



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALANO MARTINS PEDROSA

**ESTUDO DE CITOTOXICIDADE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM
HIDROXIURÉIA**

FORTALEZA

2013

ALANO MARTINS PEDROSA

**ESTUDO DE CITOTOXICIDADE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM
HIDROXIURÉIA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará para apreciação do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Romélia Pinheiro Gonçalves

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Luzia Kalyne A. Moreira Leal

FORTALEZA

2013

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

-
- P414e Pedrosa, Alano Martins.
Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiuréia / Alano Martins Pedrosa. – 2013.
110 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2013.
Orientação: Prof.^a Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves.
Coorientação: Prof.^a Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.
1. Anemia Falciforme. 2. Hidroxiuréia. 3. Neutrófilos. I. Título.

CDD 616.1527

ALANO MARTINS PEDROSA

**ESTUDO DE CITOTOXICIDADE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM
NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO
TRATAMENTO COM HIDROXIURÉIA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Farmácia Clínica.

Aprovado em: ____/____/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Romélia Pinheiro Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Dedicatória

A Deus, à minha família
e a todos aqueles que tenham
um sonho que valha a pena
ser almejado...

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a Romélia Pinheiro Gonçalves, minha orientadora, pelo acolhimento, confiança e disponibilidade empreendidos à minha pessoa e na realização deste trabalho.

À Professora Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, minha co-orientadora, pela cedência do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia Celular, uso de equipamentos e materiais e, principalmente, pela atenção e generosidade em transmitir conhecimentos e propor soluções.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Hemoglobinopatias e Doenças Genéticas Hematológicas, especialmente, a Maritza, Thayna, Talyta, Izabel, Darcielle e Jânio, pelo apoio, convivência e auxílio na superação dos desafios e lutas que travamos juntos. Maritza, você tem um amigo para sempre, com quem pode contar pra tudo.

Pela paciência e suporte técnico dispensados na realização dos experimentos, e pelas palavras que sempre me repetiam e estimulavam: ‘Tudo vai dar certo!’; a vocês, Amanda, Talita Magalhães e Luri, meus mais calorosos agradecimentos.

Aos amigos e irmãos, Zenith, Poliana, Eliana, Najla e Cristiane Santos, pela ajuda e apoio tão singular e especial de cada um de vocês para que eu pudesse chegar a esta conquista.

Aos funcionários do HEMOCE, pela presteza e disponibilidade na realização da captação e coletas das amostras de sangue dos pacientes.

Por fim, a todos os pacientes que generosamente acreditaram neste trabalho e também ‘deram o seu sangue’ para a concretização do mesmo.

EPÍGRAFE

*"As adversidades despertam em nós
capacidades que, em circunstâncias
favoráveis, teriam ficado adormecidas"*

Horácio

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará para apreciação do título de mestre. TÍTULO: “ESTUDO DE CITOTOXICIDADE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM HIDROXIURÉIA”.

MESTRANDO: Alano Martins Pedrosa

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Romélia Pinheiro Gonçalves

CO-ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

RESUMO

Anemia Falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia hereditária resultante de uma mutação pontual do gene da β -globina ($\alpha_2\beta_2^{6 \text{ GLU} \rightarrow \text{VAL}}$), originando a hemoglobina S (HbS), cuja polimerização promove crises hemolíticas e vaso-oclusivas (CVO). Atualmente, sabe-se que as mesmas são eventos iniciais na AF desencadeando uma cascata de reações que culmina com geração de espécies reativas de oxigênio, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico, lesão endotelial, susceptibilidade às infecções e processo inflamatório crônico, com envolvimento direto dos neutrófilos nesses mecanismos. Os neutrófilos de pacientes com AF exibem estruturas mais rígidas e indeformáveis e alterações na expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas e outros mediadores que podem induzir ou agravar as manifestações clínicas da doença. A hidroxiuréia (HU) constitui o avanço mais importante no tratamento da AF, sendo o único medicamento que, efetivamente, tem forte impacto na melhora da qualidade de vida dos pacientes, reduzindo o número de CVO, hospitalizações e óbitos. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos deste medicamento sobre os neutrófilos e na funcionalidade dessas células. O estudo teve como objetivo principal investigar a citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com AF, bem como o efeito do tratamento com HU sobre esses parâmetros em pacientes atendidos pelos serviços ambulatoriais de hematologia de um hospital universitário e de um hemocentro, ambos de referência em Fortaleza-Ceará. A amostra foi constituída por 101 pacientes adultos, de ambos os sexos, diagnosticados por estudo molecular, sendo divididos em dois grupos: *Grupo SS*– formado por 47 pacientes com AF, e, *Grupo SSHU*– formado por 54 pacientes em tratamento com HU. Um grupo controle, *Grupo AA*, foi formado por 50 indivíduos saudáveis, doadores voluntários de sangue, com idade e sexo pareados. Os neutrófilos foram isolados do sangue total por diferença de gradiente e utilizados para mensuração dos testes. Nos ensaios de toxicidade, observou-se que a HU não exerceu efeito citotóxico nos neutrófilos dos pacientes, entretanto, foi evidenciado uma ação citoprotetora sobre os mesmos quando comparados aos pacientes SS e grupo AA, com uma redução significativa ($p < 0,001$) na atividade de lactato desidrogenase (LDH) e aumento no percentual de células viáveis pelo teste de exclusão por Azul de Tripán e ensaio do metil tiazol tetrazólio (MTT) ($p < 0,001$). Analisando o envolvimento dos neutrófilos nos processos de inflamação e estresse oxidativo na AF, constatou-se uma significativa elevação nos níveis de citocinas e marcadores pró-

inflamatórios (TNF- α , MPO) e uma redução da interleucina anti-inflamatória IL-10 no grupo SS, bem como uma diminuição significativa da atividade das enzimas antioxidantes (SOD e GSH-Px). Os pacientes em terapia com HU apresentaram níveis semelhantes aos encontrados no grupo AA. Danos oxidativos foram analisados pela mensuração do malonaldeído (MDA), evidenciando diferença estatística entre todos os grupos do estudo ($p < 0,001$), porém, com valor de média superior no grupo SS. O presente estudo ratificou o papel preponderante dos neutrófilos na resposta inflamatória promovida pela AF, e mostrou de maneira inédita, com pacientes do Nordeste-BR, que o tratamento com HU não reduziu a viabilidade de neutrófilos, e modulou seus mecanismos pró-inflamatórios e pró-oxidantes a níveis comparáveis aos de indivíduos saudáveis.

Palavras-chave: anemia falciforme, hidroxiuréia, neutrófilos.

Dissertation submitted to the Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Ceará for appreciation the master's degree. TITLE: "STUDY CYTOTOXICITY, INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN NEUTROPHILS OF PATIENTS WITH SICKLE CELL DISEASE: THE INFLUENCE TREATMENT WITH HYDROXYUREA."

Master Student: Alano Martins Pedrosa

ORIENTATOR: Prof.^a Dr.^a Romelia Pinheiro Gonçalves

CO-ORIENTATOR: Prof.^a Dr.^a. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

ABSTRACT

Falciform Anemia (FA) is a hereditary hemoglobinopathy resulting from a β -globin gene mutation ($\alpha_2\beta_2^6 \text{GLU} \rightarrow \text{VAL}$) that originates a hemoglobin variant called S (HbS). Its polymerization promotes hemolytic and vaso-occlusive crises (VOC). Nowadays it is known that these reactions are initial FA events that unleash a chain reaction that ends with the generation of oxygen reactive types (ORT) nitric oxide (NO) bioavailability reduction, endothelial lesion, susceptibility to infections and a chronic inflammatory process with direct involvement of neutrophils in the development of such mechanisms. Neutrophils of FA patients, besides developing more rigid, non-deformable structures, also show alterations in the expression of adhesion molecules and the production of cytokines and other mediators that may induce or aggravate clinical events observed in the disease. Hydroxyurea (HU) is the most important improvement in FA treatment and the only medicine with a strong impact on the patients' quality of life, reducing the number of VOC, hospitalizations and deaths resulting from this condition. However, not much is known about the effects of this medicine on neutrophils and on the functionality of these cells. The present study aimed at investigating cytotoxicity, inflammation and oxidative stress markers in neutrophils of FA patients, as well as the effect of HU treatment over these parameters in hematology ambulatory patients from a university hospital and a blood center, both reference centers in Fortaleza – Ceará. The sample included 101 adult patients of both sexes diagnosed with FA through molecular study and it was divided into two groups: the *SS Group* – composed of 47 FA patients and the *SSHU Group* – composed of 54 FA patients under HU treatment. A control *Group AA* was composed of 50 healthy individuals, voluntary blood donors matched by age and sex. Neutrophils were isolated from whole blood by differential gradient and used to measure test. In toxicity tests carried out, it was observed that HU did not have any cytotoxic effect on patients' neutrophils, however, was shown a cytoprotective action when compared to group AA and SS patients, with a significant reduction ($p < 0,001$) in lactate dehydrogenase (LDH) levels and an increase in the percentage of viable cells through the metil tiazol tetrazolium (MTT) ($p < 0,001$) and the Trypan Blue exclusion tests. Analyzing neutrophil involvement in inflammatory and oxidative stress processes and in FA, there was a significant elevation in the levels of cytokines and pro-inflammatory markers (TNF- α , MPO) and reduced antiinflammatory interleukin IL-10 group SS, as well as a significant decrease in the activity

of antioxidant enzymes (SOD and GSH-Px). Patients under medical treatment with the tested medicine showed similar levels to those found in group AA. Oxidative damage were analyzed through malonaldehyde measurement (MDA), which was evidenced statistical differences between all studied groups ($p < 0,001$), however with a higher average value in the non-treated group of patients. The present study ratified the important role of neutrophils in the inflammatory response promoted by the AF, and shown in an unprecedented way, with the Northeast-BR patients, treatment with HU did not reduce the viability of neutrophils, and modulates its mechanisms pro-inflammatory and pro -oxidants at levels comparable to those of healthy individuals.

Key words: sickle cell disease, hydroxyurea, neutrophils.

LISTA DE FIGURAS

1 -	Estrutura da hemoglobina	19
2 -	Origem e dispersão do gene S no Brasil	23
3 -	Distribuição geográfica da hemoglobina S	24
4 -	Estrutura da hemoglobina normal e hemoglobina falciforme	27
5 -	Diagrama ilustrando a cascata de eventos fisiopatológicos derivados da polimerização da HbS desoxigenada	30
6 -	Distensão de sangue periférico. Estrutura polimorfonuclear com grânulos citoplasmáticos	34
7 -	Etapas do processo de migração leucocitária para área de inflamação	39
8 -	Mecanismo de ação da hidroxiuréia na anemia falciforme	47
9 -	Distensão da suspensão celular após isolamento por solução de gelatina a 2,5% em salina	57
10 -	Avaliação da toxicidade da HU em neutrófilos de pacientes com AF, mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH)	67
11 -	Avaliação da toxicidade da HU em neutrófilos de pacientes com AF, mensurada através do teste de MTT	69
12 -	Efeito da HU sobre marcadores de inflamação em neutrófilos de pacientes com AF, mensurado pela atividade da mieloperoxidase.....	70
13 -	Efeito da HU sobre marcadores de inflamação em neutrófilos de pacientes com AF, mensurado pelo TNF- α	71
14 -	Efeito da HU sobre marcadores de inflamação em neutrófilos de pacientes com AF, mensurado pela IL-10	72
15 -	Efeito da HU sobre marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com AF, pela mensuração da enzima SOD	73
16 -	Efeito da HU sobre marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com AF, pela mensuração da enzima GSH-Px	74
17 -	Efeito da HU sobre marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com AF, pela mensuração do MDA	75

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença e traço falciformes em 14 estados brasileiros que realizam o PNTN	26
Quadro 2 -	Efeitos adversos relacionados à administração da hidroxiuréia.....	49
Tabela 1 -	Características e detalhes clínicos dos controles e pacientes falciformes em estado estacionário, com e sem terapia de hidroxiuréia	64
Tabela 2 -	Avaliação da toxicidade da hidroxiuréia em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme através da exclusão pelo corante Azul de Tripan	65

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AF	Anemia falciforme
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
AVC	Acidente vascular-cerebral
COMEPE	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará
CVO	Crise vaso-oclusiva
DF	Doença falciforme
DMT	Dose máxima tolerada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FN	Fibronectina
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito e monócito
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina normal
HbAS	Heterozigose para falciforme (traço falciforme)
HbC	Hemoglobina C
HbD	Hemoglobina D
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S (hemoglobina falciforme)
HO•	Radical hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HU	Hidroxiuréia
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>

ICAM-2	<i>Intercellular adhesion molecule-2</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL-10	Interleucina-10
JAM	Molécula de adesão juncional
LDH	Lactato desidrogenase
LFA-1	<i>Lymphocyte function associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC-1	Antígeno macrofágico-1
MDA	Malonaldeído
MO	Medula Óssea
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Metil tiazol tetrazólio (ou tetrazólio de metiltiazol)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO $^-$	Peroxinitrito
PECAM-1	Molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1
PMN	Polimorfonucleares
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PR3	Proteinase 3
PSGL-1	<i>P- selectin glycoprotein ligand-1</i>
SOD	Superóxido dismutase
STA	Síndrome torácica aguda
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TN	Triagem neonatal
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UFC	Universidade Federal do Ceará
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEC	<i>Vascular endothelial cells</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Hemoglobina	19
2.1.1	Hemoglobinas variantes e hemoglobinopatias	20
2.2	Anemia Falciforme	21
2.2.1	Histórico	21
2.2.2	Epidemiologia	23
2.2.3	Padrão de herança da anemia falciforme	26
2.2.4	Diagnóstico da anemia falciforme	28
2.2.5	Fisiopatologia	29
2.2.6	Manifestações clínicas	31
2.3	O neutrófilo	32
2.3.1	Aspectos gerais	32
2.3.2	Neutrófilos e a inflamação	35
2.3.3	Neutrófilos e a produção de ERO	39
2.3.4	O neutrófilo e a sua importância na anemia falciforme	42
2.4	Estratégias terapêuticas	43
2.4.1	Hidroxiuréia	45
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivo geral	52
3.2	Objetivos específicos	52
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	53
4.1	Desenho do estudo	53
4.2	Local de realização do estudo	53
4.3	Seleção da amostra	53
4.3.1	População do estudo	53
4.3.2	Crterios de inclusão e exclusão dos pacientes em estudo e grupo controle	54
4.4	Aspectos éticos	55
4.5	Coleta de dados	56
4.5.1	Informações clínicas, hematológicas e demográficas	56
4.5.2	Coleta das amostras de sangue	56

4.6	Análise das amostras	56
4.6.1	Isolamento de neutrófilos	56
4.6.2	Ensaio de toxicidade	58
4.6.2.1	Teste de exclusão por Azul de Tripán	58
4.6.2.2	Atividade da LDH	58
4.6.2.3	Teste do MTT	59
4.6.3	Ensaio de marcadores de inflamação	60
4.6.3.1	Atividade da MPO	60
4.6.3.2	Determinação do TNF-α	60
4.6.3.3	Determinação da IL-10	61
4.6.4	Ensaio de marcadores de estresse oxidativo	61
4.6.4.1	Superóxido dismutase	62
4.6.4.2	Glutaciona peroxidase	62
4.6.4.3	Malonaldeído	62
4.7	Análise estatística	63
5	RESULTADOS	64
5.1	Características demográficas e hematológicas dos pacientes do estudo	64
5.2	Avaliação da toxicidade da hidroxiuréia em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme	65
5.2.1	Teste de exclusão por Azul de Tripán	65
5.2.2	Avaliação da atividade de LDH	66
5.2.3	Avaliação da viabilidade celular pelo MTT	68
5.3	Avaliação de marcadores inflamatórios em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme	70
5.3.1	Mieloperoxidase	70
5.3.2	TNF-α	71
5.3.3	IL-10	72
5.4	Avaliação de marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme	73
5.4.1	Superóxido dismutase	73
5.4.2	Glutaciona peroxidase	74
5.4.3	Malonaldeído	75
6	DISCUSSÃO	76

7	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO A	104
	ANEXO B	107

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária causada pela substituição do ácido glutâmico pela valina no sexto códon do gene da β -globina, induzindo a formação da hemoglobina S (HbS) que, quando desoxigenada, sofre polimerização e deforma a hemácia para a forma de foice. A hemácia falcizada é rígida e inflexível, favorecendo a ocorrência de eventos vaso-oclusivos e hemolíticos (GUIMARÃES; COELHO, 2010; CHIRICO; PIALOUX, 2012). Atualmente sabe-se que os mesmos são eventos iniciais na AF desencadeando uma cascata de reações que culmina com a obstrução vascular, infartos de diversos órgãos, crises álgicas, infecções recorrentes, e um processo inflamatório crônico, com envolvimento direto dos neutrófilos no desenvolvimento desses mecanismos (OKAPALA, 2004; CANÇADO *et al.*, 2009).

Os leucócitos desempenham um importante papel na fisiopatologia da AF, uma vez que o processo vaso-oclusivo e a lesão endotelial resultam em resposta inflamatória com danos em vários órgãos, que se propaga pelos elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, capazes de tornar o endotélio ativado. A ativação endotelial resulta em aumento na expressão de moléculas de adesão para neutrófilos, como por exemplo, E-selectina, P-selectina e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), induzindo a quimiotaxia de neutrófilos, que por sua vez induzem a migração transendotelial e interações adesivas com hemácias falcizadas ou não falcizadas, com outros leucócitos, plaquetas e células do endotélio vascular, levando a uma ativação pancelar que resulta na liberação de mais citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, perpetuando um ciclo vicioso de repetidas ativação e adesão celulares, com produção de moléculas inflamatórias e oxidantes que proporcionam um desequilíbrio do balanço oxidativo e um estado inflamatório crônico, fundamental no processo de vaso-oclusão e injúria/reperfusão isquêmica (OKAPA, 2006; CONRAN *et al.*, 2007a).

A contagem elevada de neutrófilos, frequentemente observada em pacientes com AF, mesmo na ausência de infecções, tem sido associada com a ocorrência de crises falcêmicas, síndrome torácica aguda (STA), acidente vascular cerebral (AVC) e morte precoce (PLATT *et al.*, 1994; OKAPALA, 2004), entretanto, os mecanismos responsáveis por esta leucocitose não estão completamente elucidados. Estudos sugerem o envolvimento dos neutrófilos na fisiopatologia da doença através de vários mecanismos, sobretudo pelo fato de serem células relativamente grandes (12-15 μ m) e rígidas, que facilmente obstruem a luz vascular e por sua habilidade de produzir mediadores inflamatórios e de estresse oxidativo, considerados como

fatores iniciadores e propagadores das manifestações clínicas e gravidade da doença (SOUZA, 2007; MIGUEL, 2010; ALMEIDA, 2011).

A hidroxiuréia (HU) é o único medicamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (1999) e *European Medicines Agency* (2008) para tratamento da AF por ser bem tolerado e induzir a síntese de hemoglobina fetal (HbF), dentre outros benefícios, como a elevação da concentração de hemoglobina, alteração da expressão de moléculas de adesão de hemácias, neutrófilos e plaquetas, e a redução da produção de granulócitos, participantes diretos dos fenômenos inflamatórios da doença (CANÇADO *et al.*, 2009; LANARO *et al.*, 2009; CHIRICO; PIALOUX, 2012).

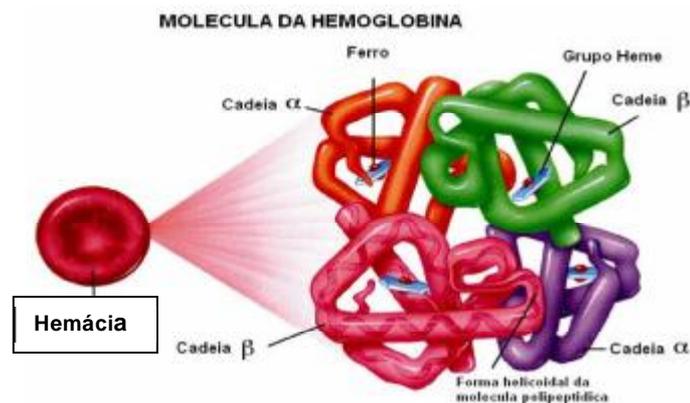
O presente estudo teve como objetivo investigar as implicações e manifestações da AF sobre o prisma das células brancas do sangue, notadamente os neutrófilos, mensurando marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, bem como, investigar a ação moduladora dessas células sobre a doença e se o principal medicamento utilizado em seu tratamento, a hidroxiuréia, exerce algum efeito citotóxico ou influencia esta modulação e níveis de marcadores, contribuindo, dessa forma, para ampliar os conhecimentos sobre a doença em nossa população e para uma maior compreensão da sua evolução, adicionando informações profícuas ao acompanhamento clínico desses pacientes e às estratégias terapêuticas empreendidas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hemoglobina

A hemoglobina, hemeproteína localizada no interior das hemácias dos mamíferos, é uma das proteínas mais generalizadas e especializadas existentes na natureza, cuja principal função é a absorção, transporte e distribuição do oxigênio (O_2) para os diversos tecidos do organismo. Possui uma estrutura (Figura 1) globular e quaternária, constituída de quatro subunidades iguais, duas a duas, compostas de dois pares de cadeias polipeptídicas, ou cadeias globínicas, sendo um par denominado de cadeias do tipo alfa (alfa- α ou zeta- ξ) e o outro de cadeias do tipo não-alfa (beta- β , delta- δ , gama- γ ou épsilon- ϵ). Sua estrutura é quimicamente unida a um núcleo prostético de ferro, a ferroprotoporfirina IX (grupo heme), que detém a propriedade de receber, ligar e/ou liberar o O_2 nos tecidos. É graças à alta reatividade do ferro e grande afinidade pelo O_2 que este pode ser transportado para todos os tecidos do corpo, incorporando-se em várias reações celulares e participando da produção de energia oxidativa (PERUTZ *et al.*, 1960; BUNN; FORGET, 1986; TORRES; BONINIDOMINGOS, 2005).

Figura 1. Estrutura da Hemoglobina.



Fonte: Mader (1997)

Nota: Representação da estrutura quaternária da hemoglobina, mostrando as quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias alfa e duas cadeias beta. Cada cadeia polipeptídica contém um grupo prostético heme ao qual se liga o O_2 .

Cada cadeia polipeptídica da globina é composta por uma sequência de aminoácidos, tendo as cadeias alfa 141 aminoácidos e as cadeias não-alfa, 146. As combinações entre as

diversas cadeias de proteínas dão origem às diferentes hemoglobinas presentes nas hemácias, desde o período embrionário até a fase adulta, produzidas no decorrer das distintas etapas do desenvolvimento humano (BUNN; FORGET, 1986; TORRES; BONINIDOMINGOS, 2005).

Nas fases embrionária e fetal, do desenvolvimento humano, e após o nascimento, encontramos seis tipos diferentes de hemoglobinas. As hemoglobinas expressas na fase embrionária são: Gower 1 ($\xi_2\varepsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) e Portland ($\xi_2\gamma_2$), que deixam de ser produzidas no início da fase fetal quando predomina a expressão da hemoglobina fetal (HbF) ($\alpha_2\gamma_2$), correspondendo a cerca de 60% da hemoglobina presente. Conforme se aproxima o nascimento, a síntese da HbF diminui sendo compensada pela formação das hemoglobinas do adulto: HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e HbA (ou HbA₁) ($\alpha_2\beta_2$). Após, aproximadamente, a vigésima oitava semana de vida, as concentrações das hemoglobinas chegam às proporções do adulto, sendo representadas por cerca de 96-98% de HbA; 2,0-3,7% de HbA₂ e < 1% de HbF (STAMATOYANNOPOULOS, 1992; TORRES; BONINIDOMINGOS, 2005).

2.1.1 Hemoglobinas variantes e hemoglobinopatias

Atualmente, mais de 900 variantes estruturais de hemoglobina já foram descritas, as quais são originadas por anormalidades genéticas que podem afetar as propriedades físicas ou químicas da molécula, resultando em alterações na solubilidade, estabilidade ou afinidade pelo oxigênio (INGRAM, 2004).

As “doenças de hemoglobina” ou hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações na porção globínica da molécula de hemoglobina, com ampla distribuição mundial, cujas alterações podem ser classificadas como estruturais ou de síntese. As alterações estruturais decorrem de mutações pontuais em uma ou mais bases que codificam os aminoácidos e incluem a substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias globínicas diferentes causando a formação de uma hemoglobina anormal (variante). As alterações de síntese (talassemias) caracterizam-se pela síntese reduzida ou nula de um ou mais tipos de cadeias globínicas (BUNN; FORGET, 1986; STEINBERG; NAGEL, 2001).

Dentre as hemoglobinas variantes de maior frequência mundial, destaca-se a hemoglobina S (HbS) ($\alpha_2\beta_2^{6\text{GLU}\rightarrow\text{VAL}}$), resultante de uma alteração estrutural por substituição de um aminoácido, que sob determinadas condições, sofre polimerização induzindo graves consequências ao indivíduo sintomático (PELIZARO *et al.*, 2012).

2.2 Anemia Falciforme

2.2.1 Histórico

A anemia falciforme (AF) é a doença hematológica hereditária de maior prevalência em todo mundo, atingindo expressiva parcela da população dos mais diferentes países (VARGAS, 2009), sendo descrita pela primeira vez, em 1910, quando James Herrick, um médico cardiologista de Chicago-EUA, relatou um caso de anemia, um pouco diferenciada, em um jovem estudante de odontologia, de raça negra, oriundo de Granada, nas Antilhas, que apresentava um quadro de anemia, icterícia, úlceras nos membros inferiores e complicações pulmonares. Herrick designou o termo de “peculiarmente alongadas e em forma de foice” para descrever a aparência das hemácias deste paciente, e também constatou que as manifestações clínicas desta doença já eram conhecidas séculos antes na África Ocidental (HERRICK, 1910; HERRICK, 1924), onde os indivíduos que apresentavam tais sintomas eram marcados por tatuagens nos membros e cintura para identificar que eram acometidos de um ‘mal desconhecido’ (WANG; LUKENS, 1999).

Na literatura ocidental, os primeiros esforços para determinar as bases genéticas das células vermelhas falcizadas foram reportados por Emmel (1917), que sugeriu a hereditariedade depois de observar falcização em pai e filho. Em 1945, hipotetizou-se que a doença poderia ser originada de anormalidades na molécula de hemoglobina e, quatro anos mais tarde, a hipótese foi demonstrada por uma diferença na velocidade de migração eletroforética em gel entre a hemoglobina falciforme (HbS) e a hemoglobina normal (HbA) em ambos os estados, oxigenado e desoxigenado (PAULING *et al.*, 1949), demonstrando que existe uma diferença no número ou tipo de grupos ionizáveis nas duas hemoglobinas. No mesmo ano, verificou-se que se tratava de uma doença genética com herança autossômica recessiva, revelando que a AF era a expressão homozigota, enquanto que, o traço falciforme era a manifestação heterozigota, de um defeito genético indefinido (NEEL, 1949).

Concomitantemente, Watson *et al.* (1948), previram a importância da HbF ao descreverem que os sintomas da AF apareciam em crianças logo após a diminuição dos níveis dessa hemoglobina, sugerindo uma possível relação benéfica no aumento dos níveis de HbF e sintomatologia da doença.

Pouco tempo depois, Ingram (1958) comprovou que a mutação responsável por originar a HbS altera apenas um aminoácido da HbA, ou seja, ele demonstrou que a

substituição do ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia da β -globina era a base genética da HbS. Tal achado explicou, dentre outras coisas, a diferença eletroforética entre as duas globinas, e foi a primeira demonstração de uma substituição de aminoácido em proteína humana. Estudos posteriores analisaram a estrutura e as propriedades físicas da HbS, a qual formava polímeros intracelulares sob desoxigenação, e colocaram a AF na vanguarda das investigações para elucidar a base molecular de doenças humanas (FERRONE, 2004; FRENETTE; ATWEH, 2007).

Em 1960, Perutz decifrou a estrutura da hemoglobina, elucidando a base molecular de sua função (PERUTZ *et al.*, 1960).

As primeiras pesquisas brasileiras referentes à AF se devem às investigações feitas pelo médico Álvaro Serra de Castro, em 1933, no Hospital São Francisco de Assis, no Rio de Janeiro, e apresentadas, em 27 de junho do mesmo ano, em sessão da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro (COUTINHO, 1933). A primeira publicação brasileira específica sobre a doença foi um artigo de autoria de Castro (1934) publicado no *Jornal de Pediatria*, sendo considerado, por seus contemporâneos, como o primeiro profissional a identificar um caso da doença no país (ARAÚJO, 1961). O artigo resume-se à exposição de cinco casos clínicos a partir de análises sistemáticas em oitenta crianças negras à procura de hemácias falciformes (CASTRO, 1934).

A AF originou-se na África e foi trazida pelos escravos para as Américas em virtude da imigração forçada dos negros durante o período da escravatura. No final do século XV e início do XVI, a Europa estava no seu apogeu, em virtude do domínio da navegação, e os conquistadores europeus – especificamente espanhóis e portugueses – iniciaram a colonização da América recém-descoberta implementando um sistema produtivo baseado na mão-de-obra escrava (KALCKMANN *et al.*, 2007). Esses escravos eram originados, especialmente, do Senegal e áreas próximas e, posteriormente, em meados do século XVII, os principais portos de origem foram da África Ocidental (Benin) e da costa africana onde os povos falavam a língua Bantu (Namíbia e Angola) (STEINBERG; NAGEL, 2001).

Assim, cerca de 3,6 milhões de negros africanos foram trazidos ao Brasil (Figura 2), ocasionando a disseminação do gene S e miscigenação racial no país, induzindo, com isso, o aparecimento da AF também em brancos (BRASIL, 2002).

Figura 2. Origem e dispersão do gene S no Brasil.



Fonte: Salzano (1986)

Migrações de negros africanos, trazidos para o Brasil, no período da escravidão, disseminando o gene S no país.

2.2.2 Epidemiologia

A AF é a mais comum dentre as doenças hematológicas hereditárias que afeta o homem em todo o mundo, com distribuição predominante em países da África, América do Sul, América Central, Arábia Saudita, Índia, Turquia, Grécia e Itália. Acredita-se que a mutação que produz a HbS (β^S), e que está presente em aproximadamente 7% na população mundial (WEATHERALL; CLEGG, 2001; VARGAS, 2009) (Figura 3), tenha ocorrido há 50-100 mil anos, entre os períodos paleolítico e mesolítico (WHO, 1982; NAOUM, 2000). Estudos iniciais discordavam quanto ao local de origem da mutação β^S , alguns apontando a Ásia (LEHMANN; MARANJIAN; MOURANT, 1963; GELPI, 1973; PANTE-DE-SOUSA *et al.*, 1998) e outros, a África. No entanto, Wainscoat *et al.* (1983), em um estudo realizado com um grupo de indivíduos jamaicanos com AF, encontraram um grande número de haplótipos diferentes, apoiando a hipótese de origem múltipla para a mutação β^S . Trabalhos posteriores indicaram que esta mutação, provavelmente, surgiu em pelo menos quatro eventos independentes nas populações africanas: em Benin, na República Africana Central (CAR), no Senegal e em Camarões (PAGNIER *et al.*, 1984; CHEBLOUNE *et al.*, 1988; LAPOUNIÉROULIE *et al.*, 1992). Além disso, o estudo de grupos populacionais da Arábia Saudita e da Índia sugeriu o surgimento independente do alelo mutante para HbS também na

Ásia (KULOZIK *et al.*, 1986). Tais mutações estão associadas à haplótipos denominados de acordo com sua origem geográfica: Benin (BEN), Bantu (CAR), Senegal (SEN), Camarões e Árabe-Indiano ou Asiático, respectivamente (KULOZIK *et al.*, 1986; ADORNO *et al.*, 2008).

Figura 3. Distribuição geográfica da Hemoglobina S.



Fonte: University of Colorado-Anschutz Medical Campus. Disponível em: <http://www.coloradosicklecellcenter.org/SickleCellTraitCourse>
Frequência da hemoglobina S nas diferentes áreas dos continentes

Apesar da incidência da HbS ser maior entre os indivíduos da raça negra, os brancos, particularmente os que são provenientes do mediterrâneo (Grécia, Itália, etc.), Oriente Médio e Índia, também apresentam a doença (RAMALHO, 1986), e, no Brasil, a intensa miscigenação racial contribui ainda mais para a presença de alelos falciformes na população não negra.

A HbS é bastante comum em países onde a malária causada por *Plasmodium falciparum* é endêmica, levantando-se a hipótese de uma elevada prevalência do traço falciforme em regiões endêmicas para malária como uma forma de proteção seletiva contra as formas mais letais desta doença (ABDULHADI, 2003).

O mecanismo para essa proteção é pouco entendido, mas sabe-se que *in vitro* há diminuição da invasão, crescimento e desenvolvimento de *P. falciparum* em hemácias com diminuída tensão de oxigênio e baixo pH (SERJEANT, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2011). Ademais, fatores como a falcização seletiva de hemácias parasitadas resultam em uma remoção celular mais efetiva pelo baço e, provavelmente, reduz o grau de parasitemia e limita substancialmente o processo infeccioso (SERJEANT, 2001). Abdulhadi (2003) propôs ainda que os mecanismos envolvidos na proteção contra malária

conferida pela HbS incluem a alteração de ligantes à moléculas de adesão na superfície das hemácias falcêmicas, modulando a aderência destas à neutrófilos e contribuindo para a eliminação das células infectadas. A malária causada por *P. falciparum* parece ter sido a força seletiva responsável pela expansão do alelo mutante há aproximadamente 4 (quatro) mil anos na Índia e 3 (três) mil anos na África (NAGEL; FLEMING, 1992), e o fato desta mutação deletéria permanecer em nosso genoma é um sinal da forte pressão que a malária exerce em nossa evolução (CARUCCI, 2004).

A frequência dessa hemoglobina mutante chega a 25% da população de algumas regiões africanas e, conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do Banco Mundial, estima-se que na África nasçam cerca de 270 mil crianças por ano com algum tipo de hemoglobinopatia associada à presença da HbS (BRASIL, 2009).

Nos Estados Unidos, a AF afeta aproximadamente 01 em cada 350 recém-nascidos afro-americanos por ano, e aproximadamente 72.000 indivíduos no total, sendo a doença hematológica genética mais prevalente no país (BONDS, 2005).

No Brasil, estima-se a existência de pelo menos dois milhões de portadores da HbS, sendo 8000 portadores de AF (BRASIL, 2002; LYRA *et al.*, 2005; CANÇADO; JESUS, 2007) e, dentre os afrodescendentes brasileiros, o traço falciforme é encontrado numa frequência que varia de 6,9% a 15% (GONÇALVES *et al.*, 2003). Foi observado ainda que, no Brasil, 78,6% dos óbitos devido à AF ocorrem até os 29 anos de idade e 37% concentram-se nos menores de nove anos (LOUREIRO; ROZENFELD, 2005).

Com base nos dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) (2009) do Ministério da Saúde, atualmente, nascem no Brasil cerca de 3.500 crianças por ano com doença falciforme (DF) (presença da HbS), ou 1/1.000 nascidos vivos, e 200 mil portadores do traço falciforme. Essa doença encontra-se distribuída na população de forma heterogênea, com maior prevalência nos estados que possuem maior concentração de afrodescendentes, com recorte social entre os mais pobres (BRASIL, 2009).

O Estado da Bahia apresenta a maior incidência, sendo 01 doente para cada 650 nascimentos e 01 portador do traço falciforme para cada 17 nascimentos. Outros estados como Rio de Janeiro, Minas Gerais, Maranhão e Pernambuco também apresentam números significativos quanto à presença da doença na população (Brasil, 2009).

Os dados obtidos em 14 estados brasileiros, sobre a doença e o traço, estão representados no quadro 1.

Quadro 1. Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença e traço falciformes em 14 estados brasileiros que realizam o PNTN.

Estados	Incidência de doença falciforme	Incidência de traço falciforme
Bahia	1:650	1:17
Rio de Janeiro	1:1.200	1:21
Pernambuco/ Maranhão/ Minas Gerais/ Goiás	1:1.400	1:23/ 1:23/ 1:23/ 1:25
Espirito Santo	1:1.800	1:28
Rondônia	1:2.500	1:34
Acre	1:3.480	1:40
São Paulo	1:4.000	1:35
Mato Grosso do Sul	1:8.360	1:70
Rio Grande do Sul	1:11.000	1:65
Santa Catarina/ Paraná	1:13.500	1:65

Fonte: PNTN/Ministério da Saúde, Programas Estaduais de Triagem Neonatal/Serviços de Referência em Triagem Neonatal Credenciados (BRASIL, 2009).

2.2.3 Padrão de herança da anemia falciforme

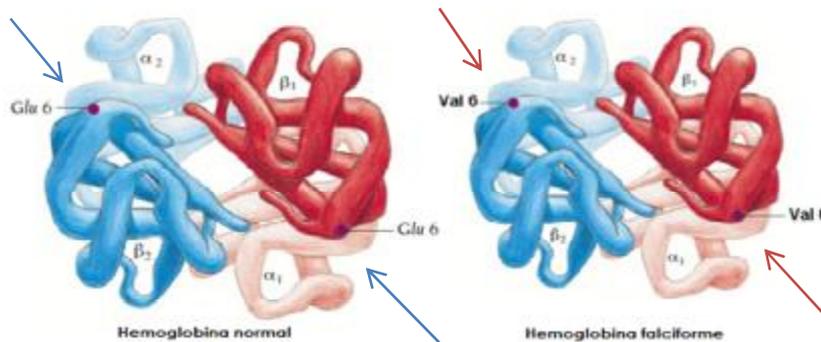
As hemoglobinopatias são doenças caracterizadas pela expressão de moléculas de hemoglobinas variantes e estão incluídas dentre as doenças genéticas mais frequentemente descritas em populações humanas (WANG; LUKENS, 1999; STEINBERG, 2008), tendo como destaque as que apresentam a HbS, sendo chamadas por doenças ou síndromes falciformes. Embora mais de 15 (quinze) genótipos diferentes tenham sido identificados como causadores de DF (REES; GIBSON, 2011), a AF destaca-se por ser a forma mais prevalente e, em geral, a que revela maior gravidade clínica e hematológica (NAOUM, 2000; BANDEIRA *et al.*, 2004; PELIZARO *et al.*, 2012).

A denominação “anemia falciforme” é reservada para a forma da doença que ocorre em indivíduos homocigotos (HbSS), e trata-se de uma doença hereditária, monogênica, de herança autossômica, codominante para a mobilidade eletroforética, ou seja, a heterozigose (HbAS) não causa doença, mas é detectável, podendo os portadores do traço falciforme apresentar de 30 a 40% da hemoglobina variante, ao passo que os portadores da AF possuem 80% ou mais da HbS no interior de suas hemácias (NAOUM, 2000). Além disso, o gene da

HbS pode combinar-se com outras anormalidades hereditárias das hemoglobinas, como a hemoglobina C (HbC), hemoglobina D (HbD), beta-talassemia, dentre outros, gerando combinações que também são sintomáticas, denominadas, respectivamente, como hemoglobinopatia SC, hemoglobinopatia SD e S/beta-talassemia (MANFREDINI *et al.*, 2007).

A AF é resultante de uma mutação pontual no sexto códon do gene da β -globina, localizado no braço curto do cromossomo 11, com a substituição de uma única base nitrogenada, de uma adenina (A) por uma timina (T), $G\mathbf{A}G \rightarrow G\mathbf{T}G$, cuja tradução molecular substitui o aminoácido ácido glutâmico pela valina, originando assim a formação da hemoglobina variante “S” (onde a letra S deriva da palavra inglesa *sickle*, que em português traduz-se como foice) em substituição da hemoglobina normal denominada “A” (STEINBERG, 2008; GUIMARÃES; COELHO, 2010; CHIRICO; PIALOUX, 2012) (Figura 4).

Figura 4. Estrutura da hemoglobina normal e hemoglobina falciforme



Fonte: <http://saude.culturamix.com/doencas/anemia-falciforme-doenca-do-sistema-sanguineo>

Esquerda: hemoglobina normal, com o aminoácido ácido glutâmico na posição 6 da cadeia da β -globina. Direita: hemoglobina falciforme, com aminoácido valina na posição 6 da cadeia da β -globina.

A maioria dos genitores de crianças com AF são heterozigotos simples, ou seja, apresentam um gene da HbA associado a um outro da HbS, transmitindo cada um deles o gene alterado para a criança, que assim recebe o gene anormal em dose dupla (homozigoto SS). Porém, não é incomum a identificação de um dos pais como afetado pela doença somente durante a investigação familiar suscitada pelo nascimento de um filho diagnosticado através de triagem neonatal ("teste do pezinho") (SILVA; RAMALHO; CASSORLA, 1993; GUEDES; DINIZ, 2007; SCHECHTER, 2008).

2.2.4 Diagnóstico da anemia falciforme

Com a finalidade inicial da prevenção de doença mental em recém-nascidos, a triagem neonatal (TN), criada nos Estados Unidos na década de 50, é uma ação preventiva que permite rastrear e detectar diversas patologias logo ao nascimento, sendo realizada por meio do ‘teste do pezinho’ em população com idade de 0 (zero) a 30 dias (preferencialmente entre o 2º e o 7º dia de vida). Desde então, a TN vem se desenvolvendo, incluindo novas patologias e métodos mais eficazes e capazes de identificar, além de doenças metabólicas como a fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito, a fibrose cística e hemoglobinopatias (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

No Brasil, a portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde incluiu a AF no PNTN, permitindo assim o diagnóstico precoce já ao nascimento como uma maneira eficiente e efetiva para reduzir a morbimortalidade da doença e proporcionar a inserção do paciente em programas de saúde multidisciplinares, com a utilização de cuidados preventivos e orientação aos pais, promovendo melhora na qualidade de vida e a promoção da saúde desses pacientes (BRASIL, 2009).

As técnicas utilizadas para avaliar amostras de sangue encaminhadas ao laboratório com suspeitas de AF, ou para acompanhamento e controle da doença, incluem testes que podem ser subdivididos em quatro grupos:

I- Confirmatórios da presença de HbS nas hemácias: teste de falcização ou teste de solubilidade;

II- Determinantes de genótipos (AS, SS, SC, dentre outros): eletroforese de hemoglobinas em meios alcalino e ácido, isoeletrofocalização, dosagem de HbF e HbA₂, e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC);

III- Determinantes de haplótipos por meio de técnicas de biologia molecular;

IV- Monitoração: hemograma, contagem de reticulócitos, morfologia eritrocitária, dosagens de: ferritina, bilirrubina, ácido úrico, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (LDH) e metaemoglobina, e pesquisas intracelulares de corpos de Heinz, HbH e HbF. (BRASIL, 2002; MELO *et al.*, 2006; Brasil, 2009).

2.2.5 Fisiopatologia

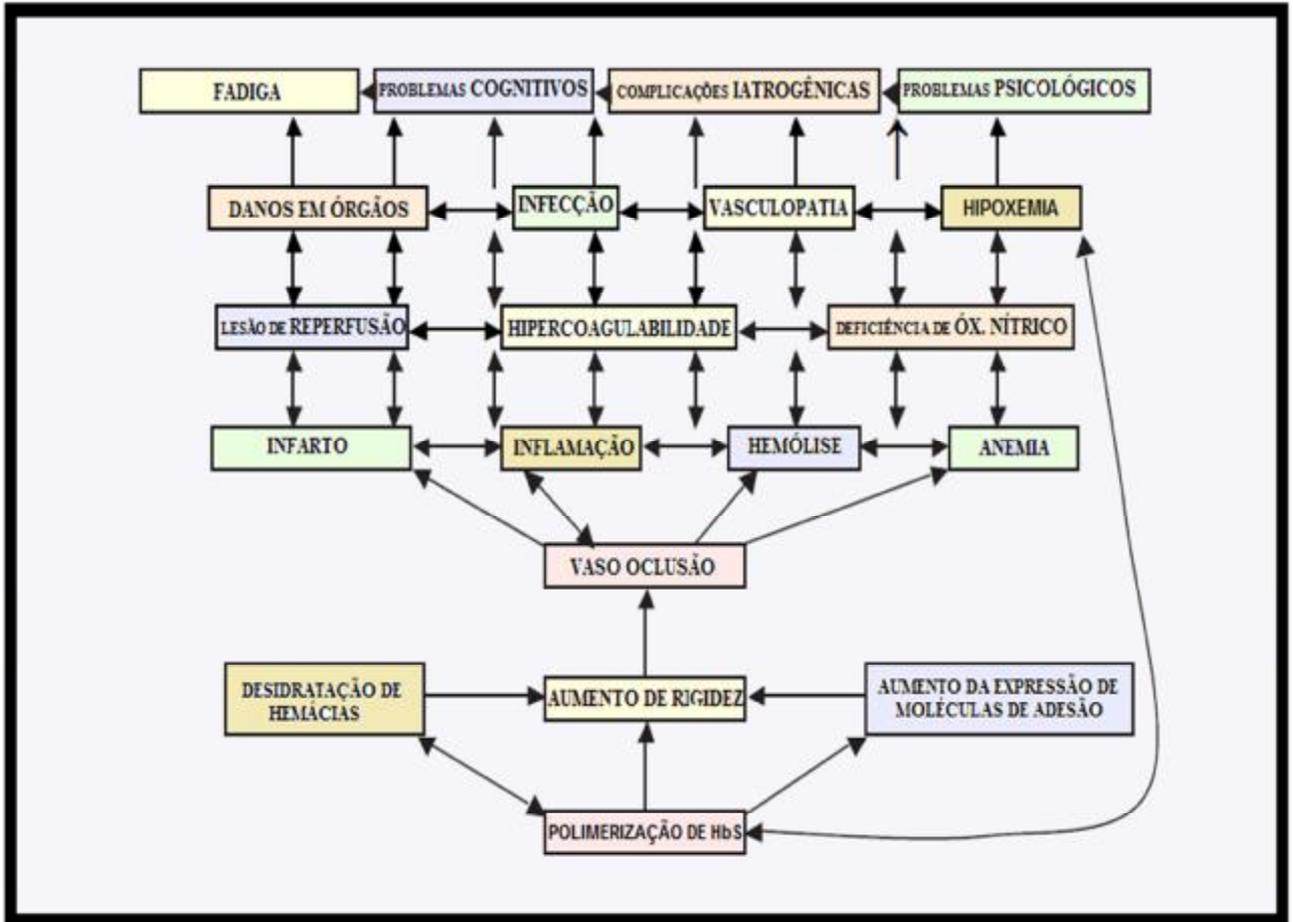
A base da fisiopatologia responsável pelo fenômeno da falcização (formação de hemácias em forma de foice ou meia lua) está na simples substituição do ácido glutâmico pela valina na posição 6 da β -globina (CANÇADO *et al.*, 2009; REES; GIBSON, 2011; CHIRICO; PIALOUX, 2012). Embora esta mudança se configure bioquímica e geneticamente como pontual, numa região da molécula que não a compromete estruturalmente, passa a ser suscetível quando a molécula de HbS perde o oxigênio e permite uma aproximação anormal entre moléculas de hemoglobina, a partir da formação de pontes de hidrogênio entre o aminoácido valina e os receptores fenilalanina (β -85) e leucina (β -88) da molécula adjacente de HbS (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003; SILVA; SHIMAUTI, 2006), com consequente polimerização das mesmas e alterações de sua estabilidade e solubilidade, levando à formação de estruturas tubulares (polímeros) que resultam em deformação e diminuição da flexibilidade das hemácias (STEINBERG, 2008; PELIZARO *et al.*, 2012; CHIRICO; PIALOUX, 2012), ocasionando a falcização, enrijecimento e encurtamento da vida média dessas células na circulação, o que pode provocar complicações clínicas e prejudicar o desenvolvimento, a qualidade de vida ou até levar o indivíduo ao óbito (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004; GUIMARÃES; COELHO, 2010; PALLIS, 2011; WANG *et al.*, 2011).

A polimerização da HbS desoxigenada é o evento fundamental na fisiopatologia da anemia falciforme (STEINBERG *et al.*, 2008; PELIZARO *et al.*, 2012), sendo influenciada pela tensão de O_2 , concentração intracelular da HbS e HbF, temperatura, associação com outras hemoglobinas e talassemia, desidratação celular (pelo aumento da viscosidade citoplasmática e vazamento de íons K^+ e água através da membrana), presença de hemoglobinas normais, tempo de circulação das hemácias na microcirculação, pela pressão sanguínea, força iônica e pH (DE FRANCESCHI; CORROCHE, 2004; STUART; NAGEL, 2004; MANFREDINI *et al.*, 2007).

Repetidas polimerizações da HbS podem causar danos definitivos na estrutura das hemácias, gerando, principalmente, hemólise intravascular e crises vaso-oclusivas (CVO), desencadeando uma cascata cíclica de reações (Figura 5) que culmina com geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e stress oxidativo, redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), lesão do endotélio, hipercoagulabilidade, aumento da expressão de moléculas de adesão de células sanguíneas e endoteliais, de injúria da isquemia/reperfusão e

um processo inflamatório crônico. A combinação dessas ações está associada com respostas inflamatórias em vários órgãos e pode produzir inúmeros outros estados patológicos secundários (RESS; GIBSON, 2011; CHIRICO; PIALOUX, 2012).

Figura 5. Diagrama ilustrando a cascata de eventos fisiopatológicos derivados da polimerização da HbS desoxigenada.



Fonte: Adaptado de REES; GIBSON, 2011.

Nota: Polimerização de HbS como fator desencadeador de eventos observados na anemia falciforme.

2.2.6 Manifestações clínicas

Os indivíduos com AF apresentam quadro clínico heterogêneo, com gravidade elevada e variável, dependente da concentração de HbS e do grau de oxigenação das hemácias (SANTOS *et al.*, 2011). As duas primeiras décadas de vida são caracterizadas por períodos assintomáticos intercalados com períodos de intensa dor, envolvendo diversos órgãos. As manifestações iniciam a partir do momento em que o nível de HbF reduz-se a níveis inferiores a 30%, com predomínio de HbS no sangue, ocorrendo, geralmente, por volta do sexto mês de vida (POWARS, 1981; GÓMEZ-CHIARI; PUIGBERT; ARAMBURU, 2003; BANDEIRA *et al.*, 2004). Evidências sugerem ainda que a presença dos haplótipos da mutação β^S em pacientes com AF está relacionada à gravidade e à evolução clínica da doença, sugerindo melhores prognósticos para os haplótipos Senegal e Asiático, cuja expressão fenotípica de HbF mostra-se elevada, e pior evolução clínica para os pacientes portadores dos haplótipos Bantu e Benin (NAOUM, 2000; SCHNOG *et al.*, 2004).

A característica marcante da AF, a falcização ou afoiçamento das hemácias, além de causar anemia hemolítica crônica, ainda é responsável pela obstrução de vasos sanguíneos ou CVO, com consequentes episódios dolorosos recorrentes, infarto e necrose de diversos órgãos, como ossos, articulações, baço, pulmões e rins, dentre outros (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004; SOUZA, 2007; MIGUEL, 2010; PALLIS, 2011). Outras intercorrências de relevância clínica são a elevada suscetibilidade às infecções bacterianas, principalmente pneumococos e *Haemophilus influenzae* (SANTOS, 2010), síndrome torácica aguda (STA), priapismo, úlceras de perna, hipodesenvolvimento somático, retardo da maturação sexual, retinopatias proliferativas, insuficiência renal crônica, alterações pulmonares e osteoarticulares, os acidentes vascular-cerebrais (AVC) e as complicações cardíacas, que, juntamente com as crises dolorosas, levam a internações hospitalares, morbidade e mortalidade (ZAGO, 2001; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008; MIGUEL, 2010).

Dentre as manifestações clínicas apresentadas por pacientes com AF, as CVO representam as mais graves, porém ainda não estão completamente elucidados os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento. Sabe-se, entretanto, que alguns estudos atribuem as CVO como sendo resultado da interação entre hemácias falcêmicas, leucócitos, plaquetas, células endoteliais e substâncias presentes no plasma dos pacientes (CHIES; NARDI, 2001;

HEBBEL; OSAROGIAGBON; KAUL, 2004; VARGAS, 2009; PALLIS, 2011). Essas oclusões da microcirculação, bem como a presença de infecções recorrentes estão associadas à elevação dos níveis de citocinas e proteínas de fase aguda na circulação, as quais, por sua vez, agravam ainda mais os fenômenos vaso-oclusivos por promoverem: ativação do endotélio vascular, indução de adesividade das hemácias e de neutrófilos ao endotélio, desenvolvimento da hiperplasia intimal vascular, ativação plaquetária, produção de endotelina e desregulação da apoptose endotelial, além do envolvimento na regulação da hematopoese, na inibição das funções imunológicas e no desenvolvimento de déficits de crescimento (MAKIS; HATZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000; MIGUEL, 2010; ALMEIDA, 2011).

Estudos afirmam que o aumento da gravidade da doença tem uma relação direta com o aumento da contagem de neutrófilos na circulação sanguínea, e a leucocitose é associada a um alto relato de mortalidade. O inverso a este pressuposto também é válido: uma redução da contagem de leucócitos diminui as manifestações e gravidade desta doença (PLATT *et al.*, 1994; ANYAEGBU *et al.*, 1998; OKPALA, 2004; ASSIS *et al.*, 2005; SOUZA, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2011; PALLIS, 2011), o que nos leva a pensar na participação dos neutrófilos como um agente modulador da AF.

Segundo alguns autores, os neutrófilos são os leucócitos que mais participam do processo de vaso-oclusão, podendo ter um papel central e iniciador no desenvolvimento da CVO, não somente pelo tamanho e estrutura rígida, como também pela produção de citocinas pró-inflamatórias e EROs ou pela ativação e adesão com hemácias (falcizadas ou não), outros leucócitos, plaquetas e células endoteliais, contribuindo, por consequência, com a propagação do estado inflamatório e processo vaso-oclusivo (CROSS *et al.*, 2005; OKPALA, 2006; CONRAN *et al.*, 2007b; CHIANG *et al.*, 2007).

2.3 O neutrófilo

2.3.1 Aspectos gerais

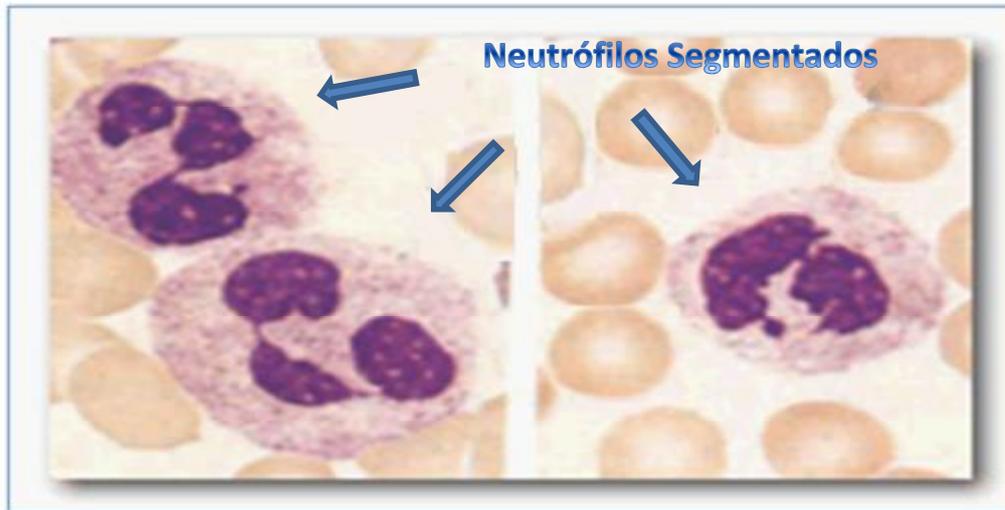
Os neutrófilos, também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares (PMN), são células sanguíneas produzidas e armazenadas na medula óssea (MO) que, quando maduras, são liberadas na corrente sanguínea, apresentando funções bactericida e fungicida altamente

potentes. Na MO, a produção de neutrófilos ocorre a partir de células hematopoiéticas pluripotentes, sob estímulo de numerosos mediadores, em especial os fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF). No homem adulto, aproximadamente 10 milhões de neutrófilos são liberados na corrente sanguínea a cada minuto, representando cerca de 50 a 70% do total de leucócitos, sendo considerados os componentes majoritários dentre os mesmos (ZYCHLINSKY; WEINRAUCH; WEISS, 2003; LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004; ALMEIDA, 2011), bem como, as primeiras células a serem recrutadas da corrente sanguínea para os sítios de inflamação, sendo, por esta razão, apreciados como a primeira linha de defesa do organismo e células efetoras centrais no sistema imune (JOHNSON; VARANI; SMOLEN, 1992; LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005; CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009).

Os neutrófilos foram descobertos por Paul Erlich, no final do século XIX, quando as técnicas de fixação e coloração celulares tornaram possíveis a identificação dos núcleos lobulados e a presença dos grânulos citoplasmáticos, característicos destas células. A coloração de tais grânulos a partir de corantes neutros conferiu a estes leucócitos a denominação de “neutrófilos” (BORREGAARD; COWLAND, 1997; DALE; BOXER; LILES, 2008; AMULIC *et al.*, 2012).

Morfologicamente, os neutrófilos são distinguidos das outras células sanguíneas por possuírem: formato esférico com cerca de 12 a 15µm de diâmetro, núcleo polimórfico, apresentando de 3 a 5 lóbulos conectados por filamentos finos de cromatina, e grânulos em abundância no citoplasma (Figura 6), os quais contêm diferentes grupos de enzimas citotóxicas, hidrolíticas e catiônicas, sendo denominados de grânulos azurófilos (ou primários), grânulos específicos (ou secundários), grânulos de gelatinase (ou terciários) e vesículas secretórias (BORREGAARD; COWLAND, 1997; ABBAS, LICHTMAN, 2005; BORREGAARD; SORENSEN; THEILGAARDMÖNCH, 2007).

Figura 6. Distensão de sangue periférico. Estrutura polimorfonuclear com grânulos citoplasmáticos.



Fonte: Plugbr.net.<<http://www.plugbr.net/o-sangue-visto-no-microscopio>

Esquerda: Aparecem dois leucócitos neutrófilos segmentados. Direita: Um leucócito neutrófilo segmentado. Estrutura polimorfonuclear com grânulos citoplasmáticos. Coloração de May-Grünwald -Giemsa. Aumento de 1000X

Os grânulos neutrofilicos distinguem-se entre si pela sua morfogênese e citoquímica, bem como pela composição de suas membranas e conteúdo em moléculas citotóxicas responsáveis pela degradação de patógenos para a defesa do hospedeiro (BORREGAARD; SORENSEN; THEILGAARDMÖNCH, 2007; DALE; BOXER; LILES, 2008; FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009). São formados durante a granulopoiese em uma sequência de eventos de diferenciação, iniciando-se no estágio de promielócito, onde surgem os primeiros grânulos (primários), também denominados de azurófilos devido a sua afinidade pelo corante azul, contendo em seu interior: hidrolases ácidas, enzimas microbicidas, mieloperoxidase (MPO), lisosima, proteinases neutras (elastase, catepsina G e proteinase 3 - PR3) (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; RADU; LEVI, 2005; KUMAR; SHARMA, 2010).

A MPO é uma hemoproteína microbicida, considerada como sendo o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, prontamente liberada dentro do fagossomo ou para o espaço extracelular após ativação por diferentes agonistas (LAU; BALDUS, 2006), catalisando reações com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formado pelo sistema NADPH oxidase, produzindo um potente oxidante: o ácido hipocloroso (HOCl), importante na defesa imune inata do organismo (BORREGAARD; COWLAND, 1997; JOINER *et al.*, 1989; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Posteriormente, durante a maturação dos neutrófilos (estágio de metamielócito) são formados os grânulos secundários ou específicos. As proteínas destes grânulos encerram diversos e potentes peptídeos antimicrobianos, incluindo colagenase, lactoferrina e hCAP-18, que induz quimiotaxia em neutrófilos, células T e monócitos (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009; FREITAS, LIMA, FERNANDES, 2009).

Os grânulos terciários ou de gelatinase assemelham-se aos secundários, porém possuem altas concentrações de gelatinase, e destacam-se como reservatórios de enzimas de degradação de componentes do tecido conjuntivo e de receptores de membrana, necessários durante extravasamento e diapedese do neutrófilo (BORREGAARD, COWLAND, 1997; KANG *et al.*, 2000; CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009; FREITAS, LIMA, FERNANDES, 2009).

Quando maduros, os neutrófilos desenvolvem vesículas secretórias altamente mobilizáveis, ricas em citocromo b558, receptores, proteínas sinalizadoras e moléculas de adesão em sua superfície, além de proteínas plasmáticas como albumina, imunoglobulina e transferrina em sua matriz (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; DALE; BOXER; LILES, 2008; FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009).

Os neutrófilos, além de possuírem como principais atividades funcionais a migração orientada para o local da infecção (quimiotaxia), aderência e englobamento de agentes patogênicos (fagocitose), e a destruição dos microrganismos invasores através da liberação de EROs e de substâncias tóxicas presentes em seus grânulos, também são capazes de controlar as funções de outras células do sistema imunológico, contribuindo, de forma crucial, para a resolução da resposta imune. Em virtude deste seu duplo papel anti-infeccioso e pró-inflamatório, são “células-chave” tanto na imunidade inata como na humoral (KUIJPERS, 2002; OKPALA, 2004; NAGATOMI, 2006; CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009; ALMEIDA, 2011).

2.3.2 Neutrófilos e a inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica normal à infecção ou lesão tecidual que permite a sobrevivência do indivíduo a diversos agentes lesivos e mantém a homeostase dos tecidos sob uma variedade de condições nocivas, sendo caracterizada por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias, tais como

neutrófilos, monócitos, macrófagos, e, em alguns casos, linfócitos (MEDZHITOV, 2010; OKIN; MEDZHITOV, 2012). Estes eventos fisiológicos, em conjunto com a liberação de mediadores citotóxicos, inflamatórios e quimiotáticos, funcionam para conter, destruir e remover os invasores ou agentes patógenos. Nos estágios posteriores da resposta inflamatória, em que o foco é a reparação do tecido lesado, o recrutamento e ativação de células mesenquimais e fibroblastos também são observados. Em geral, as respostas inflamatórias localizadas são auto-limitadas e resultam na resolução da lesão. Paradoxalmente, em certas circunstâncias, como infecção ou inflamação generalizada em indivíduos geneticamente predispostos, o desfecho destas respostas depende do equilíbrio dos estímulos e mediadores pró e anti-inflamatórios, podendo ser prejudicial e induzir danos ainda maiores por acentuar e prolongar a inflamação, manifestando-se clinicamente como disfunção ou mesmo falência de múltiplos órgãos (SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008; MEDZHITOV, 2010; OKIN; MEDZHITOV, 2012).

Em adultos saudáveis, os neutrófilos circulantes encontram-se em estado de repouso, o que garante que seu conteúdo intracelular tóxico não seja acidentalmente liberado e provoque danos aos tecidos adjacentes, porém, podem ser ativados por produtos bacterianos, citocinas ou quimiocinas, como por exemplo: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), GM-CSF, interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 e interferon- γ (IFN- γ) ou outras substâncias produzidas pelas próprias células do tecido lesado, e migrarem em número elevado para as áreas de inflamação (MEDZHITOV, 2010; WRIGHT *et al.*, 2010; OKIN; MEDZHITOV, 2012). Uma vez ativados, os neutrófilos participam da regulação da amplitude e duração da resposta imune (SOUZA, 2007), através da liberação de sinais quimiotáticos e outras citocinas, recrutando, diferenciando e ativando linfócitos B e T, células apresentadoras de antígenos e células endoteliais, dentre outros; influenciando ainda a produção e retenção celular na medula óssea (CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009).

Dentre os principais marcadores de inflamação, podemos destacar a MPO, proteína C-reativa (PCR), α -2 macroglobulina, TNF- α , transferrina e as interleucinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8) e anti-inflamatória (IL-10) (OKPALA, 2006). Tais mediadores são produzidos por diferentes tipos celulares, porém estão todos interligados formando uma cascata de estímulos, ora induzindo a liberação de outras citocinas ora reprimindo (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A MPO, por exemplo, tem sido descrita como potente mediador inflamatório, induzindo tanto a iniciação como a manutenção de numerosos eventos inflamatórios, sobretudo, os cardiovasculares (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2008).

As citocinas são glicoproteínas 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, ou seja, a mesma citocina pode apresentar diferentes atividades, dependendo das condições do microambiente celular e 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, vale ressaltar: indução da inflamação, regulação da fase de resposta aguda, ativação de linfócitos, controle da síntese de anticorpos, dentre 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 celulares. A presença de IL-12 e IFN- γ , por exemplo, determinam um perfil inflamatório onde células T CD4+ se diferenciam em linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1). 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).

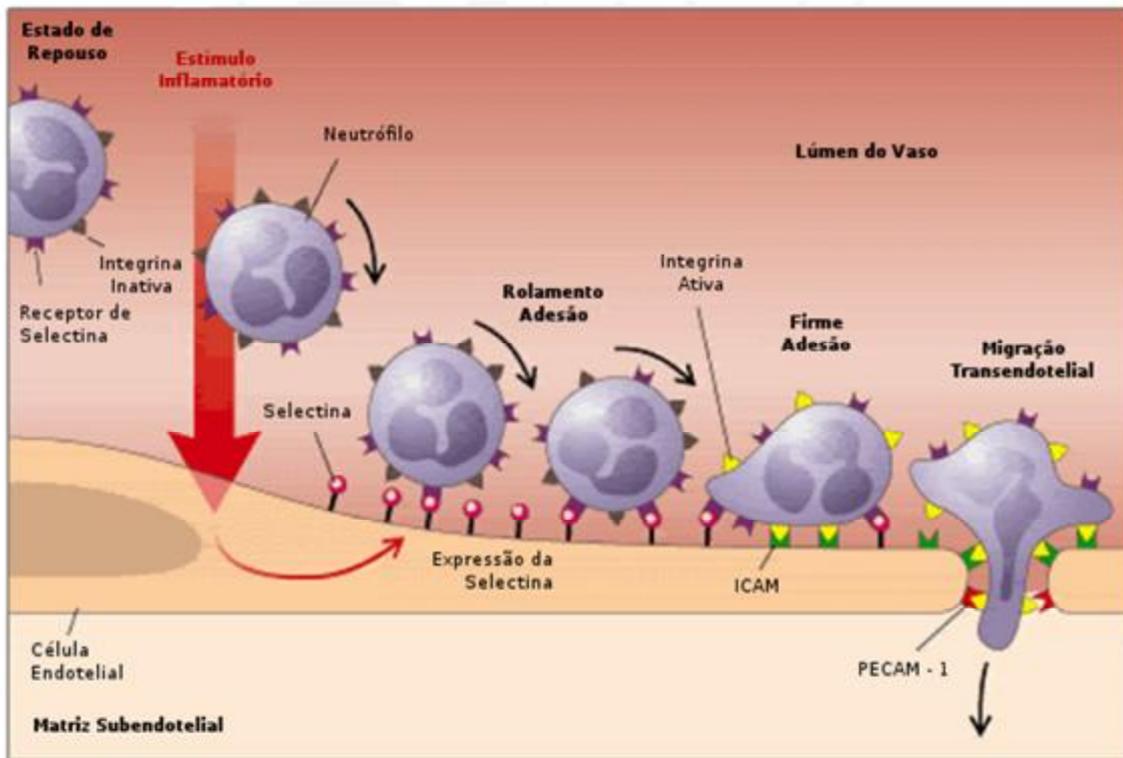
O TNF- α é um importante mediador da resposta inflamatória aguda recrutando neutrófilos e monócitos para o local da inflamação através de diversos mecanismos: induz no endotélio a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos, monócitos e linfócitos, principalmente selectinas e integrinas; estimula as células endoteliais a secretarem quimiocinas que acentuam a afinidade entre as integrinas expressas e seus ligantes leucocitários, além de induzir a quimiotaxia e o recrutamento de mais leucócitos para o foco inflamatório. Elevadas concentrações de TNF- α (e IL-1) estimulam a produção de IL-6, que por sua vez induz a liberação de proteínas de fase aguda de inflamação pelos hepatócitos (MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; BILATE, 2007).

Duas outras importantes citocinas presentes no processo inflamatório são a IL-8 e a IL-10. A IL-8 está envolvida na resposta inflamatória local e crônica, auxiliando no recrutamento de neutrófilos, basófilos e de células T para os locais da infecção (HULL *et al.*, 2001), bem como, apresenta importante papel relacionado à mobilização, ativação e desgranulação de neutrófilos, hepatócitos e queratinócitos, além do processo de angiogênese (HARADA *et al.*, 1994). Já 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. Sua principal função é inibir a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12 e TNF- α . Inibe ainda a proliferação e a função de células do perfil Th1, favorecendo, então, o desenvolvimento de respostas do perfil anti-inflamatório Th2 (MAKIS; HATIZIMICHAEL; BOURANTAS, 2000; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003; BILATE, 2007).

O neutrófilo expressa ainda uma variedade de moléculas de adesão na sua superfície, facilitando a migração transendotelial da célula ao seu local de destino. As L-selectinas (proteínas transmembranares, presentes na superfície dos leucócitos) interagem, através da PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), com as moléculas P e E-selectinas, expressas pelas células endoteliais e ativadas por fatores, tais como a trombina, histamina, EROs, TNF- α e outras citocinas ou ainda por LPS (lipopolissacarídeo: endotoxina bacteriana), e intermedeiam a ligação e rolamento da célula na camada endotelial celular. A firme adesão da célula é intermediada, principalmente, pela família de receptores leucocitários das integrinas β_2 : MAC-1 (antígeno macrófágico-1) e LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen-1*), que se ligam ao endotélio pelas moléculas de adesão ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e ICAM-2, mas também possuem afinidade por outros ligantes encontrados na matriz extracelular, tais como fibronectina (FN), iC3b e fibrinogênio. A integrina MAC-1, em particular, desempenha papel primordial tanto na adesão como na diapedese de todos os leucócitos (ASSIS *et al.*, 2005; MEDZHITOV, 2010; WRIGHT *et al.*, 2010; OKIN; MEDZHITOV, 2012) (Figura 7).

Após a forte adesão ao endotélio, os leucócitos migram através de junções interendoteliais (diapedese), envolvendo duas moléculas de adesão pertencentes à família das imunoglobulinas: a molécula de adesão plaqueta-célula endotelial-1 (PECAM-1) e a molécula de adesão juncional (JAM), e se dirigem aos sítios de inflamação guiados por fatores quimiotáticos (ASSIS *et al.*, 2005; SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008; WRIGTH, *et al.*, 2010).

Figura 7. Etapas do processo de migração leucocitária para área de inflamação.



Fonte: Adaptado de ETZIONI, 2000.

Migração transendotelial do leucócito neutrófilo segmentado para sítio de inflamação, mediado por interação de moléculas de adesão expressas em sua superfície e na parede endotelial. Os neutrófilos migram para as áreas de inflamação atraídos por sinais quimiotáticos endógenos ou gerados por agentes invasivos.

A predominância dos neutrófilos, dentre as demais células, é um fato comum nas áreas de inflamação, tanto naquelas que ocorrem em virtude da invasão tecidual por microorganismos, como naquelas relatadas por desordens imunes ou tecidos inespecíficos lesados (SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008; WRIGHT *et al.*, 2010).

2.3.3 Neutrófilos e a produção de ERO

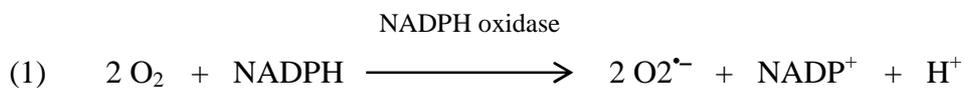
Após estimulados por fatores ambientais, mediadores inflamatórios ou durante o processo de fagocitose, os neutrófilos sofrem um conjunto de alterações metabólicas que culminam na formação de EROs, referido na literatura como “*burst*”, surto ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa, caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio e de ATP (trifosfato de adenosina), aumento da oxidação da glicose pela via da hexose monofosfato, do transporte de elétrons e da geração de radicais livres, dentre os quais, destacam-se as EROs e

as espécies reativas de nitrogênio (ERN). As EROs mais importantes são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), o H_2O_2 , HOCl e o oxigênio singlete (1O_2). Dentre as ERNs incluem-se o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

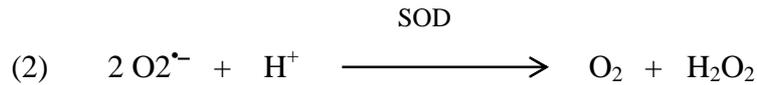
As EROs e ERNs são moléculas altamente reativas devido à presença de um par de elétrons não pareados na última camada, o que as tornam potentes agentes oxidantes, atuando em conjunto com os constituintes dos grânulos citoplasmáticos para matar e digerir os microorganismos ou partículas fagocitados (ZYCHLINSKY; WEINRAUCH; WEISS, 2003).

O metabolismo oxidativo se inicia com o complexo enzimático denominado NADPH-oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase) formado por componentes citosólicos (p67phox, p47phox e p40phox) e de membrana plasmática (gp91phox e p22phox) que coexistem em um heterodímero denominado flavocitocromo b558. Após a ativação neutrofílica, os componentes citosólicos são fosforilados por quinases e translocados para a membrana plasmática, onde interagem ainda com outras proteínas oxidases. Paralelamente, grânulos azurófilos e vesículas secretórias se fundem com a membrana plasmática para formar o fagossoma, seguido pela interação de gp91phox e p22phox com a membrana (NAUSEEF, 1999; FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009).

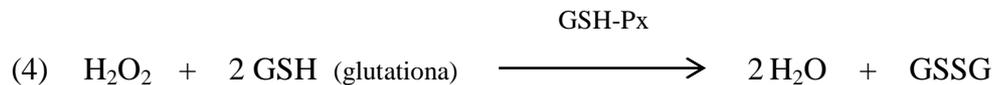
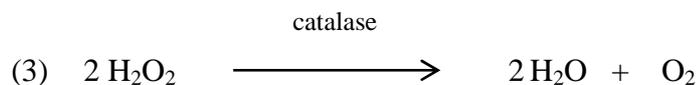
O complexo NADPH-oxidase ativo transporta elétrons do NADPH no sítio citoplasmático para o O_2 no fluido extracelular ou no espaço intrafagossômico, formando o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (reação 1)



O ânion $O_2^{\bullet-}$ é muito reativo e é removido rapidamente pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), formando o H_2O_2 , que, por sua vez, pode ser utilizado como substrato para a produção de outras ERO e/ou ERN mais efetivas como microbicidas (reação 2).



O H_2O_2 forma o radical HO^\bullet e não existe nenhuma enzima que o remova. Por isso, as enzimas que decompõem o H_2O_2 , como a catalase e a glutaciona peroxidase (GSH-Px), são de extrema importância para os seres vivos (reação 3 e 4) (MEYER; HARVEY; 1998; CADENAS; DAVIES, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).



As EROs (e ERNs) são geradas em muitos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo, tais como: atividades bactericidas, fungicidas e viróticas, participam de processos de sinalização celular, estão envolvidos na síntese e regulação de muitas proteínas e também são utilizadas para acelerar a liberação do oxigênio ligado à hemoglobina das hemácias para o interior dos tecidos favorecendo as atividades metabólicas dos mesmos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; WOOD; GRANGER, 2007).

Se por um lado, essas reações são vitais para a sobrevivência humana, por outro, quando produzidas em excesso, têm sido relacionadas com o aparecimento de processos degenerativos das inflamações crônicas e diversas patologias como a aterosclerose, envelhecimento, infarto, câncer, asma, mal de Alzheimer, diabetes, dentre outros (CADENAS; DAVIES, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007; FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; NUR *et al.*, 2011).

Quando o sistema imune inato (fagócitos) é ativado, defesas antioxidantes, enzimáticas (tais como, catalase, GSH-Px, SOD) e não-enzimáticas (vitaminas A, C, E, flavonoides, carotenoides), atuam contra as toxicidades dessas espécies reativas que nesse momento são geradas e são responsáveis pela manutenção da homeostase, equilíbrio entre a produção e a eliminação das ERO. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano consequente (NATTA;

CHEN; CHOW, 1990; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007; WOOD; GRANGER, 2007; FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; NUR *et al.*, 2011).

2.3.4 O neutrófilo e sua importância na anemia falciforme

A AF é um distúrbio, primariamente, das células vermelhas do sangue, as hemácias, porém, várias evidências sugerem que os leucócitos, especialmente os neutrófilos, possuem um papel de relevada importância na fisiopatologia e desenvolvimento das manifestações clínicas da doença, podendo estar envolvidos tanto na iniciação como na propagação das CVO, bem como na gravidade das mesmas (OKPALA, 2004; NUR *et al.*, 2011).

A contagem elevada de neutrófilos, frequentemente observada em pacientes com AF, mesmo na ausência de infecções, tem sido associada com a ocorrência de crises falcêmicas, STA, nefropatia, acidente vascular cerebral (AVC) e morte precoce (ASSIS *et al.*, 2005; NATHAN, 2006). O envolvimento dos neutrófilos no processo de oclusão vascular e comprometimento funcional dos órgãos adjacentes se deve a vários mecanismos, sobretudo pelo fato de serem células relativamente grandes (12-15 μ m) e rígidas fazendo com que seu recrutamento para a microcirculação reduza o fluxo sanguíneo dos vasos, por aderirem às paredes do endotélio ativado e sofrerem interações adesivas com hemácias, plaquetas ou outros leucócitos circulantes, retendo e formando agregados celulares que obstruem ainda mais o lúmen vascular, e por estimularem o endotélio vascular a aumentar sua expressão de ligantes para moléculas de adesão nas células sanguíneas, induzindo, desta forma, dano tecidual, infarto de órgãos adjacentes e reação inflamatória que predis põem e prolongam a CVO (CHARACHE *et al.*, 1996; OKPALA, 2004; SOUZA, 2007; MIGUEL, 2010; ALMEIDA, 2011). Os neutrófilos possuem uma meia vida que pode variar de 6 a 12 horas na circulação, porém, esse tempo para a apoptose pode ser prolongado por alguns agentes ou processos e estender esse tempo a alguns dias. Fatores como: citocinas pró-inflamatórias, hipóxia, adesão celular, transmigração e lipossacarídeos de bactérias podem promover a interrupção da apoptose e levar a um aumento do número de neutrófilos contribuindo, por consequência, com a propagação do estado inflamatório e o processo vaso-oclusivo (MOULDING *et al.*, 1998; CROSS *et al.*, 2005; CONRAN *et al.*, 2007a). O TNF- α é a única citocina que apresenta tanto uma atividade pró quanto anti-apoptótica, dependendo dos meios extra e intracelular. A sobrevivência celular é geralmente induzida por baixas doses de TNF-

α , enquanto que, o efeito pró-apoptótico é observado em altas doses da citocina (LUO; LOISON, 2007).

Embora os metabólitos de oxigênio gerados pelos neutrófilos sejam necessários para o mecanismo de defesa antimicrobiano na AF, as EROs produzidas podem lesar o neutrófilo e os tecidos ao seu redor (WEISS; LOBUGLIO, 1982; CLASTER *et al.*, 1984; NUR *et al.*, 2011; NUR *et al.*, 2012), induzir a peroxidação de lipídios na membrana das hemácias, que diminui sua capacidade de deformabilidade fazendo com que sejam removidos da circulação precocemente, bem como, podem ainda modificar a estrutura antigênica das mesmas, o que permite a ligação de imunoglobulinas resultando em lise celular (WEISS; KLAUSNER, 1988).

O aumento de ERO na AF pode ser consequência de vários mecanismos, tais como o aumento da atividade das enzimas NADPH-oxidase e xantina-oxidase endotelial devido à leucocitose e ativação endotelial, pelos repetidos ciclos de falcização das células vermelhas, processos de isquemia na microcirculação, auto-oxidação da hemoglobina polimerizada e aumento da função da enzima NOS (*nitric oxide synthase*) (AMER *et al.*, 2006; ASLAN; FREEMAN, 2007; NUR *et al.*, 2011; NUR *et al.*, 2012). Há evidências de que, nos neutrófilos, a produção de radicais livres citotóxicos pode ser elevada pela produção de NO através da enzima NOS, o que acarretaria em um aumento da apoptose neutrofílica (LUO; LOISON, 2007; OZDOGU *et al.*, 2007).

Na AF, o estresse oxidativo está envolvido em vários mecanismos fisiopatológicos, como hemólise acelerada, dano endotelial, redução da biodisponibilidade de NO, formação de peroxinitrito, aumento das propriedades adesivas das células sanguíneas, ativação da arginase e hipercoagulabilidade, potencialmente contribuindo para a vaso-oclusão relacionada à doença e subsequentes danos em órgãos (NUR *et al.*, 2011; NUR *et al.*, 2012).

2.4 Estratégias terapêuticas

A anemia falciforme é uma doença genética, que levou ao surgimento do conceito de *doença molecular*, caracterizada pelo alto índice de morbimortalidade, considerada como a mais grave dentre as doenças falciformes. Conforme já referido, a AF foi descrita pela primeira vez há aproximadamente um século, e, apesar de avanços notáveis terem sido realizados na compreensão da base da complexa fisiopatologia da doença, na qual estão

envolvidos, principalmente, a falcização de hemácias, hemólise, vaso-oclusão e uma deficiente defesa contra infecções recorrentes, provalvemente devido a uma hipofunção esplênica e redução na capacidade microbicida dos leucócitos (PEARSON, 1989; ANYAEGBU *et al.*, 1998; OKPALA, 2005; WARE; AYGUN, 2009), ainda nenhum medicamento específico foi desenvolvido para o seu tratamento, para o qual são utilizados medicamentos apenas para aliviar os sintomas da doença e/ou para tentar evitar complicações mais graves (NASCIMENTO-JR; MELO, 2012).

Em 1973, a expectativa de vida de um paciente com AF era de 14 anos. Avanços no manejo da doença mudaram radicalmente a perspectiva destes pacientes, aumentando a expectativa de vida dos mesmos para uma média de 50 anos, graças, sobretudo, ao desenvolvimento de modelos de atenção integral, hospitais-dia e aos esforços das ciências básicas e pesquisas clínicas (CLASTER; VICHINSKY, 2003).

Intervenções terapêuticas diversas têm sido aplicadas com um resultado animador traduzido pela melhoria na qualidade de vida destes pacientes, onde o diagnóstico precoce, promovido nos programas de triagem neonatal estabelecidos em alguns países, inclusive no Brasil, propicia o atendimento e utilização de medidas educacionais e preventivas como a utilização de antibióticos profiláticos durante a infância, vacinação precoce contra pneumococos e hepatites virais e a utilização de determinados medicamentos, tais como o ácido fólico, analgésicos ou anti-inflamatórios que auxiliam no bem-estar do paciente, promoção e recuperação da saúde (QUINN; ROGERS; BUCHANAN, 2004; BRASIL, 2008; STEINBERG, 2008).

O acompanhamento e tratamento das diversas alterações específicas relacionadas aos danos crônicos de órgãos ou resultantes de eventos agudos se fazem necessário, muitas vezes, pela intervenção e monitoramento cauteloso de profissionais das mais diversas áreas (hematologia, cirurgia, pneumologia, cardiologia, endocrinologia, nefrologia, neurologia, odontologia, etc.), utilizando-se ainda, em muitas intercorrências clínicas de emergência, de transfusões sanguíneas e procedimentos hemoterápicos mais complexos, como a sangria terapêutica e a exsanguineotransfusão (BRASIL, 2008). O único tratamento curativo atualmente conhecido é o transplante de medula óssea (TMO), porém sua aplicação é restrita por ser considerada de alto risco ao paciente e devido à necessidade de doador compatível e a alta taxa de complicações com significativo nível de mortalidade (FERSTER *et al.*, 2001; BUCHANAN *et al.*, 2004; SCHNOG *et al.*, 2004).

De acordo com Almeida (2011), as estratégias terapêuticas utilizadas e desenvolvidas para o tratamento da AF são baseadas em três pontos fundamentais: o primeiro seria diminuir a concentração intracelular de HbS com agentes que ativem a síntese de HbF ou agentes que impeçam a falcização da hemácia; o segundo seria diminuir os eventos de adesão celular e, conseqüentemente, a vaso-oclusão; e o terceiro ponto seria reduzir o processo inflamatório e o estresse oxidativo.

2.4.1 Hidroxiuréia

Até o momento presente, a hidroxiuréia (HU) constitui o avanço mais importante no tratamento de pacientes com AF (VARGAS, 2009), sendo considerada a mais promissora dentre as novas terapias disponíveis e o único medicamento que, efetivamente, tem forte impacto na melhora da qualidade de vida dos mesmos, reduzindo o número de CVOs e necessidade de transfusão, número de hospitalizações, tempo de internação, ocorrência de STA e, possivelmente, de eventos neurológicos agudos, além de demonstrar, de maneira contundente, redução do número de óbitos decorrentes desta doença quando comparado ao mesmo número em grupo de pacientes sem o uso do medicamento (CHARACHE *et al.*, 1996; LOUREIRO; ROZENFELD, 2005; CANÇADO *et al.*, 2009; VARGAS, 2009; PALLIS, 2011).

A HU é um agente quimioterápico sintetizado, pela primeira vez, em 1869, na Alemanha, por Dresler e Stein (DRESLER; STEIN, 1869). Somente um século depois, mais especificamente em 1967, este medicamento foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) norte-americano para o tratamento de doenças neoplásicas, e, nos anos subsequentes, para o tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica, psoríase, doenças reumáticas e policitemia vera, dentre outras. Na década de 80, passou a fazer parte do arsenal terapêutico para pacientes com AF, sendo introduzida nos protocolos de tratamento para esta doença, aqui no Brasil, a partir de 2002, mediante portaria de nº 872 do Ministério da Saúde, tornando-se, nos anos seguintes, o primeiro medicamento que comprovadamente previne complicações clínicas, melhora a expectativa de vida e aumenta a sobrevivência de pacientes (STEVENS, 1999; BRASIL, 2002; STEINBERG *et al.*, 2003; BALLAS *et al.*, 2006; WARE; AYGUN, 2009).

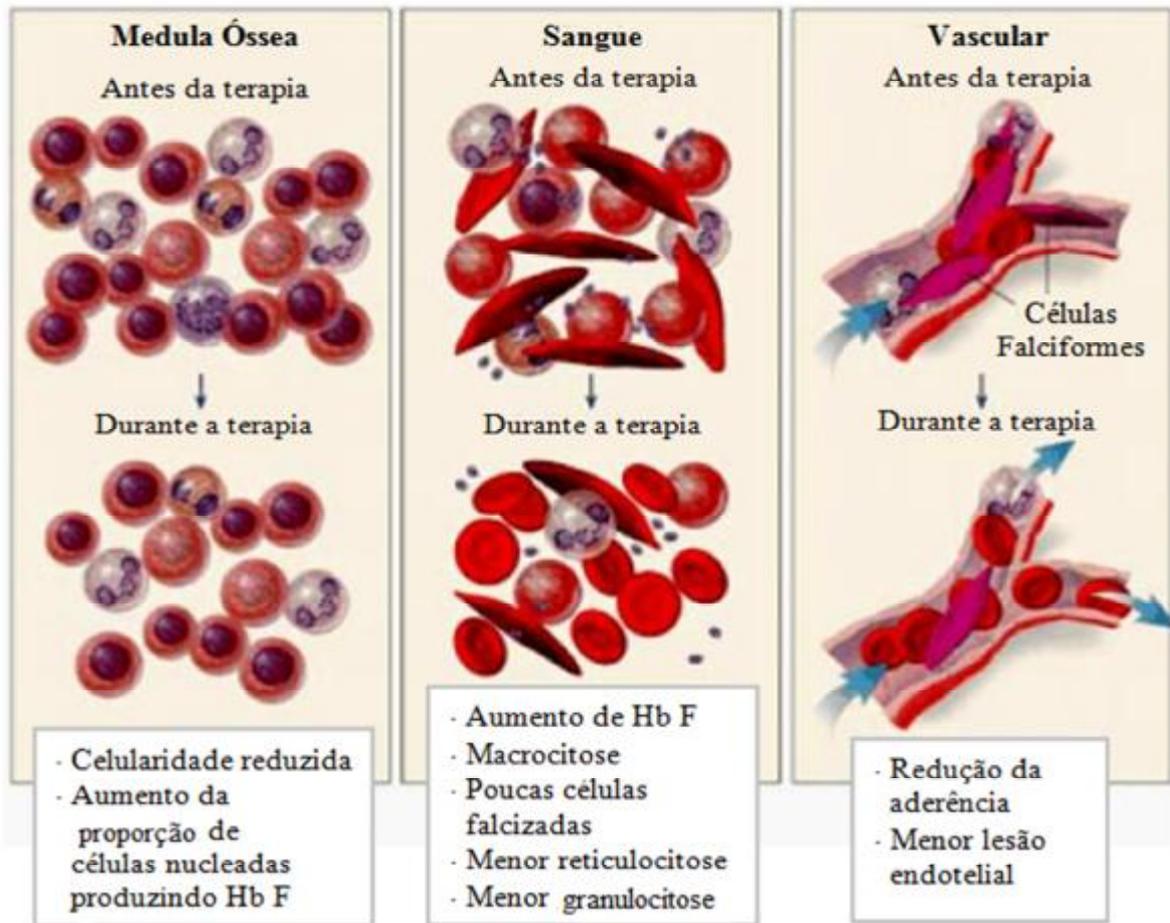
A constatação de que valores aumentados de HbF previnem várias complicações da AF fez com que a HU despertasse o interesse de muitos pesquisadores, visto que, mesmo

sem o seu mecanismo de ação esteja totalmente elucidado, este medicamento possui a habilidade de aumentar a síntese intraeritrocitária de HbF, que é um importante preditor de gravidade clínica e fator de proteção contra fenômenos de falcização, em virtude de possuir maior afinidade pelo oxigênio e inibir a polimerização de HbS, reduzindo dessa maneira as crises dolorosas e hemolíticas em alguns pacientes (SALEH *et al.*, 1999; CANÇADO *et al.*, 2009; SILVA; GONÇALVES; MARTINS, 2009; PELIZARO *et al.*, 2012). A elevação dos níveis de HbF pela HU deve-se ao fato deste medicamento promover o bloqueio da síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) pela inibição da ribonucleotídeo redutase, mantendo as células em fase S do ciclo celular (CHARACHE *et al.*, 1995; SALEH *et al.*, 1998; STEINBERG, 2008; CANÇADO *et al.*, 2009; PALLIS, 2011; BRANDOW; PANEPINTO, 2011).

Embora este medicamento seja utilizado devido à sua capacidade de induzir a síntese de HbF, há casos em que os pacientes em tratamento apresentam melhora clínica antes de apresentarem aumento significativo dos níveis desta hemoglobina, sugerindo que a indução de HbF, isoladamente, não pode explicar o efeito benéfico do tratamento e que outras ações do medicamento, e em linhagens celulares diferentes, possam estar envolvidas (CANÇADO *et al.*, 2009; WARE; AYGUN, 2009).

Evidências observadas em pacientes durante uso do medicamento, em particular efeitos no aumento da concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio (VCM) (CANÇADO *et al.*, 2009; WARE; AYGUN, 2009), na redução da contagem de reticulócitos e plaquetas, redução do número dos neutrófilos e outros granulócitos (participantes diretos dos fenômenos inflamatórios da doença), bem como sobre a hidratação eritrocitária e redução da hemólise, desempenham um papel importante no resultado terapêutico final (Figura 8) (OKPALA, 2005; CANÇADO *et al.*, 2009; LANARO *et al.*, 2009; WARE; AYGUN, 2009). Segundo Charache (1997) e Benkerrou *et al.* (2002), o decréscimo da contagem de neutrófilos no sangue periférico é o parâmetro biológico mais fortemente relacionado com o efeito benéfico da HU, sugerindo que os neutrófilos possam ser um alvo preferencial do medicamento.

Figura 8. Mecanismo de ação da hidroxiuréia na anemia falciforme.



Fonte: STEINBERG, 1999

A hidroxiuréia pode reduzir a celularidade da medula óssea e aumentar o número de eritroblastos que produzem HbF. Maiores concentrações de HbF reduzem a polimerização da HbS e o número de eritrócitos deformados, os quais sobrevivem por mais tempo, podendo atenuar a hemólise e reduzir o número de reticulócitos. O número de granulócitos, monócitos e plaquetas na circulação também é reduzido, bem como a interação com o endotélio vascular. Tais eventos podem induzir a uma redução das CVOs e danos orgânicos.

Outra resposta favorável deste medicamento tem sido a diminuição da expressão de moléculas de adesão da superfície de hemácias, plaquetas e leucócitos, bem como a redução das proteínas receptoras localizadas em células endoteliais, com consequente redução da adesão das células sanguíneas ao endotélio e da formação de oclusões vasculares, além de sua participação na diminuição e regulação da produção de citocinas, mediadores inflamatórios e oxidantes e no aumento da síntese e biodisponibilidade de NO pela ativação da guanilil ciclase (CHARACHE *et al.*, 1996; RODRIGUEZ *et al.*, 1998; SALEH *et al.*, 1998; HALSEY; ROBERTS, 2003; KING, 2004; CANÇADO *et al.*, 2009; CORDERO, 2009; LANARO *et al.*, 2009; MIGUEL, 2010). Em estudo recente, foi demonstrado que, em pacientes que fazem uso de HU, a adesão de neutrófilos à fibronectina e ao ICAM-1 é

significativamente diminuída quando comparada a pacientes sem uso de HU, apresentando níveis de adesão semelhantes aos de neutrófilos de indivíduos saudáveis (CANALLI *et al.*, 2008).

A HU possui o benefício de ser administrada por via oral (cápsulas de 500 mg) e rapidamente absorvida atingindo nível plasmático máximo entre 20-30 minutos (respondedores rápidos) e 60 minutos (respondedores lentos) após sua administração, apresentando meia-vida plasmática de três a quatro horas, sendo metabolizada no fígado e excretada por via renal (80%). A dose recomendada varia de 15-30mg/Kg/dia, não devendo exceder a dose máxima tolerada (DMT) estimada em 35mg/Kg/dia, que é a maior dose capaz de promover melhora, o mais proeminente possível, do curso clínico da doença, sem a ocorrência de toxicidade hematológica, hepática, renal ou gastrointestinal (BRAWLEY *et al.*, 2008; LANZKRON *et al.*, 2008; STROUSE *et al.*, 2008).

O tratamento deve ser de, pelo menos, dois anos e mantido por tempo indeterminado de acordo com a resposta laboratorial e evolução clínica do paciente, exceto no período gestacional e puerperal, porém, é importante lembrar que cerca de 25% dos pacientes não apresentam melhora com HU e, portanto, nestes casos o tratamento deve ser descontinuado (CANÇADO *et al.*, 2009), e que, uma monitoração laboratorial (hemograma completo, contagem de reticulócitos e plaquetas, sorologias: hepatites B e C e HIV, dosagens de transaminases hepáticas, uréia, creatinina, LDH, etc.) deve ser realizada antes de iniciar o tratamento e durante o mesmo, a fim de obter a DMT individual e avaliar a resposta do quadro clínico do paciente ao medicamento (BRAWLEY *et al.*, 2008; CANÇADO *et al.*, 2009).

Entretanto, apesar de seu uso ser considerado o marco no tratamento da AF, a HU parece estar envolvida com possíveis efeitos adversos, destacando-se, dentre eles, atividade citotóxica e carcinogênica (LANARO *et al.*, 2009), sugerindo uma cuidadosa avaliação da relação entre riscos e benefícios ao seu uso.

Segundo Cançado *et al.* (2009), dentre os possíveis efeitos adversos relacionados à administração da HU, destacam-se (Quadro 2):

Quadro 2- Efeitos adversos relacionados à administração da hidroxiuréia

EFEITOS ADVERSOS	CARACTERÍSTICAS
Neurológicos	letargia, cefaleia, tonturas, desorientação e alucinações (raras)
Gastrointestinais	estomatite, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e constipação
Dermatológicos	erupção máculo-papular, eritema facial e periférico, alopecia, hiperpigmentação da pele e das unhas, pele seca, ulceração da pele ou agravamento de úlcera já existente
Renais	elevação dos níveis séricos de uréia e creatinina
Hepáticos	elevação das aminotransferases (ALT, AST)
Reprodutivos	oligospermia, azoospermia
Mielotoxicidade	pancitopenia
Efeito teratogênico	(confirmado apenas em animais)
Hiperesplenismo	(em crianças)
Outros	edema, febre, calafrios, mal-estar, astenia.

Fonte: Adaptado de CANÇADO *et al.* (2009)

No entanto, há relatos conflitantes sobre seu potencial de causar danos ao DNA de indivíduos expostos. Lanzkron *et al.* (2008), em uma revisão sistemática sobre o uso da HU no tratamento de pacientes adultos com doença falciforme, analisaram 49 estudos randomizados com pacientes em uso do medicamento e de placebo, referenciando tanto a eficácia e efetividade quanto a toxicidade do medicamento na doença falciforme, e encontraram alto grau de evidência quanto a eficácia e efetividade, especialmente no que diz respeito ao aumento no nível de HbF, redução nas crises dolorosas, transfusões sanguíneas e hospitalizações. Com base na análise de toxicidade, observaram uma baixa e limitada evidência, sugerindo que não há suporte suficiente para declarar que o tratamento de pacientes com AF possa estar relacionado com a causalidade de aparecimento de câncer secundário, defeito na espermatogênese, leucemias ou outras anormalidades citogenéticas (LANZKRON *et al.*, 2008).

Apesar dos prováveis efeitos adversos já referidos, a HU é considerada um medicamento seguro, de fácil controle, apresentando efeitos adversos e mielossupressores facilmente detectáveis e reversíveis após a suspensão do uso da mesma. Sendo assim, vários pesquisadores têm se manifestado a favor do uso deste medicamento, salientando que os riscos relacionados às complicações secundárias à AF são muito mais elevados e graves que

os riscos relacionados aos efeitos adversos da HU (DAVES; GILMORE, 2003; STEINBERG *et al.*, 2003; BALLAS *et al.*, 2006; LANZKRON *et al.*, 2008; CANÇADO *et al.*, 2009).

Contudo, o item segurança do uso de HU, em longo prazo, permanece como questão importante, sobretudo quanto à genotoxicidade, lesão celular e impacto na função de diferentes órgãos (baço, rins, cérebro, pulmões). Desta forma, a realização de novos estudos clínicos é fundamental e permitirá maior aceitação e adesão ao uso da HU pelos pacientes e comunidade médica (BRAWLEY *et al.*, 2008; LANZKRON *et al.*, 2008; STROUSE *et al.*, 2008; CANÇADO *et al.*, 2009).

Conforme já exposto, a variabilidade das manifestações clínicas nos pacientes acometidos por esta doença se dá nas diversas fases da vida, e as razões para essa heterogeneidade ainda não são completamente entendidas, fazendo com que os pacientes se encontrem num risco permanente e elevado de desenvolver complicações clínicas que variam de formas quase assintomáticas até clinicamente graves, com ocorrência de falência de órgãos vitais, como coração, rins e pulmões; sendo responsáveis por alta mortalidade na infância ou fase juvenil, num período muito curto de tempo, especialmente devido aos repetidos episódios vaso-oclusivos e deficiência imunológica (NAOUM, 2000; BANDEIRA *et al.*, 2004), com participação direta dos neutrófilos em ambos os processos, sendo potenciais indutores de formação de EROs, estresse oxidativo, obstrução vascular e processos inflamatórios.

Salientando a carência de dados na literatura referentes ao envolvimento e comportamento dos leucócitos na fisiopatologia da anemia falciforme, este presente estudo pretende investigar as implicações e manifestações desta doença sobre o prisma das células brancas do sangue, notadamente os neutrófilos, mensurando marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, bem como essas células podem exercer ação moduladora sobre a doença. Cumpre ressaltar que a maioria dos estudos a cerca da anemia falciforme toma como objeto de interesse as hemácias e substâncias por elas liberadas, porém os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes presentes nas crises falcêmicas, considerados também como células iniciadoras e propagadoras de tais manifestações (ALMEIDA, 2011; NUR *et al.*, 2011), fazendo-se, então, útil e de extrema pertinência, uma pesquisa sobre o comportamento e modulação dos neutrófilos no desenvolvimento das complicações da doença, e para averiguar se o principal medicamento utilizado em seu tratamento, a hidroxiuréia, exerce algum efeito citotóxico sobre estas células e como influencia esta modulação e os níveis de marcadores, contribuindo, dessa forma, para ampliar os conhecimentos sobre a doença em nossa população e para uma maior compreensão da sua evolução, adicionando informações

profícuas ao acompanhamento clínico desses pacientes e às estratégias terapêuticas empreendidas.

A anemia falciforme é uma doença crônica, incurável, embora tratável, e que geralmente traz alto grau de sofrimento aos seus portadores, os quais merecem atenção especial do ponto de vista médico, genético e psicossocial. Daí sua importância e a urgência de mais estudos acerca desta temática, uma vez que só a partir de uma melhor elucidação dos mecanismos envolvidos nas manifestações clínicas apresentadas por esta doença é que se podem gerar maiores alternativas de tratamento, um melhor prognóstico e uma qualidade de vida mais digna e tranquila para estes pacientes e familiares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Ø Investigar marcadores de citotoxicidade, de inflamação e de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme, bem como a influência do tratamento com hidroxiuréia nesses parâmetros.

3.2 Objetivos específicos

- Ø Analisar, de maneira associada, o perfil e características hematológicas de pacientes com anemia falciforme, tratados com hidroxiuréia e não tratados.
- Ø Investigar o efeito do tratamento com hidroxiuréia sobre marcadores de toxicidade em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme, através do teste de exclusão por Azul de Tripán, LDH e pelo teste do metil tiazol tetrazólio (MTT).
- Ø Averiguar o efeito do tratamento com hidroxiuréia sobre marcadores inflamatórios em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme, pela mensuração dos níveis da enzima MPO e das citocinas TNF- α e IL-10.
- Ø Investigar o efeito do tratamento com hidroxiuréia sobre marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme, mensurando os níveis das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px e do malonaldeído (MDA).
- Ø Analisar a influência da dose de hidroxiuréia sobre o efeito em marcadores de toxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

A presente pesquisa enquadra-se na tipologia de estudo observacional, transversal e analítico, e avaliou, comparativamente, o comportamento de neutrófilos, e substâncias por eles produzidas, de pacientes com anemia falciforme em relação a um grupo de indivíduos saudáveis, bem como a influência da hidroxiuréia sobre os mesmos parâmetros.

4.2 Local de realização do estudo

A coleta das amostras de sangue periférico dos pacientes falciformes que concordaram em participar do estudo foi realizada no ambulatório de um hospital universitário de referência da cidade de Fortaleza-CE, no período de julho de 2011 a dezembro de 2012, enquanto que, a coleta de sangue dos voluntários saudáveis foi feita em um hemocentro da cidade de Fortaleza-CE.

Os experimentos e análises foram realizados com a colaboração do Laboratório de Toxicologia e Farmacologia Celular e Laboratório de Hemoglobinopatias e Doenças Genéticas Hematológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.3 Seleção da amostra

4.3.1 População do estudo

A “população alvo” para a realização deste estudo, aproximadamente 160 pacientes, foi constituída pela totalidade de portadores de AF cadastrados e atendidos pelos ambulatórios do setor de hematologia do hospital universitário e do hemocentro participantes da pesquisa. Deste universo, foram incluídos no estudo apenas os pacientes que consentiram, voluntariamente, em participar da pesquisa, que leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A) e atenderam aos critérios de inclusão, totalizando

um número de 101 (63,1%) pacientes, dos quais, 15 foram provenientes do hemocentro e 86, do hospital mencionados.

Os pacientes falciformes (n= 101) foram estratificados em dois grupos, segundo o uso ou não da HU:

- **Grupo SS:** formado por 47 (46,5%) pacientes com AF, sem uso de HU.

- **Grupo SSHU:** formado por 54 (53,5%) pacientes com AF em tratamento com a HU.

Para algumas análises, o grupo SSHU fora ainda estratificado conforme a posologia do medicamento para se investigar a relação dose-efeito: **SSHU-0,5g** (n= 19); **SSHU-1g** (n= 26) e **SSHU-1-2g** (n= 9). A determinação da dose de medicamento em cada subgrupo foi estabelecida baseando-se nas doses habituais tomadas pelos pacientes, que fazem uso de uma a quatro cápsulas diárias de HU (ou pela média da concentração quando a posologia requer quantidades diferentes em dias alternados), sendo a concentração de substância/cápsula igual a 500 mg (0,5g).

O grupo controle (**Grupo AA**), formado por indivíduos saudáveis, foi composto por 50 voluntários, selecionados, aleatoriamente, dentre os doadores de sangue do hemocentro participante, desde que obedecidos os critérios de inclusão, próprios para este grupo, e definidos como a seguir.

4.3.2 Critérios de inclusão e exclusão dos pacientes em estudo e grupo controle

Todos os participantes recrutados para o estudo foram esclarecidos em uma entrevista a respeito dos procedimentos experimentais, objetivos, riscos e benefícios envolvidos na pesquisa, concordaram e assinaram o TCLE e foram selecionados segundo alguns critérios:

- **PACIENTES**

Os pacientes (grupos SS e SSHU), de ambos os sexos, deveriam apresentar anemia falciforme, diagnosticada previamente por exame molecular, possuir idade igual ou superior a 18 anos, estar em estado estacionário da doença, de acordo com os critérios de Ballas (2012): ausência de episódios dolorosos agudos e/ou doenças intercorrentes, como infecções e inflamações, nas quatro semanas precedentes ao estudo; ausência de admissões hospitalares até o terceiro dia após coleta de sangue, bem como, apresentar ausência de transfusão sanguínea nos quatro meses precedentes ao estudo. Para o grupo SSHU, o tratamento com

hidroxiuréia consistiu na administração de uma dosagem de 15-30 mg/kg/dia, variando de 0,5g a 2g diárias, por pelo menos 3 meses.

Foram tomados como critérios de exclusão a não concordância e assinatura do TCLE, pacientes que não apresentaram análises de hemoglobinas confirmatórias do perfil SS por HPLC ou em cujos prontuários não dispunham de informações consistentes quanto ao seu diagnóstico, tratamento ou acompanhamento clínico, pacientes obesos, tabagistas, etilistas, gestantes ou com sobrecarga de ferro, presença de sorologia positiva para HIV-1 e 2, HBV, HCV ou HTLV-1 e 2, que fizeram uso de anti-inflamatórios, quelante de ferro, vitaminas antioxidantes ou algum imunossupressor nos últimos 15 (quinze) dias.

- GRUPO CONTROLE

Neste grupo, foram incluídos indivíduos adultos, doadores de sangue no hemocentro que fez parte do estudo, aparentemente saudáveis, de ambos os sexos, com idades e características pareadas aos grupos de pacientes, não obesos, não fumantes, que não faziam consumo habitual de bebida alcóolica ou fármacos, que apresentaram parâmetros hematológicos dentro dos valores referenciais, sem evidências de processo infeccioso e/ou inflamatório há pelo menos três meses e sem alteração do perfil eletroforético de hemoglobina (AA).

Foram excluídos os indivíduos que não concordaram em participar do estudo ou não assinaram o TCLE.

4.4 Aspectos éticos

O trabalho de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (COMEPE) da Universidade Federal do Ceará, e aprovado sob protocolo de nº 101/12, segundo os princípios e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares.

Todos os experimentos foram realizados seguindo as normas de Biossegurança de acordo com a Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005, regulamentada pelo decreto nº 5.591 de 22 de novembro de 2005.

4.5 Coleta de dados

4.5.1 Informações clínicas, hematológicas e demográficas

Os dados clínicos, hematológicos e demográficos necessários para este estudo foram coletados a partir de entrevista com os pacientes e de busca nos prontuários médicos dos mesmos, sendo tais informações transferidas para a Ficha Clínica de Pacientes (ANEXO B), e mantidas em sigilo de pesquisa.

4.5.2 Coleta das amostras de sangue

Foram coletados 20 mL de sangue periférico por punção venosa de cada participante deste estudo, e imediatamente acondicionados em tubo Falcon contendo igual volume de anticoagulante (Alsever), homogeneizando em seguida o sangue e reservando-o em caixa térmica com gelo até a sua manipulação.

A coleta do sangue dos pacientes foi realizada mediante a presença dos mesmos no ambulatório do hospital para consulta/acompanhamento médico e exames laboratoriais de rotina, enquanto a coleta do sangue dos indivíduos saudáveis foi realizada no hemocentro em virtude da presença destes para a doação voluntária de sangue.

4.6 Análise das amostras

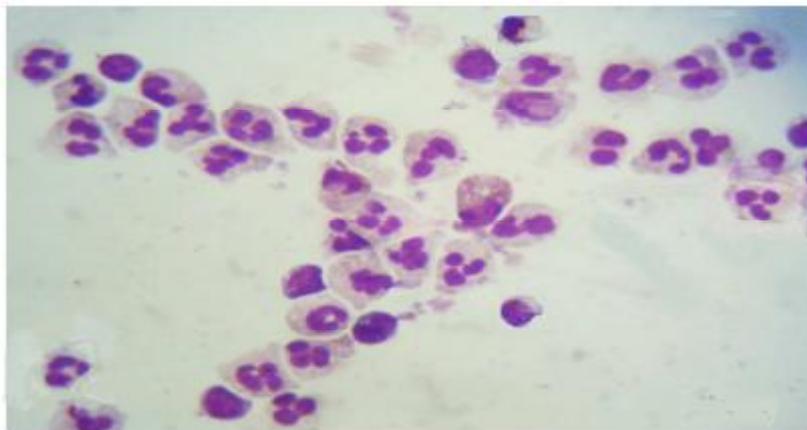
4.6.1 Isolamento de neutrófilos

A obtenção do isolado de neutrófilos realizou-se segundo técnica descrita por Henson (1971) e modificada por Lucisano e Mantovani (1984). O sangue foi centrifugado, o plasma desprezado e a camada de células foi lavada diversas vezes com solução salina (0,9% p/v). Uma solução de gelatina 2,5% (p/v) foi adicionada para formar um gradiente de separação entre neutrófilos e demais componentes sanguíneos. As hemácias contaminantes foram lisadas pela adição de uma solução lisante de NH_4Cl 0,83% (com pH 7,2 a 37°C) e após ser lavado com salina, o *pellet*, formado, predominantemente, de neutrófilos, foi ressuspenso com solução de Hank's gel (gelatina a 0,1%).

Após o isolamento, foi quantificado o número de neutrófilos obtidos por meio de diluição 1/10 em solução de Turk e contados em câmara de Neubauer, seguido de ajustes de população de células pela adição de Hank's gel, conforme testes a serem realizados. Simultaneamente, lâminas de esfregaços foram confeccionadas para se determinar a porcentagem de neutrófilos presentes na suspensão, sendo coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa e visualizadas em microscopia óptica comum de imersão (aumento de 400x) (Figura 9). Esta metodologia de isolamento de neutrófilos proporcionou a preparação de suspensões celulares contendo de 85-93% de neutrófilos, utilizadas nos testes de toxicidade ou cujos sobrenadantes foram aliqüotados e conservados em freezer -80° até sua utilização.

Todos os ensaios desta pesquisa foram realizados a partir de neutrófilos em estado basal, buscando conservar, ao máximo, as mesmas características que *in vivo* no momento da coleta do material, sem indução de qualquer característica clínica da doença de forma artificial.

Figura 9. Distensão da suspensão celular após isolamento por solução de gelatina a 2,5% em salina.



Fonte: própria.

Predomínio dos leucócitos neutrófilos segmentados. Coloração de May-Grünwald-Giemsa. Aumento 400X.

4.6.2 Ensaios de toxicidade

A avaliação da citotoxicidade da hidroxiuréia em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme foi realizada através de alguns modelos experimentais visando investigar possíveis efeitos tóxicos deste medicamento sobre a membrana plasmática, metabolismo e morte celular.

4.6.2.1 Teste de exclusão por Azul de Tripán

O Azul de Tripán é um corante ácido incorporado apenas por células não viáveis, devido a lesões na membrana plasmática; sua absorção é indicativa de dano irreversível da membrana, precedendo a morte celular (MINERVINI; FORNELLI; FLYNN, 2004).

A viabilidade celular foi determinada, de forma preliminar, pelos ensaios de exclusão por Azul de Tripán a 0,1%, onde, 100µL da suspensão celular (5×10^6 células/mL) foram adicionados a um *ependorf* contendo igual volume de uma solução do corante e, após 10 minutos em repouso, os neutrófilos foram contados em uma câmara de Neubauer e avaliados quanto à sua viabilidade, sendo estimada pela contagem de 200 células em microscopia óptica comum (RENZI *et al.*, 1993).

4.6.2.2 Atividade da LDH

A LDH é uma enzima citosólica, assim sua detecção no fluido extracelular é um indicativo de morte ou perda da integridade celular e, na avaliação da viabilidade celular, constitui um dos mais sensíveis métodos empregados como parâmetro de citotoxicidade (LOPES, 2010).

Neutrófilos de pacientes ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados por 15 minutos a 37°C na presença de solução de Hanks (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% -controle positivo). A seguir, os tubos de reação foram centrifugados a 755 g, por 10 minutos a 4° C, e os sobrenadantes transferidos para outros tubos e mantidos em banho de gelo para a determinação da atividade da enzima LDH, cuja localização está no citoplasma das células e é liberada quando ocorre alteração da permeabilidade da membrana celular. Esta enzima é responsável pela conversão de piruvato à lactato na presença de NADH. O ensaio foi realizado utilizando o Kit LDH (Liquiform) e baseia-se na medida do decréscimo da

absorbância em 340nm devido à oxidação do NADH, a qual é proporcional à atividade da LDH na amostra. Alíquotas de 250µL de substrato (reagente de trabalho) foram acrescidas de 25 µL da amostra de sobrenadante, foi homogeneizada a mistura e realizada a leitura da absorbância em 340nm nos tempos 1 e 3 minutos a 37°C, em espectrofotômetro. A atividade da enzima LDH foi calculada seguindo-se as especificações do fabricante da seguinte maneira:

$$A = [(A_1 - A_2) / 2] \times 1746,03$$

Onde:

A= atividade da enzima LDH na amostra em U/L;

A₁= absorbância inicial (1 minuto) em 340nm;

A₂= absorbância final (3 minutos) em 340nm;

1746,03= fator de cálculo estipulado pelo fabricante para volume de amostra de 25µL.

4.6.2.3 Teste do MTT

É um método colorimétrico para determinar a viabilidade celular e se baseia no fato do MTT, sal de coloração amarela, ser reduzido pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase, que forma parte da cadeia respiratória da mitocôndria, a um sal, Formazan, que possui cor púrpura. Assim a ausência da redução do MTT indica uma diminuição da atividade metabólica celular, ou seja, na viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Neutrófilos de pacientes (5×10^6 células/mL) foram incubados por 30 minutos a 37°C na presença de Hanks (células não tratadas) ou Triton X-100 (0,2% -controle citotóxico positivo) em placa de 96 poços e atmosfera de CO₂. Decorrido esse período, a placa foi centrifugada a 2000 rpm por 15 minutos a 25°C e o sobrenadante descartado. Foi adicionado uma nova solução (150 µL) contendo 10% de MTT, na concentração de 10 mg/mL, e estas células foram incubadas novamente por mais 3 horas, a 37°C. Por fim, a placa foi centrifugada novamente nas mesmas condições acima, o sobrenadante foi descartado e a placa permaneceu em estufa, por cerca de 48-72h, para secagem completa. Depois deste tempo, foi adicionado 150 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) puro para a lise das células e solubilização do formazan. Neste instante, as placas foram agitadas durante 15 minutos com o auxílio de um agitador de placas, e a absorbância aferida em leitor de microplacas a 595nm.

4.6.3 Ensaio de marcadores de inflamação

Mensuração de “enzimas inflamatórias”, como a MPO, e citocinas pró e anti-inflamatórias, tais como, TNF- α e IL-10, respectivamente, foram analisados para investigar a modulação e sinalização de rotas inflamatórias pelos neutrófilos de pacientes com AF, bem como o papel anti-inflamatório da HU nestes pacientes.

4.6.3.1 Atividade da MPO

A MPO é uma das principais enzimas liberadas pelos grânulos azurófilos dos neutrófilos, correspondendo a cerca de 5% do total das proteínas destas células e um pouco mais de 25% das proteínas granulares, fazendo dos neutrófilos a principal fonte de MPO, que pode ser encontrada também nos macrófagos e fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial, sêmen e outros), bem como no coração, rins, pele, fígado e placenta. A MPO tem sido considerada por longo tempo um constituinte chave do arsenal citotóxico neutrofílico, porém evidências recentes têm comprovado a contribuição desta hemoproteína para o dano tecidual durante inflamação, incluindo iniciação e propagação de complicações agudas em processos inflamatórios, com poderosas propriedades pró-inflamatórias, além das pró-oxidantes (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2008).

A suspensão de neutrófilos de pacientes falciformes ($5,0 \times 10^6$ células/mL) foi centrifugada e o sobrenadante utilizado para a realização do teste em placa de 96 poços. Aos 50 μ L do sobrenadante foi adicionado PBS (100 μ L), tampão fosfato (50 μ L) e H₂O₂ (0,012%) (20 μ L). Após incubar por 5 minutos a 37°C, foi acrescido 20 μ L de 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB 1,5 mM), sendo a reação interrompida, após 3min de incubação a 37°C pela adição de 30 μ L de acetato de sódio (1,5 M; pH 3,0). A 620 nm, a absorbância foi determinada e expressa como média \pm EPM (DE YOUNG *et al.*, 1989).

4.6.3.2 Determinação do TNF- α

O TNF- α é um dos principais mediadores de respostas imunes e inflamatórias agudas e contribui para o desenvolvimento de várias condições como doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes, podendo agravar as CVO e levar ao aparecimento de episódios infecciosos e inflamatórios na AF (SOUZA, 2007).

A determinação do TNF- α realizou-se por ensaio imunoenzimático utilizando kit de ELISA comercializado (eBioscience-USA: Human TNF alpha ELISA Ready-Set-Go!). O procedimento foi realizado conforme orientação do fabricante, e todas as amostras (sobrenadante de $5,0 \times 10^6$ células/mL) foram testadas no mesmo ensaio após descongelamento das amostras até a temperatura ambiente. A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa a 450 nm e os resultados convertidos a pg/mL por curva padrão.

4.6.3.3 Determinação da IL-10

A determinação da IL-10 foi possível pela utilização do kit de ELISA (eBioscience-USA), tomando 100 μ L do sobrenadante de uma população de $5,0 \times 10^6$ neutrófilos/mL, conforme especificações do fabricante do kit. Após leitura da placa a 450 nm, os resultados foram convertidos a pg/mL utilizando curva padrão.

4.6.4 Ensaios de marcadores de estresse oxidativo

Pacientes com AF são frequentemente expostos a um estresse oxidativo devido ao desequilíbrio entre a produção de EROs e agentes antioxidantes. Os métodos mais utilizados para aferição indireta das EROs e, conseqüentemente, das lesões oxidativas são os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a atividade enzimática e/ou a concentração de tripeptídeos e aldeídos (MDA). A proteção enzimática contra o estresse oxidativo baseia-se, quase que exclusivamente, na dismutação do ânion $O_2^{\cdot-}$, realizada pela enzima SOD, ou na decomposição do H_2O_2 , sendo a GSH-Px uma das principais enzimas antioxidantes envolvidas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Dentre as classes de moléculas que podem ser lesadas pelas EROs, os lipídeos são os mais suscetíveis à oxidação. A degradação dos lipídeos de membrana e os produtos finais da peroxidação lipídica, como o MDA e outros aldeídos, são especialmente danosos, reduzindo a viabilidade das células. A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo método do MDA (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

4.6.4.1 Superóxido dismutase

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD, a forma SOD-cobre-zinco, que está presente principalmente no citosol, e a SOD-manganês, localizada primariamente na mitocôndria. A função desta enzima é acelerar a dismutação da principal ERO, o radical tóxico $O_2^{\cdot-}$, em H_2O_2 e O_2 (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A medida da atividade da SOD nos neutrófilos de pacientes falciformes (sobrenadante de $5,0 \times 10^6$ células/mL) foi determinada utilizando o Kit RANSOD® (RANDOX BRASIL Ltda) e especificações do fabricante. Este método emprega 50 μ L da amostra diluída (1:1) e uma solução de xantina (1,7 mL) e xantina oxidase (250 μ L) para gerar radicais superóxido, os quais reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (INT) que forma o composto róseo de formazan. A atividade da superóxido dismutase foi medida através do grau de inibição dessa reação a 505nm.

4.6.4.2 Glutationa peroxidase

A GSH-Px catalisa a redução do H_2O_2 , e peróxidos orgânicos, para seus correspondentes álcoois à custa da conversão da GSH a GSSG (VASCONCELOS *et al.*, 2007), e foi determinada utilizando o Kit RANSEL – GLUTATIONA PEROXIDASE (RANDOX BRASIL Ltda), a partir de 50 μ L da amostra de pacientes (sobrenadante de $5,0 \times 10^6$ neutrófilos/mL). Neste método, a GSH-Px catalisa a oxidação da GSH pelo Hidroperóxido de Cumeno. Na presença da glutaciona redutase e NADPH a Glutationa oxidada é imediatamente convertida na forma reduzida como uma oxidação concomitante da NADPH a $NADP^+$. A oxidação de NADPH foi registrada espectrofotometricamente a 340 nm por 2 minutos, pelo decaimento da absorbância.

4.6.4.3 Malonaldeído

O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico. Nesta reação, duas moléculas do ácido reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo, cuja intensidade é aferida por espectrofotometria (DRAPER; HADLEY, 1990).

Na determinação do MDA, 125 μL do sobrenadante de uma suspensão de neutrófilos ($5,0 \times 10^6$ células/mL) de pacientes foram colocados em tubos de vidro e incubados em banho-maria a 37 °C por uma hora. A seguir, foram adicionados 200 μL de ácido perclórico a 35% para precipitar proteínas existentes, seguido de centrifugação a 1400 rpm por 20 minutos. Ao sobrenadante, foram acrescidos 100 μL de ácido tiobarbitúrico 1,2% e a mistura foi incubada a 95-100°C, por 30 minutos, em banho-maria. Após resfriada, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 560 nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 5.0 (USA) e do SPSS for Windows (*Statistic Package for Social Science* versão 19.0), conforme apropriado. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Utilizou-se o teste de Kolmogorov Smirnov para verificar a normalidade dos dados, e a comparação das médias entre os grupos foi feita pela análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Tukey (para dados com distribuição normal) e Teste Kruskal-Wallis, seguido do pós teste Dunn's Multiple Comparisons (para amostras com distribuição anormal). Foi considerado significativo $p < 0,05$ para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Características demográficas e hematológicas dos pacientes do estudo

O perfil demográfico e clínico-hematológico dos pacientes está representado na Tabela 1, onde podemos observar alterações significativas entre os grupos pelos efeitos benéficos do uso da hidroxiuréia.

Tabela 1: Características e detalhes clínicos dos controles e pacientes falciformes em estado estacionário com e sem terapia de hidroxiureia.

	AA (n=50)	SS (n= 47)	SSHU (n= 54)	p-valor*
Masculino/Feminino	28/22	22/25	27/34	---
Idade (anos)	34,6 (18; 30; 55)	32 (18; 29; 69)	32,17 (19; 31; 63)	---
Hemácias (x 10¹² /L)	4,5 (4,2; 4,4; 5,2)	2,66 (1,77; 2,58; 4,0)	2,61 (1,73; 2,57; 3,82)	0,724
Hemoglobina (g/dL)	13,5(12,2; 13,4; 15,2)	8,20 (5,57; 7,94; 11,53)	9,21 (5,5; 9,4; 12,4)	0,001
Hematócrito (%)	41 (37; 42; 49)	24,05 (16,9; 23,85; 32,9)	26,40 (17,6; 26,8; 34,3)	0,005
VCM (fL)	87 (79; 85,9; 92,1)	90,8 (74,4; 89,5; 107,6)	101,8 (79,7; 101,2;134,4)	<0,001
HCM (pg)	28,9(25,9; 28,5; 31,6)	30,9 (24,4; 30,4; 37,7)	35,5 (27,3; 36,2 ; 47,8)	<0,001
Leucócitos (x10⁹/L)	5,1 (4,2; 4,9; 8,4)	12,29 (5,55; 11,45; 22,10)	9,83 (3,20; 9,12; 19,70)	0,002
Neutrófilos (%)	47 (39; 43; 51)	59 (41; 54; 85)	49 (31; 47; 72)	0,048
Reticulócitos (x10³/μL)	ND	272,5 (110,9; 254,2; 597,8)	235,4 (110,5; 230,8; 433,3)	0,518
Plaquetas (x 10⁶/μL)	220 (148; 181; 312)	371 (154; 373; 798)	388,2 (385; 431; 880,4)	0,904
HbF (%)	ND	5,6 (0,6; 7,1; 13,8)	15,12 (1,9; 9,5; 38,7)	<0,001

AA, indivíduos saudáveis (controle); SS, pacientes falciformes em estado estacionário que não fazem uso de hidroxiuréia; SSHU, pacientes falciformes em estado estacionário em uso de hidroxiuréia (15-30mg/Kg/d, por pelo menos três meses); VCM, volume corpuscular médio; HCM, Hemoglobina corpuscular média; N/D, não determinado. Os valores apresentados (exceto M/F) representam as médias (mínimo, mediana, máximo).

(*) Foi realizado o teste Kruskal-Wallis para comparação das médias entre os grupos estudados.

5.2 Avaliação da toxicidade da hidroxiuréia em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme

5.2.1 Teste de exclusão por Azul de Tripán

Nos ensaios realizados, a suspensão celular foi avaliada quanto à sua viabilidade, obtendo $95,3 \pm 0,33$; $93,7 \pm 0,34$ e $95,0 \pm 0,42$ % de viabilidade para os grupos AA, SS e SSHU, respectivamente (**Tabela 2**), quando analisadas pelo teste de Azul de Tripán, evidenciando uma redução significativa no número de células viáveis apenas no grupo SS, quando comparadas com o grupo AA.

Tabela 2. Avaliação da toxicidade da hidroxiuréia em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme através da exclusão pelo corante Azul de Tripán.

Grupos	Número de células (%)	
	viáveis	não viáveis
AA (n= 50)	$95,3 \pm 0,33$	$4,7 \pm 0,33$
SS (n= 47)	$93,7 \pm 0,34$ *	$6,2 \pm 0,35$
SSHU (n= 54)	$95,0 \pm 0,42$	$5,0 \pm 0,42$

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram acrescidos ao Azul de Tripán 0,1% em solução salina (v/v), e a seguir foi realizada a contagem de células, até um total de 200 células em microscopia óptica, diferenciando-as em viáveis e não viáveis. AA: grupo de indivíduos saudáveis - controle; SS: pacientes falciformes; SSHU: pacientes falciformes em uso de HU. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., * vs controle ($p < 0,05$ – ANOVA e Teste de Tukey).

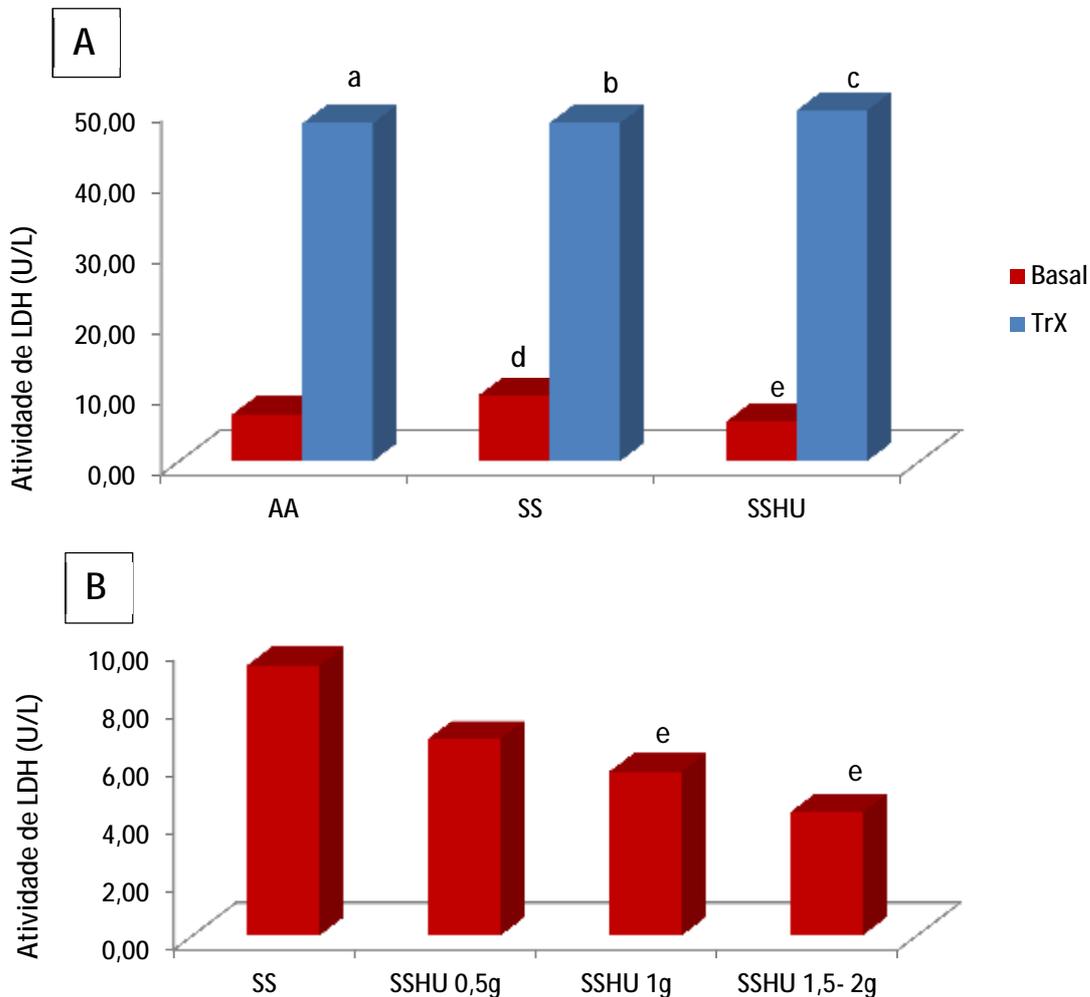
5.2.2 Avaliação da atividade de LDH

A Figura 10 (A e B) mostra os resultados obtidos na avaliação de toxicidade em neutrófilos de pacientes com AF, mensurada pela enzima LDH, onde foi observado que a AF promoveu um aumento significativo na atividade da LDH ($9,33 \pm 0,81$ U/L) em relação ao grupo de pacientes sadios ($6,62 \pm 0,72$ U/L), contudo, esse efeito foi revertido mediante o tratamento com HU ($5,59 \pm 0,37$ U/L).

A suspensão de neutrófilos dos grupos AA, SS e SSHU na presença do Triton X-100 (padrão citotóxico positivo) mostrou uma citotoxicidade expressiva, revelada pelo aumento significativo da atividade de LDH ($47,83 \pm 2,8$; $47,84 \pm 3,0$ e $49,59 \pm 3,2$ U/L, respectivamente), quando comparados aos neutrófilos não tratados com o Triton X.

A Figura 10 B mostra os valores médios de LDH de acordo com a dose de medicamento administrada, com médias de $6,93 \pm 0,54$; $5,66 \pm 0,61$ e $4,27 \pm 0,59$ U/L para os respectivos grupos SSHU-0,5g, SSHU-1g e SSHU-1,5-2g.

Figura 10. Avaliação da toxicidade da HU em neutrófilos de pacientes com AF, mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).



Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células/mL) foram incubados ou não com Triton X e após 10 minutos foi determinada a atividade de LDH. **(A)** Atividade de LDH por grupos de estudo, AA: grupo de indivíduos saudáveis (n=27); SS: pacientes falciformes (n=38); SSHU: pacientes falciformes em uso de HU (n=41). Basal: células não tratadas; Tr X: Triton X-100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico positivo. **(B)** Atividade de LDH por dose de HU (SSHU-0,5g, n=13; SSHU-1g, n=17; SSHU-1,5-2g, n=9). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. das análises realizadas em quadruplicata e em dias diferentes, onde **a** vs Basal AA; **b** vs Basal SS; **c** vs Basal SSHU; **d** vs Basal AA; **e** vs Basal SS ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5.2.3 Avaliação da viabilidade celular pelo MTT

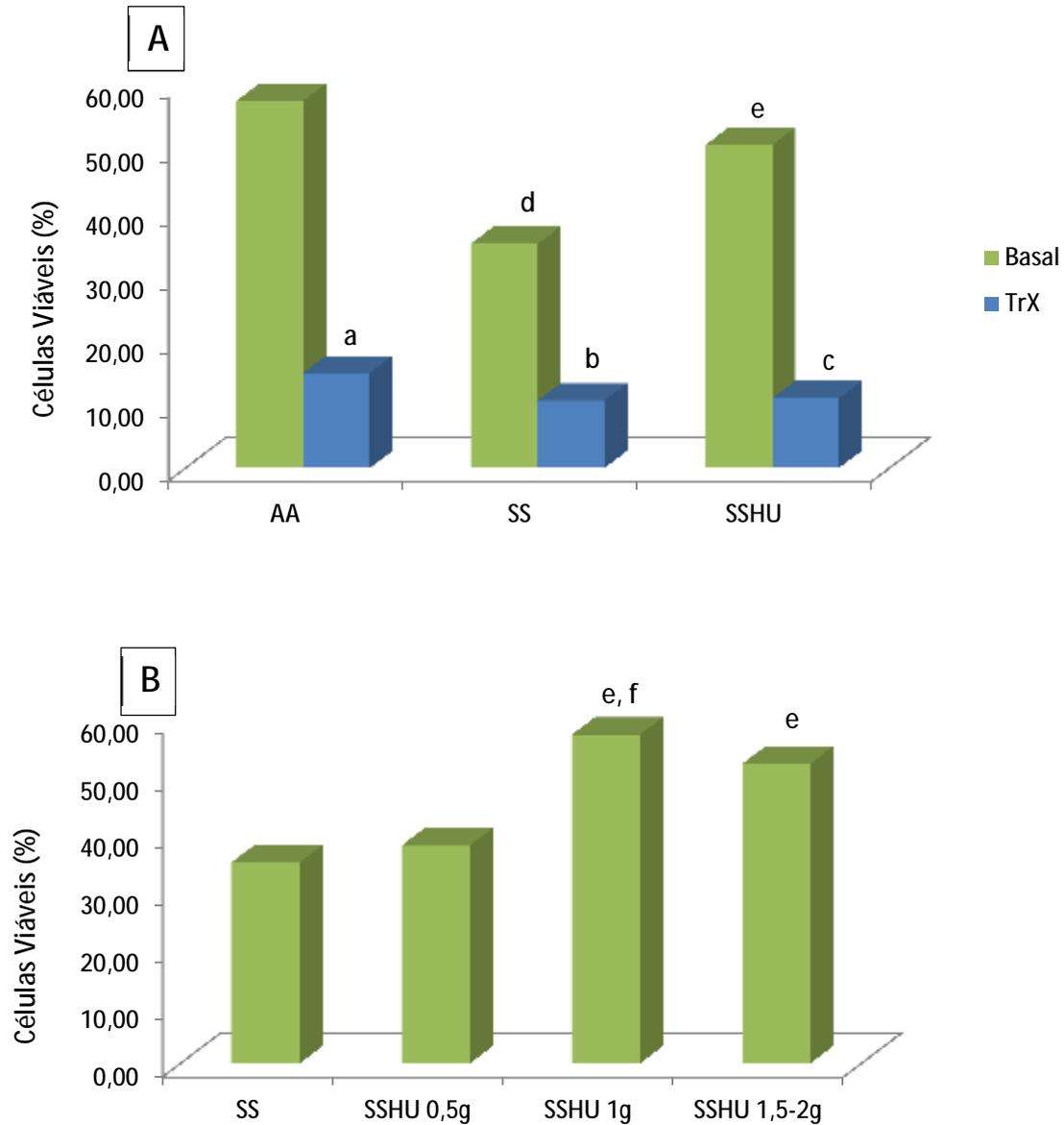
A viabilidade celular analisada pelo teste do MTT (Figura 11) demonstrou uma redução significativa de células viáveis no grupo SS ($35,14 \pm 2,32$ % de células viáveis) quando comparado ao grupo AA ($57,46 \pm 3,29$ % de células viáveis), porém foi evidenciado um aumento significativo de viabilidade celular no grupo SSHU ($50,59 \pm 03,64$ % de células viáveis) ao confrontarmos com o grupo sem terapia com HU.

Os valores médios dos controles citotóxicos positivos (Triton X) realizados para cada grupo de estudo foram de $14,88 \pm 1,6$ (AA); $10,46 \pm 0,9$ (SS) e $10,81 \pm 0,8$ (SSHU) % de células viáveis, demonstrando uma diferença estatisticamente significante em relação às células não tratadas com o padrão positivo.

A Figura 11B mostra os valores médios de MTT de acordo com a dose de medicamento administrada, com médias de $35,48 \pm 3,38$; $56,62 \pm 6,35$ e $50,98 \pm 3,32$ % de células viáveis para os respectivos grupos SSHU-0,5g, SSHU-1g e SSHU-1,5-2g.

Os resultados corroboram com os encontrados para o teste de toxicidade pela mensuração da atividade da enzima LDH apresentados anteriormente, mostrando que a HU foi capaz de promover uma citoproteção aos neutrófilos dos pacientes quando observados por esses modelos de ensaio.

Figura 11. Avaliação da toxicidade da HU em neutrófilos de pacientes com AF, mensurada através do teste de MTT.



Neutrófilos (5×10^6 células/mL) foram incubados com MTT e avaliados quanto à viabilidade celular. **(A)** Viabilidade celular por grupos de estudo, AA: grupo de indivíduos saudáveis (n=39); SS: pacientes falciformes (n=20); SSHU: pacientes falciformes em uso de HU (n=21). Basal: células não tratadas; Tr X: Triton X-100 (0,2%, v/v) – padrão citotóxico. **(B)** Viabilidade celular por dose de HU (SSHU-0,5g, n=6; SSHU-1g, n=8; SSHU-1,5-2g, n=7). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. das análises realizadas em quadruplicata e em dias diferentes, onde **a** vs Basal AA; **b** vs Basal SS; **c** vs Basal SSHU; **d** vs Basal AA; **e** vs SS; **f** vs SSHU-0,5g ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

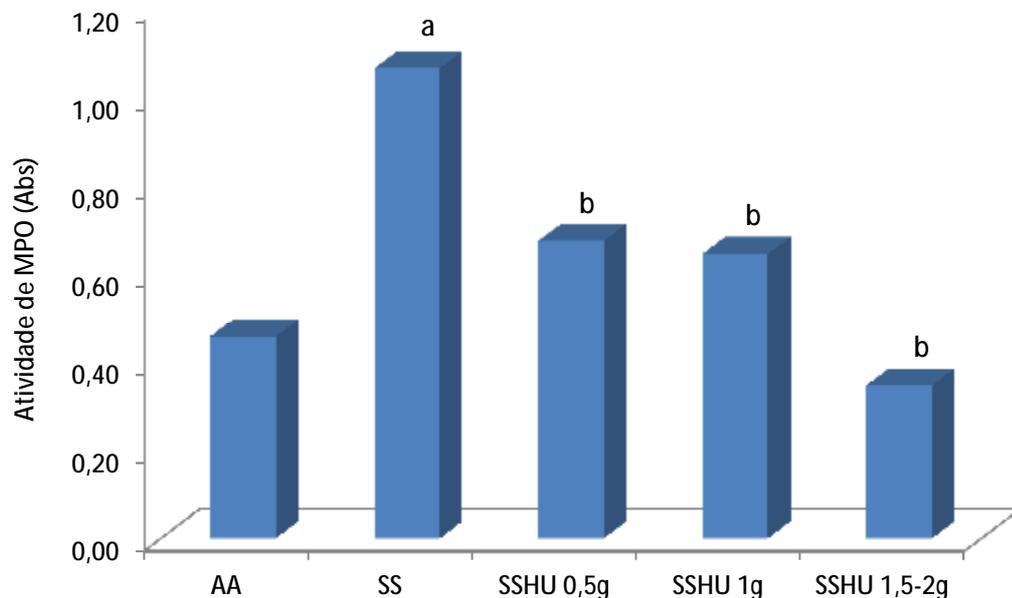
5.3 Avaliação de marcadores inflamatórios em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme

5.3.1 Mieloperoxidase

A MPO é um importante marcador biológico de processos inflamatórios, e foi mensurada em neutrófilos de pacientes com AF em estado estacionário para se investigar a influência da HU sobre a liberação dessa enzima.

Foram obtidos valores médios de absorbância de $0,45 \pm 0,05$ e $1,08 \pm 0,14$ para os grupos AA e SS, respectivamente, mostrando uma significativa elevação da atividade de MPO no grupo de pacientes sem tratamento. Os pacientes em uso de HU expressaram média de $0,67 \pm 0,1$; $0,64 \pm 0,08$ e $0,34 \pm 0,07$, para as doses de 0,5g; 1g e 1,5-2g, respectivamente, e uma redução da atividade de MPO em relação aos pacientes sem tratamento com HU (Figura 12).

Figura 12. Efeito da HU sobre marcadores de inflamação em neutrófilos de pacientes com AF, mensurado pela atividade da mieloperoxidase.



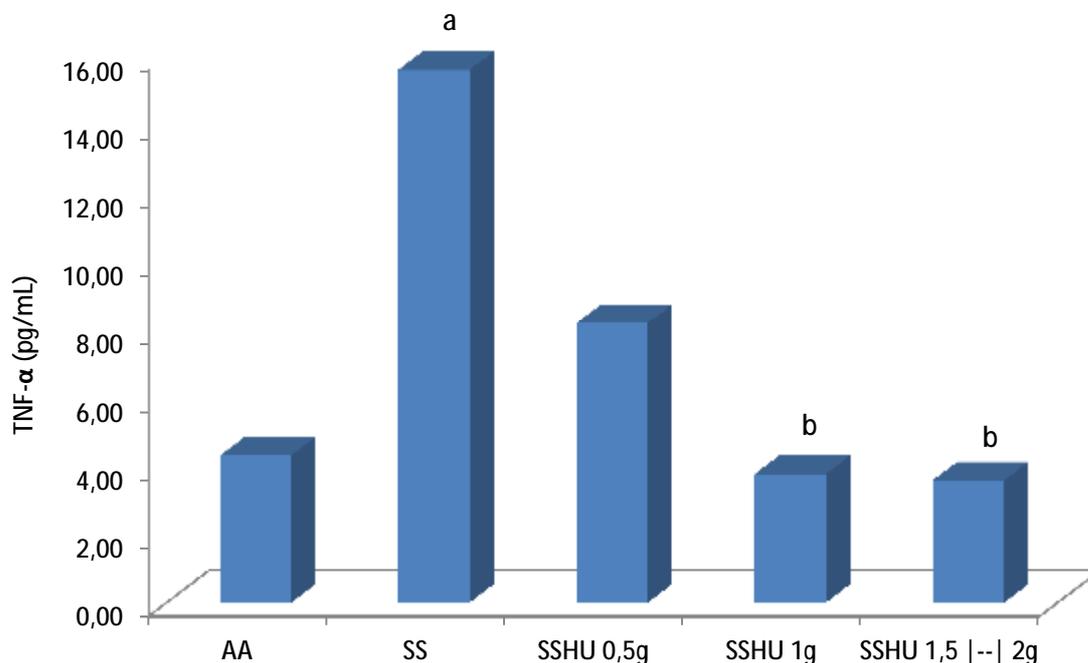
Neutrófilos ($5,0 \times 10^6$ células/ml- 50 μ L/poço de placa) foram incubados com tampões, H_2O_2 e TMB e a absorbância de sua MPO foi mensurada. AA: grupo de indivíduos saudáveis (n=30); SS: pacientes falciformes (n=40); SSHU: pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=14; 1g, n=24; 1,5-2g, n=9). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. das análises realizadas em triplicata, onde **a vs SS**; **b vs SS** ($p < 0,001$ – ANOVA e Teste de Tukey).

5.3.2 TNF- α

O efeito da HU sobre citocinas inflamatórias em neutrófilos de pacientes com AF foi investigado pela mensuração dos níveis de TNF- α e observamos que a HU induz uma redução em seus níveis.

O grupo controle (AA) formado por indivíduos saudáveis expressou uma média de $4,31 \pm 0,4$ pg/mL, enquanto os pacientes com AF mostraram um valor médio de $15,62 \pm 2,4$ pg/mL, mostrando uma elevação bastante significativa neste último grupo. No grupo de pacientes em uso de HU estratificado segundo as doses, os resultados foram de $8,21 \pm 1,5$; $3,77 \pm 0,36$ e $3,59 \pm 0,39$ pg/mL, respectivamente para SSHU-0,5g; SSHU-1g e SSHU-1,5-2g (Figura 13).

Figura 13. Efeito da HU sobre marcadores de inflamação em neutrófilos de pacientes com AF, mensurada pelo TNF- α .

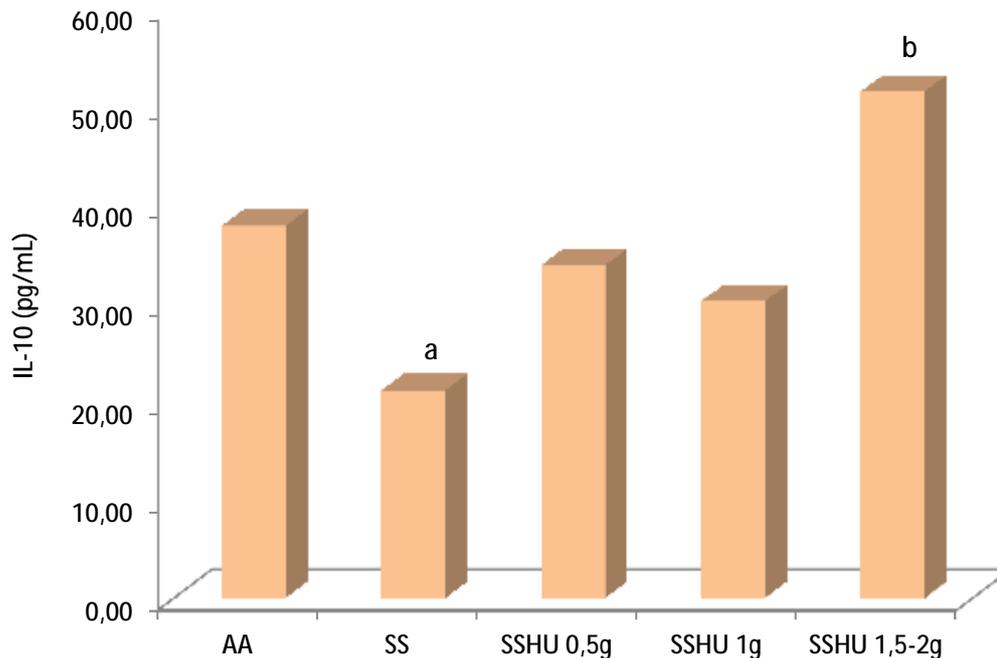


Neutrófilos ($5,0 \times 10^6$ células/ml- 100 μ L de sobrenadante/poço de placa) foram incubados conforme especificações do fabricante do Kit de ELISA (eBioscience-USA) e a leitura realizada em 450 nm. AA: grupo de indivíduos saudáveis (n=23); SS: pacientes falciformes (n=36); SSHU: pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=15; 1g, n=17; 1,5-2g, n=9). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., onde **a** vs AA; **b** vs SS ($p = 0,012$ – Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's Multiple Comparison).

5.3.3 IL-10

Os níveis da interleucina anti-inflamatória IL-10 foram mensurados por meio de teste de ELISA, onde observamos uma redução significativa no grupo SS ($21,21 \pm 2,2$ pg/mL) em relação ao grupo AA ($37,85 \pm 3,5$ pg/mL). Ao compararmos o grupo de pacientes em tratamento com o grupo sem tratamento, observamos um aumento significativo dos níveis de IL-10 apenas no grupo SSHU-1,5-2g ($51,49 \pm 12,1$ pg/mL). As médias dos grupos SSHU-0,5g e SSHU-1g foram de $33,89 \pm 6,5$ pg/mL e $30,19 \pm 4,7$ pg/mL, respectivamente (Figura 14).

Figura 14. Efeito da HU sobre marcadores de inflamação em neutrófilos de pacientes com AF, mensurada pela IL-10.



Neutrófilos ($5,0 \times 10^6$ células/ml- 100 μ L de sobrenadante/poço de placa) foram incubados conforme especificações do fabricante do Kit de ELISA (eBioscience-USA) e leitura realizada em 450 nm. AA: grupo de indivíduos saudáveis (n=16); SS: pacientes falciformes (n=32); SSHU: pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=10; 1g, n=15; 1,5-2g, n=6). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., onde **a** vs AA; **b** vs SS (p= 0,002 – Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's Multiple Comparison).

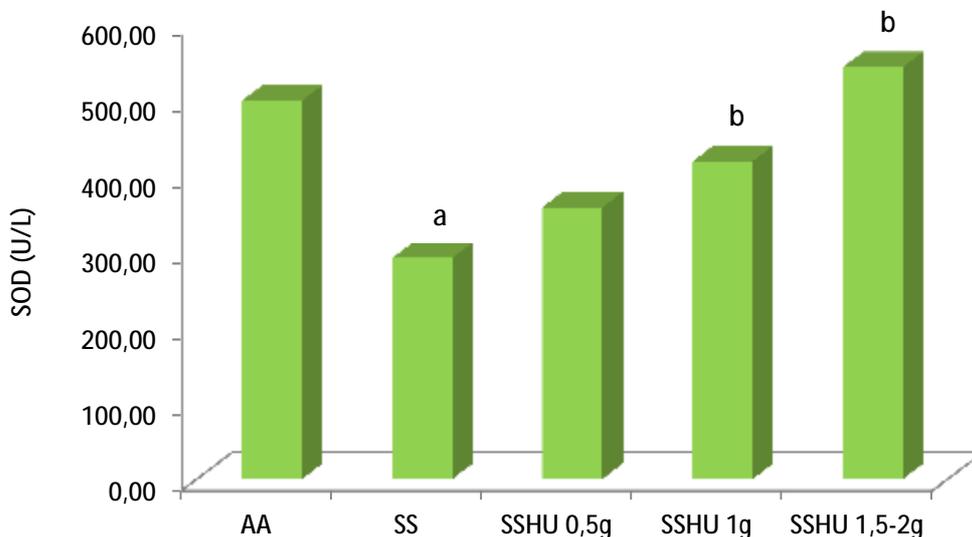
5.4 Avaliação de marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme

5.4.1 Superóxido dismutase

Os pacientes com AF também foram investigados quanto à liberação da enzima SOD em seus neutrófilos e a influência da HU sobre essa liberação.

Valores médios de 498,7 \pm 33 U/L (AA); 291 \pm 20 U/L (SS); 358 \pm 27,5 U/L (SSHU-0,5g); 418,3 \pm 35,1 U/L (SSHU-1g) e 542,6 \pm 82,1 U/L (SSHU-1,5-2g) demonstraram redução significativa dos níveis da enzima SOD no grupo SS em relação ao grupo AA, e uma elevação estatisticamente significativa nos grupos SSHU-0,5g e SSHU-1,5-2g quando comparados ao grupo sem tratamento (Figura 15).

Figura 15. Efeito da HU sobre marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com AF, pela mensuração da enzima SOD.



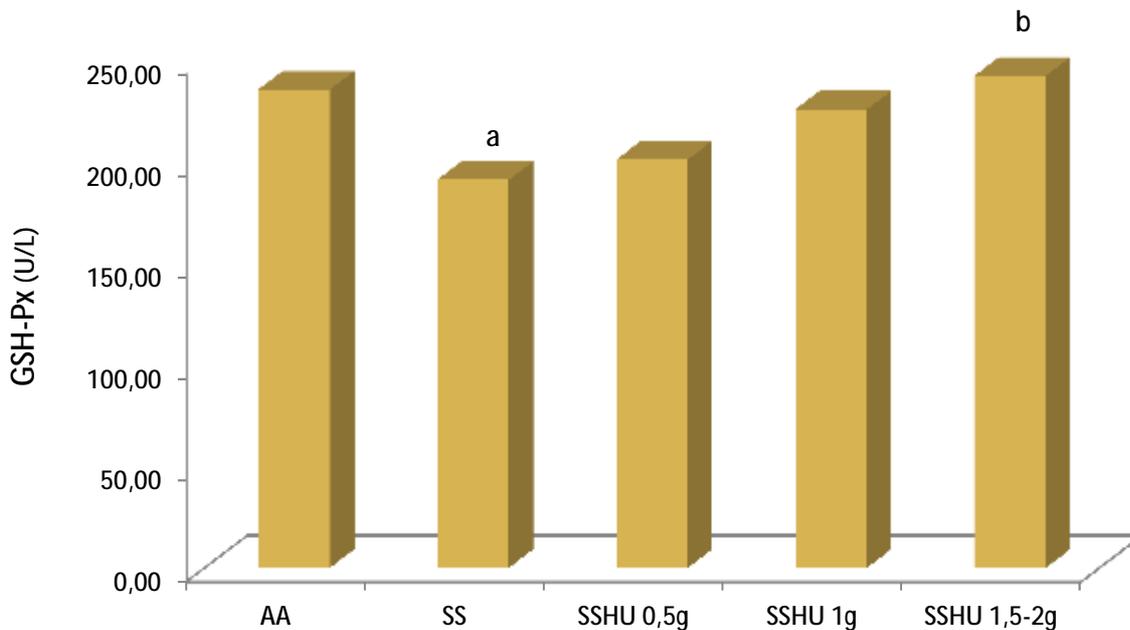
Neutrófilos ($5,0 \times 10^6$ células/ml- 50 μ L de sobrenadante) foram incubados com solução de xantina e xantina oxidase para formação do composto róseo de formazan. A atividade da superóxido dismutase foi medida através do grau de inibição dessa reação a 505nm. AA: grupo de indivíduos saudáveis (n=29); SS: pacientes falciformes (n=36); SSHU: pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=14; 1g, n=23; 1,5-2g, n=9). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., onde **a** vs AA; **b** vs SS ($p < 0,001$ – ANOVA e teste de Tukey).

5.4.2 Glutationa peroxidase

A Figura 16 mostra a determinação da GSH-Px nos grupos de estudo, onde foi observada uma redução significativa da atividade da enzima no grupo SS ($191,4 \pm 6,4$ U/L) em relação ao grupo AA ($235,7 \pm 8,8$ U/L), bem como uma elevação no grupo SSHU-1,5-2g ($242,5 \pm 14,2$ U/L) quando comparado com o grupo sem tratamento com HU (SS).

As médias de GSH-Px nos outros pacientes que faziam uso de HU foram de $216 \pm 16,9$ U/L e $229,7 \pm 12,5$ U/L, para as respectivas doses de 0,5g e 1g.

Figura 16. Efeito da HU sobre marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com AF, pela mensuração da enzima GSH-Px.

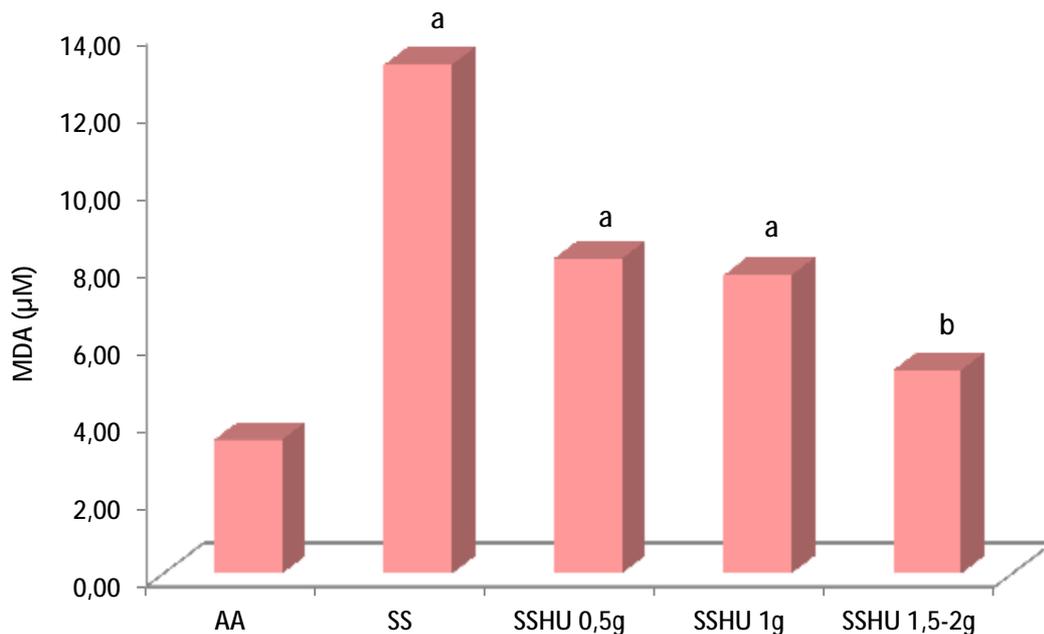


Níveis de GSH-Px foram mensurados em Neutrófilos ($5,0 \times 10^6$ células/ml- 50 μ L de sobrenadante) pela redução de H_2O_2 à custa da conversão da GSH a GSSG, na presença de NADPH, cuja oxidação foi registrada pelo decaimento da absorbância a 340 nm. AA: grupo de indivíduos saudáveis (n=30); SS: pacientes falciformes (n=42); SSHU: pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, n=13; 1g, n=23; 1,5-2g, n=9). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., onde **a** vs AA; **b** vs SS ($p=0,004$ – ANOVA e teste de Tukey).

5.4.3 Malonaldeído

A Figura 17 representa as médias dos níveis de produtos de peroxidação lipídica, mensurados pelo teste do MDA, a partir da reação com o ácido tiobarbitúrico com formação de sais de cor rósea, onde observamos um aumento significativo nos grupos SS ($13,15 \pm 1,17 \mu\text{M}$), SSHU-0,5g ($8,15 \pm 1,32 \mu\text{M}$) e SSHU-1g ($7,73 \pm 0,88 \mu\text{M}$) quando comparados ao grupo AA ($3,46 \pm 0,40 \mu\text{M}$), e uma redução estatisticamente significativa no grupo SSHU-1,5-2g ($5,27 \pm 0,84 \mu\text{M}$) em relação ao grupo SS.

Figura 17. Efeito da HU sobre marcadores de estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com AF, pela mensuração do MDA.



A partir de $125 \mu\text{L}$ do sobrenadante de neutrófilos ($5,0 \times 10^6$ células/mL), moléculas de MDA reagiram estequiometricamente com ácido tiobarbitúrico para formar um cromóforo róseo, cuja intensidade foi aferida a 560 nm . AA: grupo de indivíduos saudáveis ($n=29$); SS: pacientes falciformes ($n=38$); SSHU: pacientes falciformes em uso de HU (0,5g, $n=14$; 1g, $n=22$; 1,5-2g, $n=9$). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M., onde **a** vs AA; **b** vs SS ($p < 0,001$ – ANOVA e teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, podemos observar que a AF cursa com graves alterações hematológicas, quando comparados os valores médios hematológicos dos pacientes com os de indivíduos saudáveis, demonstrando que os pacientes portadores da doença apresentam um quadro anêmico crítico e permanente. Evidenciamos uma melhora significativa dos valores hematológicos no grupo que estava fazendo uso da HU quando comparado ao grupo sem tratamento, representada por uma elevação da concentração da taxa de hemoglobina, hematócrito e VCM, bem como um decaimento do número de reticulócitos e um aumento de 270% na concentração da HbF, sugerindo que o medicamento gerou uma proteção contra o fenômeno de falcização das hemácias, com conseqüente redução do processo de hemólise e anemia. Estes dados corroboram com os encontrados em alguns estudos, os quais têm reportado a eficácia da HU em portadores de AF por conduzir à melhora clínica e hematológica pela redução da incidência de episódios vaso-oclusivos, principalmente pelos seus efeitos múltiplos sobre a linhagem eritrocitária, isto é, por promover elevação no nível de HbF em cerca de 60% dos pacientes tratados, elevar a taxa de hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM) e reduzir o número de reticulócitos (KINNEY *et al.*, 1999; COVAS *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006).

Da mesma forma, observamos uma redução no número de leucócitos totais e de neutrófilos entre os pacientes do grupo em tratamento em relação aos que não faziam uso da HU, confirmando os relatos na literatura (CHIANG *et al.*, 2007; CANÇADO *et al.*, 2009; WARE; AYGUN, 2009) sobre a ação indutora da HU na redução do número de leucócitos circulantes, e, conseqüentemente, redução de processos vaso-oclusivos e inflamatórios.

Lanzkron *et al.* (2008), em um estudo sobre o consenso do uso de HU em pacientes adultos com AF, notaram que os níveis de hemoglobina foram mais altos no grupo que recebeu a HU no tratamento. O mesmo aconteceu com os níveis de HbF, e o número médio de crises álgicas foi 44% mais baixo do que do grupo controle (pacientes não tratados com HU). As internações e outras eventuais complicações também caíram de forma significativa.

Atualmente, a HU é o único medicamento aprovado pelo FDA norte americano, com comprovada ação de modificar o processo da doença, melhorando os parâmetros hematológicos e a diminuição de necessidade de transfusão sanguínea ou hospitalização (CANÇADO *et al.*, 2009; VARGAS, 2009; PALLIS, 2011), principalmente, por elevar a

concentração de HbF nas hemácias, inibindo, assim, a polimerização da HbS e subsequentes eventos decorrentes, como os episódios de dores articulares, AVCs, STA, infartos pulmonares, CVOs, dentre outros (WANG *et al.*, 2011). Embora a HU seja conhecida por inibir a síntese de DNA via inativação da enzima ribonucleotideo redutase, o que leva a uma alteração na cinética da proliferação eritróide e produção de mais células com características fetais, Células F, que estimulam diretamente a síntese de HbF e inibem a síntese de novas moléculas de HbS (FRANCO *et al.*, 2006), existem relatos que sugerem que a HU, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é capaz de produzir moléculas de NO e aumentar a sua biodisponibilidade na circulação de pacientes falcêmicos, favorecendo a vasodilatação e reprimindo a atividade de moléculas de adesão e formação de radicais livres (COKIC *et al.*, 2003; KING, 2004), além de induzir a expressão de γ -globina em progenitores de células eritróides através da ativação da via dependente de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (COKIC *et al.*, 2003).

Entretanto, sabe-se que as hemácias não são as únicas células sanguíneas circulantes envolvidas na AF, e há evidências que indicam que os benefícios da HU na AF podem ser independentes de suas propriedades indutoras de HbF. Uma redução na contagem de leucócitos, sobretudo neutrófilos, muitas vezes, antecede o aumento dos níveis de HbF (CHARACHE *et al.*, 1996; CANÇADO *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2011) e promove uma melhora clínica das manifestações da doença, mesmo na ausência de elevação da HbF, sugerindo tanto a participação direta dessas células na fisiopatologia da AF, como a ação da HU na regulação da liberação e ativação dos neutrófilos (CANÇADO *et al.*, 2009; WARE; AYGUN, 2009). Uma contagem elevada no número de neutrófilos em pacientes com AF, normalmente, está relacionada a um aumento da gravidade e risco de morte prematura, e segundo Charache (1997) e Benkerrou *et al.* (2002), o decréscimo da contagem de neutrófilos no sangue periférico é o parâmetro biológico mais fortemente relacionado com o efeito benéfico da HU, sugerindo que os neutrófilos possam ser um alvo preferencial do medicamento. No entanto, há poucos relatos na literatura de estudos relacionados à influência da HU sobre neutrófilos de pacientes com AF, e ainda pouco se sabe sobre os mecanismos de ação e seus efeitos, principalmente, no que diz respeito à citotoxicidade e lesão celular, e na funcionalidade e liberação de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo por essas células.

Em nosso estudo, avaliamos a possibilidade da HU causar danos na estrutura de neutrófilos de pacientes com AF através de alguns ensaios visando investigar possíveis efeitos

tóxicos deste medicamento sobre a membrana plasmática e metabolismo celular. Nesse contexto, foram empregados alguns modelos experimentais como o teste de exclusão por Azul de Tripán, LDH e MTT.

O ensaio de viabilidade celular pelo corante Azul de Tripán em neutrófilos de pacientes com AF permitiu diferenciar células viáveis (não coradas) de células não viáveis (coradas de azul) antes da realização de todos os testes, e constitui um ensaio preliminar na avaliação da citotoxicidade de uma droga teste, sendo capaz de distinguir as células viáveis, impermeáveis ao corante ácido Azul de Tripán, daquelas permeáveis ao corante. Esta última condição constitui um forte indicativo de dano à membrana plasmática que culmina na morte celular (HYNES *et al.*, 2003; MINERVINI; FORNELLI; FLYNN, 2004).

O Azul de Tripán é um corante de exclusão incorporado apenas por células permeabilizadas devido a lesões na membrana plasmática. Após a entrada na célula, o corante atravessa o invólucro nuclear e acaba por se localizar nos núcleos, que ficam corados de azul (HYNES *et al.*, 2003; MINERVINI; FORNELLI; FLYNN, 2004; LOPES, 2010). No presente estudo, houve diferença significativa ($p < 0,05$) quanto à viabilidade dos neutrófilos apenas nos grupos AA e SS, sugerindo dano ou fragilidade na permeabilidade membranar de neutrófilos de pacientes com AF. Não foi observada diferença estatística entre o grupo SSHU e os grupos AA e SS, indicando que a HU não causou redução de células viáveis no grupo de pacientes em tratamento, tendo valores bastante próximos aos do controle, e, portanto, não é citotóxica a neutrófilos nesse modelo de teste.

Ainda na mesma linha de investigação, a medida da atividade da LDH, enzima presente no citoplasma celular, constitui num marcador de membrana íntegra com sensibilidade considerável (LOPES, 2010). Os grupos tratados com o padrão citotóxico (Triton X-100) apresentaram atividade de LDH significativamente elevada em relação aos grupos não tratados ($p < 0,0001$), e, no presente estudo, observamos que o grupo de pacientes SS apresentou uma alteração na integridade celular de seus neutrófilos quando comparados ao grupo controle formado de indivíduos saudáveis, demonstrada pela elevação significativa da atividade da enzima ($p = 0,011$), indicando dano de membrana citoplasmática, com consequente aumento da liberação de LDH para o meio externo. Dados semelhantes são encontrados em estudos com hemácias de pacientes falciformes, onde se observa um aumento no nível plasmático de LDH em pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis (KATO *et al.*, 2006; CANÇADO *et al.*, 2009), e esta elevação da enzima está positivamente associada ao aumento de risco dos pacientes virem a sofrer de priapismo, hipertensão pulmonar, úlceras

cutâneas em membros inferiores, resistência ao NO ou mesmo morte precoce (KATO *et al.*, 2006; STEINBERG, 2008; REES; GIBSON, 2011).

Nenhuma alteração significativa no nível de atividade de LDH foi observada entre os pacientes em uso de HU quando comparados aos indivíduos saudáveis ($p > 0,05$), porém, ao compararmos aqueles com os pacientes sem tratamento, observamos uma redução de 41,01% no nível de LDH ($p < 0,001$), sugerindo que, nas condições deste experimento, a HU, não somente, não exerceu efeito citotóxico nos neutrófilos dos pacientes, como também, promoveu um efeito citoprotetor a estas células, com redução de 10,9% do nível de LDH em relação aos indivíduos saudáveis do grupo controle. Os resultados confirmam aqueles encontrados pela contagem celular utilizando o corante Azul de Tripán.

A LDH é uma enzima citosólica, sendo assim, sua detecção no fluido extracelular é um indicativo de morte ou perda da integridade e, na avaliação da viabilidade celular, constitui num dos métodos mais sensíveis e de fácil execução (LOPES, 2010).

Estudos anteriores relatam que níveis plasmáticos de LDH estão significativamente mais elevados em pacientes com AF quando comparados a grupos controles formados por indivíduos saudáveis, sugerindo o uso da quantificação da enzima como parâmetro de hemólise, já que se trata de uma enzima citoplasmática, liberada em decorrência de alteração da permeabilidade ou lise da membrana celular (KATO *et al.*, 2006; STEINBERG, 2008). Uma vez que a HU está envolvida no aumento da HbF e, conseqüentemente, na redução da polimerização da HbS e das CVOs e hemólise, níveis plasmáticos mais baixos de LDH são encontrados em pacientes que fazem uso de terapia de HU em relação aos pacientes que não fazem uso do medicamento (STEINBERG, 2008; SILVA *et al.*, 2009), corroborando com os dados observados neste estudo.

Cartron e Elion (2008), discutindo as CVOs como sendo de fisiopatologia complexa, multifatoriais e dando importância às interações intercelulares mediadas pelas moléculas de adesão presentes nas células sanguíneas e endoteliais, descreveram que a terapia com HU leva à diminuição da adesividade celular com conseqüente diminuição dos processos vaso-oclusivos e morte celular, e isso seria um fator preponderante para uma redução dos níveis de LDH na AF.

Nós nos propusemos a analisar cada parâmetro deste estudo conforme a posologia da HU administrada no grupo de pacientes em tratamento, segundo estratificação deste grupo já mencionada, e pudemos observar uma relação inversamente proporcional quanto à dose de medicamento e nível de LDH liberado, indicando que os pacientes que fizeram uso de uma

quantidade maior da substância obtiveram uma maior proteção contra o dano celular, representado pela detecção de níveis mais baixos da enzima, sendo encontrado um valor de $p=0,04$ entre os subgrupos SSHU-0,5g e SSHU-1,5-2g.

A influência do tempo de tratamento com HU e sua associação com marcadores e metabolismo celular não foi investigada neste estudo devido a informações inconsistentes ou controversas nos prontuários dos pacientes, impossibilitando uma análise mais acurada e fidedigna, mas acreditamos que seja de grande importância e que estudos posteriores venham a contemplar esses dados.

Vários ensaios *in vitro* podem ser empregados na avaliação do potencial citotóxico de substâncias químicas pela mensuração de diversos parâmetros que vão desde a contagem direta de células às medidas da integridade da membrana e da atividade metabólica celular. A medida da função metabólica celular pode ser investigada determinando o nível de ATP ou a atividade mitocondrial, esta investigada em nosso estudo através do teste do MTT.

Pela análise do teste do MTT, observamos uma redução significativa na viabilidade celular entre as células tratadas com Triton X-100 (controle citotóxico positivo) e as células basais (sem tratamento) em cada grupo de indivíduos do estudo ($p<0,0001$). Demonstramos que a própria doença, representada pelo grupo SS, altera o metabolismo celular dos neutrófilos quando comparados aos indivíduos saudáveis (AA), reduzindo o número de células viáveis nesse modelo de ensaio ($p<0,001$).

A ausência de alterações significantes ($p>0,05$) entre o grupo saudável (controle) e pacientes em tratamento, bem como a significância estatística observada ao compararmos os pacientes com e sem tratamento ($p=0,002$) corroboram com os resultados encontrados no teste de toxicidade pela mensuração da LDH e sugerem ausência de toxicidade sobre o metabolismo celular, particularmente relacionado à atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase.

Em um estudo realizado para se analisar a toxicidade mitocondrial direta de alguns medicamentos antirretrovirais, foi visto que a HU isoladamente não alterou a funcionalidade mitocondrial celular, apesar de inibir a divisão celular, o que é consistente com os seus já conhecidos efeitos citostáticos. No entanto, segundo o autor do estudo, a combinação da HU e alguns medicamentos antirretrovirais podem induzir a uma elevação da citotoxicidade mitocondrial, o que pode ser atribuído devido ao efeito citostático da HU e a capacidade que ela tem de aumentar a concentração relativa de outras substâncias e ao fato de que a disfunção

mitocondrial torna-se evidente quando a produção de ATP diminui abaixo de certo limiar, o que poderia ter sido causado pelo sinergismo das drogas em teste (FOLI *et al.*, 2001).

Em relação ao teste do MTT por dose de medicamento administrado, observamos uma associação dose-efeito positiva, e assim como no teste do LDH, podemos supor, pelas observações e condições aqui realizadas, que concentrações mais elevadas do medicamento estão relacionadas a uma melhor resposta do paciente ao tratamento no que diz respeito à proteção de sua viabilidade celular, sem, no entanto, deixar de observar e monitorar a resposta individual e a DMT de cada paciente a fim de se obter a dose mais adequada, capaz de promover melhora do curso clínico da doença, o mais proeminente possível, sem a ocorrência de toxicidade hematológica, hepática, renal ou gastrointestinal (LANZKRON *et al.*, 2008; STROUSE *et al.*, 2008).

De Montalembert (2008) discute em seu trabalho que a HU é a única droga que demonstrou eficácia na prevenção de recidivas de crises dolorosas, crises torácicas agudas e na redução das necessidades transfusionais em pacientes com AF. Descreve ainda, que esta resposta foi variável na França e que as crianças geralmente experimentavam melhoras mais significativas do que adultos. Expõe as incertezas quanto a alterações na fertilidade com o uso do medicamento em longo prazo e afirma que os benefícios advindos do uso da HU superam os possíveis efeitos de mielotoxicidade, os quais podem ser facilmente monitorados e corrigidos pela suspensão do medicamento.

Segundo alguns pesquisadores, a HU é um medicamento com alto potencial biológico e antineoplásico e que, por limitar a síntese de DNA em progenitores celulares, pode também promover efeitos colaterais como citotoxicidade e mielossupressão (FLANAGAN *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011). Entretanto, as evidências que demonstram que a HU é capaz de induzir leucemia ou outras malignidades em pacientes com AF em tratamento com este medicamento ainda permanecem conflitantes e controversas, da mesma forma em que a questão de sua eficácia e segurança, em longo prazo, ainda não está completamente definida, com alguns estudos atribuindo que a HU é genotóxica, com ação clastogênica e teratogênica, enquanto outros sugerindo que a mesma possui baixa mutagenicidade *in vivo*, com frequência de alterações cromossômicas semelhantes às encontradas nos indivíduos saudáveis utilizados como grupo controle (HANFT *et al.*, 2000; DE LIMA *et al.*, 2003; FRIEDRISCH *et al.*, 2008; STEINBERG *et al.*, 2010).

Pelizaro *et al.* (2012) relatam que, embora este medicamento tenha respostas positivas, alguns aspectos do tratamento permanecem obscuros, incluindo dosagem ideal, tempo de uso,

idade do paciente, dentre outros. Tais questionamentos também são encontrados em outros estudos, onde se afirma que o efeito na metilação do DNA, atribuído à HU, pode depender da concentração da droga, tempo de exposição e linhagem celular analisada, ou mesmo da resposta individual de cada paciente (FYRBERG *et al.*, 2011). No entanto, ainda há poucos dados na literatura referentes a estes levantamentos, visto que se trata de uma droga que somente há pouco mais de 25 anos foi introduzida oficialmente no tratamento de pacientes com AF, sendo que, no Brasil, isto só aconteceu na década passada, e apesar de vir sendo utilizada com bons resultados, promovendo uma alteração e regulação do estado inflamatório e hemolítico, além de uma considerável melhora no quadro clínico geral e prognóstico do paciente, mais estudos à cerca da questão segurança são essenciais.

Os pacientes com AF encontram-se em estado inflamatório permanente, sob estímulos diversos e constantes (CHIES; NARDI, 2001). Crescentes evidências indicam que fatores inflamatórios dentro da microcirculação podem desempenhar um papel significativo na vaso-occlusão, que é característica da AF (LANARO *et al.*, 2009).

Apesar das evidências do envolvimento primordial dos neutrófilos na modulação clínica e nos aspectos fisiopatológicos da doença, o mecanismo pelo qual o número dessas células está aumentado nos pacientes permanece não completamente elucidado, embora alterações na produção de citocinas de leucócitos sejam sugeridas como importantes participantes desse fenômeno (CONRAN *et al.*, 2007b). Além disso, o efeito da terapia com HU sobre a liberação de mediadores inflamatórios e citocinas pró e anti-inflamatórias não é bem compreendido e uma investigação nesses parâmetros pode ajudar a esclarecer a patogênese da doença e suas complicações e auxiliar na avaliação da gravidade e prognóstico.

Ao avaliarmos os níveis dos marcadores inflamatórios pela mensuração da MPO e TNF- α nos grupos em estudo, observamos uma elevação significativa ($p < 0,001$ para MPO, e $p = 0,001$ para TNF- α) no grupo de pacientes SS em relação aos indivíduos do grupo AA, bem como uma redução nos níveis desses marcadores no grupo de pacientes em tratamento com HU (SSHU), quando comparado ao grupo sem tratamento, sugerindo que tanto a MPO como TNF- α são importantes mediadores inflamatórios presentes em vários dos processos que culminam na vaso-occlusão, injúria tissular e formação de EROs na AF, e que a HU age como um importante anti-inflamatório, promovendo uma redução nos níveis e atividades desses marcadores. Em ambos os ensaios, observamos que as concentrações de 1g e 1,5-2g de medicamento promoveram uma maior redução nos níveis dos marcadores, mostrando uma

tendência que doses mais elevadas de HU estão associadas a níveis mais baixos de MPO e TNF- α , quando analisados nas condições apresentadas.

Em um estudo recente, realizado a partir de neutrófilos isolados, foi observado um discreto aumento da atividade da MPO em relação aos controles saudáveis e os autores sugerem que o aumento do estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes falciformes seja devido ao aumento da geração de peróxidos e ONOO⁻ intracelulares (ASLAN; CANATAN, 2008). Estudos anteriores (KINNEY *et al.*, 1999; SALEH; HILLEN; DUITZ, 1999) demonstraram o efeito da HU sobre a atividade da MPO em pacientes com AF, sendo relatada uma redução significativa dos níveis de MPO, mesmo na ausência de uma diminuição do número de leucócitos, o que implica que a HU também induz uma diminuição da atividade dos neutrófilos, e tal ação pode ajudar a atenuar a fase de propagação de uma CVO.

Sabe-se que, em situações normais, a MPO exerce uma função primordial no processo de defesa do organismo ao reagir com moléculas de H₂O₂ e formar o ácido hipocloroso, um potente agente oxidante com atividade antimicrobiana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). No entanto, em situações de intensa ativação celular como acontece na AF, ocorre o excesso de atividade da MPO, o que pode ser bastante prejudicial. A geração excessiva de oxidantes pela MPO está ligada ao dano tecidual em muitas doenças, especialmente aquelas caracterizadas pela inflamação aguda e crônica. A produção exacerbada de HOCl pode ativar o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e fosforilar resíduos de tirosinas nas células B e T, levando a um aumento na produção de TNF- α , bem como reagir com lipoproteínas ocasionando uma peroxidação lipídica e aumento da permeabilidade de membranas, contribuindo para a iniciação e manutenção de processos inflamatórios crônicos e lesões oxidativas (WOOD; GRANGER, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Dados semelhantes aos nossos foram encontrados em alguns estudos (BUCHANAN *et al.*, 2004; CONRAN *et al.*, 2007a; LANARO *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2011) demonstrando uma elevação significativa no nível plasmático de TNF- α em pacientes falciformes sem tratamento quando comparados a indivíduos saudáveis e a pacientes em terapia com HU.

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para os sítios de inflamação, não somente pela quimiotaxia induzida pela IL-8 (KOBAYASHI, 2008), como também, por estímulos gerados pelo TNF- α (e IL-1), os quais têm sido demonstrados por iniciar a adesão de leucócitos às paredes dos vasos sanguíneos, inicialmente os neutrófilos e, subsequentemente, os monócitos e linfócitos (MIGUEL, 2010). Na AF, o TNF- α é

responsável por promover o aumento das interações hemácias-leucócitos (TURHAN *et al.*, 2004) e alterações no fenômeno da apoptose neutrofílica, com liberação de seu conteúdo celular de forma não controlada (LUO; LOISON, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2011), dando suporte para a hipótese de que esta molécula inflamatória além de aumentar as propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com AF, pode interferir no tempo de vida celular e na liberação de outros mediadores, contribuindo, portanto, com o desenvolvimento dos processos inflamatórios, vaso-oclusivos e gravidade da doença. Hedó *et al.* (2009) afirmam que o TNF- α pode ainda ativar os hepatócitos a sintetizarem proteínas de fase aguda, que também se encontram elevadas na AF, enquanto Abbas e Lichtman (2005) declaram que esta citocina promove a ativação de proteínas do sistema de coagulação, alterando a atividade pró e anticoagulante nos pacientes.

Ainda na mesma linha de investigação, a IL-10, importante citocina anti-inflamatória em humanos, também se mostra envolvida na regulação dos processos inflamatórios e de imunidade na AF. Em nosso estudo, os pacientes sem tratamento (SS), e em estado estacionário, apresentaram níveis significativamente mais baixos quando comparados aos indivíduos saudáveis, ou mesmo quando relacionados aos pacientes em tratamento com HU. Valores reduzidos também foram observados no grupo em tratamento (nas doses de 0,5g e 1g) quando comparado ao controle saudável, porém, sem significância estatística.

Na literatura, não foi evidenciado um consenso sobre os níveis de IL-10 na AF, e os casos reportados tratavam-se de dosagens plasmáticas expressando valores elevados (VEIGA *et al.*, 2012) ou sem diferença significativa (LANARO *et al.*, 2009) quando comparados pacientes e indivíduos saudáveis. Neste último estudo também foi observado um aumento significativo de IL-10 no grupo de pacientes em uso de HU (20-30mg/Kg/dia) quando feito pareamento com o grupo de pacientes sem tratamento, e os autores também demonstraram uma elevação significativa na expressão de genes que codificam mRNA para síntese de IL-10 em neutrófilos, mas não em monócitos, de pacientes em tratamento com HU. Uma correlação positiva e significativa entre a concentração de HbF e a expressão desses genes também foi visualizada, levando-nos a supor que a HU e HbF podem ter um papel importante no aumento da IL-10 anti-inflamatória.

Sabe-se que a IL-10 é antagonista de diversas citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007), e além de inibir a produção dessas citocinas, também pode suprimir a inflamação por vários outros mecanismos imunoregulatórios, tais como, redução da expressão de HLA classe II, por reprimir efeitos

biológicos do interferon-gama (IFN- γ); das citocinas produzidas por neutrófilos e células NK e atenuar a expressão dos receptores de necrose tumoral na circulação sistêmica e inibir a atividade das células apresentadoras de antígenos (KANG; ALLEN, 2005).

Lanaro *et al.*(2009) relatam que as alterações nos níveis de citocinas e outros marcadores inflamatórios na AF, bem como o efeito e mecanismo de ação da HU sobre esses mediadores permanecem conflitantes e inconclusivos. Vale ressaltar que as citocinas envolvidas no processo da inflamação e oclusão vascular são produzidas e liberadas por diversos tipos celulares, havendo necessidade, portanto, de estudos mais detalhados e específicos para se compreender melhor a participação de cada componente celular na fisiopatologia da doença e como esses componentes respondem ao tratamento com HU. Outro ponto de relevância que deve ser apreciado é o acompanhamento e monitoramento clínico individual a cada paciente, visto que a HU produz alterações importantes no sistema imune-inflamatório do paciente, e um efeito exarcebado desse medicamento pode comprometer a defesa e homeostase do organismo.

Analisando os marcadores de estresse oxidativo gerados por neutrófilos de pacientes com AF, observamos uma alteração em seus níveis quando comparados aos indivíduos saudáveis do grupo controle. Evidenciamos uma redução significativa das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px, bem como uma elevação de cerca de 360% nos níveis de MDA, indicando que pode existir uma produção/liberação deficiente ou insuficiente de agentes antioxidantes, o que acarretaria em um aumento de agentes oxidantes, incluindo EROs e ERNs, especialmente os peróxidos, e agravamento dos danos vasculares e tissulares.

Ao confrontarmos os pacientes com e sem uso de HU, constatamos que o uso do medicamento possui o benefício de reduzir o estresse oxidativo na AF pela retomada de níveis de enzimas antioxidantes, compatíveis com os encontrados no grupo controle, destacando, assim como nos testes anteriores, resultados mais expressivos entre os pacientes com doses mais altas.

A AF é caracterizada por estresse oxidativo crônico decorrente de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a atividade de enzimas antioxidantes. No entanto, os poucos estudos que têm avaliado a atividade de enzimas antioxidantes em pacientes com AF (ou em camundongos geneticamente alterados) produziram resultados conflitantes em relação aos níveis de SOD e GSH-Px (NATTA; CHEN; CHOW, 1990; RUSANOVA *et al.*, 2010).

Dados semelhantes aos nossos foram encontrados por Cho *et al.* (2010) demonstrando níveis reduzidos de SOD e GSH-Px em hemácias de pacientes falciformes e uma elevação

desses valores no grupo de pacientes tratados com HU, e por Rusanova *et al.* (2010) que relataram um aumento significativo de produtos de peroxidação lipídica em hemácias de pacientes e uma redução da enzima SOD, porém os níveis de GSH-Px estavam elevados em relação ao grupo controle e não foram utilizados parâmetros com pacientes em uso de HU.

Segundo Amer *et al.* (2005), o estresse oxidativo observado na AF torna as hemácias, leucócitos e plaquetas dos pacientes mais susceptíveis à ação de outras EROs endógenas, provocando situações que vão desde danos localizados a complicações generalizadas. As membranas das hemácias, por exemplo, apresentam elevada peroxidação lipídica que, quando associada à deficiência de agentes antioxidantes, contribui para o processo de falcização, com formação de células mais rígidas e hemólise vascular (ASLAN; FREEMAN, 2007; ASLAN; CANATAN, 2008). Da mesma forma, a ativação plaquetária que caracteriza a AF como sendo um 'estado de hipercoagulabilidade' devido ao aumento na expressão de seus marcadores de superfície, tais como CD62P e CD40L, e à elevação nos níveis de fatores estimulantes da coagulação, também pode ser resultado do estresse oxidativo (ATAGA, 2009).

Cho *et al.* (2010) relataram uma correlação inversamente proporcional entre o TNF- α e a SOD, onde a atividade da enzima é inibida por níveis elevados da citocina. Demonstraram ainda uma correlação positiva da GSH-Px com a HbF, e uma correlação negativa entre aquela com níveis da enzima LDH. Pelas evidências expostas podemos afirmar que a HU interfere, nos processos relacionados tanto à inflamação como nos que envolvem o estresse oxidativo (além dos eventos hemolíticos). Esta hipótese também é sustentada por outro estudo no qual se demonstra que níveis elevados de HbF estão associados com uma redução da peroxidação lipídica, bem como com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD, GSH-PX, catalase) (RUSANOVA *et al.*, 2010).

O presente trabalho foi inédito na região Nordeste do Brasil e demonstrou que os neutrófilos de pacientes com AF apresentam uma ineficaz proteção antioxidante, podendo induzir uma desregulação e aumento na formação de espécies reativas, levando-nos a supor que isto poderia gerar um maior agravamento de danos e lesões oxidativas e um desequilíbrio na produção de agentes antimicrobianos, com consequente aumento da susceptibilidade a infecções recorrentes observada em pacientes falciformes. Ratificamos ainda o importante papel dos neutrófilos na resposta inflamatória promovida pela AF, e demonstramos que o tratamento com a HU não reduziu a viabilidade de neutrófilos nem gerou efeito citotóxico nestas células, mas foi capaz de modular seus mecanismos pró-inflamatórios em níveis

comparáveis aos encontrados em indivíduos saudáveis, podendo modular o curso das manifestações clínicas e gravidade da doença.

7 CONCLUSÃO

- Nossos resultados demonstraram que o uso de HU em pacientes com AF melhoraram o quadro clínico-hematológico dos mesmos, evidenciado pelo aumento da concentração da hemoglobina, hematócrito, VCM e da HbF, e pela redução do número de leucócitos, neutrófilos e reticulócitos, sugerindo uma menor frequência de processos de falcização, hemólise e CVOs;
- Os nossos resultados sugerem que pacientes com AF apresentam neutrófilos com alterações de permeabilidade membranar e de metabolismo funcional, quando comparados aos neutrófilos de indivíduos saudáveis;
- Os neutrófilos de pacientes, mesmo em estado estacionário, demonstram estarem ativados e podem ter papel preponderante na fisiopatologia da doença pela liberação de estímulos inflamatórios e EROs, apesar da ausência de crises álgicas ou vaso-oclusivas;
- A terapia com hidroxiuréia não exerceu efeito citotóxico em neutrófilos de pacientes com AF, quando analisado pelos testes de LDH, Azul Tripán e MTT, e pode ser capaz de promover um efeito protetor a essas células;
- Os neutrófilos de pacientes em tratamento com hidroxiuréia apresentaram uma redução de estresse oxidativo e nos níveis dos marcadores inflamatórios, apoiando a hipótese que o medicamento não somente interfere no número, mas também na expressão qualitativa dessas células;
- Evidenciamos uma tendência de relação dose-efeito positiva, no grupo de pacientes em tratamento com hidroxiuréia, pela observação de que os níveis dos marcadores mensurados por este estudo estavam mais próximos dos encontrados no grupo de indivíduos saudáveis (controle) quando os pacientes faziam uso de doses mais altas do medicamento.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora: 2005.445-465 p.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders; 2003, 249-262 p.
- ABDULHADI, N. H. Protection against severe clinical manifestations of Plasmodium falciparum malaria among sickle cell trait subjects is due to modification of the release of cytokines and/or cytoadherence of infected erythrocytes to the host vascular beds. **Medical hypotheses**, v. 60, n. 6, p. 912-914, 2003.
- ADORNO, E. V. *et al.* Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in the northeast of Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 31, n. 3, p. 621-625, 2008.
- ALMEIDA, C. B. **Papel dos leucócitos na fisiopatologia da anemia falciforme**. 2011. 146 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica) – Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.
- ALMEIDA, C. B. *et al.* Alterations in cell maturity and serum survival factors may modulate neutrophil numbers in sickle cell disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 11, p. 1239-1246, 2011.
- AMER, J. *et al.* Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **British journal of haematology**, v. 132, n. 1, p. 108-113, 2006.
- AMULIC, B. *et al.* Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 459-489, 2012.
- ANYAEGBU, C. *et al.* Peripheral blood neutrophil count and candidacidal activity correlate with the clinical severity of sickle cell anaemia (SCA). **European journal of haematology**, v. 60, n. 4, p. 267-268, 1998.
- ARAÚJO, J. T. Literatura brasileira sobre anemia falciforme. **Sangre**, Zaragoza, v. 6, p. 87-98, 1961.
- ASLAN, M.; CANATAN, D. Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. **Experimental hematology**, v. 36, n. 11, p. 1535-1544, 2008.
- ASLAN, M.; FREEMAN, B. A. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 11, p. 1469-1483, 2007.
- ASSIS, A. *et al.* Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. **Acta haematologica**, v. 113, n. 2, p. 130-136, 2005.
- ATAGA, K. I. Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias. **Haematologica**, Pavia, v.94, n.11, p.1481-1484, 2009.

BALLAS, S. K. More definitions in sickle cell disease: steady state v base line data. **American journal of hematology**, v. 87, n. 3, p. 338, 2012.

BALLAS, S. K. *et al.* Hydroxyurea and sickle cell anemia: effect on quality of life. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 4, n. 1, p. 59, 2006.

BANDEIRA, F. *et al.* Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital Hemope, Recife-PE. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 3, p. 189-194, 2004.

BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BENKERROU, M. *et al.* Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 99, n. 7, p. 2297-2303, 2002.

BILATE, A. M. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 3, 2007.

BONDS, D. R. Three decades of innovation in the management of sickle cell disease: the road to understanding the sickle cell disease clinical phenotype. **Blood**, v. 19, n. 2, p. 99-110, 2005.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3503-3521, 1997.

BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends in immunology**, v. 28, n. 8, p. 340-345, 2007.

BRANDOW, A. M.; PANEPINTO, J. A. Monitoring toxicity, impact, and adherence of hydroxyurea in children with sickle cell disease. **American journal of hematology**, v. 86, n. 9, p. 804-806, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes**, Brasília, DF: ANVISA, 2002.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de educação em saúde: Linha de cuidado em doença falciforme**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, v. 1, 2008.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de educação em saúde: Linha de cuidado em doença falciforme**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, v. 2, 2009.

BRAWLEY, O. W. *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: hydroxyurea treatment for sickle cell disease. **Annals of internal medicine**, v. 148, n. 12, p. 932-938, 2008.

- BUCHANAN, G. R. *et al.* Sickle cell disease. **ASH Education Program Book**, v. 2004, n. 1, p. 35-47, 2004.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free radical biology & medicine**, v. 29, n. 3-4, p. 222, 2000.
- CANALLI, A. A. *et al.* 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.
- CANÇADO, R. D. *et al.* Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 361-366, 2009.
- CARTRON, J. P.; ELION, J. Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. **Transfusion clinique et biologique**, v. 15, n. 1-2, p. 39-50, 2008.
- CARUCCI, D. Know thine enemy. **Nature**, v. 430, n. 7002, p. 944-945, 2004.
- CASCAO, R.; ROSARIO, H.; FONSECA, J. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. **Acta reumatologica portuguesa**, v. 34, n. 2B, p. 313, 2009.
- CASTRO, A. S. A anemia de hematias falciformes. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 427, 1934.
- CHARACHE, S. Mechanism of action of hydroxyurea in the management of sickle cell anemia in adults. *Seminars in hematology*, 1997. p.15.
- CHARACHE, S. *et al.* Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive" switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **Medicine**, v. 75, n. 6, p. 300, 1996.
- CHARACHE, S. *et al.* Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 20, p. 1317-1322, 1995.
- CHEBLOUNE, Y. *et al.* Structural analysis of the 5'flanking region of the beta-globin gene in African sickle cell anemia patients: further evidence for three origins of the sickle cell mutation in Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 12, p. 4431-4435, 1988.
- CHIANG, E. Y. *et al.* Imaging receptor microdomains on leukocyte subsets in live mice. **Nature methods**, v. 4, n. 3, p. 219-222, 2007.
- CHIES, J.; NARDI, N. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. **Medical hypotheses**, v. 57, n. 1, p. 46-50, 2001.
- CHIRICO, E.; PIALOUX, V. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Sickle Cell Disease. **Life**, v. 64. n. 1, p. 72-80, 2012.

- CHO, C. S. *et al.* Hydroxyurea-induced expression of glutathione peroxidase 1 in red blood cells of individuals with sickle cell anemia. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2010.
- CLASTER, S. *et al.* Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. **Blood**, v. 64, n. 5, p. 1079-1084, 1984.
- CLASTER, S.; VICHINSKY, E. P. Managing sickle cell disease. **British Medical Journal**, v. 327, n 7424, p. 1151-1155, 2003.
- COKIC, V. P. *et al.* Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231-240, 2003.
- CONRAN, N. *et al.* Inhibition of caspase-dependent spontaneous apoptosis via a cAMP-protein kinase A dependent pathway in neutrophils from sickle cell disease patients. **British journal of haematology**, v. 139, n. 1, p. 148-158, 2007a.
- CONRAN, N. *et al.* Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. **Annals of hematology**, v. 86, n. 4, p. 255-261, 2007b.
- CORDERO, E. A. A. **Avaliação imunogenética de pacientes com anemia falciforme**. 2009. 117f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Programa de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- COUTINHO, E. Diagnóstico de anemias. **A Folha Médica**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 447-450, 1933.
- COVAS, D. T. *et al.* Effects of hydroxyurea on the membrane of erythrocytes and platelets in sickle cell anemia. **haematologica**, v. 89, n. 3, p. 273-280, 2004.
- CROSS, A. *et al.* Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 191-202, 2005.
- DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935-945, 2008.
- DAVES, S. C.; GILMORE, A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood**, v. 17, n. 2, p. 99-109, 2003.
- DE FRANCESCHI, L.; CORROCHER, R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. **haematologica**, v. 89, n. 3, p. 348-356, 2004.
- DE LIMA, P. *et al.* Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study. **Genetics and molecular biology**, v. 2, n. 3, p. 328-33, 2003.

DE MONTALEMBERT, M. Hydroxyurea treatment in patients affected with sickle cell anemia: Efficacy and safety. **TRANSFUSION CLINIQUE ET BIOLOGIQUE**, v. 15, n. 1/2, p. 34, 2008.

DE YOUNG, L. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Inflammation Research**, v. 26, n. 3, p. 335-341, 1989.

DRAPER, H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421, 1990.

DRESLER, W.; STEIN, R. Ueber den hydroxylharnstoff. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 150, n. 2, p. 242-252, 1869.

EMMEL, V. E. A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle-shaped red blood corpuscles. **Archives of Internal Medicine**, v. 20, n. 4, p. 586, 1917.

ETZIONI, A. Integrins: the molecular glue of life. **Hospital Practice**, v. 35, n. 3, p. 102-110, 2001.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRONE, F. A. Polymerization and sickle cell disease: a molecular view. **Microcirculation**, v. 11, n. 2, p. 115-128, 2004.

FERSTER, A. *et al.* Five years of experience with hydroxyurea in children and young adults with sickle cell disease. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3628-3632, 2001.

FLANAGAN, J. M. *et al.* Assessment of genotoxicity associated with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 698, n. 1, p. 38-42, 2010.

FOLI, A. *et al.* Direct analysis of mitochondrial toxicity of antiretroviral drugs. **Aids**, v. 15, n. 13, p. 1687, 2001.

FRANCO, R. S. *et al.* The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 1073-1076, 2006.

FREITAS, M.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica chimica acta**, v. 649, n. 1, p. 8-23, 2009.

FRENETTE, P. S.; ATWEH, G. F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 4, p. 850, 2007.

FRIEDRISCH, J. R. *et al.* DNA damage in blood leukocytes of individuals with sickle cell disease treated with hydroxyurea. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 649, n. 1, p. 213-220, 2008.

FYRBERG, A. *et al.* Induction of fetal hemoglobin and ABCB1 gene expression in 9- β -D-arabinofuranosylguanine-resistant MOLT-4 cells. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 68, n. 3, p. 583-591, 2011.

GALIZA NETO, G. C.; DA SILVA PITOMBEIRA, M. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 51-56, 2003.

GELPI, A. Migrant populations and the diffusion of the sickle-cell gene. **Annals of Internal Medicine**, v. 79, n. 2, p. 258-264, 1973.

GÓMEZ-CHIARI, M.; PUIGBERT, J. T.; ARAMBURU, J. O. Drepanocitosis: experiencia de un centro. **An Pediatr**, v. 58, n. 2, p. 95-99, 2003.

GONÇALVES, M. S. *et al.* β S-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, n. 10, p. 1283-1288, 2003.

GUEDES, C.; DINIZ, D. Um caso de discriminação genética: o traço falciforme no Brasil. **Revista de Saúde Coletiva**, v. 17, n.3,p. 601-620, 2007.

GUIMARÃES, C. T. L.; COELHO, G. O. A importância do aconselhamento genético na anemia falciforme; The importance of genetic counseling at sickle cell anemia. **Ciência saúde coletiva**, v. 15, n. supl. 1, p. 1733-1740, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press Oxford, v. 3, 2007.

HALSEY, C.; ROBERTS, I. A. G. The role of hydroxyurea in sickle cell disease. **British journal of haematology**, v. 120, n. 2, p. 177-186, 2003.

HANFT, V. N. *et al.* Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3589-3593, 2000.

HARADA, A. *et al.* Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 56, n. 5, p. 559-564, 1994.

HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**, v. 11, n. 2, p. 129-151, 2004.

HEDO, C. *et al.* Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. **Journal of internal medicine**, v. 233, n. 6, p. 467-470, 2009.

HENSON, P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles. **The Journal of Immunology**, v. 107, n. 6, p. 1535-1546, 1971.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, v. 6, n. 5, p. 517, 1910.

_____. Abstract of discussion. **JAMA**, v. 83, p. 1-16, 1924.

HYNES, J. *et al.* Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. **Journal of biomolecular screening**, v. 8, n. 3, p. 264-272, 2003.

HULL, J.; ACKERMAN, H.; ISLES, K.; USEN, S.; PINDER, M.; THOMSON, A.; KWIATKOWSKI, D. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. **American journal of human genetics**, v. 69, n. 2, p. 413-419, 2001.

INGRAM, V. M. Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by fingerprinting. **Biochimica et biophysica acta**, v. 28, n. 3, p. 539, 1958.

INGRAM, V. M. Sickle-Cell Anemia Hemoglobin: The Molecular Biology of the First" Molecular Disease"—The Crucial Importance of Serendipity. **Genetics**, v. 167, n. 1, p. 1-7, 2004.

JOHNSON, K. J.; VARANI, J.; SMOLEN, J. E. Neutrophil activation and function in health and disease. **Immunology series**, v. 57, p. 1, 1992.

JOINER, K. A. *et al.* The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. **The Journal of cell biology**, v. 109, n. 6, p. 2771-2782, 1989.

KALCKMANN, S. *et al.* Racismo Institucional: um desafio para a equidade no SUS. **Saude soc**, v. 16, n. 2, p. 146-155, 2007.

KANG, S. S.; ALLEN, P. M. Priming in the presence of IL-10 results in direct enhancement of CD8+ T cell primary responses and inhibition of secondary responses. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p. 5382-5389, 2005.

KANG, T. *et al.* Functional characterization of MT3-MMP in transfected MDCK cells: progelatinase A activation and tubulogenesis in 3-D collagen lattice. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 15, p. 2559-2568, 2000.

KATO, G. J. *et al.* Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279-2285, 2006.

KING, S. B. Nitric oxide production from hydroxyurea. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 6, p. 737-744, 2004.

KINNEY, T. R. *et al.* Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. **Blood**, v. 94, n. 5, p. 1550-1554, 1999.

KOBAYASHI, Y. The role of chemokines in neutrophil biology. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 2400, 2008.

KUIJPERS, T. W. Clinical symptoms and neutropenia: the balance of neutrophil development, functional activity, and cell death. **European journal of pediatrics**, v. 161, n. 1, p. 75-82, 2002.

KULOZIK, A. *et al.* Geographical survey of β S-globin gene haplotypes: Evidence for an independent Asian origin of the sickle-cell mutation. **American journal of human genetics**, v. 39, n. 2, p. 239, 1986.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 11, p. 1325-1334, 2010.

LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; ALBUQUERQUE, D. M.; SAAD, S. T. *et al.* Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. **Journal Leukocytes Biology** v.85, n.2, p. 235-242, fev. 2009.

LANZKRON, S. *et al.* Evidence-based Review for the NIH Consensus Development Conference on Hydroxyurea for the Treatment of Adults with Sickle Cell Disease. **Annals of internal medicine**, v. 5, 2008.

LAPOUNIÉROULIE, C. *et al.* A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. **Human genetics**, v. 89, n. 3, p. 333-337, 1992.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes–Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology & therapeutics**, v. 111, n. 1, p. 16-26, 2006.

LAURANCE, S. *et al.* Hydroxycarbamide stimulates the production of proinflammatory cytokines by endothelial cells: relevance to sickle cell disease. **Pharmacogenetics and genomics**, v. 20, n. 4, p. 257, 2010.

LEHMANN, H.; MARANJIAN, G.; MOURANT, A. Distribution of sickle-cell haemoglobin in Saudi Arabia. **Nature**, v. 198, p. 492-493, 1963.

LOPES, A.A. **Avaliação da atividade antiinflamatória e antioxidante das cápsulas do extrato seco padronizado e da afrormosina, isoflavonóide, obtidos de *Amburana cearensis*** A C SMITH. 2010. 136 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internações por doença falciforme no Brasil. **Rev saúde pública**, v. 39, n. 6, p. 943-949, 2005.

- LUCISANO, Y.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **The Journal of Immunology**, v. 132, n. 4, p. 2015-2020, 1984.
- LUO, H. R.; LOISON, F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. **American journal of hematology**, v. 83, n. 4, p. 288-295, 2008.
- LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature immunology**, v. 6, n. 12, p. 1182-1190, 2005.
- LYRA, I. M. et al. Clinical, hematological, and molecular characterization of sickle cell anemia pediatric patients from two different cities in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 4, p. 1287-1290, 2005.
- MADER, S. **Inquiry to life**. MacGraw Hill Companies, 8.ed. 1997.
- MAKIS, A.; HATZIMICHAEL, E.; BOURANTAS, K. The role of cytokines in sickle cell disease. **Annals of hematology**, v. 79, n. 8, p. 407-413, 2000.
- MANFREDINI, V. et al. A Fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma**, v. 19, p. 3-6, 2007.
- MARQUES, A. H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, p.27-32, 2007.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.
- MELO, P. R.; ARAÚJO, L. M. M.; DIAS-PENNA, K. G. B.; MESQUITA, M. M.; CASTRO, F. S. A importância do diagnóstico precoce na prevenção das anemias hereditárias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p.149-152, 2006.
- MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. 373p.
- MIGUEL, L. I. **Papel dos mediadores inflamatórios nas propriedades adesivas dos neutrófilos de pacientes com Anemia Falciforme e os efeitos de drogas moduladoras de nucleotídeos cíclicos nesta adesão**. 2010. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)- Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2010.
- MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K. M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, depxinivalenol, and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. **Toxicol In Vitro**. v. 18, p. 21-28, 2004.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOULDING, D. A. *et al.* Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2495-2502, 1998.

NAGATOMI, R. The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function. **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 54-71, 2006.

NAGEL, R. L.; FLEMING, A. F. Genetic epidemiology of the beta s gene. **Baillière's clinical haematology**, v. 5, n. 2, p. 331-365, 1992.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 1, p. 5-22, 2000.

NASCIMENTO-JR, N. M.; MELO, T. R. F. Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Novos Compostos Híbridos para o Tratamento dos Sintomas da Anemia Falciforme. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 6, p. 447-451, 2012.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.

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

NAUSEEF, W. M. The NADPH-dependent oxidase of phagocytes. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, n. 5, p. 373, 1999.

NEEL, J. V. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. **Science (New York, N.Y.)**, v. 110, n.2846, p.64-66, 1949. Disponível em:< <http://europepmc.org/abstract/MED/17774955> .

NUR, E. *et al.* Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **American journal of hematology**, v. 86, n. 6, p. 484-489, 2011.

NUR, E. *et al.* N-acetylcysteine reduces oxidative stress in sickle cell patients. **Annals of hematology**, p. 1-9, 2012.

OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of Inflammatory Diseases. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. R733-R740, 2012.

OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease—a red cell disorder. **Blood reviews**, v. 18, n. 1, p. 65-73, 2004.

_____, I. Leukocyte adhesion and the pathophysiology of sickle cell disease. **Current opinion in hematology**, v. 13, n. 1, p. 40, 2006.

_____, I. New therapies for sickle cell disease. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 19, n. 5, p. 975, 2005.

OZDOGU, H. *et al.* The apoptosis of blood polymorphonuclear leukocytes in sickle cell disease. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 72, n. 4, p. 276-280, 2007.

PAGNIER, J. *et al.* Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 6, p. 1771-1773, 1984.

PALLIS, F. R. **Avaliação funcional dos eosinófilos na anemia falciforme e o efeito do tratamento com hidroxiuréia.** 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)-Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

PANTE-DE-SOUSA, G. *et al.* Origin of the hemoglobin S gene in a northern Brazilian population: the combined effects of slave trade and internal migrations. **Genetics and molecular biology**, v. 21, n. 4, 1998.

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

PEARSON, H. A. The kidney, hepatobiliary system, and spleen in sickle cell anemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 565, n. 1, p. 120-125, 1989.

PELIZARO, B. I. *et al.* Hydroxyurea in the sickle cell anemia: toxicity and effectiveness. **Rev enferm UFPE on line**, v. 6, n. 8, p. 1864-1870, 2012.

PERUTZ, M. F. *et al.* Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5-5Å resolution obtained by x-ray analysis. **Nature**, v.185, p.416-422, 1960

PLATT, O. S. *et al.* Mortality in sickle cell disease--life expectancy and risk factors for early death. **New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 23, p. 1639-1644, 1994.

PLUGBR.NET. Disponível em:<<http://www.plugbr.net/o-sangue-visto-no-microscopio>> Acesso em: 06 jun. 2012.

POWARS, D. *et al.* Pneumococcal septicemia in children with sickle cell anemia. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 245, n. 18, p. 1839-1842, 1981.

QUINN, C. T.; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R. Survival of children with sickle cell disease. **Blood**, v. 103, n. 11, p. 4023-4027, 2004.

RADU, A. S.; LEVI, M. Anticorpos contra o citoplasma de neutrófilos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. Supl 1, p. S16-S20, 2005.

RAMALHO, A. As hemoglobinopatias hereditárias: um problema de saúde pública no Brasil. Ribeirão Preto: Ed. Soc. Bras. **Genética**, 1986.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **British journal of haematology**, v, 156, p. 433-445, 2011.

RENZI, D.; VALTOLINA.; M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi endpoint citotoxicity assay. Italian Culture Meeting. **Alternative to Laboratory Animals**. v.21, p. 86-89, 1993.

RIBEIRO, R. C. M. *et al.* Importância da avaliação da hemoglobina fetal na clínica da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, p. 136-141, 2008.

RODRIGUEZ, G. I. *et al.* A bioavailability and pharmacokinetic study of oral and intravenous hydroxyurea. **Blood**, v. 91, n. 5, p. 1533-1541, 1998.

ROMAN, R. M.; WENDLAND, A. E.; POLANCZYK, C. A. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 1, p. e12-e19, 2008.

RUSANOVA, I. *et al.* Oxidative stress status, clinical outcome, and β -globin gene cluster haplotypes in pediatric patients with sickle cell disease. **European journal of haematology**, v. 85, n. 6, p. 529-537, 2010.

SAUDE.CULTURA. Disponível em: < <http://saude.culturamix.com/doencas/anemia-falciforme-doenca-do-sistema-sanguineo>> Acesso em: 01 jan. 2013.

SALEH, A. *et al.* Cytokines and soluble adhesion molecules in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. **Acta haematologica**, v. 100, n. 1, p. 26-31, 1998.

SALEH, A.; HILLEN, H.; DUIJS, A. Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. **Acta haematologica**, v. 102, n. 1, p. 31-37, 1999.

SALZANO, F. M. Em busca das raízes. **Ciência Hoje**, v. 5, n. 25, p. 49-53, 1986.

SANTOS, J. L. Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 489-490, 2010.

SANTOS, J. L. *et al.* Mutagenic and Genotoxic Effect of Hydroxyurea. **Int J Biomed Sci**, v. 7, p. 263-267, 2011.

SCHNOG, J. *et al.* Sickle cell disease; a general overview. **Neth J Med**, v. 62, n. 10, p. 364-74, 2004.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p.3927-3938, 2008.

SERJEANT, G. R. The emerging understanding of sickle cell disease. **British journal of haematology**, v. 112, n. 1, p. 3-18, 2001.

SILVA, R. B.; RAMALHO, A. S.; CASSORLA, R. A anemia falciforme como problema de saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 1, p. 54-58, 1993.

SILVA, L. B.; GONÇALVES, R. P.; MARTINS, M. F. Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal eo prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, p. 417-20, 2009.

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 2, p. 144-8, 2006.

SOUZA, C. C. **Anemia falciforme: aspectos genéticos e imunológicos associados à IL-8 e ao TNF- α** . 2007. 93f. Dissertação (Mestrado em Imunologia).- Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

STEINBERG, M. H. Management of sickle cell disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 13, p. 1021-1030, 1999.

STEINBERG, M.; NAGEL, R. New and recombinant mutant hemoglobins of biological interest. **Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management**. Cambridge University Press, Cambridge, p. 1195-1211, 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. *et al.* Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 13, p. 1645-1651, 2003.

STEINBERG, M. H. *et al.* The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. **American journal of hematology**, v. 85, n. 6, p. 403-408, 2010.

STEVENS, M. Hydroxyurea: an overview. **Journal of biological regulators and homeostatic agents**, v. 13, n. 3, p. 172, 1999.

STROUSE, J. J. *et al.* Hydroxyurea for sickle cell disease: a systematic review for efficacy and toxicity in children. **Pediatrics**, v. 122, n. 6, p. 1332-1342, 2008.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **The Lancet**, v. 364, n. 9442, p. 1343-1360, 2004.

SUZUKI, T.; CHOW, C. W.; DOWNEY, G. P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 6, p. 1348-1361, 2008.

TURHAN, A. *et al.* Intravenous immune globulin prevents venular vaso-occlusion in sickle cell mice by inhibiting leukocyte adhesion and the interactions between sickle erythrocytes and adherent leukocytes. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2397-2400, 2004.

UNIVERSITY OF COLORADO-ANSCHUTZ MEDICAL CAMPUS. School of medicine. Disponível em: <<http://www.coloradosicklecellcenter.org/SickleCellTraitCourse>> Acesso em: 15 ago. 2012.

VARGAS, A. E. **Expressão gênica e perfil imunogenético de pacientes com anemia falciforme**. 2009, 123f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Programa de

Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEIGA, P. C. *et al.* Serum cytokine profile among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. **Archives of Oral Biology**, 2012. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996912004049>>

WAINSCOAT, J. *et al.* Multiple origins of the sickle mutation: evidence from beta S globin gene cluster polymorphisms. **Molecular biology & medicine**, v. 1, n. 2, p. 191, 1983.

WANG, W.; LUKENS, J. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. **Wintrob's Clinical Hematology**. Philadelphia: Willians and Wilkins, 1999, p. 1346-1397.

WANG, W. C. *et al.* Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). **The Lancet**, v. 377, n. 9778, p. 1663-1672, 2011.

WARE, R. E.; AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. **ASH Education Program Book**, v. 1, p. 62-69, 2009.

WATSON, J.; STARMAN, A. W.; BILELLO, F. P. The significance of the paucity of sickle cells in newborn Negro infants. **The American journal of the medical sciences**, v. 215, n. 4, p. 419-423, 1948.

WEATHERALL, D.; CLEGG, J. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WEISS, D.; KLAUSNER, J. Neutrophil-induced erythrocyte injury: a potential cause of erythrocyte destruction in the anemia associated with inflammatory disease. **Veterinary Pathology Online**, v. 25, n. 6, p. 450-455, 1988.

WEISS, S.; LOBUGLIO, A. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 47, n. 1, p. 5, 1982.

WHO. Hereditary anemias: genetic basis, clinical features, diagnosis and treatment. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 60, n. 5, p. 643-660, 1982. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/6983923> >

WILLIAMS, T. N. *et al.* Negative epistasis between the malaria-protective effects of α -thalassemia and the sickle cell trait. **Nature genetics**, v. 37, n. 11, p. 1253-1257, 2005.

WOOD, K. C.; GRANGER, D. N. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 34, n. 9, p. 926-932, 2007.

WRIGHT, H. L. *et al.* Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1618-1631, 2010.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2004, 1081p.

ZAGO, M. A. Anemia falciforme e doenças falciformes. In: BRASIL. **Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população afro-descendente.**, Brasília: Ministério da Saúde, p. 13-35, 2001.

ZYCHLINSKY, A.; WEINRAUCH, Y.; WEISS, J. Introduction: Forum in immunology on neutrophils. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 5, n. 14, p. 1289, 2003.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: “ESTUDO DE CITOTOXICIDADE, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM NEUTRÓFILOS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME: INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM HIDROXIURÉIA”

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A **anemia falciforme** é uma doença genética (transmitida dos pais para os filhos) que provoca a deformação das células sanguíneas dos pacientes. Esta doença se manifesta com forte anemia e crises dolorosas em vários órgãos. Os indivíduos com esta doença também possuem maior facilidade de adquirir vários tipos de infecções causadas por bactérias e vírus.

A **hidroxiuréia** é o medicamento mais utilizado no tratamento desta doença porque promove a melhora dos sintomas nos pacientes. Apesar disso, não se sabe exatamente como a hidroxiuréia age no organismo, mas acredita-se que também tenha importante papel sobre os neutrófilos, que são um tipo de célula do sangue que está envolvido no desenvolvimento da doença.

O presente estudo pretende investigar a ação deste medicamento sobre os neutrófilos de pacientes com anemia falciforme.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Será coletada uma amostra de sangue. Desta amostra, serão isolados os neutrófilos, e estas células serão utilizadas para análise de testes laboratoriais. Algumas informações sobre outros exames que o paciente tenha feito serão obtidas dos prontuários médicos. O uso do sangue para qualquer outra finalidade é proibido.

Será feito um grupo controle com indivíduos normais (sem a doença), doadores de sangue do hemocentro do Ceará, a fim de comparar os resultados dos testes laboratoriais a serem realizados.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

1. Os participantes desta pesquisa estarão colaborando para o avanço do conhecimento sobre a anemia falciforme, e contribuindo para o desenvolvimento de uma melhor compreensão do tratamento da doença.

2. Investigar possíveis efeitos não benéficos causados pela hidroxiuréia nos neutrófilos dos pacientes;

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

- Realizar uma coleta de sangue, que pode causar dor temporária e/ou vermelhidão no local da coleta.

HÁ A POSSIBILIDADE DESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em 2012. No entanto, é possível que outros fatores relacionados à doença possam vir a ser analisados mais adiante.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE:

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não será revelada nenhuma informação que permita identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa, e sem prejuízo de sua assistência médica.
- D. A divulgação dos resultados será totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes.

Em caso de dúvida, poderá comunicar-se com o pesquisador ALANO MARTINS PEDROSA, que reside na Rua João Sorongo, 55 – apto 101A, Jardim América, Fortaleza-CE. Fone: (0xx85) 8665-4755/, ou pelo endereço da Universidade Federal do Ceará / Faculdade

de Farmácia: Rua Capitão Francisco Pedro, 1210 – Rodolfo Teófilo – CEP 60430-370, Fone: (85) 3366 8058 / 3366 8264.

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC – Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada deste termo.

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinale com um X apenas 1 das opções abaixo:

() Autorizo o uso do material coletado para esta pesquisa.

() Autorizo o uso e estoque do material coletado para esta pesquisa e para a análise de outros fatores que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Nome do paciente: _____

Nome do responsável legal: _____

Assinatura do paciente ou do responsável legal: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Fortaleza, _____ de _____ de 201__.

ANEXO B

FICHA CLÍNICA DE PACIENTES

1. Identificação do Paciente

Nºpront.: _____

Nome completo: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: () M () F

Identidade (nº): _____

Endereço completo: _____

Referência: _____

Cidade: _____ UF: _____

Telefone: _____ Celular: _____

e-mail: _____

Etnia:

() Nenhuma () Branco () Afrodescendente () Índio () Pardo

Deficiência:

() Nenhuma () Auditiva () Visual () Física () Dislexia () Múltipla

2. Diagnóstico

2.1. Data do diagnóstico: _____

2.2. Concentração de HbF ao diagnóstico: _____

2.3. Eletroforese de hemoglobina:

Resultado: _____

2.4. Hemograma:

Obs.: anotar qual a dosagem de HU que estava tomando na época do hemograma

