot da distribuição dos marcadores inflamatórios dos pacientes com AF (n=67) de acordo com o tempo de tratamento com HU.



Na Tabela 6, podem-se verificar os valores-p do teste de Kruskal-Wallis. Somente a IL-10 apresentou significância ao nível de 5%, onde infere-se que os pacientes com AF que permaneceram em tratamento com HU por um período  $\geq 20$  meses apresentam valores médios (e medianos) de IL-10 maiores, comparativamente, aos pacientes que encontravam-se em tratamento por um período menor que 20 meses de tratamento.

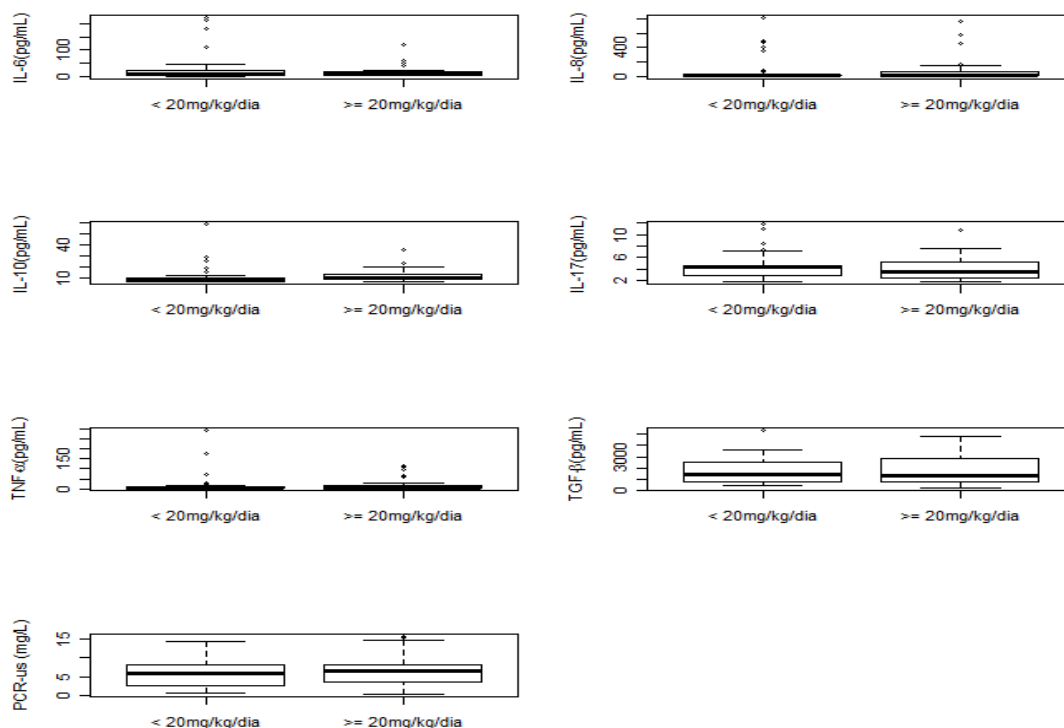
**Tabela 6** - Níveis descritivos (valores p) dos testes para avaliar efeito do tempo de tratamento com HU nos marcadores inflamatórios de pacientes com AF (n=67).

Perfil	Valor p
IL-6(pg/mL)	0,418
IL-8(pg/mL)	0,812
IL-10(pg/mL)	<b>0,014*</b>
IL-17(pg/mL)	0,723
TNF-α (pg/mL)	0,550
TGF-β (pg/mL)	0,704
PCR-us (mg/L)	0,187

\*p<0,05

#### 4.6.2. Perfil inflamatório dos pacientes com AF de acordo com a dose diária de HU

**Figura 16** - Box-plot da distribuição dos marcadores inflamatórios dos pacientes com AF (n=67) de acordo com a dose diária de HU.



Na Tabela 7, podem-se observar os valores-p do teste de Kruskal-Wallis, para avaliar a influência da dose diária de HU nos marcadores inflamatórios dos pacientes com AF.

**Tabela 7** - Níveis descritivos (valores p) dos testes para avaliar efeito da dose diária de HU nos marcadores inflamatórios dos pacientes com AF (n=67).

Perfil	Valor p
IL-6(pg/mL)	0,960
IL-8(pg/mL)	0,317
IL-10(pg/mL)	<b>0,004*</b>
IL-17(pg/mL)	0,448
TNF-α (pg/mL)	0,475
TGF-β (pg/mL)	0,864
PCR-us (mg/L)	0,658

\*p<0,05

Assim como na influência do tempo de tratamento, apenas a IL-10 apresentou significância estatística ao nível de 5%. Diante disso, observa-se que os pacientes que recebiam doses  $\geq 20\text{mg/kg/dia}$ , apresentaram valores médios (e medianos) de IL-10 maiores, comparativamente, aos pacientes que receberam doses inferiores a  $20\text{mg/kg/dia}$ .

#### 4.7 Distribuição dos haplótipos do *cluster* $\beta\text{S}$

Foi realizada a confirmação molecular da HbSS e em seguida o estudo dos haplótipos da mutação  $\beta\text{S}$  no gene da cadeia beta globínicas em 67 pacientes com AF.

Como resultado, observou-se a prevalência do genótipo Bantu/Bantu em 31 pacientes (46,3%), seguido do padrão heterozigoto Bantu/Benin em 22 pacientes (32,8%), do Benin/Benin que foi constituído de 8 (11,9%) pacientes e do Bantu/Atípico com 6 pacientes (9,0%). O haplótipo Bantu foi o mais prevalente (67,1%) seguido do haplótipo Benin (28,3%) (Tabela 8).

**Tabela 8-** Distribuição dos haplótipos, cromossomos, padrão de haplótipo e genótipos nos pacientes com AF (n = 67).

Haplótipos	Cromossomos (n)	Rflps <sup>a</sup>	Genótipo	Pacientes (n)
Bantu	90 (67,1%)	-+----	Bantu/Bantu	31 (46,3%)
Benin	38 (28,3%)	----+-	Benin/Benin	8 (11,9%)
		-+---+	Bantu/Benin	22 (32,8%)
Atípico	6 (4,6%)		Bantu/Atípico	6 (9,0%)

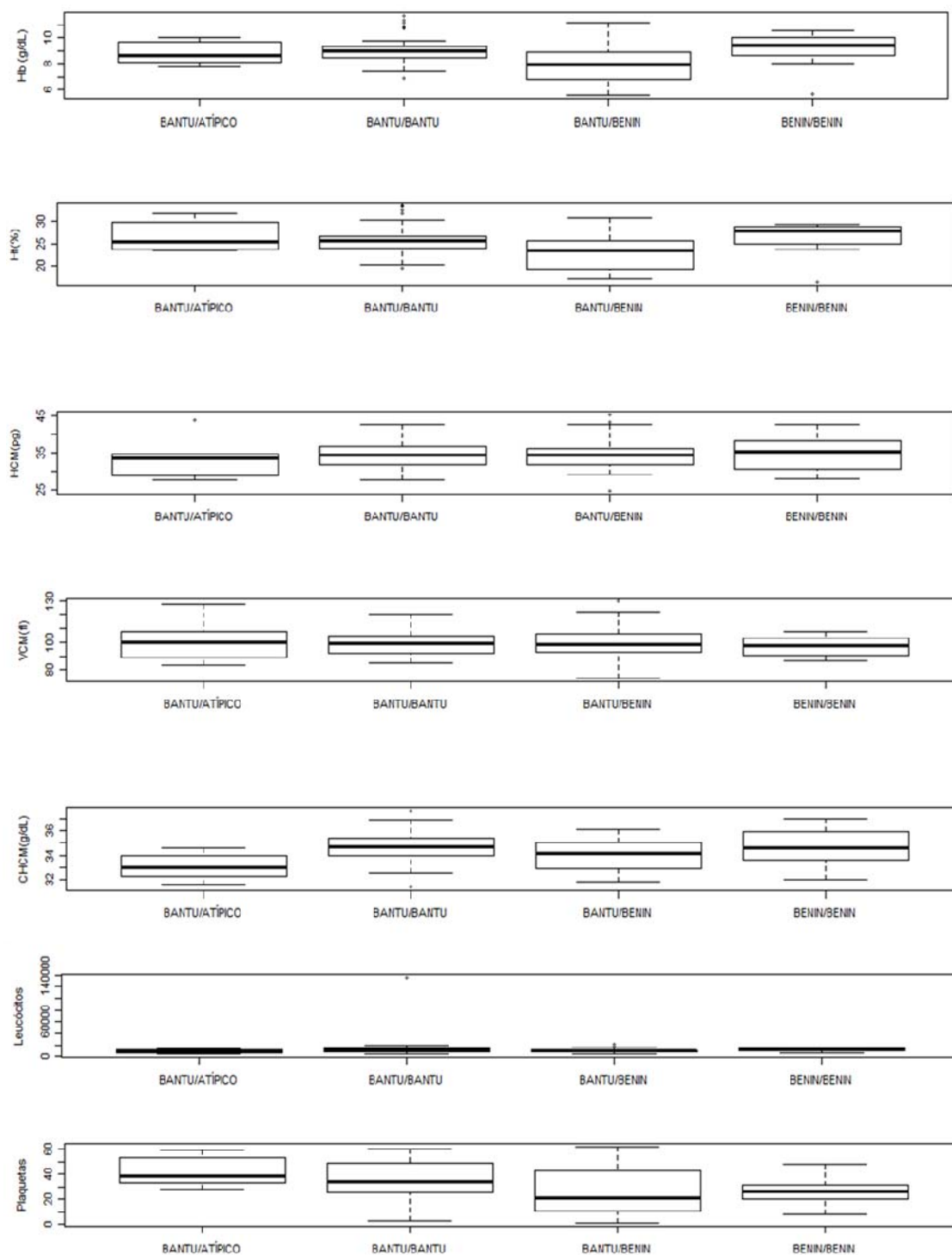
n: número; RFLP: restriction fragment length polymorphism.

<sup>a</sup> RFLP's utilizadas para definir o haplótipo segundo a ordem: 5' $\gamma^G$  – XmnI,  $\gamma^G$  – Hind III,  $\gamma^A$  – Hind III,  $\psi\beta$  – Hind II, 3' $\psi\beta$  – Hind II, 5' $\beta$  – Hinf I, respectivamente.

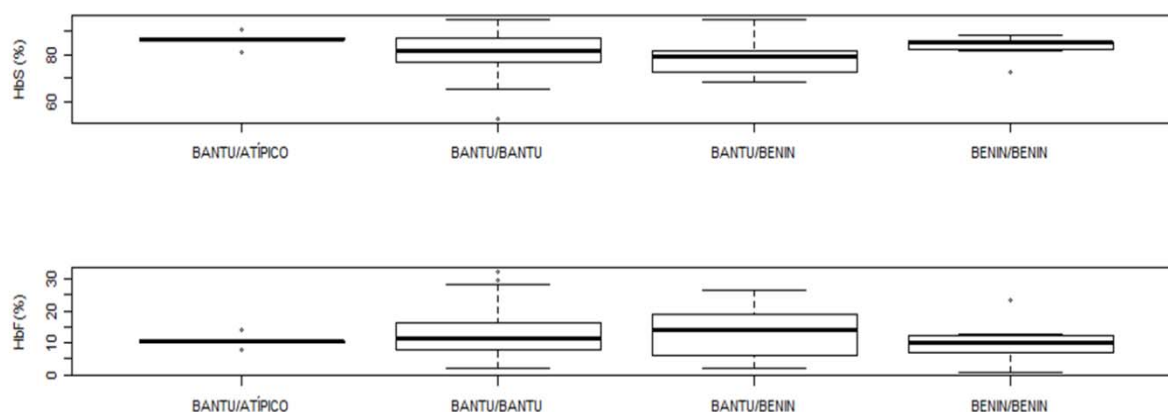
#### 4.8 Distribuição dos pacientes com AF por tipo de haplótipo do *cluster* $\beta\text{S}$ segundo os parâmetros hematológicos e perfil de Hb.

Foi avaliada a influência dos haplótipos do *cluster*  $\beta\text{S}$  nos parâmetros hematológicos e no perfil de Hb dos pacientes com AF (figuras 17 e 18).

**Figura 17** - Box-plot da distribuição dos pacientes com AF (n=67) por haplótipo do *cluster*  $\beta S$  segundo os parâmetros hematológicos (Hb, Ht, HCM, VCM, CHCM, Leucócitos e Plaquetas).



**Figura 18** - Box-plot da distribuição dos pacientes com AF (n=67) por haplótipo do *cluster*  $\beta$ S segundo as concentrações de HbS e HbF.



Os níveis descritivos (valores p) para os testes de igualdade entre medianas dos parâmetros hematológicos e das concentrações de hemoglobinas para cada tipo de haplótipo do *cluster*  $\beta$ S são observados em seguida na tabela 9.

**Tabela 9** - Níveis descritivos (valores p) dos testes para igualdade entre medianas dos parâmetros hematológicos para cada tipo de haplótipo do *cluster*  $\beta$ S no grupo de pacientes AF.

Parâmetro	Valor-p
Hb (g/dL)	<b>0,026*</b>
Ht ( %)	0,068
VCM (fL)	0,942
HCM (pg)	0,848
CHCM (g/dL)	<b>0,042*</b>
Leucócitos	0,226
Plaquetas	0,107
HbF( %)	0,607
HbS (%)	0,082

\* p<0,05

Na tabela acima, verifica-se que os parâmetros hematológicos que apresentam diferença significativa, ao nível de 5%, são a Hemoglobina (Hb) e a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). Então, seguiu-se com a realização dos testes não paramétricos de comparações múltiplas via bootstrap para

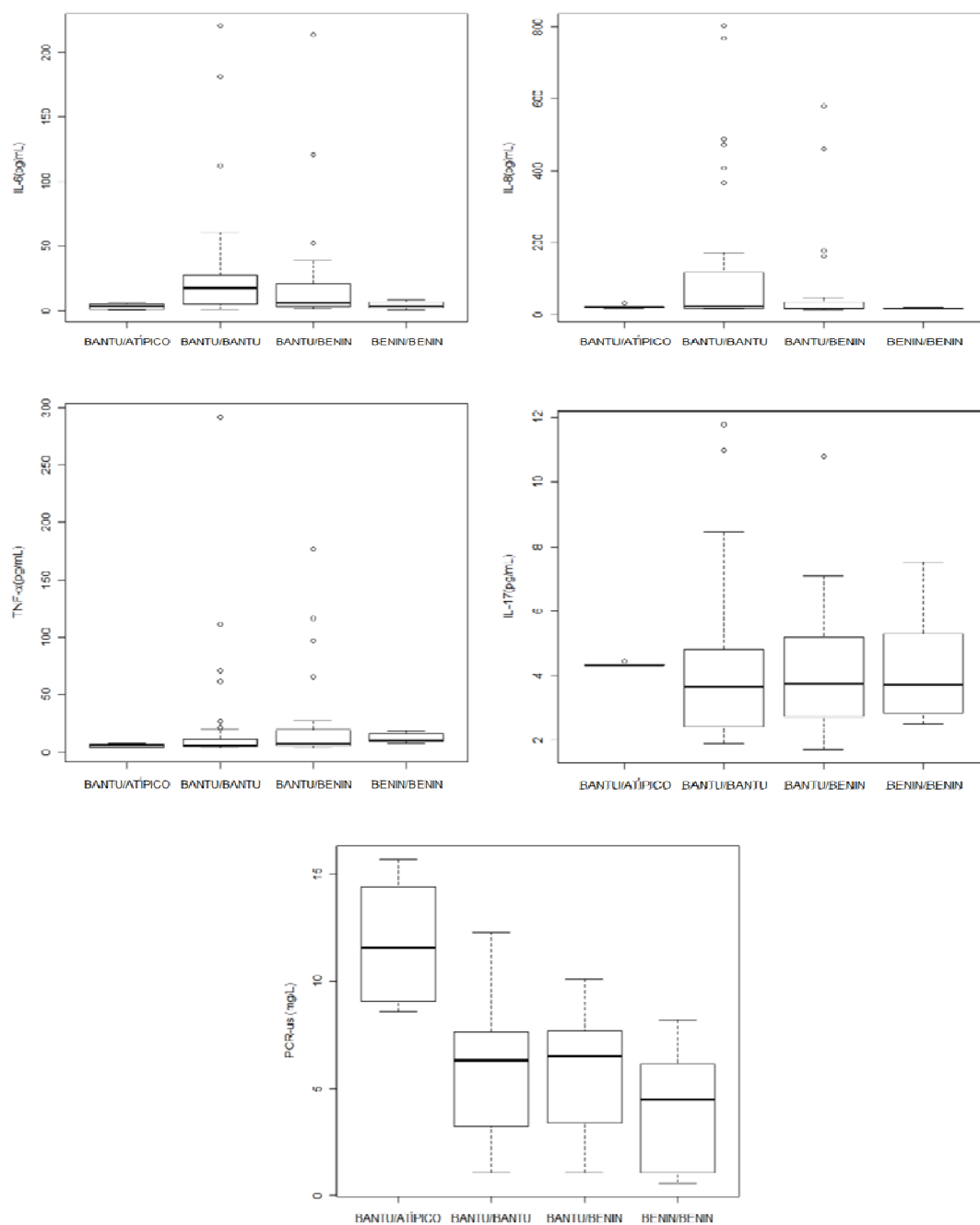
os dois parâmetros em questão, com o objetivo de se detectar as diferenças existentes.

Para a Hb, ao nível global de 5%, observou-se que os pacientes com haplótipo BANTU/BENIN apresentaram menores concentrações quando comparados aos pacientes com haplótipos BANTU/ATÍPICO, BANTU/BANTU e BENIN/BENIN. Com relação ao CHCM, verificou-se que o número mediano nos pacientes com haplótipo BANTU/ATÍPICO foi menor do que o número mediano nos pacientes com haplótipos BANTU/BANTU, BANTU/BENIN e BENIN/BENIN, enquanto que não houve diferença do CHCM para os pacientes com haplótipos BANTU/BANTU, BANTU/BENIN e BENIN/BENIN, ao nível de significância global de 5%.

#### **4.9 Marcadores de inflamação e associação com os haplótipos do *cluster* da $\beta$ -globina**

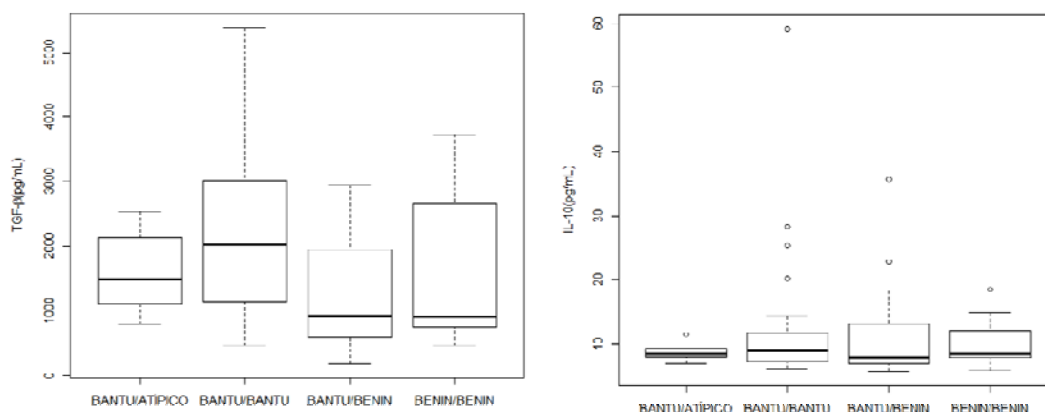
Os pacientes foram estratificados em 4 grupos de acordo com os haplótipos do *cluster*  $\beta$ S: Bantu/Atípico (n=6), Bantu/Bantu (n= 31), Bantu/Benin (n=22) e Benin/Benin (n=8). As figuras 19 e 20 evidenciam o perfil inflamatório dos pacientes com AF de acordo os haplótipos do *cluster*  $\beta$ S.

**Figura 19** - Box-plot dos marcadores pró-nflamatórios nos pacientes com AF (n=67) de acordo com os haplótipos do *cluster*  $\beta$ S.





**Figura 20** - Box-plot dos marcadores antinflamatórios nos pacientes com AF (n=67) de acordo com seus haplótipos do *cluster*  $\beta$ S.



Na Tabela 10, verificamos em valores descritivos a influência dos haplótipos do *cluster*  $\beta$ S no perfil inflamatório dos pacientes com AF (n=67).

**Tabela 10** - Níveis descritivos (valores p) dos testes para igualdade entre médias dos perfis inflamatórios para os grupos de haplótipos dos pacientes com AF. Os valores p foram obtidos utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

Perfil	Valor p
IL-6(pg/mL)	<b>0,003*</b>
IL-8(pg/mL)	<b>0,039*</b>
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,091
IL-17(pg/mL)	0,660
PCR-us (mg/L)	<b>0,006*</b>
TGF- $\beta$ (pg/mL)	<b>0,017*</b>
IL-10(pg/mL)	0,858

\* p<0,05

Observa-se que as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 não apresentaram diferença segundo os tipos de haplótipos ao nível de 5%. Então, após aplicação do teste de comparações múltiplas não-paramétricas, com valores p obtidos via bootstrap, concluiu-se, ao nível global de 5%, que:

i) **IL-6:** Os valores medianos de IL-6 para os pacientes com haplótipo BANTU/BANTUN são maiores que os respectivos valores dos pacientes com haplótipo BENIN/BENIN.

ii) **IL-8:** Os valores medianos de IL-8 para os pacientes com haplótipo BANTU/BANTUN são maiores que os respectivos valores dos pacientes com haplótipo BENIN/BENIN.

iii) **PCR-us:** Os valores medianos de PCR-us para os pacientes com haplótipo BATUN/ATÍPICO são maiores que os respectivos valores medianos para todos os demais pacientes com haplótipos BENIN/BENIN, BANTU/BANTU e BANTU/BENIN.

iv) **TGF- $\beta$ :** Os valores medianos de TGF- $\beta$  para os pacientes com haplótipo BANTU/BANTUN são maiores que os respectivos valores dos pacientes com haplótipo BANTUN/BENIN.

## 5. DISCUSSÃO

Embora todos os pacientes com AF apresentem a mesma mutação genética, observa-se uma grande variabilidade clínica entre os pacientes. Portanto, fatores adicionais, inclusive genéticos como a concomitância da  $\alpha$ -talassemia e os haplótipos da  $\beta$ -globina, podem influenciar na qualidade de vida dos doentes.

O principal evento patológico da AF é a polimerização da HbS. O polímero formado danifica os glóbulos vermelhos, aumenta a viscosidade plasmática e exacerba a expressão de moléculas de adesão endotelial. Essas mudanças causam a oclusão vascular que resulta em hemólise, disfunção endotelial, inflamação crônica e stress oxidativo (REES; GIBSON, 2011). Vaso-oclusões recorrentes, crises hemolíticas e consequente ativação do endotélio vascular, induzem respostas inflamatórias contínuas na AF, que se manifestam por elevação nos níveis de citocinas inflamatórias, diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e *stress* oxidativo (CONRAN; COSTA, 2009(a)). A partir daí, os pacientes com AF encontram-se em um estado inflamatório crônico de origem multifatorial, que envolve células endoteliais, eritrócitos, leucócitos e plaquetas. (ZAGO; PINTO, 2007).

Vários estudos já demonstraram níveis elevados de citocinas em pacientes mesmo durante o estado estacionário da AF (RAGHUPATHY *et al.*, 2000; CROZIAT, 1994), pois acredita-se que ocorram oclusões microvasculares nessa fase da doença. Estes micro-enfartes subclínicos seriam induzidos pelo aumento nas propriedades adesivas dos reticulócitos e eritrócitos falciformes ao endotélio vascular e pela ativação crônica endotelial com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), porém não se tornam suficientes para gerar uma complicação clínica (STUART; NAGEL, 2004; MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000; HEBBEL, 1997).

No presente estudo, pacientes com AF em uso de HU e durante estado estacionário da doença apresentaram valores elevados das citocinas com perfil pró-inflamatório IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17 quando comparados à população saudável, fato esse que se encontra de acordo com a literatura, uma vez que há, na AF, um quadro inflamatório crônico.

Outro estudo recente também obteve resultados semelhantes ao presente, onde os valores de TNF- $\alpha$ , IL-6 mostraram-se elevados em pacientes com AF durante estado basal em relação à voluntários saudáveis (QARI; DIER; MOUSA, 2012).

Em um trabalho realizado por Noronha e cols. (2007) 54 pacientes com AF foram estratificados quanto à clínica (durante estado estacionário, em crises hemolíticas e em crises vaso-oclusivas) e quanto ao uso ou não de HU, e comparados com indivíduos saudáveis. Os autores avaliaram, então, diversos marcadores de inflamação, dentre eles, a IL-6. Como resultado, não foi observada diferença significativa em relação ao tratamento ou não com HU. Ainda neste trabalho, os valores da IL-6 foram significativamente maiores nos grupos em crises do que no grupo em estado estacionário, porém não houve diferença entre os grupos de indivíduos saudáveis e em estado estacionário da AF, o que se encontra discordante do presente estudo onde os valores de IL-6 apresentaram elevação significativa nos pacientes com AF em fase estacionária quando relacionados ao controle saudável.

Kuvibidila e cols. (1997) avaliaram os níveis plasmáticos de TNF-alfa em 143 crianças com AF e observaram que houve um aumento da citocina nos pacientes em relação à indivíduos saudáveis e ainda durante crises infecciosas quando comparada ao estado estacionário da doença. Demonstrando, então, a importância do Tnf- $\alpha$  como marcador inflamatório na AF, dado este, condizente com o encontrado por este trabalho onde a citocina também apresentou-se aumentada nos pacientes com AF durante estado estacionário em relação ao grupo de indivíduos saudáveis.

A PCR-us, que também é um marcador pró-inflamatório, mostrou-se elevada nos pacientes com AF quando comparados com indivíduos saudáveis. O achado encontra-se de acordo com os dados literários recentes. Em 2009, Hedro *et al.* avaliaram os níveis de sete proteínas de fase aguda da inflamação em 73 pacientes com AF e compararam com 50 indivíduos saudáveis. Dentre os marcadores a PCR apresentou valores significativamente elevados nos pacientes com AF. Em 2012, Kanavak e cols. investigaram a PCR-us em pacientes durante tratamento com HU e

obtiveram valores aumentados da proteína plasmática com nível de significância menor que 0,001, tal como o presente trabalho.

Acerca do perfil anti-inflamatório, pudemos observar no presente trabalho que, o TGF- $\beta$  se apresentou elevado nos pacientes falciformes se comparados aos indivíduos normais, enquanto a IL-10, apesar de não atingir significância estatística entre os grupos, também apresentou uma tendência de elevação nos pacientes com AF ( $11,2 \pm 8,1$ ) em relação ao grupo controle ( $9,98 \pm 3,03$ ).

Sabe-se que a principal função da IL-10 no microambiente inflamatório que se instaura na AF é tentar limitar a síntese de outras citocinas e controlar a inflamação. Estudos recentes observaram, assim como o presente, o aumento da IL-10 em pacientes com AF e sugerem um mecanismo anti-inflamatório compensatório na tentativa de controlar possíveis efeitos nocivos causados pela inflamação crônica (LANARO *et al.*, 2009; WALTER; FUNG; KILLILEA, 2006).

Graido-Gonzalez *et al.* (1998) observaram uma tendência de aumento da IL-10 somente durante as crises da doença, mas não durante estado estacionário. Os autores sugerem, que os pacientes com AF apresentam maiores riscos de adquirir infecções graves e de apresentar uma defeituosa migração de neutrófilos para os sítios de inflamação, o que pode ser atribuído à exposição crônica aos mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10.

Os valores do TGF- $\beta$ , por sua vez, apresentaram diferença estatística com  $p < 0,01$  entre os grupos, evidenciando o aumento da citocina nos pacientes com AF.

O TGF- $\beta$  participa da regulação da diferenciação de glóbulos brancos e da angiogênese (DERYNCK; ZHANG, 2003). Na AF, estudos recentes relacionam o TGF como um marcador urinário de disfunção renal, e associam SNPs no gene da citocina ao aumento na predisposição para o AVC e para a hipertensão pulmonar (MOHTAT *et al.*, 2011; STEINBERG, 2009).

Croizat e Nagel (1999) avaliaram em seu estudo a elevação nos níveis plasmáticos do TGF-beta de pacientes com AF quando comparados com indivíduos saudáveis. Os autores observaram ainda uma correlação entre a citocina e a HbF. Foi verificado que pacientes que apresentavam HbF  $< 8,5$  tinham menores valores

plasmáticos de TGF- $\beta$ , enquanto pacientes com HbF>8,5 apresentam níveis mais elevados da citocina e concluíram que a taxa de hematopoese na doença SS é controlada pelo TGF- $\beta$ .

Na correlação entre a concentração de HbS e os marcadores inflamatórios nos pacientes com AF apesar de não obter-se significância estatística, observou-se uma tendência de aumento nos valores das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e ainda na PCR-us em pacientes que apresentaram valores elevados de HbS. Tal observação encontra-se de acordo com a literatura, uma vez que quanto maior a concentração de HbS, pior será o quadro clínico do paciente com maiores chances de complicações clínicas decorrentes de um quadro inflamatório (REES; GIBSON, 2011). No perfil antiinflamatório, o TGF- $\beta$  também apresentou tendência de elevação nos pacientes com maiores valores de HbS, o que pode indicar uma tentativa de controlar o quadro inflamatório. Em contrapartida, a IL-10 apresentou uma tendência inversa à elevados valores de HbS. Nesses pacientes, a citocina mostrou-se diminuída, uma possível hipótese para a discrepância do resultado será discutida adiante.

Para a correlação entre a concentração e HbF e os marcadores inflamatórios esperava-se a relação inversa à que foi discutida para a HbS. Os pacientes com valores elevados de HbF deveriam apresentar resposta pró-inflamatória menor e valores elevados das citocinas antiinflamatórias, porém não foi observada essa tendência no presente trabalho. A hipótese mais aceita para essa discordância literária seria devido ao uso de HU e consequentemente a indução medicamentosa da síntese de HbF.

Em relação aos valores hematológicos dos pacientes estudados, a média da concentração de HbF no presente estudo foi de 12,6%. Os resultados obtidos foram superiores à outros trabalhos onde os pacientes em uso de HU foram excluídos. A concentração média de HbF encontrada por Galiza Neto *et al.* (2005) foi de 7,61%; Gonçalves *et al.* (2003) encontraram uma HbF de 8,25% e Silva e Gonçalves (2009) valores de 6,72%. O trabalho realizado por Lanaro *et al.* (2009) confirma a influência da HU na concentração de HbF uma vez que obtém média de 7,48% de HbF para pacientes que não estavam em tratamento e 12,55% de HbF em pacientes tratados, valor esse, condizente com a concentração média de HbF de 12,6% apresentada no

presente trabalho. Em outro estudo mais recente Bakanay e cols. (2012) avaliaram retrospectivamente 188 pacientes com AF antes e depois do tratamento com HU e obtiveram média de HbF de 5,8% nos pacientes antes da terapia e 18,5% após uso contínuo de HU.

Dada à severidade da AF e aos riscos de mortalidade decorrente de complicações, a grande maioria os pacientes adultos atendidos no ambulatório do HEMOCE fazem terapia com HU, por isso, a comparação com grupo de pacientes não tratados não foi possível. Então, todos os participantes desse estudo se encontravam em uso de HU por um período mínimo de seis meses e em uma dose que variava de 500mg/dia até 1g/dia.

Sabe-se que o uso da HU, principalmente em adultos, já é bem estabelecido e visa prolongar o tempo e a qualidade de vida desses pacientes com menor número de intercorrências. Evidências já mostram que o uso contínuo de HU reduz o número e a gravidade das crises em 75% dos pacientes além de aumentar significativamente a expectativa de vida em até 40% (STEINBERG *et al.*, 2003 CHARACHE *et al.*, 1995).

Apesar de a HU apresentar um efeito modulador na clínica do paciente, seus efeitos sobre o endotélio vascular, expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas ainda parece ser contraditório. Saleh *et al.* (1998) acompanharam pacientes em tratamento com o medicamento durante 5 meses e não observaram relação da droga com os valores de IL-6, VCAM-1, ICAM-1, E-selectina, P-selectina, entre outros marcadores de inflamação.

Já no estudo realizado por Lanaro e cols. (2009) pacientes em uso de HU apresentaram valores diminuídos da citocina TNF- $\alpha$ , enquanto que para a IL-8 os valores foram semelhantes aos pacientes sem uso da hidroxiuréia. Neste mesmo trabalho a IL-10 apresentou níveis mais elevados no grupo em tratamento, o que demonstra uma possível atividade da HU em potencializar o perfil anti-inflamatório Th-2 nos pacientes.

Para garantir que o perfil inflamatório dos pacientes AF foi influenciado diretamente pelos haplótipos da beta globina e não pelo tratamento com HU, a associação do medicamento com os marcadores inflamatórios foi realizada.

Observou-se, a partir daí, que somente a IL-10 se mostrou sensível ao tratamento com HU. Pacientes que faziam uso de HU por um período maior de tempo e em uma dose mais elevada apresentavam maiores níveis plasmáticos de IL-10. Não foi observada diferença significativa nos pacientes com AF quando comparados à controles saudáveis para a IL-10, uma vez que a maior parte da população em estudo tomava uma dose inferior de HU (56,7% dos pacientes) e por um intervalo de tempo menor (61,2%), o que justificaria os baixos níveis plasmáticos da IL-10. Vale salientar que a IL-10 apresentou uma relação inversa entre a HbS e os marcadores inflamatórios, o que pode ser justificada pela influência direta do medicamento nos níveis plasmáticos da citocina.

Os haplótipos do gene da  $\beta^S$ - globina também influenciam as características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme. Estudos realizados previamente sugerem que o haplótipo Bantu está associado a uma maior incidência de complicações clínicas do que o haplótipo Benin (SILVA; GONÇALVES, 2010; ADORNO *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2003; STEINBERG, 2001).

Para o estado do Ceará, no estudo realizado por Galiza Neto e colaboradores (2005), o haplótipo Benin mostrou-se prevalente. Porém, um estudo posterior constatou a prevalência do haplótipo Bantu, seguido do haplótipo Benin no estado do Ceará (SILVA; GONÇALVES; RABENHORST, 2009). O presente trabalho deu continuidade ao estudo anterior aumentando a amostragem na determinação dos haplótipos em pacientes adultos com AF no estado do Ceará. Silva, Gonçalves e Rabenhorst (2009) analisaram os haplótipos da mutação  $\beta^S$  em 34 pacientes, enquanto o trabalho atual tipificou os haplótipos em 67 pacientes AF, confirmando os achados anteriores onde o haplótipo Bantu é o mais prevalente no estado (67,1%), seguido do haplótipo Benin (28,3%).

A composição dos haplótipos da AF já foi analisada em outros estudos que observaram prevalência do haplótipo Bantu nos estados de Rio Grande do Norte, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo (CABRAL *et al.*, 2011; SILVA; KLAUTAU-GUIMARÃES; GRISOLIA, 2010; FLEURY, 2007; GONÇALVES *et al.*, 1994; ZAGO; FIGUEIREDO; OGO, 1992).



Os dados obtidos no estudo atual, também estão em conformidade com dados literários que afirmam que o haplótipo Bantu é o mais presente no Brasil, seguido pelos haplótipos Benin e Senegal (PANTE-DE-SOUZA *et al.*, 1998).

Estudos de prevalência tornam-se importantes, pois sugerem a diversidade de origens étnicas da população brasileira, tendo em vista que a presença da AF está relacionada com o componente afro-descendente, devido ao tráfico de escravos oriundos da África vindos ao Brasil. Registros históricos dão conta que durante muito tempo a principal rota do tráfico negreiro partia da região de Benin em direção à Salvador e que para as outras regiões do país, os escravos eram trazidos principalmente das regiões do Congo e de Angola, de onde o haplótipo Bantu era proveniente (PANTE-DE-SOUZA *et al.*, 1998).

Na comparação entre os haplótipos e as características hematológicas estudadas, apenas os valores de Hb e CHCM apresentaram diferença estatisticamente significativa. Em relação ao CHCM, foi observado que o haplótipo Bantu/Atípico apresentou valores menores quando comparado aos demais haplótipos, o que difere dos dados de Gonçalves *et al.*(2003), onde o haplótipo Bantu/Atípico apresenta-se com valores intermediários de CHCM entre os demais haplótipos (valor menor que os haplótipos Benin/Benin e Bantu/Benin e maiores que os valores para o haplótipo Bantu/Bantu). Para a Hb, o haplótipo Bantu/Benin apresentou níveis mais elevados do que os demais haplótipos, o que corrobora com os dados encontrados por Gonçalves *et al.*(2003), mas difere dos resultados obtidos por Silva e Gonçalves (2009) que investigaram a mesma população do estudo atual. Tal divergência pode ser justificada pelo aumento na amostra, uma vez que o número de pacientes envolvidos no presente trabalho é de 67, enquanto em 2009 as pesquisadoras investigaram 47 pacientes com AF, ou ainda ao fato dos pacientes envolvidos no presente trabalho estarem em uso de HU. A HU induz o aumento da concentração de HbF, favorecendo um curso clínico menos grave da doença. Seu uso terapêutico está associado ainda à diminuição reticulócitos e aumento de Hb, HCM e VCM (NEVES *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 1997).

Os haplótipos da  $\beta$  globina vêm sendo alvo de muitos estudos que, assim como o atual, avaliam a influência do polimorfismo nas características da doença. Russanova *et al.* (2010) encontraram correlação positiva entre a mutação e o estado

de estresse oxidativo no qual se encontram os pacientes e observaram que os haplótipos Senegal e Árabe-indiano estão associados à melhor resposta antioxidante.

Já o estudo desenvolvido por Rocha e cols. (2012) tentou associar os haplótipos com o risco de lesão no DNA e a possível interferência da HU, que é potencialmente genotóxica. Os autores concluíram que o risco de lesão no DNA está associado ao polimorfismo genético, onde pacientes com haplótipo Bantu apresentam maior dano no DNA do que pacientes com haplótipo Benin.

Na associação dos haplótipos com os marcadores de inflamação, observamos que o haplótipo Bantu/Bantu apresenta níveis mais elevados dos marcadores pró-inflamatórios IL-6, IL-8 e PCR-us o que deve justificar o fato do referido haplótipo ser associado a um pior prognóstico com grande variedade de manifestações clínicas. Com o aumento do perfil inflamatório, os pacientes estão mais sujeitos a complicações clínicas como crises vaso-oclusivas, crises dolorosas, sequestro esplênico, entre outras. Já pacientes com haplótipo Benin que apresentaram menores valores dos mesmos marcadores inflamatórios, têm menor risco de desenvolver complicações clínicas provenientes do quadro inflamatório e, portanto desenvolvem melhor prognóstico.

Apesar de não atingir significância estatística as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-17 também apresentaram tendência de elevação nos pacientes do Haplótipo Bantu/Bantu quando comparados ao haplótipo Benin/Benin.

A citocina de caráter regulatório da resposta imune TGF- $\beta$  também se mostrou mais elevadas no haplótipo Bantu e diminuídas no haplótipo Benin. Uma hipótese para essa constatação seria a existência de um mecanismo anti-inflamatório compensatório na tentativa de controlar a inflamação. Como dito anteriormente, todos os pacientes encontravam-se no estado estacionário da doença, então citocinas anti-inflamatórias podem ser responsáveis pela manutenção dos pacientes sem crises, uma vez que se apenas o estado pró-inflamatório estivesse elevado, os pacientes estariam propensos a apresentarem em complicações clínicas.

O haplótipo Bantu/Benin, mostrou, para os dois perfis de citocinas, valores intermediários (exceto para a PCR-us). A esse fato pode-se atribuir duas hipóteses: o haplótipo Benin poderia apresentar efeito protetor nesses pacientes, o que diminuiria os níveis comparados ao haplótipo Bantu; ou o haplótipo Bantu pode revelar-se como fator de agravamento dos perfis inflamatórios nesses pacientes.

Cajado *et al.* (2011) associaram os níveis séricos, os polimorfismos das citocinas IL-8 e TNF e os haplótipos da AF à fenótipos clínicos de 210 pacientes crianças. Os dados obtidos demonstram uma correlação positiva entre a IL-8 e HbS e uma correlação inversa com a HbF, caracterizando a IL-8 como um marcador de mau prognóstico com base na maior capacidade de ocasionar hemólise intravascular, dano oxidativo, ativação e oclusão vascular. Em relação aos haplótipos uma associação multivariada dos marcadores clássicos foi obtida e o haplótipo Bantu foi associado ao pior prognóstico com maior risco de sequestro esplênico nos pacientes. Os alelos A do gene do TNF-alfa e T do gene da IL-8 mostraram-se importantes, preditores de eventos clínicos quando associados aos haplótipos. Os autores destacaram a contribuição de marcadores genéticos no fenótipo clínico, porém não realizaram uma associação direta entre os haplótipos e os níveis séricos das duas citocinas.

Estudo semelhante, porém com a citocina TGF- $\beta$  avaliou os polimorfismos do gene da interleucina e do gene da cadeia da  $\beta$ -globina e suas respectivas associações com a susceptibilidade à infecções. Como resultado, um SNP no TGF esteve associado com a bacteremia, mas novamente uma correlação direta entre os haplótipos da AF e os níveis da citocina não foi realizada (ADEWOYE *et al.*, 2006).

Então, estudos anteriores investigaram a associação dos haplótipos da  $\beta$ -globina com o prognóstico, com a prevenção de lesões de órgãos, e com a melhoria da qualidade de vida de pacientes com AF, mas o entendimento de que o perfil inflamatório pode variar de acordo com polimorfismos genéticos ligados ao *cluster* da  $\beta$ -globina do paciente falciforme é novo.

## 6. CONCLUSÃO

Os pacientes com AF demonstraram no presente trabalho um perfil inflamatório exacerbado em relação à população saudável, com aumento das citocinas pró e anti-inflamatórias, o que corrobora com achados que sugerem um quadro inflamatório crônico nos pacientes.

Para a correlação entre as concentrações de HbS e o perfil inflamatório dos pacientes com AF, o presente trabalho demonstrou uma tendência de pacientes que apresentaram valores elevados de HbS apresentarem também maiores concentrações plasmáticas de marcadores pró-inflamatórios (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e PCR-us) e antiinflamatório (TGF- $\beta$ ).

Para a correlação entre a concentração de HbF e os marcadores inflamatórios foi observado que os pacientes com valores elevados de HbF apresentaram tendência de elevação dos valores de marcadores pró-inflamatórios (IL-8, IL-17, TNF- $\alpha$  e PCR-us) e anti-inflamatório (IL-10). A hipótese mais aceita para essa discordância literária seria devido ao uso de HU e consequentemente a indução medicamentosa da síntese de HbF.

Na associação entre o tratamento com HU e o perfil inflamatório dos pacientes com AF, observou-se que apenas a IL-10 foi sensível ao medicamento, pois apresenta valores elevados em pacientes submetidos ao tratamento por um período maior de tempo e à uma dose maior, o que sugere que a terapia com HU não influenciou o perfil inflamatório dos pacientes com AF.

O haplótipos mais prevalente determinados nos pacientes adultos com AF no estado do Ceará foi o haplótipo Bantu (67,1%), seguido do haplótipo Benin (28,3%), o que apresentou conformidade com os dados históricos sobre as origens da população negra trazida ao estado do Ceará e com estudos realizados previamente no estado.

Na comparação entre os haplótipos e as características hematológicas estudadas, o CHCM apresentou valores menores no haplótipo Bantu/Atípico quando comparado aos demais haplótipos e a Hb apresentou níveis mais elevados no

haplótipo Bantu/Benin do que os demais haplótipos. Sugere-se a influência da HU nos parâmetros laboratoriais dos pacientes com AF.

Os resultados sugerem que os haplótipos do *cluster* da  $\beta$  globina exercem influência no perfil inflamatório dos pacientes com AF. O haplótipo Bantu mostrou-se associado a um perfil inflamatório elevado, enquanto o haplótipo Benin apresentou perfil inflamatório mais contido, o que está em conformidade com dados literários onde pacientes Bantu são considerados de pior prognóstico e com maiores chances de desenvolver complicações clínicas provenientes desse estado hiper-inflamatório, enquanto pacientes Benin apresentam curso clínico mais brando da doença com poucas manifestações clínicas que resultam de um perfil inflamatório controlado. Então, o perfil inflamatório dos pacientes com AF parece estar associado à polimorfismos genéticos ligados ao gene da beta globina.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBAS. A. K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. **Cellular and Molecular Immunology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders; 2003, p. 249-262.
- ADEWOYE, A. H.; NOLAN, V. G.; MA, Q.; BALDWIN, B.; WYSZYNSKI, D. F.; FARRELL, J. J.; FARRER, L. A.; STEINBERG, M. H. Association of Polymorphisms of IGF1R and Genes in the Transforming Growth Factor- $\beta$ /Bone Morphogenetic Protein Pathway with Bacteremia in Sickle Cell Anemia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 593 – 598, 2006.
- ADORNO, E.V. *et al.* Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v.31, n.3, p. 621-625, 2008.
- ADORNO, E.V.; ZANETTE, A.; LYRA, I.; SOUZA, C.C.; SANTOS L.F.; MENEZES, J.F.; *et al.* The beta-globin gene cluster haplotypes in sickle cell anemia patients from Northeast Brazil: a clinical and molecular view. **Hemoglobin.**, v. 28, n. 3, p. 267-71, 2004.
- ATAGA, K. I.; KEY, N. S. Hypercoagulability in Sickle Cell Disease: New Approaches to an Old Problem. **Hematology**, v. 2007, n. 1, p. 91 – 96, 2007.
- ANTONARAKIS, S. E.; KAZAZIAN, H. H.; ORKIN, S. H. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. **Hum. Genet.**, v. 69, n. 1, p. 1-14, 1985.
- ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R. S. Sickle Hemoglobin (Hb S) Allele and Sickle Cell Disease: A HuGE Review. **Am J Epidemiol.**, v. 151, n. 9, 2000.
- BAIN, B.J. **Haemoglobinopathy Diagnosis**. 2ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.
- BAKANAY, S. M.; DAINER, E.; CLAIR, B.; ADEKILE, A.; DAITCH, L.; WELLS, L. *et al.* Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 545 – 547, 2012.
- BLAKE G.J.; RIDKER P.M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. **Circ. Res.** v. 89, n. 9, p. 763-771, 2001.
- BILATE, A. M. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 3, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas**. Brasília, 2010.
- CABRAL *et al.* Determination of  $\beta$ S haplotypes in patients with sickle-cell anemia in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 34, n. 3, p. 421-424. 2011.
- CAJADO, C.; CERQUEIRA, B.A.V.; COUTO, F.D.; MOURA-NETO, J.P.; VILAS-BOAS, W.; DOREA, M.J.; LYRA, I.M.; BARBOSA, C.G.; REIS, M.G.; GONCALVES,

M.S. TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (\_308G>A and \_251A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Cytokine**, v. 56, p. 312–317, 2011.

CANÇADO, R.D., JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 203-206, 2007.

CANALLI, A. A.; CONRAN, N.; FATTORI, A.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. **Exp. Hematol.**, v. 32, n. 8, p. 728-734, 2004.

CANALLI, A. A.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; SAAD, S. T. O.; CONRAN, N.; COSTA, F. F. Increased adhesive properties of neutrophils in sickle cell disease may be reversed by pharmacological nitric oxide donation. **Haematologica.**, v. 93, n. 4, p. 605-609. 2008.

CHANG, Y. P.; MAIER-REDELSPERGER, M.; SMITH, K. D.; CONTU, L.; DUCROCO, R.; DE MONTALEMBERT, M.; BELLOY, M.; ELION, J.; DOVER, G. J.; GIROT, R. The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. **Br. J. Haematol.**, v. 96, n. 4, p. 806-814, 1997.

CHARACHE, S.; TERRIN, M. L.; MOORE, R. D.; DOVER, G. J.; BARTON, F. B.; ECKERT, S. V. *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1317 – 1322, 1995.

CHIANG, E. Y.; FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol Oncol Clin North Am.** v. 19, n. 5, p. 771 – 784, 2005.

CONRAN, N.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Hemoglobin.** v. 33, n. 1, p. 1-16, 2009a.

CONRAN, N.; COSTA, F. F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 1824–1838, 2009b.

CROZIAT H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br. J. Haematol.**, v. 87, p. 592–594, 1994

CROIZAT, H. NAGEL, R.L. Circulating Cytokines Response and the Level of Erythropoiesis in Sickle Cell Anemia. **American Journal of Hematology**, v. 60, p. 105 – 115, 1999.

DAVIES, S. C.; GILMORE, A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood Reviews**, v. 17, p. 99 – 109, 2003.

DERYNCK, R. ZHANG, Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature**, v. 425, p. 577 – 584, 2003.

FLEURY, M.K. Haplótipos do cluster da globina beta em pacientes com anemia falciforme no Rio de Janeiro: Aspectos clínicos e laboratoriais. **RBAC**, v. 39, n. 2 p. 89-93, 2007.

FRENETTE, P. S; ATWEH, G. F. Sick cell disease: old discoveries, new concept and future promise. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n.4, p.850-858, 2007.

FRIEDRISCH, J.R. *et al.*, DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Mutat. Res.**, v. 649, p. 213–220, 2008.

GONCALVES, M.S. *et al.*  $\beta$ S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.10, p. 1283-1288, 2003.

GONÇALVES, M. S.; NECHTMAN, J. F.; FIGUEIREDO, M. S.; KERBAUY, J.; ARRUDA, V. R.; SONATI, M. F.; SAAD, S. O. T.; COSTA, F. F.; STOMING, T. A. Sick cell disease in a Brazilian population from Sao Paulo: a study of the beta s haplotypes. **Hum Hered**, v. 44, n. 6, p. 322-327, 1994.

Guidelines for the control of haemoglobin disorders. Report of the VIth Annual Meeting of the WHO Working Group on Haemoglobinopathies, Cagliari, Sardinia, 8–9 April, 1989. Geneva, World Health Organization, 1989 (unpublished document WHO/HDP/WG/HA/89.2).

GALIZA NETO, G.C.; PITOMBEIRA, M. S.; VIEIRA. H. F.; VIEIRA, M. L. C.; FARIAS, D. A.B. Análise dos haplótipos do gene da  $\beta$ S-globina no Ceará. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n. 5, 2005.

GONÇALVES, M.S.; BONFIM, G.C.; MACIEL, E. *et al.* BetaS-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, n. 10, p. 1283-1288, 2003.

GRAIDO-GONZALEZ, E.; DOHERTY, J. C.; BERGREEN, E. W.; ORGAN, G.; TELFER, M.; MCMILLEN, M. A. Plasma Endothelin-1, Cytokine, and Prostaglandin E<sub>2</sub> Levels in Sick Cell Disease and Acute Vaso-Occlusive Sick Cell Crisis. **Blood.**, v. 92, n. 7, p. 2551-2555, 1998.

GROSVELD, F.; DILLON, N.; HIGGS, D. The regulation of human globin gene expression. **Baillidre's Clinical Haematology**, v. 6, n. 1, 1993.

HEBBE R.P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2561–2564, 1997.

HEDO, C. C.; AKEN'OVA, Y. A.; OKPALA, I. E.; DUROJAIYE, A. O.; SALIMONU, L. S. Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 233, n. 6, p. 467–470, 2009.

IKUTA, T.; AUSENDA, S.; CAPPELLINI, M. D. Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase–cGMP-dependent protein kinase pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.98, p. 1847 – 1852, 2001.



IANNONE, R.; OHENE-FREMPONG, K.; FUCHS, E. J.; CASELLA, J. F.; CHEN, A. R. Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Anemia: Progress and Prospects. **Pediatr Blood Cancer**, v. 44, p. 436 – 440, 2005.

JOHNSON, C.; TELEN, M. J. Adhesion molecules and hydroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. **Haematologica**. v. 93, n.4, p. 481-486, 2008.

KASSCHAU, M. R.; BARABINO, G.A. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. **Blood**, v. 87, p. 771-780, 1996.

KANAVAK, I.; MAKRYTHANASI, P.; LAZAROPOULOU, C.; KATTAMIS, A. TZANETEA, R.; KALOTYCHOU. Adhesion molecules and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with sickle cell and beta-thalassaemia. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42, n. 1, p. 27–33, 2012.

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

KATO, G. J.; HEBBEL, R. P.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M.T. Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, Pathophysiology, Genetics, Translational Medicine and New Research Directions. **Am. J. Hematol.**, v. 84, n. 9, p. 618 – 625, 2009.

KOHNE, E. Hemoglobinopathies: Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. **Dtsch Arztebl Int.**, v. 108, n. 31, p. 532-40, 2011.

KUMAR, A.; ECKMANN, J.R.; SWERLICK, R. A.; WICK, T.M. Phorbol ester stimulation increases sickle erythrocyte adherence to endothelium: a novel pathway involving  $\alpha 4\beta 1$  integrin receptors on sickle reticulocytes and fibronectin. **Blood**, v. 88, p. 4348-4358, 1996.

KUVIBIDILA, S.; GARDNER, R.; ODE, D.; YU, L.; LANE, G.; WARRIER, R. P. Tumor necrosis factor alpha in children with sickle cell disease in stable condition. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 89, n. 9, p. 609–615, 1997.

LANARO, C. FRANCO-PENTEADO, C. F. ALBUQUEQUE, D. M. SAAD, S. T. O. CONRAN, N. COSTA, F. F. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 235-242, 2009.

LIMA, C.S.P.; ARRUDA, V.R.; COSTA, F.F.; SAAD, S.T.O. Minimal doses of hydroxyurea for sickle cell disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 8, p. 933-940, 1997.

MAKIS, A.C. HATIZIMICHAEL, E.C.BOURANTAS, K.L. The role of cytokine in sickle cell disease. **Ann hematol**. v. 79, p. 407-413. 2000.

MAKIS, A.C.; HATZIMICHAEL E.C.; STEBBING, J.; BOURANTAS, K.L. C-Reactive Protein and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 as Markers of Severity in Sick Cell Disease. **Arch. Intern. Med.**, v. 166, n. 3, p. 366-368, 2006.

MANCA, L.; MASALA, B. Disorders of the Synthesis of Human Fetal Hemoglobin. **Life**, v. 60, n. 2, p. 94-111, 2008.

MOHTAT, D.; THOMAS, R.; DU, Z.; BOAKYE, Y.; MOULTON, T.; DRISCOLL, C.; WORONIECKI, R.; Urinary transforming growth factor beta-1 as a marker of renal dysfunction in sickle cell disease. **Pediatr. Nephrol.**, v. 26, p. 275-280, 2011.

MOORE, R. D.; CHARACHE, S.; TERRIN, M. L.; BARTON, F. B.; BALLAS, S. K. Cost-effectiveness of hydroxyurea in sickle cell anemia. **American Journal of Hematology**, v. 64, n. 1, p. 26 - 31, 2000.

NAGEL, R.L. The origin of hemoglobin gene: clinical, genetic and anthropological consequences **Einstein Quart. J. Biol. Med.**, v.2, p. 53-62, 1984.

NEVES, F.; MENEZES NETO, O. A.; POLIS, L. B. BASSI, S. C. BRUNETTA, D.M. Hematological differences between patients with subtypes of sickle cell disease on hydroxyurea treatment. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 34, n. 6, p. 426-429, 2012.

NORONHA, J. F. A.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. O. LORAND-METZE, I.G.H. GROTTTO, H.Z.W. **Evaluation of reticulated platelets in patients with sickle cell diseases.** Thrombosis Research, v. 121, p. 259-267, 2007.

OKPALA, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Curr. Opin. Hematol.** v. 13, p. 40-44, 2006.

PANTE-DE-SOUZA, G. *et al.* Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. **Genet. Mol. Biol.**, v. 21, p. 427-30, 1998.

PATHARE, A.; KINDI, S.A.; DAAR, S.; DENNISON, D. Cytokines in Sickle Cell Disease. **Hematology**, v. 8, n. 5, p. 329-337, 2003.

PAULING, L.; ITANO, H.A.; SINGER, S.J.; WELLS, I.C. Sickle cell anemia, a molecular disease. **Science**, v. 110, p. 543-548, 1949.

PERUTZ, M.F.; GROSMANN, M.G.; CULLIS, A.F. MUIRHEAD, H.; WILL, G. Structure of hemoglobina. **Nature.**, v. 185, p. 416-422, 1960.

PINHEIRO, L. S.; GONÇALVES, R. P.; TOMÉ, C. A. S.; ALCÂNTARA, A. E.; MARQUES, A. R. C.; SILVA, M. M. Prevalência de hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v.28, n.2, p. 122-125, 2006.

PLATT, O. S. Hydroxyurea for the Treatment of Sick Cell Anemia. **N. Engl. J. Med.** v. 358, p. 1362 – 1369, 2008.

POWARS, D.R. Sick cell anemia:  $\beta^S$ -gene-cluster haplotypes as prognostic indicators of vital organ failure. **Seminars in Hematology**, v. 28, p. 202 – 208, 1991.

POWARS, D.; WEISS, J. N.; CHAN, L. S.; SCHROEDER, W. A. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia? **Blood**, v. 63, p. 921 – 926, 1984.

QARI, M. H.; DIER, U.; MOUSA, S. A. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. **Clin Appl Thromb Hemost.**, v. 18, n. 2, p. 195-200, 2012.

RAGHUPATHY, R.; HAIDER, M. Z.; AZIZIEH, F. A.; D'SOUSA, T. M.; ADEKILE, A. D. Th1 and Th2 cytokine profiles in sickle cell disease. **Acta Haematol.**, v. 103, p. 197–199. 2000.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 156, p. 433 – 445, 2011

ROCHA, L. B. S.; ELIAS, D. B. D.; BARBOSA, M. C.; BANDEIRA, I. C. J.; GONÇALVES, R. P. DNA damage in leukocytes of sickle cell anemia patients is associated with hydroxyurea therapy and with HBB\*S haplotype. **Mutat. Res.** 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.08.003>

ROTHER, R. P.; BELL, L.; HILLMEN, P.; GLADWIN, M. T. The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin. **Jama.**, v. 293, n. 13, p. 1653-1662, 2005.

RUSANOVA, I.; ESCAMES, G.; COSSIO, G.; BORACE, R. G.; MORENO, B.; CHAHBOUNE, M.; PEZZI, L. C. L.; DI'EZ, T.; CASTROVIEJO, D.A. Oxidative stress status, clinical outcome, and b-globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **European Journal of Haematology**, v. 85 p. 529–537, 2010.

SALEH, A.W. DUTSB, A.J. GERBERSB, A. DE VRIESB, C. HILLEND, H.F.P. Cytokines and Soluble Adhesion Molecules in Sick Cell Anemia Patients during Hydroxyurea Therapy. **Acta Haematologica**, v. 100, n. 1, p. 26-31, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SEBASTIANI, P.; SOLOVIEFF, N.; HARTLEY, S. W.; MILTON, J. N.; RIVA, A.; DWORKIS, D. A.; MELISTA, E.; KLINGS, E. S.; GARRETT, M. E.; TELEN, M. J.; OFORI-ACQUAH, S.F. LALLOZ, M.R.A. LAYTON, D.M. Localisation of *cis* Regulatory Elements at the b-Globin Locus: Analysis of Hybrid Haplotype Chromosomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 254, n. 1, p. 181 – 187, 1999.

SILVA, L. B.; GONCALVES, R. P. Características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene da  $\beta$ S-globina em Fortaleza, Ceará. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n.1, p. 40-44, 2009.

SILVA, L. B. GONÇALVES, R.P. RABENHORST, S.H.B. Analise dos haplótipos da anemia falciforme em Fortaleza revela as origens étnicas da população cearense. **J Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 2, p. 115-118, 2009.

SILVA, W. S.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N.; GRISOLIA, C. K.  $\beta$ -globin haplotypes in normal and hemoglobinopathic individuals from Reconcavo Baiano, State of Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 411-417. 2010.

SIMÕES B. P.; PIERONIII, F.; BARROS, G. M. N.; MACHADO, C. L.; CANÇADO, R. D.; AURÉLIO, M. *et al.* Consenso Brasileiro em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas: Comitê de Hemoglobinopatias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 1, p. 46-53, 2010.

STAMATOYANNOPOULUS, G.; GROSVELD, F. Hemoglobin Switching. In: STAMATOYANNOPOULUS, G.; MAJERUS, P.W. PERLMUTTER, R.M.; VARMUS, H. **The molecular basis of blood diseases**. 3. ed. Philadelphia. W.B. Saunders Company, 2001. p- 135-182.

STEINBER, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 129, p. 465–481, 2005.

STUART, M.J.; NAGEL, R.L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, p. 1343 – 1360, 2004.

STEINBERG, M.H. Genetic Etiologies for Phenotypic Diversity in Sickle Cell Anemia. **The scientific world journal**. v. 9, p. 46–67, 2009.

STEINBERG, M. Modulation of fetal hemoglobin in sickle cell anemia. **Hemoglobin**, v. 25, n. 2, p. 195-211, 2001.

STEINBERG M. H. Sickle cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. **ScientificWorldJournal**. v. 8, p. 1295 – 1324, 2008.

STEINBERG M. H. Pathophysiologically based drug treatment of sickle cell disease. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 27, n. 4, p. 204-210, 2006.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 129, p. 465 – 481, 2005.

STEINBERG, M.H.; NAGEL, R.L.; LAWRENCE,C.; SWAMINATHAN, V.; LU, Z.; PLOCZYNSKI, M.; HARREL, A.  $\beta$  globin gene haplotype in Hb SC disease. **Am. J. Hematol.**, v. 52, p. 189-191, 1996.

STEINBERG, M.H.; BARTON, F.; CASTRO, O.; PEGELOW, C. H.; BALLAS, S. K.; KUTLAR, A. *et al.* Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **Jama.**, v. 289, p. 1645 – 1651, 2003.

SUTTON, M.; BOUHASSIRA, E. E.; NAGEL, R. L. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of beta-like globin gene cluster haplotypes. **Am. J. Hematol.**, v. 32, n. 1, p. 66-69, 1989

SZMITKO, P. E.; WANG, C.H.; WEISEL, R.D.; ALMEIDA JR, ANDERSON TJ, VERMA S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: part I. **Circulation.** v. 108, n. 16, p. 1917-1923, 2003.

VICHINSKY, E. Hemoglobin E Syndromes. **Hematology**,v. 2007, n.1, p.79-83, 2007

WALTER, P. B.; FUNG, E. B.; KILLILEA, D. W. *et al.* Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 135, p. 254–263, 2006.

WEATHERALL, D.J.; CLEGG, J.B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, 2001.

WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A.B. Red cells: inherited anaemias. **Lancet**, v. 355, p. 1169-1175, 2000.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, v. 29, n. 3 p. 207-14, 2007.

ZAGO, M.A. FIGUEIREDO, M.S. OGO, S.H. Bantubs cluster haplotype predominates among Brazilian Blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 88, p. 295 – 298, (1992).

ZAGO, M.A.; SILVA, W.A.; DALLE, B.; GUALANDRO, S.; HUTZ, M.H.; LAPOUMEROULIE, C.; TAVELLA, M.H.; ARAUJO, A.G. *et al.* Atypical  $\beta$ S Haplotypes Are Generated by Diverse Genetic Mechanisms. **American Journal of Hematology**, v. 63, p. 79 – 84, 2000.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu, 2004.

## 8. APÊNDICES

### APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos pacientes com anemia falciforme.

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada “**ESTUDO DOS MARCADORES DE INFLAMAÇÃO: CORRELAÇÃO COM OS HAPLÓTIPOS NA ANEMIA FALCIFORME**”, que tem como objetivo principal avaliar se a presença de uma alteração das células do sangue pode estar relacionada com o aumento de inflamação nos pacientes com Anemia Falciforme acompanhados no ambulatório do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará-HEMOCE. Caso aceite participar, será coletado do Sr(a) uma pequena quantidade de sangue para que possamos analisar se existe influência entre estes elementos e se esses mesmos elementos podem ser responsáveis por fatores que agravam seu estado de saúde.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Informo que o Sr (a) pode desistir de participar da pesquisa, a qualquer momento, sem causar nenhum prejuízo em seu acompanhamento médico no HEMOCE. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de caráter científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Convido o Sr (a), participar da pesquisa, em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Izabel cristina Justino Bandeira, que reside na rua Jaime Benévolo, 1441, bairro de Fátima, Fortaleza,CE. Fone: (0xx85) 3067-1364/ 8735-6391. **Para informações sobre questões éticas relacionadas a esse estudo, o senhor(a) poderá dirigir-se ao: Comitê de Ética em Pesquisa na Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60 430-370 – (85) 3366. 8589– Fortaleza – Ceará.**

Para tanto, necessitamos que a Senhor (a) autorize a coleta de 4 mL sangue, coleta esta que será realizada por profissionais experientes, com material descartável e com todos os cuidados necessários para que não ofereçam nenhum risco ao paciente. A coleta de sangue será realizada no Hemocentro do Estado do Ceará-HEMOCE, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, durante uma consulta de rotina, sem prejuízo adicional à sua rotina.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com a pesquisadora. Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifestos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

---

Assinatura do participante da pesquisa

---

Assinatura do pesquisador

**APÊNDICE B – Artigo submetido à revista Cytokine – aguardando aceite.**