



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

JÂNIO EMANUEL ANDRADE CAVALCANTE

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS $TNF\alpha$, $IFN\gamma$,
 $TGF\beta$, IL-6 E IL-10 NO PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL DE PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

FORTALEZA

2013

JÂNIO EMANUEL ANDRADE CAVALCANTE

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS TNF α , IFN γ ,
TGF β , IL-6 E IL-10 NO PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL DE PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

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

FORTALEZA

2013

JÂNIO EMANUEL ANDRADE CAVALCANTE

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS TNF α , IFN γ ,
TGF β , IL-6 E IL-10 NO PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL DE PACIENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves (UFC)
Orientadora

Prof. Dr. Jose Ájax Nogueira Queiroz (UFC)
Membro da Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria da Silva Pitombeira (UFC)
Membro da Banca Examinadora

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes (UNIFOR)
Membro da Banca Examinadora

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio Alfredo e Maria Júlia pelo amor, paciência e todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação e aos meus irmãos Breno e Henrique pelo amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o suporte que foi imprescindível para meu ingresso na pós-graduação.

À minha noiva Mariana pelo amor, companheirismo, amizade e carinho.

À minha orientadora profa. Romélia Pinheiro Gonçalves pela paciência, confiança e disposição para contornar os obstáculos que são característicos em toda pesquisa.

Ao prof. Max Victor Carioca Freitas pela disponibilidade e colaboração em várias etapas deste trabalho.

À profa Cristiana Cunha da Frota por ter disponibilizado o Laboratório de Micobactérias para a realização da tipificação dos polimorfismos avaliados neste estudo.

Aos professores da pós-graduação pela dedicação e compromisso com a pesquisa.

Às colegas Carlivânia e Livia Coelho pelo enorme auxílio na tipificação dos polimorfismos e na extração do material genético.

Aos colegas de laboratório Izabel, Paulo, Alano, Darcielle, Liliane, Geane, Maritza, Thaína, Thalita, Thiago, Luana, Marília, Ana, Juliane e Pedro.

Aos amigos Alana, Herene, Sandra, Rafael, Socorro, Luciana e Juracy.

Às amigas e colegas de corrida Vitória Régia e Silviane Praciano por ter me dado valiosos conselhos e ter influenciado de forma direta e indireta na elaboração desta dissertação.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é causada por uma mutação pontual que leva a substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia de beta globina. A associação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) e diversos eventos clínicos tem sido descrita em pacientes com AF. O objetivo do presente estudo foi verificar a frequência dos polimorfismos nos genes das citocinas TNF α , IFN γ , TGF β , IL-6, e IL-10 nos pacientes com AF e controles saudáveis, e investigar o impacto dos genótipos dessas citocinas no perfil clínico-laboratorial dos pacientes. 41 indivíduos adultos com diagnóstico molecular de AF, de ambos os sexos, em acompanhamento ambulatorial no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) participaram do estudo, no período de março de 2011 a julho de 2012. Um grupo controle foi constituído por 90 indivíduos saudáveis pareados quanto à idade e o sexo. Foram coletados 5 mL de sangue venoso para extração do DNA através do kit GFX Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare) e para tipificação dos polimorfismos dos genes das citocinas através do “kit” da “One-Lambda” (Canoga Park, CA, EUA). A análise das frequências dos polimorfismos e as associações com os eventos clínicos foram realizadas pelo teste exato de Fisher bicaudal. Para verificar a influência dos genótipos nos parâmetros laboratoriais foram utilizados o teste paramétrico ANOVA e o não paramétrico de Kruskal Wallis. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos por busca ativa nos prontuários médicos. Pacientes com AF tipificados para os genótipos de TGF β CC GC/ CC CC /TT CC/TC CC (baixo produtor) obtiveram um número mediano de leucócitos maior do que os pacientes do grupo TT GG/TC GG (alto produtor). Houve diferença significativa na frequência dos genótipos de IL-6 entre o grupo de pacientes e o grupo controle. Ainda em relação a IL-6, os pacientes tipificados para o genótipo CC apresentaram valores médios/medianos de CHCM maiores que os pacientes portadores dos genótipos GC ou GG. Foi evidenciada tendência dos pacientes tipificados para o genótipo C/C apresentarem menores níveis de hemoglobina fetal (HbF) e maiores porcentagens de reticulócitos. Houve uma associação entre o grupo de genótipos de IL-10 ACC ATA + ATA ATA + ACC ACC, grupo baixo produtor de IL-10, e a síndrome torácica aguda (STA). Conclui-se que genótipos associados com a baixa produção de IL-10 possam desempenhar um papel importante na predisposição à STA em adultos com AF. Se confirmado esse resultado, a análise de genótipos em genes de citocinas pode contribuir na prevenção de STA na AF.

Palavras-chave: Anemia falciforme. Citocinas. Polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is caused by a point mutation leading the substitution of glutamic acid for valine at the sixth position of the beta globin chain. Associations between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and several clinical events have been described in sickle cell patients. The aim of this study was to determine the polymorphisms frequency in the cytokine genes TNF α , IFN γ , TGF β , IL-6 e IL-10 in sickle cell patients and healthy controls, and to investigate the cytokines genotypes influence in clinical and laboratory profile in sickle cell patients. The sickle cell patients group was composed by 41 adults' patients with molecular diagnosis, of both sexes, in outpatients care at the Hematology Center of Ceará (HEMOCE), from march 2011 to july 2012. The study included 90 healthy blood donors matched for age and sex. We collected 5 mL of venous blood for DNA extraction kit using the GFX Genomic Blood DNA Purification (GE Healthcare) and typing of cytokine genes polymorphisms by kit from One-Lambda (Canoga Park, CA, USA). The polymorphisms frequencies analysis and associations between polymorphisms and clinical events were performed using the two-tailed Fisher exact test. To check the genotypes influence in laboratory parameters were used parametric test ANOVA and non-parametric Kruskal Wallis test. The clinical and laboratory data were obtained by active search in the medical records. Sickle cell patients typified for TGF β genotypes showed a tendency to appear a lower frequency of TGF β T/T G/G genotype than control group. Sickle cell patients typified for CC GC/ CC CC /TT CC/TC CC TGF β genotypes (low producer) obtained a leukocytes median number greater than patients typified for TT GG/TC GG TGF β group (high producer). A significant difference on IL-6 genotypes frequency was observed between patient group and control group. Regarding IL-6, patients typified for CC genotype exhibited an average/median MCHC higher than patients typified for GC or GG genotypes. Patients typified for CC genotype showed evident tendency to lower fetal hemoglobin levels and higher reticulocytes percentages. We find an association between ACC ATA + ATA ATA + ACC ACC IL-10 group, lower IL-10 producer, and acute chest syndrome (ACS). It is concluded that genotypes associated with low IL-10 production may play a role in the predisposition to ACS in sickle cell patients. If confirmed this result, the analysis of genotypes in cytokine genes can contribute to the prevention of ACS in sickle cell patients.

Keywords: Sickle cell anemia. Cytokine. Genetic polymorphisms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Região de origem e abrangência dos quatro principais haplótipos β s africanos e um asiático	20
Figura 2 – Células produtoras, alvos e efeitos das principais citocinas relacionadas à resposta imune.....	24
Figura 3 – Localização de polimorfismos únicos de nucleotíós nos alelos 1 (A) e 2 (T) de um cromossomo	25
Figura 4 – Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) e diferentes fenótipos na anemia falciforme e em que população os polimorfismos foram descritos.....	26
Figura 5 – Visualização das bandas através da eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando o controle interno de amplificação de 440 pb (β -globina) e os genótipos	35
Figura 6 – <i>Boxplot</i> dos parâmetros hematológicos para cada genótipo de TNF α -308 em pacientes com anemia falciforme.....	38
Figura 7 – <i>Boxplot</i> dos parâmetros hematológicos para cada grupo de genótipo de TGF β em pacientes com anemia falciforme.....	41
Figura 8 – <i>Boxplot</i> dos parâmetros hematológicos para cada genótipo de IFN γ em pacientes com anemia falciforme.....	44
Figura 9 – <i>Boxplot</i> dos parâmetros hematológicos para cada grupo genótipos de IL-6 em pacientes com anemia falciforme.....	46
Figura 10 – <i>Boxplot</i> dos parâmetros hematológicos para cada grupo genótipos de IL-10 em pacientes com anemia falciforme.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com características demográficas	37
Tabela 2 –	Frequência dos genótipos de TNF α -308 em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle	38
Tabela 3 –	Frequência dos genótipos de TNF α -308 em pacientes com anemia falciforme de acordo com eventos clínicos	39
Tabela 4 –	Frequência dos genótipos de TGF β em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle	40
Tabela 5 –	Frequência dos grupos de genótipos de TGF β em pacientes com anemia falciforme de acordo com eventos clínicos	42
Tabela 6 –	Frequência dos genótipos de IFN γ em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle	43
Tabela 7 –	Frequência dos genótipos de IFN γ em pacientes com anemia falciforme de acordo com eventos clínicos	45
Tabela 8 –	Frequência dos genótipos de IL-6 em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle	46
Tabela 9 –	Frequência dos genótipos de IL-6 em pacientes com anemia falciforme de acordo com os eventos clínicos	48
Tabela 10 –	Frequência dos genótipos de IL-10 em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle	49
Tabela 11 –	Frequência dos genótipos de IL-10 em pacientes com anemia falciforme de acordo com eventos clínicos	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AF	Anemia falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
BMP	“Bone morphogenetic protein”
C	Citosina
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<u>fL</u>	Fentolitro
g	Gramma
G	Guanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias Granulócito-Macrófago
Hb	Hemoglobina
HbF	Hemoglobina fetal
<u>HbS</u>	Hemoglobina S
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará
HU	Hidroxiureia
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídeo
ICAM-1	“Intercellular adhesion molecule” 1
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LHGDH	Laboratório de Hemoglobinopatias e genética das Doenças Hematológicas
L	Litro
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mA	Miliampere
NFkB	“Nuclear Factor kappa beta”
NFATc2	“Nuclear Factor of activated T cells cytoplasmic” 2
PAF	Fator ativador de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
SNP	Polimorfismos de nucleotídeos únicos

T	Timina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato -EDTA
TGF	“Transforming growth factor”
Th	T “helper”
TNF	“Tumoral necrosis fator”
UV	Ultravioleta
V	Volt
VCAM-1	“Vascular cell adhesion molecule” 1
VCM	Volume corpuscular médio
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	A hemoglobina	14
1.2	A hemoglobina S	15
1.2.1	<i>Epidemiologia da Hb S</i>	15
1.3	Fisiopatologia da anemia falciforme (AF)	16
1.4	Fatores moduladores da anemia falciforme	17
1.5	Citocinas	21
1.6	Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes codificadores de citocinas	24
1.6.1	<i>Polimorfismos de nucleotídeos únicos e anemia falciforme</i>	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1	Desenho do estudo	30
3.2	Casuística	30
3.3	Local do estudo	31
3.4	Seleção da amostra	31
3.4.1	<i>Crítérios de inclusão</i>	31
3.4.2	<i>Crítérios de exclusão</i>	31
3.5	Material biológico	31
3.6	Dados clínicos e laboratoriais	32
3.6.1	<i>Definição das variáveis avaliadas</i>	32
3.6.1.1	<i>Variáveis demográficas</i>	32

3.6.1.2	<i>Variáveis clínicas</i>	32
3.6.1.3	<i>Variáveis laboratoriais</i>	32
3.7	Polimorfismo no gene das citocinas	33
3.7.1	<i>Extração do DNA</i>	33
3.7.2	<i>Tipificação dos polimorfismos das citocinas TNFα, TGFβ, IFNγ, IL-6 e IL-10</i>	33
3.7.3	<i>Análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose</i>	34
3.7.4	<i>Interpretação dos resultados</i>	34
3.8	Análise estatística	35
3.9	Considerações éticas	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Caracterização da população estudada	37
4.2	TNFα -308	37
4.3	TGFβ códon 10 e códon 25	40
4.4	IFNγ +874	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 A hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma proteína de estrutura globular quaternária composta por quatro cadeias polipeptídicas - cadeias globínicas - e um grupo prostético (grupo heme), formado por quatro grupos pirrólicos, unidos entre si por radicais metanílicos, contendo ferro (PERUTZ *et al.*, 1960; STEINBERG; BRUGNARA, 2003).

Durante o desenvolvimento humano, são encontrados seis tipos diferentes de hemoglobina. Na fase embrionária, as hemoglobinas expressas são: *Gower 1*, *Gower 2* e *Portland* que são substituídas pela hemoglobina fetal (HbF) no início da fase fetal. Em seguida, ocorre síntese da hemoglobina A (HbA), compensando a diminuição da HbF à medida que se aproxima o nascimento. A concentração da HbF é aproximadamente 60% logo após o nascimento, contudo, ao longo dos seis primeiros meses, a HbA passa a predominar. Nos adultos normais, a concentração de HbF varia de 0 a 1% (LAVELLE, 2004; FATHALLAH; ATWEH, 2006; MOREIRA *et al.*, 2008).

De acordo com suas similaridades genéticas e estruturais, as cadeias globínicas têm sido agrupadas considerando-se a síntese multigênica específica para as cadeias tipo alfa (α) e beta (β) (WAGENER *et al.*, 2001; OKPALA, 2004). Com uma extensão superior a 60kb, o gene da betaglobina está localizado na região cromossômica 11p15.5. Nesta região, estão presentes os genes epsilon ϵ , gama glicina γ G, gama adenina γ A, um pseudogene e os genes delta δ e beta β (MOHANDAS; EVANS, 1989). Na região cromossômica 16p13, está localizado o gene da alfa globina, num segmento de DNA de 35 kb. Neste segmento estão localizados os genes zeta ζ , dois pseudogenes, e os genes alfa 1 (α 1) e alfa 2 (α 2). Estes genes duplicados codificam as cadeias globínicas alfa (McCURDY; SHERMAN, 1978).

A principal função da hemoglobina é realizar o transporte de oxigênio dos pulmões até os tecidos, sendo este possível devido à capacidade dos átomos de ferro da hemoglobina de se combinarem reversivelmente com o oxigênio molecular (NAUM, 1996, WAGENER *et al.*, 2001; STEINBERG; BRUGNARA, 2003; OKPALA, 2004).

1.2 A hemoglobina S

De acordo com o *Globin Gene Server* foram descritas 1.149 hemoglobinas variantes até março de 2012. A hemoglobina variante mais frequente no mundo é a hemoglobina S (HbS), causada por uma mutação no gene da betaglobina. Neste caso, ocorre à substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para o GTC, no gene da globina beta S, o que resulta na troca do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na sexta posição da globina beta. Esta mutação pontual dá origem a hemoglobina S, que é anormal e, sob determinadas condições, pode sofrer um processo denominado de polimerização, sendo responsável pela fisiopatologia das doenças falciformes (WAGENER et al., 2001).

1.2.1 Epidemiologia da HbS

Na África, Oriente Médio, países do Mediterrâneo e Índia, o gene β_s , gene com mutação pontual que leva a formação da hemoglobina S, é amplamente encontrado, sendo que a disseminação deste gene vem ocorrendo através de movimentos migratórios (DAVIES, 1997).

O gene β_s está presente em aproximadamente 7% da população mundial (WEATHERALL; CLEGG, 2001; MODELL; DARLISON, 2008). Na América Latina, o gene β_s está presente em 8% dos indivíduos afrodescendentes. Nos Estados Unidos, a cada 800 crianças afrodescendentes, uma é portadora do gene β_s (LOREY et al., 1996).

No Brasil, entre os recém-nascidos vivos, figuram anualmente cerca de 3.500 crianças com doença falciforme e 200.000 com traço falciforme. No estado da Bahia, onde há uma alta prevalência da doença, a cada 650 nascidos vivos, um apresenta anemia falciforme e, a cada 17 nascidos vivos, um é portador de traço falciforme (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Em Fortaleza, Pinheiro e colaboradores (2006) encontraram uma prevalência de 4,1% de recém-nascidos portadores de HbS, examinando 389 amostras de cordão umbilical com emprego de eletroforese por cromatografia líquida de alta eficiência.

1.3 Fisiopatologia da anemia falciforme (AF)

A desoxigenação da hemoglobina S acarreta a formação de polímeros devido à troca do ácido glutâmico pela valina, o que leva a uma interação hidrofóbica entre moléculas de hemoglobina. Este consiste no evento fundamental da patogênese molecular da AF, causando distorção na forma da hemácia e acentuada diminuição na sua deformabilidade (BUNN, 1997).

O processo de falcização ocorre quando a oxi-hemoglobina S perde o oxigênio e forma a deoxi-HbS. Assim formam-se pontes de hidrogênio entre os aminoácidos valina da posição 1 da β s-globina e a valina mutante que substitui o ácido glutâmico da posição 6 da mesma globina. A estrutura espacial da molécula de HbS é modificada por esta substituição que promove contatos intermoleculares com outros aminoácidos da β s-globina (NAOUM, 2000). Uma vez tendo sido reestabelecidas as condições físico-químicas, a HbS torna-se solúvel novamente. Porém, devido ao dano irreversível à membrana, células irreversivelmente falcizadas não retornam à forma normal mesmo quando reoxigenadas (STUART; NAGEL, 2004).

A homeostase de cátions é prejudicada em células falcizadas e, com o aumento do efluxo de água e potássio, sua densidade é aumentada (BRUGNARA *et al.*, 1989; BRUGNARA, 2003).

A forma falcizada da HbS é um dos fatores responsáveis pela obstrução da microvasculatura, resultando em crise vaso-oclusiva (STUART; NAGEL, 2004). Os episódios de vaso-oclusão são frequentes na AF contribuindo para elevadas taxas de morbidade e mortalidade da doença (ROSSE *et al.*, 2000).

Desde a descrição da AF como uma entidade clínica há quase um século, investigações sobre os episódios vaso-oclusivos têm sido dinâmicas e variadas, levando à delimitação de um processo complexo, acompanhado de interações entre hemácias, leucócitos, endotélio, proteínas plasmáticas e plaquetas (FRENETTE; ATWED, 2007). A vasculopatia observada em pacientes com AF é induzida por vários fatores, tais como células falcizadas, componentes gerados dos processos hemolíticos e inflamatórios, lesão de isquemia-reperfusão, aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e diminuição da disponibilidade do óxido nítrico (NO) (OKPALA, 2004; MADIGAN; MALIK, 2006).

O dano ao endotélio vascular é um fato de extrema relevância na fisiopatologia na AF. A expressão anormal de proteínas como a anquirina, banda 3, espectrina e CD36 foi

observada em reticulócitos falcêmicos, assim como moléculas que promovem o aumento da adesão ao endotélio como o fator de von Willebrand, trombospodina, fibronectina, integrina $\alpha_5\beta_3$, VCAM-1, ICAM-1, e E-selectina (SOLOVEY *et al.*, 1997; HARLAN, 2000; HEBBEL *et al.*, 2004). Adicionalmente, a fosfatidilserina, molécula de adesão presente em maior quantidade na parte interna da membrana das hemácias normais, está expressa na membrana das hemácias na forma falcizada. Esta expressão confere as hemácias com forma falcizada um potencial de adesão celular três vezes maior que hemácias normais contribuindo para os fenômenos vaso-oclusivos na anemia falciforme (HEBBEL, 1997; FRENETTE; ATWEH, 2007).

O processo inflamatório, a adesão leucocitária ao endotélio vascular e a subsequente injúria endotelial contribuem para a patogênese da anemia falciforme (CHIANG; FRENETTE, 2005). A oclusão da microcirculação associada a processos infecciosos recorrentes são importantes fatores que estimulam o aumento dos produtos do estresse oxidativo, de citocinas e proteínas de fase aguda (TURHAN *et al.*, 2002).

1.4 Fatores moduladores da anemia falciforme

O curso clínico de pacientes com AF é caracteristicamente variável. Complicações devido à anemia hemolítica e a episódios vaso-oclusivos podem resultar lesões a vários órgãos. A concentração de Hb Fetal, α -talassemia, e haplótipos do “cluster” do gene da β -globina são alguns dos moduladores genéticos descritos na literatura (CHARACHE *et al.*, 1995; THOMAS *et al.*, 1997; STEINBERG, 2009). No entanto, estudos vêm demonstrando que outros fatores genéticos e ambientais possam explicar discrepância entre o fenótipo com os fatores acima definidos (BALDWIN *et al.*, 2005; ASHLEY-KOCH *et al.*, 2008). Trabalhos têm verificado que as comorbidades frequentes na AF como a hipertensão pulmonar, úlceras de pernas, priapismo e acidente vascular cerebral (AVC) estão associados com a intensidade da hemólise intravascular. As crises álgicas, síndrome torácica aguda (STA) e osteonecrose estão associadas com episódios de vaso-oclusão e com a elevada viscosidade sanguínea (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; TAYLOR *et al.*, 2008).

A α -talassemia reduz a concentração de HbS e, portanto, a polimerização da HbS. Logo, pacientes com AF e α -talassemia concomitante apresentam menor grau de hemólise, menor VCM e baixa contagem de reticulócitos. O mecanismo se deve ao fato de a redução da concentração de HbS diminuir a densidade do eritrócito e aumentar a meia vida do mesmo,

consequentemente, reduzindo o processo hemolítico. Assim, espera-se que haja uma redução de eventos decorrentes da hemólise, incluindo AVC, úlcera de pernas, priapismo e hipertensão pulmonar. No entanto, eventos associados com a viscosidade sanguínea, como crises algicas, síndrome torácica aguda e necrose avascular do fêmur ocorrem com maior frequência quando a α -talassemia coexiste com a AF (SERJEANT, 1995; THOMAS; HIGGS; SERJEANT, 1997).

A HbF é o principal modulador da apresentação clínica na AF, por inibir a polimerização da HbS (ADEKILE; HUISMAN, 1993). Ensaios observacionais têm sugerido que o aumento na concentração da HbF está associado com a redução da gravidade de fenótipos característicos em pacientes com AF (CHARACHE, 1990; CHARACHE *et al.*, 1995; STEINBERG *et al.*, 2003). A hidroxiuréia (HU) tem sido a única opção de tratamento na AF, tendo como finalidade promover o aumento dos níveis de HbF (CHARACHE *et al.*, 1987; RODGERS, 1992; EL-HAZMI *et al.*, 1992; CHARACHE, 1994). A HU é uma droga que inibe a redutase ribonucleotídico sendo utilizada no tratamento de doenças mieloproliferativas. Após a demonstração de que a HU aumentava a produção de HbF em babuínos, o uso de HU foi testado em adultos com AF (CHARACHE *et al.*, 1992). Steinberg *et al.* (2003) observaram uma redução de 40% da mortalidade em um ensaio clínico com a participação de 299 pacientes com AF, em uso de HU quando comparados a um grupo controle. Neste estudo, a mortalidade acumulada em 9 anos foi de 28% nos pacientes com níveis de HbF inferiores a 0,5% após o seguimento ser completado, e em pacientes com níveis de HbF iguais ou superiores a 0,5 % a mortalidade foi de 15%.

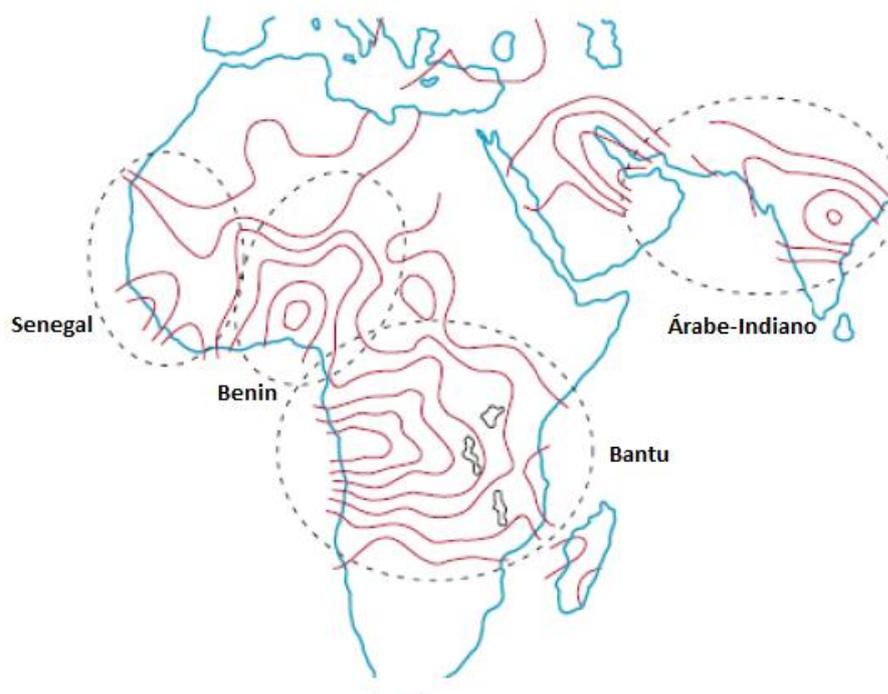
A redução da taxa de crises algicas em pacientes com AF em uso de HU foi observada por Charache *et al.* (1995). A média de crises foi de 2,5 crises por ano no grupo em uso de HU contra 4,5 crises por ano no grupo placebo, sendo que o tempo médio para o início da crise foi de 3 meses no grupo controle e de 1,5 meses no placebo. A HU age reduzindo a expressão da molécula VCAM-1 solúvel, consequentemente reduzindo a adesão de hemácias falcizadas ao endotélio vascular (BRIDGES *et al.*, 1996; SALEH *et al.*, 1999). A HU exerce um aumento no teor de água e na deformabilidade das hemácias, na capacidade das hemácias falcizadas fluírem pela microvasculatura e altera a capacidade das hemácias aderirem ao endotélio (ALIYU; TUMBLIN; KATO, 2006).

Outro importante modulador da AF são os haplótipos que podem ser definidos como padrões de vários polimorfismos no DNA ao longo de uma região de um cromossomo. Os haplótipos podem ser utilizados como marcadores para migração de populações em estudos

antropológicos e para detectar “distâncias” genéticas entre os principais grupos étnicos em estudos sobre a origem da raça humana. Haplótipos específicos são encontrados nos cromossomos de portadores do alelo β_s (NAGEL; RANNEY, 1990).

Os haplótipos β_s são definidos pela variação de sequências de DNA no agrupamento de genes da β -globina – cerca de 60 Kb no cromossomo 11 (PAGNIER *et al.*, 1984) – que alteram o sítio de reconhecimento de endonucleases de restrição (STUART; NAGEL, 2004). A nomeação destes haplótipos é baseada de acordo com a região geográfica em que predominam e são usados para definir a provável região onde teve origem a mutação. Os haplótipos podem ser classificados em cinco diferentes tipos: Bantu ou Republica Central Africana (CAR – Central African Republic), associado às regiões centro-sul e leste do continente africano; Benin (Ben), associado à região centro-oeste africana; Senegal (Sen), associado ao oeste atlântico africano; Camarões (Cam), associado às regiões ao longo da costa oeste da África (PAGNIER *et al.*, 1984) e Árabe-Indiano, predominante na Arábia Saudita, Bahrein, Kuwait, Omã e Índia (Figura 1) (STUART; NAGEL, 2004).

Figura 1 – Região de origem e abrangência dos quatro principais haplótipos β_s africanos e um asiático.



Fonte: Adaptado de Stuart e Nagel, 2004.

A diversidade clínica de pacientes com AF parece estar relacionada com os haplótipos β s. Maiores níveis de HbF são observados em pacientes portadores dos haplótipos Senegal ou Árabe-Indiano, apresentando um curso clínico menos grave. Menores níveis de HbF e um curso clínico mais grave são observados em portadores do haplótipo CAR (Bantu). Portadores do haplótipo Benin e Camarões, geralmente, apresentam características clínicas intermediárias (POWERS, 1991; POWERS; HITI, 1993; ASHLEY-KOCH *et al.*, 2000; ADEKILE, 2005; STEINBERG, 2005; RUND; FUCHAROEN, 2008; STEINBERG, 2009).

Os níveis de HbF, a α -talassemia e os haplótipos β s são importantes moduladores da AF, porém não podem explicar completamente a diversidade clínica e laboratorial observada na doença. Polimorfismos genéticos podem afetar a patogênese e os fenótipos desta enfermidade, pois estas alterações genéticas podem interferir em importantes eventos fisiopatológicos da AF (STEINBERG, 2009).

1.5 Citocinas

Citocinas são importantes moléculas efetoras e reguladoras da resposta imunológica (GOSAIN e GAMELLI, 2005) podendo ser classificadas por diferentes padrões de acordo com a sua função, sendo uma divisão comum a baseada no paradigma T *helper* tipo 1/T *helper* tipo 2, descrito pela primeira vez por Mosmann e colaboradores (1986).

Os dois maiores subtipos de células T CD4⁺, Th1 e Th2, apresentam diferença no padrão de produção de citocinas e exercem diferentes funções na resposta imunológica. Células Th1 murinas secretam interleucinas (IL-2, IFN γ e TNF α/β) que direcionam para uma resposta imunológica do tipo inflamatória contra patógenos intracelulares (MOSNANN *et al.*, 1986; RAGHUPATHY, 2001). Por outro lado, os linfócitos Th2 secretam citocinas (IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13) que medeiam uma defesa humoral, antiinflamatória, estimulando a produção de anticorpos contra antígenos extracelulares e inibindo as funções macrofágicas (RAGHUPATHY, 2001).

O paradigma entre os linfócitos Th1/Th2 é amplamente estudado por pesquisadores por anos, porém bastante complexo. O IFN γ e a IL-4 são os dois principais antagonistas destas classes de citocinas que representam dois tipos distintos de reações imunológicas, contrabalanceando um ao outro (GUSTAFSSON, 2007). A IL-10 é um produto das células Th2 que inibe o desenvolvimento das células Th1, enquanto que o IFN γ , um produto das células Th1 inibe a ativação das células Th2 (RAGHUPATHY, 2001).

Os perfis de resposta imunológica Th1 ou Th2 todavia não são únicos. Outros padrões de resposta imunológica diferentes do Th1 e Th2 têm sido descrito, tais como o padrão de resposta tipo Th3 e Tr1 (BORREGO *et al.*, 2007). O perfil de citocinas secretadas pelas células Th3 é composto por TGF β , IL-4 e IL-10, já as células Tr (reguladoras)1 secretam níveis elevados de IL-10, IFN γ , TGF β e IL-5, baixos níveis de IL-2 e não secretam IL-4 (LAN *et al.*, 2005).

O TGF β , além de suprimir a proliferação das células T, inibe as funções das células T efetoras e a diferenciação destas células em células Th1 ou Th2 efetoras em cultura de tecidos (GORELIK *et al.*, 2002). O TGF β é importante para a indução de células produtoras de IL-17 sob condições inflamatórias (MANGAN *et al.*, 2006; WEAVER *et al.*, 2006).

As células Th17 fazem parte de um perfil que produz IL-17 e IL-22 (LIANG *et al.*, 2006), atuando principalmente contra bactérias extracelulares e fungos. Entretanto,

possivelmente, estão relacionadas com a patogênese de diversas doenças autoimunes, inflamatórias e alérgicas, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, doença de Crohn, colite e asma (ONISHI; GAFFEN, 2010). A diferenciação das células Th17 é induzida pela ação concomitante do TGF β e IL-6, e possivelmente IL-1 β . A IL-23 atua na amplificação (células T de memória) e estabilização do fenótipo Th17 das células efetoras que passam a produzir principalmente IL-17, IL-21 e IL-22 (ROMAGNANI, 2008; AWASTHI; KUCHROO, 2009; ONISHI; GAFFEN, 2010).

O TNF α é uma citocina sintetizada como proteína de membrana que necessita ser clivada para produzir sua forma solúvel. Macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, linfócitos natural killer (NK), B e T são os principais produtores de TNF α (ANDERSON; NAKADA; DEWITTE, 2004).

Uma potente citocina pró-inflamatória e imunoregulatória envolvida na iniciação e regulação da resposta inflamatória (MAKHATADZE, 1998), o TNF α apresenta funções biológicas variadas e complexas, visto que tanto a resistência a doenças como complicações patológicas podem ser conferidas por esta citocina. Tanto a proliferação celular regulada pelo NF κ B, como o efeito apoptótico ligado a c-jun N-terminal kinase (JNK) podem ser reguladas pelo TNF α (AMANULLAH *et al.*, 2003).

A produção local desta citocina é benéfica em situações agudas, pois promove o aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular permitindo que, em particular, neutrófilos e macrófagos migrem para sítios apresentando dano tissular e infecção (BARBARA; VAN OSTADE; LOPEZ, 1996).

No entanto, o TNF α pode desempenhar um papel prejudicial, pois o choque tóxico induzido por endotoxinas bacterianas está associado com altos níveis de TNF α (TRACEY *et al.*, 1986). Esta citocina induz também a produção de IL-1 e IL-6 que desencadeiam febre, sonolência e liberação de glicocorticóides (HERMANN *et al.*, 1998).

O IFN γ é uma citocina que estimula macrófagos induzindo mecanismos antimicrobianos e antitumorais, bem como as vias de processamento e apresentação de antígenos. Além disso, orquestra a atração de leucócitos e direciona o crescimento, a maturação e a diferenciação de vários tipos celulares (YOUNG; HARDY, 1995; BOEHM *et al.*, 1997).

O $\text{IFN}\gamma$ é o principal produto de células Th1 e inclina a resposta imune para o fenótipo Th1, pois promove mecanismos efetores como: imunidade mediada por células inatas, imunidade citotóxica específica, e ativação de macrófagos (BOEHM *et al.*, 1997).

TGF β é uma citocina pleiotrópica que influencia vários tipos celulares (KIM *et al.*, 2005). No entanto, atua no sistema imune como uma citocina regulatória (HORWITZ *et al.*, 2008). O TGF β é membro da superfamília TGF β que inclui activinas, inibinas, fatores de crescimento e diferenciação, e proteína morfogenética óssea. TGF β 1 e suas isoformas (TGF β 2 e TGF β 3) são sintetizadas por várias células e secretadas como precursores latentes complexadas com uma proteína de ligação de TGF β latente (LTBP) (ROBERTS, 1998).

Componentes da imunidade adaptativa e da imunidade inata são regulados pelo TGF β (GORELIK; CONSTANT; FLAVELL, 2002; LAOUAR *et al.*, 2005). A inibição da função de células inflamatórias e a promoção da função de células T regulatórias são duas vias pelas quais o TGF β regula a resposta imune (LI *et al.*, 2006).

A IL-6 apresenta uma variedade de efeitos biológicos, pois esta citocina pleiotrópica atua na regulação imune, hematopoiese, inflamação e oncogenese. Esta citocina é sintetizada por macrófagos, células dendríticas, células B, células endoteliais, astrócitos e fibroblastos em resposta a estímulos como TNF α , IL-1 β , fator derivado de plaquetas, ou componentes fúngicos e bacterianos (KISHIMOTO, 2005).

A IL-6 promove a diferenciação das células T efectoras em células Th2 através da supra regulação do NFATc2 e do c-maf e inibe a diferenciação das células Th1 ao bloquear a sinalização do $\text{IFN}\gamma$. Na presença do TGF β , a IL-6 atua na diferenciação das células Th17 através de uma supra-regulação mediada pelo STAT3 (DIEHL; RINCON, 2002; MANGAN *et al.*, 2006; VELDHONEN *et al.*, 2006)

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que previne doenças inflamatórias e autoimunes (HAWRYLOWICZ; O'GARRA, 2005; O'GARRA *et al.*, 2008). A IL-10 foi inicialmente descrita como um produto das células Th2 que atua suprimindo a síntese de citocinas das células Th1 (FIORENTINO *et al.*, 1989). A IL-10 é produzida por macrófagos, células dendríticas, células B, e vários subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (MOORE *et al.*, 2001; KAMANAKA *et al.*, 2006).

A IL-10 atua diretamente nas células T CD4⁺ inibindo a proliferação e produção de IL-2, IFN γ , IL-4, IL-5 e TNF α . Desta forma, tanto a resposta imune inata como a adaptativa pode ser regulada pela IL-10, já que esta citocina limita a ativação e diferenciação das células T nos linfonodos e suprime as respostas pró-inflamatórias nos tecidos (SCHANDENE *et al.*, 1994; JOSS *et al.*, 2000).

Figura 2 – Células produtoras, alvos e efeitos das principais citocinas relacionadas à resposta imune.

Citocina	Células produtoras	Alvos e efeitos
1. Citocinas relacionadas à resposta imune inata		
TNF- α	Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Vasculatura (inflamação); fígado (indução de proteínas de fase aguda); caquexia; morte celular; ativação de neutrófilos
IL-6*	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Fígado (induz proteínas de fase aguda), promove proliferação de células B e secreção de anticorpos, inibe diferenciação de células Treg
2. Citocinas relacionadas à resposta imune adaptativa		
IFN- γ	Células Th1, células T CD8+, células NK	Ativa macrófagos, induz a expressão de MHC classe I e classe II, aumenta apresentação de antígenos
IL-10	Macrófagos, células dendríticas, linfócitos Treg	Inibe proliferação de células Th1
TGF- β	Células T, macrófagos, fibroblastos	Inibe proliferação de células T e B, inibe ativação de macrófagos, promove mudança de classe de anticorpos para IgE e diferenciação de células Treg

Fonte: Adaptada de Goldsby et al., 2000

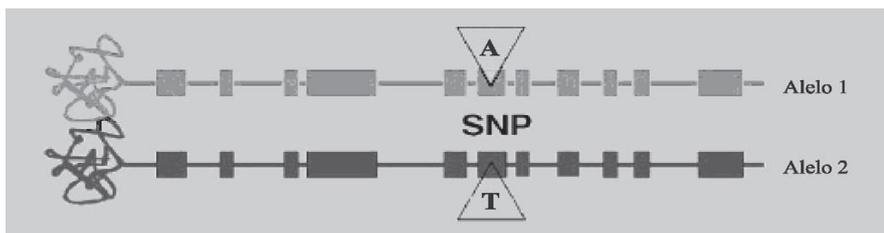
1.6 Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes codificadores de citocinas

Dentro de uma espécie, cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (*loci*) a sequência do DNA pode variar. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004).

Os tipos de polimorfismos mais comuns incluem segmentos repetidos “in tandem” (nucleotídios de mini e microsátélites), deleções/inserções/duplicações de segmentos pequenos ou grandes (variantes do número de cópias) e polimorfismos de nucleotídios únicos (CHORLEY *et al.*, 2008). Polimorfismos de nucleotídios únicos (SNPs) são sítios do genoma nos quais a sequência de DNA de uma porcentagem de indivíduos da população difere por uma única base

(DE NARDIN, 2009) (Figura 2), sendo o tipo de variação mais comum no genoma humano (COLLINS *et al.*, 1997).

Figura 3 - Localização de polimorfismos únicos de nucleotídeos nos alelos 1 (A) e 2 (T) de um cromossomo.



Fonte: Adaptado de VISENTAINER *et al.*, 2008.

De acordo com a base de dados de SNPs do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), mais de 11 milhões de SNPs já foram identificados na população humana, porém a maioria dos polimorfismos comuns tem pouca relevância sobre a saúde do homem. Contudo, recentes evidências sugerem que a susceptibilidade a doenças podem ser influenciadas pelos SNPs (CHORLEY *et al.*, 2008).

O estudo de polimorfismos em genes de citocinas visa um melhor entendimento da etiologia e patogenia de doenças humanas, identificando marcadores potenciais de susceptibilidade e severidade, alvos para intervenção terapêutica e novas estratégias para prevenção de doenças (BIDWELL *et al.*, 1999; KUBISTOVA *et al.*, 2009).

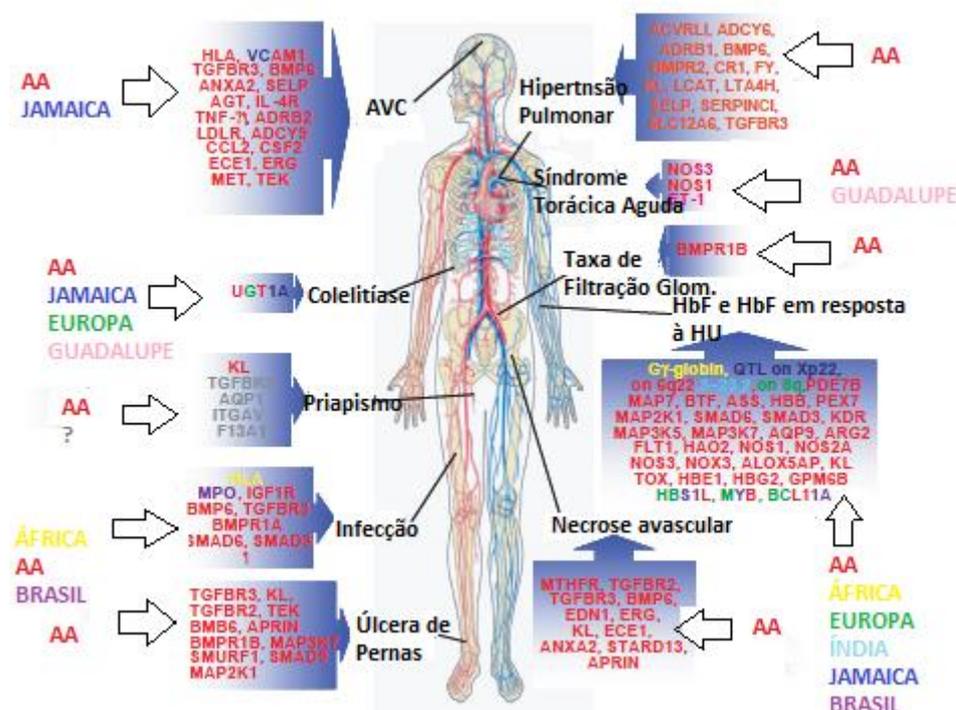
1.6.1 Polimorfismos de nucleotídeos únicos e anemia falciforme

Nos últimos anos, estudos genéticos e a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) mostraram a associação entre SNPs de diferentes genes e fenótipos em portadores de AF (STEINBERG, 2005; KUTLAR, 2005). Dentre estas características clínicas, podemos citar: crises dolorosas, prevalência de acidente vascular cerebral, úlceras de pernas, hipertensão pulmonar, osteonecrose, complicações hepatobiliares e priapismo, entre outras (STEINBERG; ADEWOYE, 2006; STEINBERG, 2005; 2009).

Como observado na Figura 3, as manifestações clínicas caracteristicamente presentes em portadores de AF parecem ser moduladas por polimorfismos em genes que estão envolvidos

nos processos de inflamação, interação de células, modulação de lesão oxidante e biologia do óxido nítrico (DRISS *et al.*, 2009).

Figura 4 – Associação entre polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) e diferentes fenótipos na anemia falciforme.



Fonte: Adaptado de DRISS, 2009. AA= população afro-americana.

Ao investigar a presença de polimorfismos em 230 crianças com anemia falciforme e a ocorrência de AVC, foi evidenciada a associação de AVC em grandes vasos com polimorfismos no gene do receptor da interleucina 4 (IL-4) S503P, no gene de TNF α -308G e no gene do receptor β 2-adrenérgico Q27E, já a ocorrência de AVC em pequenos vasos foi associada com polimorfismos no gene da molécula de adesão vascular-celular 1 (VCAM-1) -1594 T>C e no gene do receptor de lipoproteínas de baixa densidade (HOOPE *et al.*, 2004; HOOPE *et al.*, 2007). Sebastiani e colaboradores (2005) analisaram 108 polimorfismos em 39 genes de 1398 indivíduos afro-americanos portadores de hemoglobina S, sendo que 31 polimorfismos em 12 genes foram evidenciados interagindo com a hemoglobina fetal e modulando o risco de AVC.

A presença do polimorfismo no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) C677T em pacientes com anemia falciforme foi associada a altos níveis de homocisteína e a

necrose avascular por Kutlar e colaboradores (2001), sendo esta correlação confirmada na população brasileira (MOREIRA NETO *et al.*, 2006).

Polimorfismos no gene do receptor I do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1R) e em genes da via TGFbeta/BMP (BMP6, TGFBR3, *bone morphogenetic protein receptor, type IA* (BMPRI1A), SMAD6 and SMAD3) sugerem que ambos podem desempenhar um importante papel na reposta imune de pacientes com AF e ajudam a identificar pacientes que são propensos a desenvolver bacteremia (ADEWOYE *et al.*, 2006). No Brasil, Costa e colaboradores (2005) evidenciaram que a presença do polimorfismo G-463A no gene que codifica a enzima mieloperoxidase foi associada a infecções em pacientes com AF. Neste estudo, apenas 31,7% dos 63 pacientes sem infecções apresentavam o genótipo A/G, enquanto 60,7% dos 28 pacientes com um ou mais episódios infecciosos foram tipificados para o genótipo A/G.

Em 111 pacientes com AF que apresentavam hipertensão pulmonar, foram estudados 297 SNPs em 49 genes, sendo que associações deste fenótipo e genes da superfamília de TGFβ/BMP (ACVRL1, BMPRI2, e BMP6) foram descritas (ASHLEY-KOCK *et al.*, 2008).

A associação entre o polimorfismo no gene do receptor III do TGFβ e o AVC foi observado por Sebastiani e colaboradores (2005) em uma amostra de 1398 indivíduos com AF. A associação entre osteonecrose e a presença de SNPs nos genes dos receptores II e III do TGFβ em pacientes com AF foi relatado por Baldwin e colaboradores (2005). Já Elliott e colaboradores (2007) demonstraram uma forte evidência de associação entre SNP no gene do receptor III do TGFβ e episódios de priapismo em portadores de AF. Neste estudo, 33% dos indivíduos que apresentaram o genótipo AA para o SNP no receptor III do TGFβ tiveram priapismo, comparado com 59% dos indivíduos com genótipo AT e 75% dos indivíduos com genótipo TT. Assim, o risco para a ocorrência de priapismo foi 2,8 vezes maior para cada alelo adicional T no SNP do receptor III do TGFβ.

Polimorfismos no gene da IL-6 têm sido associados à susceptibilidade e à severidade em várias doenças, incluindo artrite juvenil idiopática (FISHMAN *et al.*, 1998) e doença meningocócica (BALDING *et al.*, 2003). Fragoso e colaboradores (2010) ao analisarem pacientes com síndrome coronariana aguda observaram uma significativa diferença entre a distribuição do genótipo de IL-6 -572 G>C entre pacientes com esta síndrome e indivíduos controle sadios.

O polimorfismo no gene da IL-10 inclui 3 genótipos (AA, GA e GG): AA está associado com baixa produção de IL-10, enquanto GA e GG estão ligados a intermediária e alta produção desta interleucina, respectivamente. Significância entre o polimorfismo no gene da IL-10 -1082 e a susceptibilidade para o desenvolvimento de câncer cervical entre mulheres japonesas foi evidenciada por Matsumoto e colaboradores (2010). O aumento na frequência de polimorfismos no gene da IL-10 está associado com o risco de caquexia em pacientes com câncer gástrico entre chineses (SUN *et al.*, 2010).

O polimorfismo no gene do IFN γ + 874 foi associado a infecções em pacientes com AF, sendo o alelo IFN γ +874T um fator genético associado com a ocorrência de infecções nesta população (JOANNES, 2010).

Polimorfismos de nucleotídeos únicos podem atuar como fatores moduladores da AF, uma vez que estas alterações genéticas podem interferir em importantes vias envolvidas na fisiopatologia da doença. Fenótipos caracteristicamente observados na AF têm sido associados a polimorfismos em genes codificadores de citocinas. A busca por marcadores de susceptibilidade genética associada aos fenótipos e às alterações laboratoriais características da AF mostra-se relevante, pois poderá permitir uma intervenção precoce com o objetivo de evitar ou minimizar a ocorrência de manifestações clínicas nestes pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparar a frequência de polimorfismos nos genes das citocinas TNF α , IFN γ , TGF β , IL-6 e IL-10 entre pacientes com anemia falciforme e indivíduos saudáveis, associando genótipos dessas citocinas aos eventos clínicos e aos parâmetros laboratoriais apresentados por

pacientes em acompanhamento ambulatorial no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará (HEMOCE)/Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC).

2.2 Objetivos Específicos

1. Traçar o perfil demográfico (idade e sexo) dos pacientes com AF em acompanhamento ambulatorial no HEMOCE;
2. Comparar a frequência de polimorfismos nos genes das citocinas TNF α , IFN γ , TGF β , IL-6 e IL-10 entre pacientes com AF e indivíduos saudáveis;
3. Avaliar o impacto dos genótipos das citocinas TNF α , IFN γ , TGF β , IL-6 e IL-10 na concentração de hemoglobina, VCM, CHCM, níveis de HbF, leucometria, contagem de plaquetas e porcentagem de reticulócitos nos pacientes com AF;
4. Associar os genótipos das citocinas TNF α , IFN γ , TGF β , IL-6 e IL-10 com manifestações clínicas nos pacientes com AF.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Estudo do tipo transversal, documental e analítico com o propósito de investigar a frequência e a associação entre polimorfismos nos genes das citocinas TNF α , TGF β , IFN γ , IL-6 e IL-10 e os achados clínicos e laboratoriais, em pacientes com anemia falciforme provenientes do Hospital Universitário Walter Cantídio em acompanhamento ambulatorial no Centro de

Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), no período de março de 2011 a Julho de 2012. Um estudo caso-controle foi realizado para comparar a frequência dos polimorfismos nos genes das citocinas TNF α , TGF β , IFN γ , IL-6 e IL-10 no grupo de pacientes com anemia falciforme e em indivíduos saudáveis.

3.2 Casuística

Um total de 41 pacientes adultos com o diagnóstico molecular de anemia falciforme confirmado, de ambos os sexos e com idade variando de 19 a 67 anos foram selecionados de acordo com critérios de inclusão e exclusão. Integraram o grupo controle 90 indivíduos adultos, de ambos os sexos, sem hemoglobinopatias (HbAA), composto por doadores de sangue atendidos no HEMOCE mediante a apresentação do Termo de consentimento livre e esclarecido.

Para análise das variáveis clínicas e laboratoriais, os pacientes foram estratificados agrupando genótipos associados com alta, intermediária ou baixa produção de citocinas. Em relação aos genótipos de TNF α , os pacientes foram estratificados em dois grupos: GG (baixa) e GA (alta). Já em relação aos genótipos de TGF β , foram formados três grupos: TT GG/TC GG (alta), TC GC/CC GG/ TT GC (intermediária) e CC GC/CC CC/TT CC/TC CC (baixa). Dois grupos foram formados para estratificar os pacientes em relação aos genótipos de IL-10: GCC GCC/GCC ACC/GCC ATA (alta e intermediária) e ACC ACC/ACC ATA/ ATA ATA (baixa), enquanto que os grupos formados para avaliar os genótipos de IL-6 foram: GG/GC (alta) e CC (baixa). Foram estratificados em três grupos, os genótipos de IFN γ : TT (alta), TA (intermediária) e AA (baixa). A associação entre os genótipos e a alta, intermediária ou baixa produção de citocinas foi baseada de acordo com dados fornecidos pelo fabricante do kit (“One-Lambda” (Canoga Park, CA, USA)) utilizado para tipificação dos polimorfismos abordados neste estudo e com dados previamente relatados na literatura (TURNER *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1997; FISHMAN *et al.*, 1998; PERREY *et al.*, 1998; KOOS *et al.*, 2000; DAÍ *et al.*, 2006; HENAO *et al.*, 2006).

Houve diferença no número de pacientes por grupo devido à dificuldade na amplificação de material genético de algumas amostras.

3.3 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) e no Laboratório de Micobactérias, ambos da Universidade Federal do Ceará, e no ambulatório do HEMOCE.

3.4 Seleção da amostra

3.4.1 Critérios de inclusão

Pacientes adultos com diagnóstico de AF confirmado por estudo molecular e dados clínico-laboratoriais, em estado estacionário da doença. O estado estacionário foi definido de acordo com os critérios propostos por Ballas (2011): não ocorrência de crises dolorosas por 4 semanas consecutivas; ausência de internações hospitalares nos últimos 2-3 dias; nenhuma transfusão sanguínea durante 4 meses e não ocorrência de episódios infecciosos ou inflamatórios nas últimas 4 semanas.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes que não estavam no estado estacionário da doença, com idade inferior a 18 anos e aqueles que se recusaram a participar do estudo.

3.5 Material biológico

A coleta de material biológico foi realizada seguindo os procedimentos padrão para coleta de amostras biológicas. Para a extração do DNA genômico e análises moleculares foram coletados 5 mL de sangue venoso em tubo a vácuo contendo EDTA (Etilenodiaminotetracético). As amostras coletadas foram submetidas à extração do DNA genômico dos leucócitos, sendo o DNA extraído armazenado a -80° C até a realização da tipificação dos polimorfismos.

3.6 Dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos (úlceras de perna, litíase biliar, síndrome torácica aguda e necrose avascular do fêmur), laboratoriais (Hb, VCM, CHCM, nível de HbF, contagem de leucócitos, contagem de plaquetas e percentagem de reticulócitos) e demográficos (idade e sexo) foram obtidos através da consulta aos prontuários médicos e organizados em uma ficha clínica pré-estruturada (APÊNDICE A). A coleta dos dados e do material biológico foi realizada simultaneamente.

3.6.1 Definição das variáveis avaliadas

3.6.1.1 Variáveis demográficas

Idade: intervalo entre a data de nascimento e julho de 2012.

Sexo: duas categorias – masculino/feminino.

3.6.1.2 Variáveis clínicas

Úlceras de perna, litíase biliar, síndrome torácica aguda e necrose de fêmur: registro no prontuário como parte das manifestações clínicas presentes entre o período em que o paciente foi admitido no serviço de hematologia até julho de 2012. Variável nominal dicotômica: sim/não.

3.6.1.3 Variáveis laboratoriais

As variáveis laboratoriais Hb (g/dL), VCM (fL), CHCM (g/dL), HbF (%), contagem de leucócitos ($\times 10^9/L$), contagem de plaquetas ($\times 10^9/L$) e reticulócitos (%) foram variáveis numéricas contínuas obtidas no momento da coleta do material biológico, que foi realizada quando os pacientes estavam no estado estacionário da doença.

3.7 Polimorfismo no gene das citocinas

3.7.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada com uso do kit GFX “Genomic Blood DNA Purification”, da GE Healthcare. A extração, ligação, lavagem e eluição do DNA foram executadas seguindo rigorosamente o protocolo proposto pelos fabricantes.

3.7.2 Tipificação dos polimorfismos das citocinas *TNF α* , *TGF β* , *IFN γ* , *IL-6* e *IL-10*

Os SNPs, dos genes das citocinas *TNF α* -308G→A, *IFN γ* +874T→A, *TGF β* códon 10 e códon 25, *IL-6* -174G→A e *IL-10* -1082G→A, -819C→T, -592A→C (Quadro 1), foram tipificados pela técnica de reação de cadeia da polimerase utilizando-se iniciadores de sequência específica, empregando-se *kits* da *One-Lambda* (Canoga Park, CA, USA).

Quadro 1 – Polimorfismo dos genes das citocinas tipificados

Gene	Polimorfismo
TNFα	-308 G → A
IFNγ	+874 T→A
TGFβ	códon 10 e códon 25
IL-6	-174 G→A
IL-10	-1082 G→A, -819 C→T, -592 A→C

O *kit* que foi utilizado para a tipificação utilizado é composto por quatro placas de 96 poços cada e 24 tubos com solução de citosina, guanina, adenina e timina (D-mix).

Segundo instruções do fabricante foi adicionado 1 μ L de água MiliQ ao poço correspondente ao controle negativo. Logo após, acrescentado 1 μ L de Taq polimerase (5U/ μ L) ao tubo contendo o D-Mix agitando-se vigorosamente por 5 segundos. Dessa solução foi pipetado 9 μ L (D-Mix / Taq polimerase) ao poço correspondente ao controle negativo. A essa

solução (D-Mix / Taq polimerase) foi adicionado 19 μ L do DNA extraído com posterior agitação em vortex por 5 segundos. Foram pipetados 10 μ L dessa nova solução (DNA / Taq polimerase / D-Mix) em cada poço contendo os iniciadores seqüência-específica, em que os iniciadores encontram-se liofilizados em cada poço da placa.

A placa foi colocada em um termociclador para amplificação do DNA, que ocorreu através de uma desnaturação inicial de 96°C por 130s e 63°C a 60s, seguido de 9 ciclos a 96°C por 10s e 63°C por 60s. Então, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 96°C por 10s, anelamento a 59°C por 50s, extensão a 72°C por 30s e, finalmente, 4°C até a utilização.

3.7.3 Análise dos fragmentos de DNA em gel de agarose

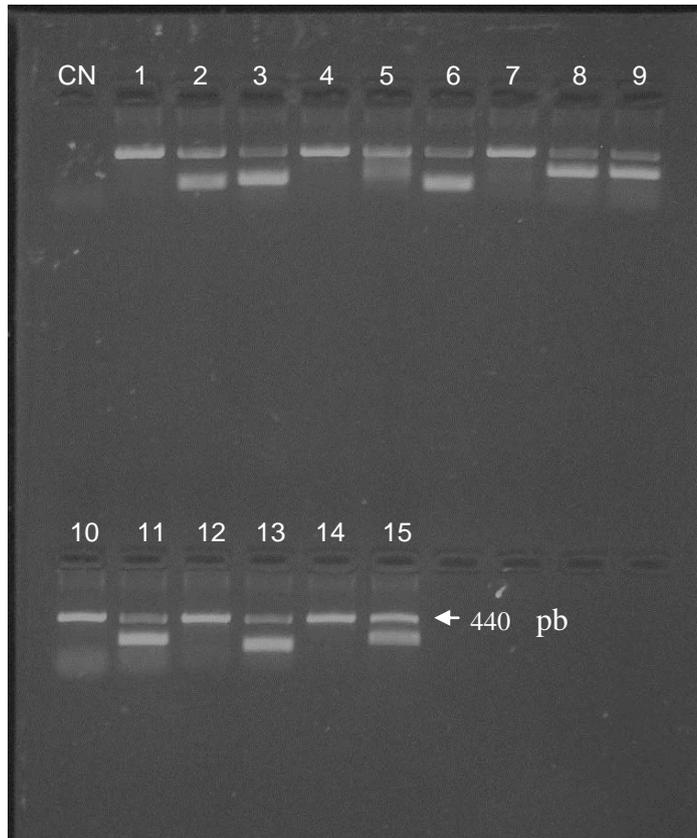
Foram pesados 0,75 gramas de agarose (Invitrogen), em uma balança analítica, e em um Erlenmeyer de 50 mL foram acrescentados 50 mL de tampão TBE 1X e a agarose previamente pesada. Para a dissolução completa da mistura usamos uma manta térmica, sendo a mistura colocada em uma fôrma apropriada que demarcaram os poços no gel de agarose. Os produtos da reação de polimerização em cadeia foram vizualizados em gel de agarose após eletroforese, a corrente elétrica utilizada para desenvolvimento da corrida eletroforética foi de 150V, 400mA durante 7 minutos (Electrophoresis Power Supply EPS 600 – Pharmacia Biotech), e as bandas foram vizualizadas em transiluminador luz UV à 304nm, após adição de brometo de etídio na concentração final de 0,5 μ L/mL ao gel. Em seguida, o gel foi fotografado para documentação.

3.7.4 Interpretação dos resultados

Como controle interno de amplificação foi utilizado um par de iniciadores não alélicos, responsáveis pela amplificação do gene da β -globina, produzindo um produto de amplificação de 440 pares de bases (pb). Quando o produto de amplificação esteve presente e controle interno ausente ou não, se considerou positivo para o grupo de alelos ou do alelo.

O tamanho do fragmento do produto específico não foi considerado, pois a interpretação foi meramente baseada na presença ou ausência da amplificação do alelo ou do grupo específico (Figura 4).

Figura 5: Visualização das bandas através de eletroforese em gel de agarose 1,5%.



A figura demonstra o controle interno de amplificação de 440 pb (β - globina) e os genótipos. 1 e 2: TNF- α G/G; 3 a 6: TGF- β T/T G/G ; 7 a 11: IL-10 GCC/ACC; 12 e 13 IL-6 G/G; 14 e 15: IFN- γ A/A. CN: controle negativo (água substituindo o DNA).

A interpretação dos resultados referentes aos polimorfismos dos genes das citocinas estudadas foi realizada conforme a planilha fornecida pelo kit (One –Lambda, Canoga Park, CA, EUA).

3.8 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software livre R. A versão utilizada foi a 2.12.0. A frequência dos genótipos e os eventos clínicos foram analisados pelo teste exato de Fisher bicaudal. Para verificar a diferença dos parâmetros hematológicos em relação aos genótipos foi utilizado o teste de ANOVA (paramétrico), bem como o teste de Kruscall-Wallis

(não-paramétrico). O teste de Wilcoxon (não-paramétrico) foi utilizado para realizar comparações múltiplas, quando houve significância nas análises com mais de três grupos de genótipos. Os valores de p foram calculados para cada comparação, sendo considerados significantes os valores de $p < 0,05$ com intervalo de confiança de 95%.

3.9 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do HUWC (Protocolo nº 010.03.12) (ANEXO A). Todos os sujeitos da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B). Os sujeitos agrupados como controle assinaram o TCLE para voluntário doador de sangue do HEMOCE, estando em conformidade com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da população estudada

Foram avaliados 41 pacientes com anemia falciforme e 90 indivíduos sadios no grupo controle. Em relação aos indivíduos estudados, houve uma discreta predominância do sexo masculino no grupo controle (56,7%), enquanto que no grupo dos pacientes a predominância foi do sexo feminino (53,7%). Quanto à idade, a média de idade dos pacientes foi de 36,7 anos, e a do grupo controle de 32,3 anos.

Tabela 1 - Distribuição dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com características demográficas.

Características demográficas	AF (n=41)	Controles (n=90)
Sexo	n (%)	n (%)
Masculino	19 (46,3)	51 (56,7)
Feminino	22 (53,7)	39 (43,3)
Amplitude Idade	19-67 anos	18-59 anos
Média	36,7 anos	32,3 anos

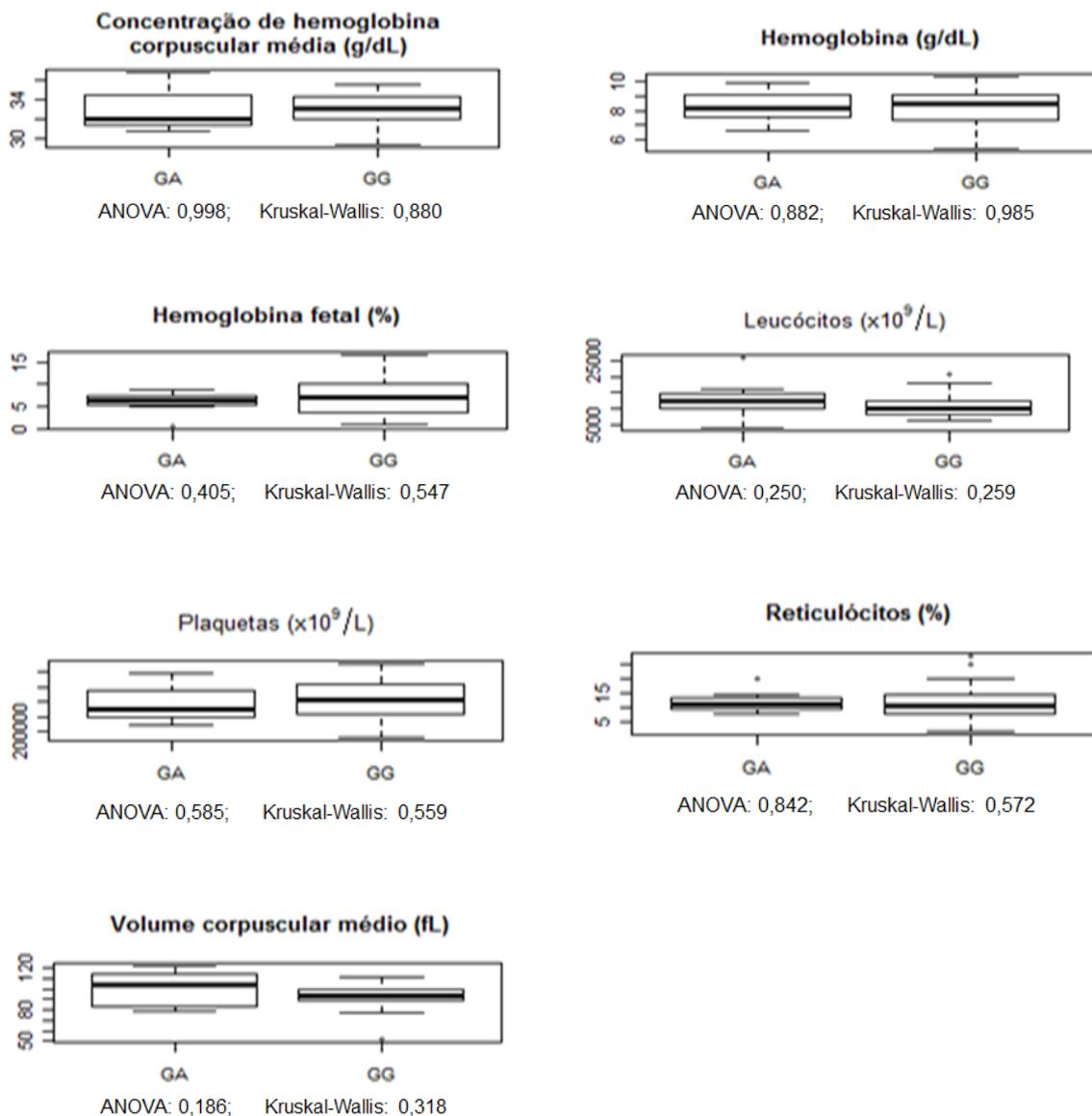
4.2 TNF α -308

O genótipo G/G foi o mais frequente nos pacientes e nos controles (81,6% e 78,9%, respectivamente), enquanto o genótipo A/A foi o menos frequente (0,0% e 1,1%, respectivamente). Não houve diferença significativa quando estas frequências foram comparadas (valor- $p > 0,999$).

Tabela 2- Frequência dos genótipos de TNF α -308 em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle.

TNF α -308	AF (n=38)	Controles (n=90)
	n (%)	n (%)
A/A	0 (0,0)	1 (1,1)
G/A	7 (18,4)	18 (20,0)
G/G	31 (81,6)	71 (78,9)

Figura 6 - Boxplot dos parâmetros hematológicos para cada genótipo de TNF α -308 em pacientes com anemia falciforme.



A figura 6 demonstra que não há diferença significativa na distribuição dos parâmetros hematológicos entre os genótipos de TNF α -308 para os pacientes com AF. A Tabela 3 demonstra as frequências dos genótipos de TNF α -308 em pacientes com AF de acordo com as manifestações clínicas. Nenhuma diferença foi significativa, evidenciando não haver associação dos genótipos em questão na ocorrência dos eventos clínicos.

Tabela 3- Frequência dos genótipos de TNF α -308 em pacientes com anemia falciforme de acordo com eventos clínicos.

TNFα -308	G/G	G/A	Valor-p
	n (%)	n (%)	
Úlceras de perna			
Sim	13 (81,3)	3 (18,7)	> 0,999
Não	18 (81,8)	4 (18,2)	
Síndrome torácica aguda			
Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	0,147
Não	29 (85,3)	5 (14,7)	
Necrose do fêmur			
Sim	4 (100,0)	0 (0,0)	> 0,999
Não	27 (79,4)	7 (20,6)	
Litíase biliar			
Sim	9 (81,8)	2 (18,2)	> 0,999
Não	22 (81,5)	5 (18,5)	

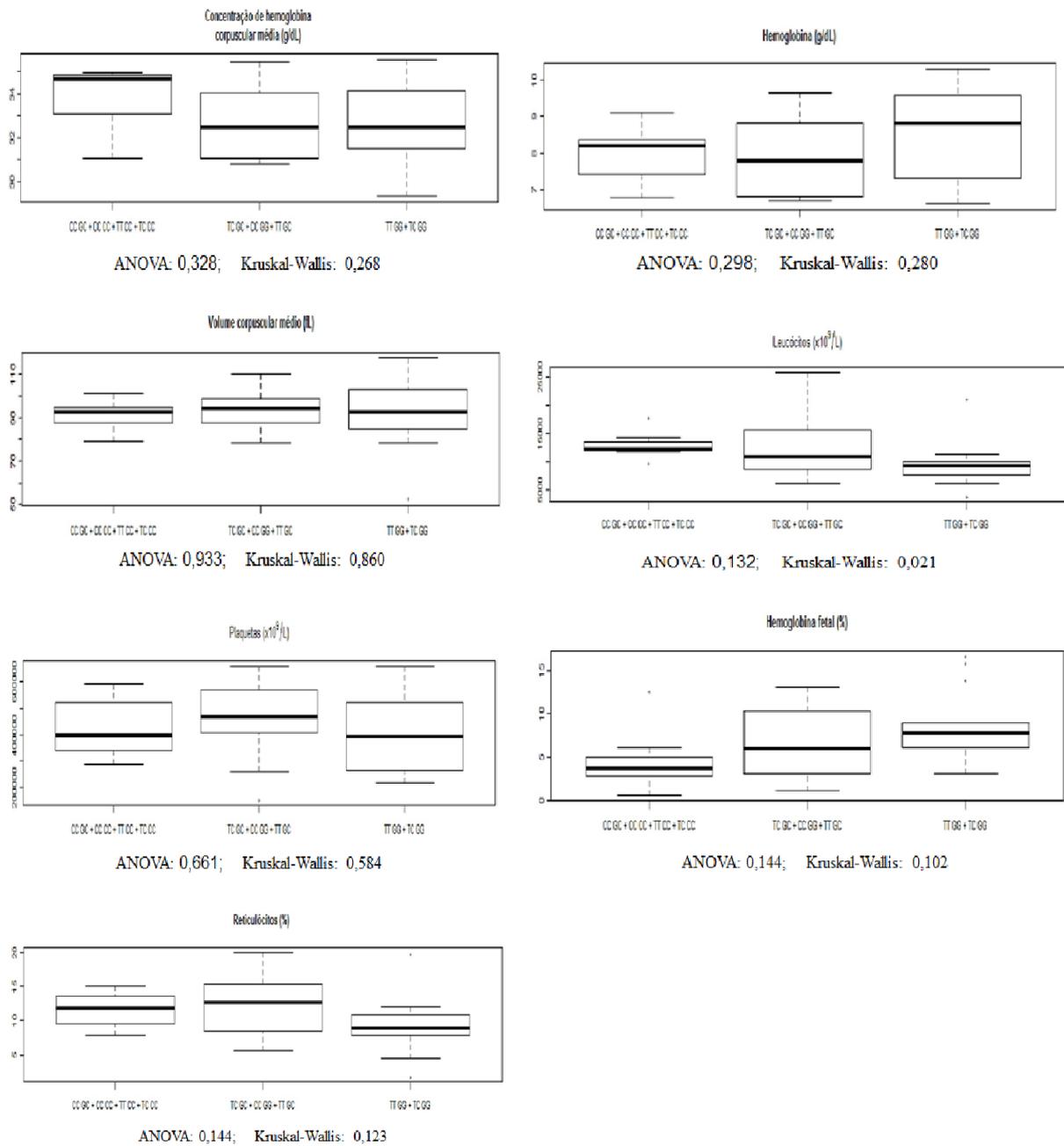
4.3 TGF β códon 10/25

O genótipo mais frequente tanto no grupo de pacientes como no grupo controle foi o T/C G/G (23,3% e 38,6%, respectivamente), já o genótipo T/T G/G foi observado em 16,7% dos pacientes com anemia falciforme e em 36,4% dos indivíduos do grupo controle. Assim, houve uma tendência do grupo de pacientes com anemia falciforme apresentar uma menor frequência do genótipo T/T G/G em relação ao grupo controle.

Tabela 4- Frequência dos genótipos de TGF β em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle.

TGF β códon 10/25	AF n (%)	Controles n (%)
T/T G/G	5 (16,7)	32 (36,4)
T/C G/G	7 (23,3)	34 (38,6)
T/C G/C	3 (10,0)	4 (4,5)
C/C G/G	6 (20,0)	15 (17,1)
T/T G/C	2 (6,7)	1 (1,1)
C/C G/C	1 (3,3)	0 (0,0)
C/C C/C	1 (3,3)	2 (2,3)
T/C C/C	1 (3,3)	0 (0,0)
T/T C/C	4 (13,4)	0 (0,0)

Figura 7 - Boxplot dos parâmetros hematológicos para cada grupo de genótipo de TGF β em pacientes com anemia falciforme.



Como observado na Figura 7, não há diferença significativa na distribuição dos parâmetros hematológicos entre os grupos de genótipos de TGF β para os pacientes com AF, com exceção do número mediano de leucócitos. Ao utilizar o teste (não-paramétrico) de Wilcoxon, foi demonstrado que o número mediano de leucócitos é maior para indivíduos com AF tipificados para os genótipos de TGF β CC GC/CC CC /TT CC/TC CC (baixo produtor) comparativamente aos indivíduos do grupo TT GG/TC GG (alto produtor), enquanto não há

diferença significativa no número mediano de leucócitos para indivíduos do grupo intermediário TC GC/CC GG/ TT GC com relação aos grupos “alto produtor” e “baixo produtor”. A Tabela 5 demonstra a frequência dos grupos de genótipos de TGF β de acordo com os eventos clínicos. Nenhuma diferença foi significativa, não havendo associação entre o grupo de genótipos em questão com os eventos clínicos.

Tabela 5- Frequência dos grupos de genótipos de TGF β em pacientes com anemia falciforme de acordo com eventos clínicos

TGF β códon 10/25	CC GG + TT GC + TC GC	TT CC + CC GC + CC CC + CC GG	TT GG + TC GG	Valor-p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Úlceras de perna				
Sim	5 (38,5)	3 (23,0)	5 (38,5)	0,895
Não	5 (29,4)	4 (23,5)	8 (47,1)	
Síndrome torácica aguda				
Sim	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	0,089
Não	9 (33,3)	5 (18,5)	13 (48,2)	
Necrose do fêmur				
Sim	1 (33,3)	0 (0,0)	2 (66,7)	0,776
Não	9 (33,3)	7 (26,0)	11 (40,7)	
Litíase biliar				
Sim	3 (33,3)	3 (33,3)	3 (33,3)	0,701
Não	7 (33,3)	4 (19,0)	10 (47,6)	

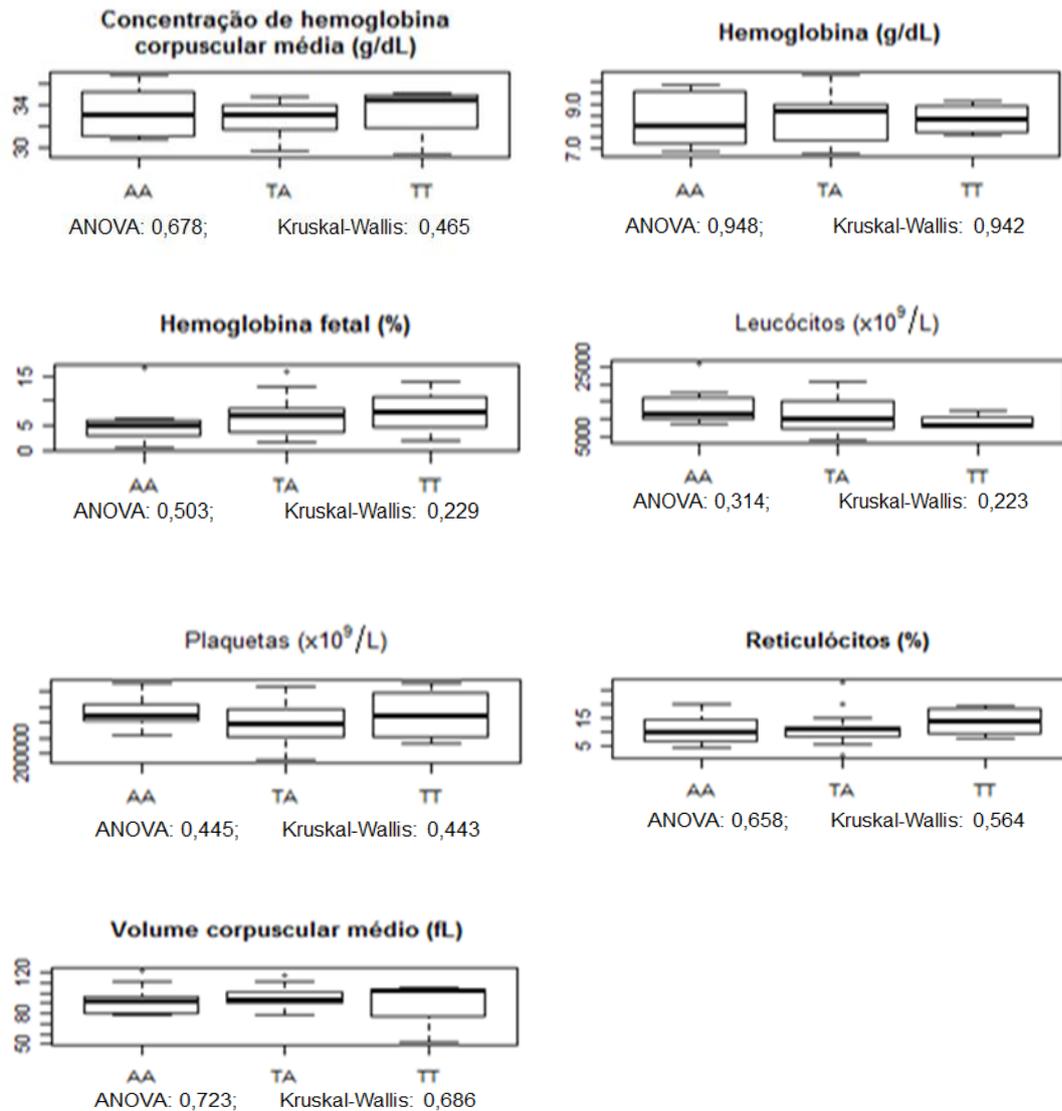
4.4 IFN γ +874

Os genótipos de IFN γ tipificados em pacientes com AF e no grupo controle podem ser observados na Tabela 6. O genótipo T/A foi o mais frequente tanto no grupo de pacientes como no controle (53,6% e 56,7%, respectivamente). O genótipo menos frequente em ambos os grupos foi o T/T, sendo observado em 14,3% dos pacientes com AF e em 8,9% no grupo controle. Não houve diferença significativa entre o grupo de pacientes e o controle (valor- $p=0,693$).

Tabela 6 - Frequência dos genótipos de IFN γ em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle.

IFNγ +874	AF	Controle
	n (%)	n (%)
T/T	4 (14,3)	8 (8,9)
T/A	15 (53,6)	51 (56,7)
A/A	9 (32,1)	31 (34,4)

Figura 8 - Boxplot dos parâmetros hematológicos para cada genótipo de IFN γ em pacientes com anemia falciforme.



A figura 8 acima demonstra que não houve diferença significativa na distribuição dos parâmetros hematológicos entre os genótipos de IFN γ para os pacientes com AF. Na Tabela 7, pode-se observar a frequência dos genótipos de IFN γ de acordo com os eventos clínicos. Nenhuma diferença foi significativa, assim não houve associação entre os genótipos de IFN γ e as manifestações clínicas dos pacientes com AF.

Tabela 7 - Frequência dos genótipos de IFN γ em pacientes com anemia falciforme de acordo com eventos clínicos.

IFNγ +874	AA	TA	TT	Valor-p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Úlceras de perna				
Sim	6 (54,5)	4 (36,4)	1 (9,1)	0,127
Não	3 (17,6)	11 (64,8)	3 (17,6)	
Síndrome torácica aguda				
Sim	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0,0)	0,712
Não	7 (28,0)	14 (56,0)	4 (16,0)	
Necrose do fêmur				
Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0,0)	0,800
Não	7 (29,1%)	13 (54,2%)	4 (16,7%)	
Litíase biliar				
Sim	5 (55,6)	3 (33,3)	1 (11,1)	0,185
Não	4 (21,1)	12 (63,2)	3 (15,7)	

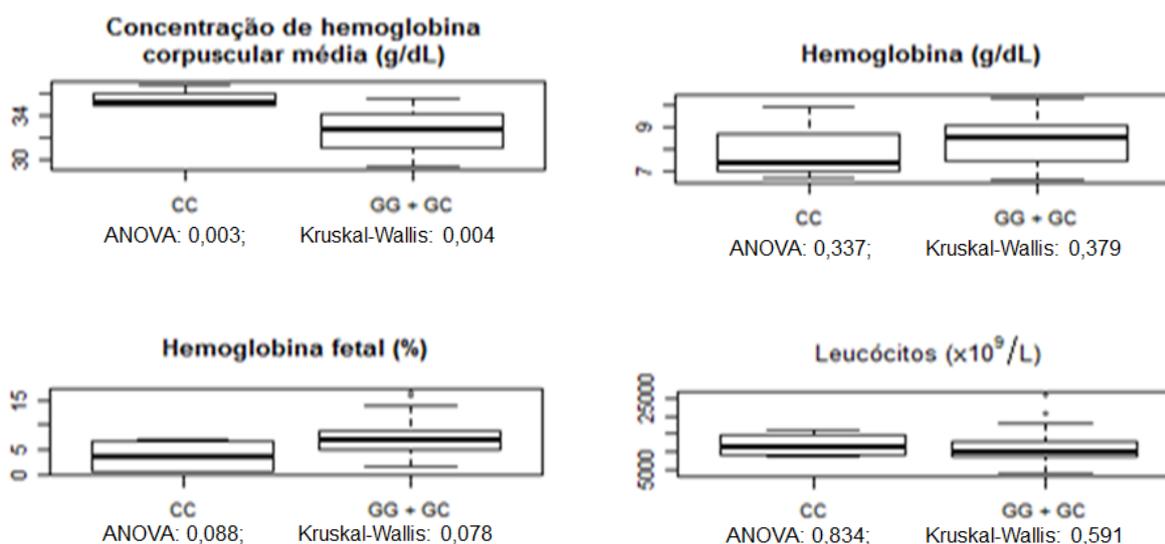
4.5 IL-6 -174

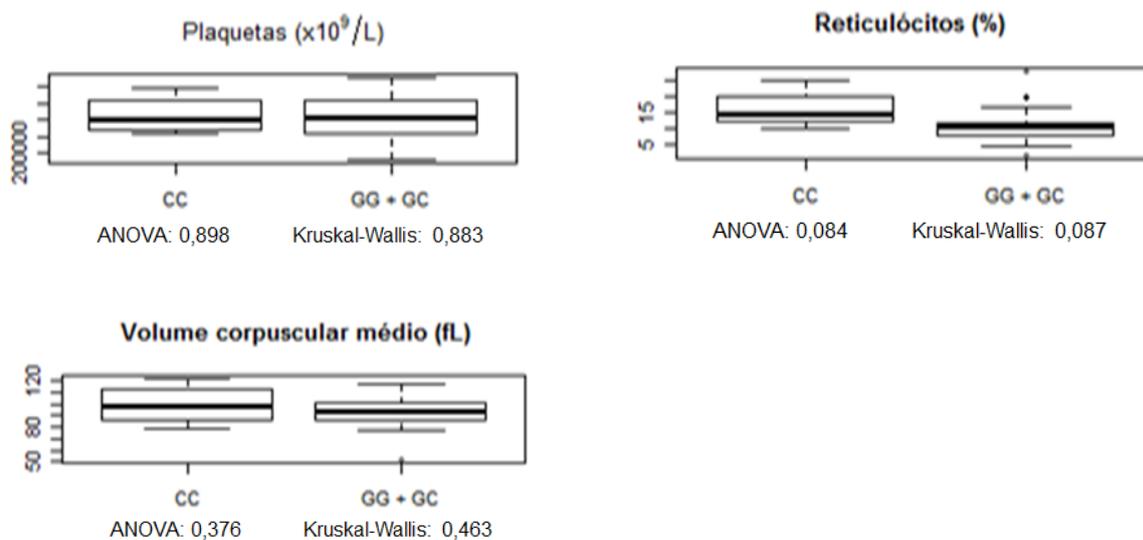
As tipificações dos genótipos de IL-6 em pacientes com AF e no grupo controle estão na tabela 8. Em ambos os grupos o genótipo mais frequente foi o G/G, presente em 73% dos pacientes e em 50% do grupo controle, evidenciando uma diferença entre os grupos estudados (valor- $p=0,04$).

Tabela 8 - Frequência dos genótipos de IL-6 em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle.

IL-6 -174	AF	Controle
	n (%)	n (%)
G/G	27 (73,0)*	45 (50,0)
G/C	6 (16,2)	33 (36,7)
C/C	4 (10,8)	12 (13,3)

Figura 9 - Boxplot dos parâmetros hematológicos para cada grupo genótipos de IL-6 em pacientes com anemia falciforme.





Como demonstrado na figura 9, há diferença significativa nos valores da concentração de hemoglobina corpuscular média entre os grupos de pacientes com AF tipificados para IL-6 -174, sendo a média/mediana da concentração de hemoglobina corpuscular média (g/dL) maior para os pacientes que apresentaram genótipos C/C frente aos que apresentaram G/G ou G/C. Houve ainda uma tendência dos pacientes tipificados para o genótipo C/C apresentarem menores níveis de hemoglobina fetal e maiores porcentagens de reticulócitos.

Na Tabela 9, encontra-se a frequência dos genótipos de IL-6 -174 de acordo com as manifestações clínicas em pacientes com AF. Não houve diferença significativa, evidenciando a ausência de associação entre os genótipos de IL-6 -174 e os eventos clínicos dos pacientes envolvidos no estudo.

Tabela 9- Frequência dos genótipos de IL-6 em pacientes com anemia falciforme de acordo com os eventos clínicos

IL-6 -174	C/C	G/G + G/C	Valor-p
	n (%)	n (%)	
Úlceras de perna			
Sim	2 (12,5)	14 (87,5)	>0,999
Não	2 (9,5)	19 (90,5)	
Síndrome torácica aguda			
Sim	0 (0,0)	4 (100,0)	>0,999
Não	4 (12,1)	29 (87,9)	
Necrose do fêmur			
Sim	1 (25,0)	3 (75,0)	0,380
Não	3 (9,1)	30 (90,9)	
Litíase biliar			
Sim	3 (30,0)	7 (70,0)	0,053
Não	1 (3,7)	26 (96,3)	

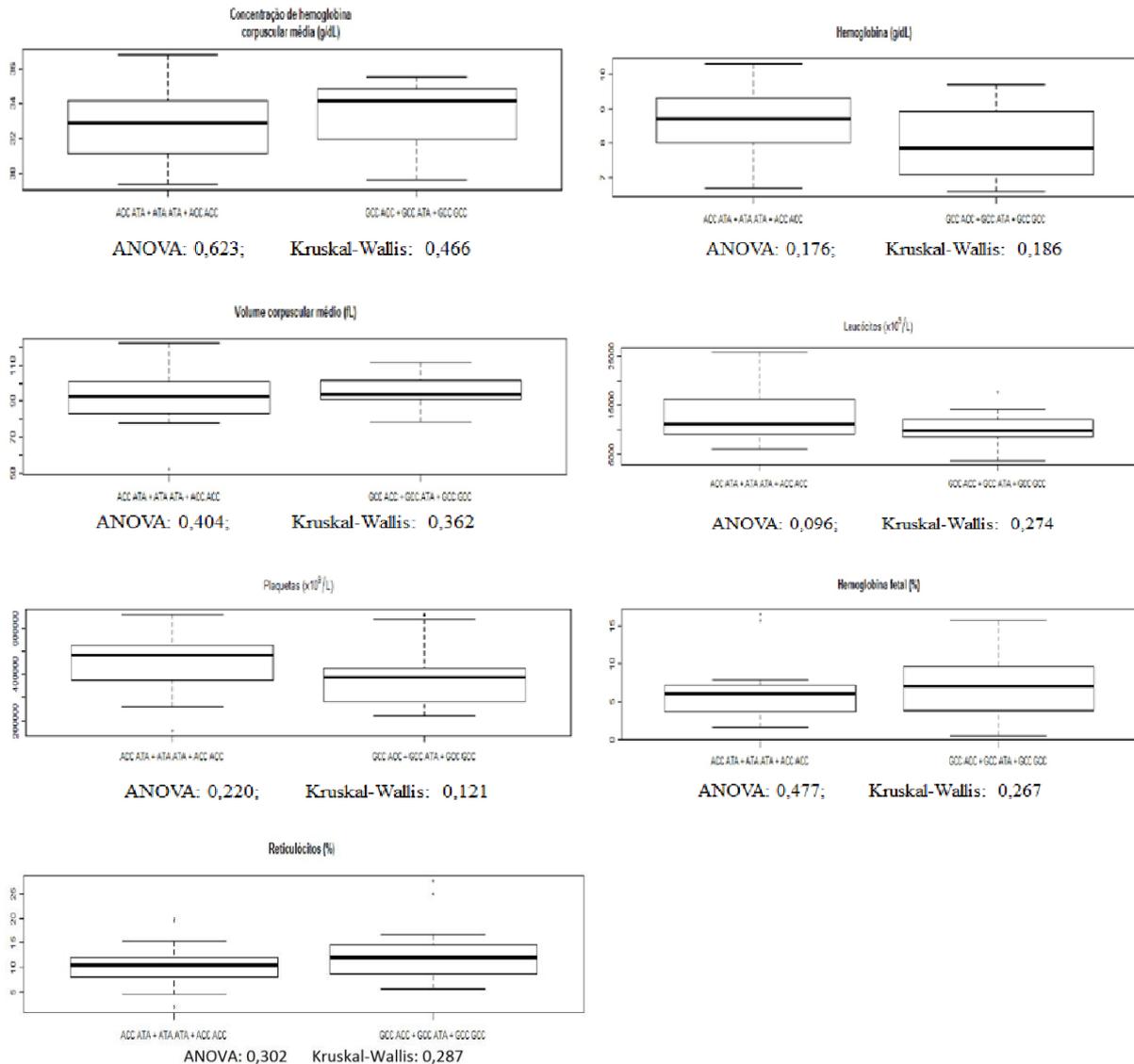
4.6 IL-10 -1082, -819, -592

Em relação à frequência dos genótipos de IL-10 em pacientes com AF e no grupo controle (Tabela 10), os genótipos ACC/ATA e GCC/ATA foram os mais frequentemente observados no grupo de pacientes (24,3%), enquanto que no grupo controle, os genótipos GCC/ACC, GCC/ATA e GCC/GCC apresentaram a mesma frequência (20,9%). Tanto no grupo de pacientes como no controle o genótipo ACC/ACC foi o menos frequente (5,0% e 5,8%, respectivamente). Assim, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os genótipos nos grupos de pacientes e controles (valor- $p=0,538$).

Tabela 10 - Frequência dos genótipos de IL-10 em pacientes com anemia falciforme e no grupo controle.

IL-10 -1082, -819, -592	AF	Controle
	n (%)	n (%)
ACC/ACC	2 (5,5)	5 (5,8)
ACC/ATA	9 (24,3)	17 (19,8)
ATA/ATA	7 (18,9)	10 (11,6)
GCC/ACC	7 (18,9)	18 (20,9)
GCC/ATA	9 (24,3)	18 (20,9)
GCC/GCC	3 (8,1)	18 (20,9)

Figura 10 - Boxplot dos parâmetros hematológicos para cada grupo genótipos de IL-10 em pacientes com anemia falciforme.



Não houve diferença significativa na distribuição dos parâmetros hematológicos entre os grupos de genótipos de IL-10 para os pacientes com AF (Tabela 15). Na Tabela 11, observa-se que houve uma associação entre o grupo de genótipos de IL-10 ACC ATA + ATA ATA + ACC ACC, grupo baixo produtor de IL-10, e a síndrome torácica aguda. Apesar de não significativa, este grupo de genótipos foi detectado em 60,0% dos pacientes que apresentaram úlceras de perna contra 40,9% dos pacientes sem esta manifestação clínica.

Tabela 11- Frequência dos genótipos de IL-10 em pacientes com anemia falciforme de acordo com eventos clínicos.

IL-10 -1082, -819, -592	ACC ATA + ATA ATA + ACC ACC	GCC ACC + GCC ATA + GCC GCC	Valor-p
	n (%)	n (%)	
Úlceras de perna			
Sim	9 (60,0)	6 (40,0)	0,325
Não	9 (40,9)	13 (59,1)	
Síndrome torácica aguda			
Sim	4 (100,0)	0 (0,0)	0,046
Não	14 (42,4)	19 (57,6)	
Necrose do fêmur			
Sim	2 (50,0)	2(50,0)	>0,999
Não	16 (48,5)	17 (51,5)	
Litíase biliar			
Sim	6 (50,0)	6 (50,0)	>0,999
Não	12 (48,0)	13 (52,0)	

5 DISCUSSÃO

Um melhor conhecimento sobre os fatores moduladores da AF é fundamental para o entendimento da sua fisiopatologia, possibilitando melhorias na assistência aos pacientes através da modificação do curso natural da doença (ADORNO *et al.*, 2008). Em populações originadas de várias etnias, como a população brasileira, a frequência de SNPs em genes de citocinas é variável (VANDERBORGHT *et al.*, 2004). A tipificação de polimorfismos em genes de citocinas pode ser usada como um possível mecanismo de análise antropológica, por meio do qual se pode avaliar a influência das disparidades raciais na suscetibilidade genética a doenças (TREJAUT *et al.*, 2004).

Neste estudo, não foi evidenciada diferença entre a frequência dos genótipos de TNF α -308 dos grupos comparados. Houve uma predominância do genótipo G/G tanto no grupo de pacientes como no grupo controle (81,6% e 78,9%, respectivamente). A frequência do genótipo G/A foi de 18,4% nos pacientes e 20,0% no grupo controle, sendo o genótipo A/A o menos frequentemente encontrado nos pacientes (0,0%) e controles (1,1%), corroborando outros estudos. Cajado *et al.* (2011) encontraram uma frequência de 80,2% para o genótipo G/G, 18,2% para o genótipo G/A e 1,6% para o genótipo A/A em pacientes baianos com AF. A frequência do genótipo G/G encontrada por Hoppe *et al.* (2007) foi de 75% em crianças afro-americanas portadoras de HbSS. Em pacientes com AF oriundos do estado de São Paulo, a frequência do genótipo G/G foi de 83,7% enquanto que a de G/A foi 16,3% (VICARI *et al.*, 2011).

Não houve diferença entre os genótipos de TNF α -308 e os parâmetros hematológicos ou eventos clínicos em pacientes avaliados em nosso estudo. Apesar disso, níveis elevados de TNF α têm sido associados ao genótipo G/A, sendo que o alelo A para esse polimorfismo foi associado à ocorrência de choque séptico grave, óbito e complicações neurológicas (HAJJER; HUTCHINSON, 2001). O TNF α é uma citocina pró-inflamatória que atua aumentando moléculas de adesão, propriedades quimiotáticas e aderência de neutrófilos ao endotélio vascular. Esta citocina induz a geração de radicais livres, a produção de outros mediadores inflamatórios, como IL-1 e prostaglandina E2, e a atividade pró-coagulante das células endoteliais através da liberação do PAF e do fator de von Willenbrand. Assim, a elevação de níveis sanguíneos de TNF α , em pacientes com AF, pode aumentar a frequência de episódios de vaso-oclusão levando ao aparecimento de manifestações clínicas (BEUTLER; GRAU, 1993; MALAVÉ *et al.*, 1993; BUCHANAN *et al.*, 2004)

A associação entre o genótipo G/A e a ocorrência de sequestro esplênico foi relatada em pacientes baianos com AF, sendo o risco de ocorrência deste evento 4,6 vezes maior em pacientes portadores do alelo -308A (CAJADO *et al.*, 2011). Hoopes e colaboradores (2007) observaram que pacientes com a homozigose para o alelo -308G tiveram o risco de desenvolver AVC 3 vezes maior, enquanto o alelo -308A foi considerado um fator genético protetor contra a ocorrência de AVC em portadores de AF. Vicari e colaboradores (2011) não encontraram associação entre o alelo -308A e AVC. Assim, ainda há controvérsias entre a influência de polimorfismos no gene de TNF α -308 e manifestações clínicas na AF.

Em relação à frequência dos genótipos de TGF β , códons 10 e 25, não houve diferença significativa entre os pacientes e controles, porém houve tendência do grupo de pacientes com anemia falciforme apresentar uma menor frequência do genótipo T/T G/G em relação ao grupo controle. Em ambos os grupos, o genótipo T/C G/G (23,3% e 38,6%, respectivamente) foi o mais frequentemente observado. Estudos envolvendo polimorfismos de TGF β nos códons 10 e 25 na AF são escassos, embora, em outras doenças, este tema tem sido abordado em trabalhos recentes na população cearense. Lima (2008) encontrou uma maior frequência do genótipo T/C G/G em pacientes cearenses com hanseníase (50%). Um predomínio do genótipo T/C G/G (54%) em pacientes cearenses com síndrome mielodisplásica foi descrito por Costa (2011). Desta forma, o predomínio do genótipo T/C G/G encontrada em nosso estudo está condizente com publicações referentes ao polimorfismo de TGF β nos códons 10 e 25 descritas na população cearense.

Ainda em relação ao TGF β , os pacientes com AF que fizeram parte do grupo de genótipos CC GC/ CC CC/ TT CC/ TC CC (baixo produtor) apresentaram um número mediano de leucócitos superior aos que foram tipificados para os genótipos TT GG/TC GG (alto produtor). Não houve diferença entre o número mediano de leucócitos do grupo de genótipos TC GC/ CC GG/ TT GC (produtor intermediário) e os grupos alto e baixo produtores.

O TGF β age na medula óssea diminuindo a proliferação de precursores hematopoiéticos, e conseqüentemente, reduzindo o número de leucócitos circulantes (KELLER *et al.*, 1988). Adicionalmente, o TGF β atua como potente fator quimiotático recrutando leucócitos da circulação sanguínea para sítios inflamatórios (WAHL *et al.*, 1987). Assim, o aumento do valor mediano de leucócitos no grupo de pacientes tipificados para genótipos associados com a baixa produção de TGF β ratifica a influência desta citocina na leucometria.

Em relação aos eventos clínicos, não foi encontrada associação com os genótipos de TGF β , apesar de este ser um importante modulador da resposta inflamatória.

Em nosso estudo, foram tipificados polimorfismos no gene da IL-10 nas regiões -1082 G \rightarrow A, -819 C \rightarrow T e -592 A \rightarrow C. Os dados obtidos demonstraram uma maior frequência dos genótipos ACC/ATA e GCC/ATA no grupo de pacientes (24,3%), enquanto que no grupo controle, os genótipos GCC/ACC, GCC/ATA e GCC/GCC apresentaram a mesma frequência (20,9%), entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os genótipos dos grupos estudados.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que controla processos inflamatórios pela supressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, bem como a apresentação de antígenos e moléculas co-estimulatórias em monócitos/macrófagos, neutrófilos, e células T (MOORE *et al.*, 2001). Uma associação entre indivíduos com o grupo de genótipos ACC ATA + ATA ATA + ACC ACC, grupo baixo produtor de IL-10, e a síndrome torácica aguda foi observada em nosso estudo. Não temos conhecimento de nenhum outro estudo que tenha avaliado a associação de polimorfismos no gene da IL-10 nas regiões -1082 G \rightarrow A, -819 C \rightarrow T e -592 A \rightarrow C e o perfil clínico-laboratorial em pacientes com anemia falciforme até o presente momento.

A HbF é um importante modulador do curso clínico de pacientes com AF, pois age diminuindo a polimerização da HbS, e conseqüentemente o processo de falcização das hemácias que consiste em fator crucial na fisiopatologia da doença (ADEKILE; HUISMAN,1993). Conforme publicado por IKUTA *et al.* (2011), a presença da citocina pró-inflamatória GM-CSF promove uma redução na expressão de HbF em pacientes com AF, sendo este um possível mecanismo de resistência à hidroxiureia nestes pacientes. Assim, a associação entre o grupo de genótipos baixo produtor de IL-10, ACC ATA + ATA ATA + ACC ACC, e a síndrome torácica aguda pode estar relacionada com a baixa produção de IL-10 induzida por este grupo de genótipos. Dessa forma, a capacidade de IL-10 antagonizar a ação de citocinas pró-inflamatórias, como o GM-CSF, estaria prejudicada nesse grupo de genótipos, e assim, não contrabalanceando a ação de citocinas que aumentam a susceptibilidade ao desenvolvimento de um curso clínico mais grave em pacientes com AF.

Estudos que visem à quantificação dos valores séricos de IL-10 em pacientes com anemia falciforme são necessários para que se avalie de forma mais clara sua influência sobre a expressão da HbF e as manifestações clínicas nessa população.

Em nosso estudo, não houve diferença entre a frequência dos genótipos de IFN γ +874 no grupo de pacientes e controles. No primeiro grupo, o genótipo mais frequente foi o T/A (53,6%), seguido pelo genótipo A/A com uma frequência de 32,1% e o genótipo T/T foi o menos frequentemente observado (14,3%). Já a frequência do genótipo A/A descrita por Joannes et al. (2010) foi de 48,6% em pacientes com AF na população francesa. Albuquerque et al. (2009) encontraram uma frequência de 68% do genótipo T/A, 23% do genótipo A/A e 9% do genótipo T/T em um grupo de pacientes com toxoplasmose residentes no Estado do Rio de Janeiro.

Nenhuma associação entre a frequência dos genótipos de IFN γ +874 e os parâmetros hematológicos foi encontrada em nosso estudo. O IFN γ age ativando a transcrição de genes que participam da atividade antiviral, apoptose, processamento de antígeno, expressão de MHC e o desenvolvimento de linfócitos Th1. Esta citocina atua também na indução de macrófagos à destruição e/ou restrição do crescimento de bactérias-alvo (DORNMAN; HOLLAND, 2000).

O genótipo T/T está associado à produção de altos níveis de IFN γ , o genótipo A/T com níveis intermediários e o genótipo A/A com baixos níveis de IFN γ (LÓPEZ-MADERUELO *et al.*, 2003; DAÍ *et al.*, 2006; HENAO *et al.*, 2006). A presença do genótipo A/A tem sido previamente associada a uma maior susceptibilidade no desenvolvimento de várias doenças. Yu et al. (2006) associou o genótipo A/A com a infecção pelo vírus da hepatite B em chineses. Este genótipo foi associado à gastrite devido à infecção por *Helicobacter pylori* na Itália (ZAMBON *et al.*, 2005), à tuberculose na população espanhola (LÓPEZ-MANDERUELO *et al.*, 2003) e à diabetes mellitus tipo 2 em gregos (TSIAVOU *et al.*, 2005).

O genótipo G/G de IL-6 predominou em 73% dos pacientes com AF contra 50% do grupo controle. Já o genótipo G/C esteve presente em 16,2% dos pacientes e em 36,7% dos controles, sendo o genótipo C/C observado nos pacientes e controles nas proporções de 10,8% e 13,3%, respectivamente. Assim, foi evidenciada uma diferença significativa entre a frequência dos genótipos de IL-6 nos grupos de pacientes e controles.

Em nosso estudo, os pacientes tipificados para o genótipo C/C apresentaram um valor médio/mediana superior na concentração de hemoglobina corpuscular média em relação àqueles tipificados para os genótipos G/C e G/G. Hemácias com a CHCM aumentada, ou células

densas, têm baixa afinidade pelo oxigênio, reduzida deformabilidade, viscosidade elevada, alta propensão à formação de polímeros de HbS na desoxigenação e menor sobrevivência (FABRY; KAUL, 1991; SCHNOG *et al.*, 2004). Uma vez que a taxa de polimerização da HbS desoxigenada depende da concentração de hemoglobina, as células densas contribuem para que ocorram os processos hemolíticos e vaso-oclusivos da doença (BUNN, 1997). Dessa forma, os pacientes que apresentaram o genótipo C/C, baixo produtor de IL-6, ao apresentarem maiores valores da CHCM podem ter uma susceptibilidade aumentada no desenvolvimento de hemólise e fenômenos vaso-oclusivos. Em nosso estudo, houve uma tendência de pacientes portadores do genótipo C/C de IL-6 apresentar valores medianos de hemoglobina fetal menor e valores medianos de reticulócitos maiores do que o grupo de pacientes que foram tipificados para os genótipos G/G ou G/C, reforçando a hipótese de que os pacientes tipificados para os genótipos C/C são mais susceptíveis à ocorrência de hemólise.

Estudos envolvendo polimorfismos no gene de IL-6 e a produção de IL-6 têm sido controversos. Porém, autores como Fishman *et al.* (1998) e Burzota *et al.* (2001) associaram o genótipo G/C à uma maior produção de IL-6 comparado ao genótipo C/C.

A IL-6 está entre as citocinas mais fortemente associadas à anemia (CASSASNOVAS *et al.*, 2007). Consiste em um potente indutor da expressão de hepcidina que leva a uma redução da absorção de ferro no intestino, e bloqueia a liberação de ferro do sistema retículo endotelial e do fígado (NEMETH *et al.*, 2004; KEMNA *et al.*, 2005; WEISS, 2009). Durante processos inflamatórios, a IL-6 pode induzir a síntese de hepcidina levando a uma hipoferremia (NEMETH *et al.*, 2004). Dessa forma, seria necessária a dosagem sérica de IL-6 para que fosse avaliada a influência dos polimorfismos no gene de IL-6 e a anemia apresentada por estes pacientes.

Os resultados observados neste estudo demonstram que os genótipos de citocinas envolvidas na fisiopatologia da AF estão associados a fenótipos característicos da doença e a importantes alterações laboratoriais que refletem a severidade da mesma. A busca por marcadores genéticos que determinem a susceptibilidade ou proteção a manifestações clínicas na AF é extremamente relevante, pois estes podem auxiliar na prevenção do desenvolvimento destas manifestações trazendo uma melhor qualidade de vida para os pacientes.

Estudos adicionais com um maior número de pacientes e que visem à análise dos níveis de citocinas são necessários para uma melhor compreensão sobre a influência destas

moléculas na fisiopatologia da AF, bem como para confirmar a associação entre os polimorfismos abordados em nosso estudo e os fenótipos e alterações laboratoriais observados em pacientes com AF.

6 CONCLUSÕES

No diz respeito à associação entre os genótipos de IL-10 e a ocorrência de eventos clínicos nos pacientes envolvidos em nosso estudo, observou-se que houve associação entre o

grupo baixo produtor de IL-10, ACC ATA + ATA ATA + ACC ACC, e a ocorrência de síndrome torácica aguda nos pacientes com AF;

Em relação à frequência dos genótipos de IL-6, foi evidenciada diferença significativa entre os genótipos de pacientes e controle. Os pacientes tipificados para o genótipo C/C apresentaram valores da concentração de hemoglobina corpuscular média maiores que os tipificados para os genótipos G/C e G/C. Foi observada tendência dos pacientes tipificados para o genótipo C/C em apresentarem menores níveis de hemoglobina fetal e maiores porcentagens de reticulócitos.

No que se refere aos genótipos de TGF β , foi observada tendência do grupo de pacientes com anemia falciforme em apresentar menor frequência do genótipo T/T G/G em relação ao grupo controle. O grupo de pacientes com AF tipificados para os genótipos CC GC/ CC CC/ TT CC/ TC CC (baixo produtor) apresentaram um número mediano de leucócitos superior aos que foram tipificados para os genótipos TT GG/TC GG (alto produtor);

REFERÊNCIAS

ADEKILE, A. Mild-phenotype sickle cell disease: molecular basis clinical presentation and management recommendations. **Current. Paediatrics.**, v. 15, n. 1, p.57-61, 2005.

ADEKILE, A. D.; HUISMAN, T. H. J.; HbF in sickle cell anemia. **Experientia.**, v. 49, p. 16-27, 1993.

ADEWOYE, A. H.; NOLAN, V. G.; MA, G.; BALDWIN, C.; WYSZYNSKI, D. F.; FARRELL, J. J.; FARRER, L. A.; STEINBERG, M.H. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 5, p. 593-598, 2006.

ADORNO, E. V.; ZANETTE, A.; LYRA, I.; SEIXAS, M. O.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Clinical and molecular characteristics of sickle cell anemia in Northeast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 31, p. 621-625, 2008.

ALBUQUERQUE, M. C.; ALEIXO, A. L. Q. C.; BENCHIMOL, E. I.; LEANDRO, A. C. C. S.; NEVES, L. B.; VICENTE, R. T.; ALMEIDA-BONECINI, M. G.; ALMENDOEIRA, M. R. R. The IFN γ +874 T/A gene polymorphism is associated with retinochoroiditis toxoplasmosis susceptibility. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 104, n. 3, p. 451-455, 2009.

ALIYU, Z. Y.; TUMBLIN, A.R.; KATO, J. G. Current therapy of sickle cell disease. **Haematologica.**, v. 91, n.1, p. 7-10, 2006.

AMANULLAH, A.; AZAM, N.; BALLIET, A.; HOLLANDER, C.; HOFFMAN, B.; FORNACE, A.; LIEBERMANN, D. Cell signaling: cell survival and a Gadd45-factor deficiency. **Nature.**, v. 424, n. 6950, p. 741, 2003.

ANDERSON, G. M.; NAKADA, M. T.; DEWITTE, M. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis and treatment of câncer. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 4, n. 4, p. 314-320, 2004.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R. S.; Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, v. 151, n. 9, p.839-845, 2000.

ASHLEY-KOCH, A.; ELLIOTT, L.; KAIL, M. E.; DE CASTRO, L. M.; JONASSAINT, J.; JACKSON, T. L.; PRICE, J.; ATAGA, K. I.; LEVESQUE, M. C.; WEINBERG, J. B.; ORRINGER, E. P.; COLLINS, A.; VANCE, J. M.; TELEN, M. J. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. **Blood.**, v. 111, p. 5721-5726, 2008.

AWASTHI, A.; KUCHROO, V. K. Th17 cells: from recursos to players in inflammation and infection. **Inte. Immunol.**, v. 21, n. 5, p. 489-498, 2009.

BALASUBRAMANIAN, S. P.; COX, A.; BROWN, N. J.; REED, M. W. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 30, n.6, p. 593-601, 2004.

BALDWIN, C.; NOLAN, V. G.; WYSZYNSKI, D. F. et al. Association of klotho, bone morphogenic protein 6, and annexin A2 polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **Blood.**, v. 106, n. 1, p. 372-375, 2005.

BALLAS, S.K. More definitions in sickle cell disease: Steady state v base line data. **Am. J. Hemotol.**, v. 1, p. 1, 2011.

BARBARA, J. A.; VAN OSTADE, X.; LOPEZ, A. Tumor necrosis factor- alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 74, n. 5, p. 434-443, 1996.

BEUTLER, B.; GRAU, G. Tumor necrosis factor in pathogenesis of infectious diseases. **Crit Care Med.**, v. 21, p. 423-422, 1993.

BIDWELL, J.; KEEN, L.; GALLANGHER, G.; KIMBERLY, R.; HUIZINGA, T.; MCDERMOTT, M. F.; OKSENBERG, J.; MCNICHOLL, J.; POCIOT, F.; HARDT, C., DALFONSO, S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes Immun.**, v. 1, p.3-19, 1999.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J. C. Cellular responses to interferon- γ . **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 749-795, 1997.

BORREGO, L. M.; ROSA, S.; ALGUERÓ, C.; TRINDADE, H.; PINTO, J. R. Células reguladoras. **Rev. Port. Pneumol.**, v. 13, p. 365-376, 2007.

BRIDGES, K. R.; BARABINO, G. D.; BRUGNARA, C.; CHO, M. R.; CHRISTOPH, G. W.; DOVER, G.; EWENSTEIN, B. M.; GOLAN, D. E.; GUTTMANN, C. R.; HOFRICHTER, J.; MULKERN, R. V.; ZHANG, B.; EATON, W. A. A multiparameter analysis of sickle erythrocytes in patients undergoing hydroxyurea therapy. **Blood.**, v. 88, n.12, p. 4701-4710, 1996.

BRUGNARA, C. Sickle cell disease: from membrane pathophysiology to novel therapies for prevention of erythrocyte dehydration. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 25, n. 12, p. 927- 933, 2003.

BRUGNARA, C.; BUNN, H. F.; TOSTESON, D.C. Ion content and transport and the regulation of volume in sickle cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 556, p. 96-103, 1989.

BUCHANAN, G. R.; BEBAUN, M. R.; QUINN, C. T.; STEINBERG, M. H. Sickle cell disease. **Hematology.**, p. 35-47, 2004.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, Massachussets, v.337, n.11, p. 762-769, 1997.

BURZOTTA, F.; IACOVIELO, L.; Di CASTELNUOVO, A. et al. Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. **Am. J. Cardiol.**, v. 88, n. 1, p. 125-128, 2001.

CAJADO, C. S; CERQUEIRA, B. A. V; COUTO, F. D; MOURA-NETO, J. P; VILAS-BOAS, W; DOREA, M. J; LYRA, I. M; BARBOSA, C. G; REIS, M. G; GONÇALVES, M. S. TNF-alpha and IL-8: Serum levels and gene polymorphisms (-308G>A and -251 A>T) are associated with classical biomarkers and medical history in children with sickle cell anemia. **Citokine**, v. 56, n. 2, p. 312-317, 2011.

CASSASNOVAS, R. O.; MOUNIER, N.; BRICE, P. et al. Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: A study from the Groupe d'Étude des Lymphomes de l'Adulte. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, p. 1732-1740, 2007.

CHARACHE, S. Fetal hemoglobin, sickling, and sickle cell disease. **Adv. Pediatr.**, v. 37, p. 1-31, 1990.

- CHARACHE, S.; DOVER, G. J.; MOORE, R. D.; ECKERT, S.; BALLAS, S. K.; KOSHY, M.; MILNER, P. F.; ORRINGER, E. P.; PHILLIPS, G.; PLATT, O. S. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 79, p. 2555-2565, 1992.
- CHARACHE, S. Experimental therapy of sickle cell disease. Use of hydroxyurea. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 16, n. 1, p. 62-66, 1994.
- CHARACHE, S.; DOVER, G. J.; MOYER, M. A. MOORE, J. W. Hydroxyurea – induced augmentation of fetal hemoglobin production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v. 69, n. 1, p.109-116, 1987.
- CHARACHE, S.; TERRIN, M. L.; MOORE, R. D. et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 20, p. 1317-22, 1995.
- CHIANG, E.; FRENETTE, P. S. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 19, n. 5, p. 771-784, 2005.
- CHORLEY, B. N. et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies. **Mutat. Res.**, v. 659, p. 147-157, 2008.
- COLLINS, F. S.; GUYER, M. S.; CHACRAVARTI, A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. **Science**, v. 278, n.5343, p. 1580-1581, 1997.
- COSTA, R. N.; CONRAN, N.; ALBUQUERQUE, D. M.; SOARES, P. H. SAAD, S. T. COSTA, F. F. Association of the G-463A myeloperoxidase polymorphism with infection in the sickle cell anemia. **Haematologica**, v. 90, n. 7, p. 977-979, 2005.
- COSTA, CARLIVÂNIA BEZERRA. Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas TNF α , IFN γ , TGF β , IL-6 e IL-10 em Síndrome Mielodisplásica. 2011. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- DAÍ, C. Y.; CHUANG, W. L.; HSIEH, M. Y.; LEE, L. P.; HOU, N. J.; CHEN, S. C.; LIN, Z. Y.; HSIEH, M. Y, WANG, L. Y.; TSAI, J. F.; CHANG, W. Y.; YU, M. L. Polymorphism of interferon-gamma gene at position +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C. **Transl Res.**, v. 148, p. 128-133, 2006.
- DAVIES, S. C.; ONI, L. Fortnightly review: management of patients with sickle cell disease. **British Medical Journal**, v. 315, p. 656-660, 1997.
- DE NARDIN, E. Genetic polymorphisms and immune responses. **Immunol. Invest.**, v. 38, n.3-4, p. 198-202, 2009.
- DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molec Immunol.**, v. 39, n. 9, p. 531-536, 2002.
- DORMAN, S. E.; HOLLAND, S. M. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 11, p. 321-333, 2000.

DRISS, A.; ASARE, K. O.; HIBBERT, J. M.; GEE, B. E.; ADAMKIEWICZ, T. V.; STILES, J. K. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomics Insights.**, v. 2, p. 23-48, 2009.

EL-HAZMI, M. A. F.; WARSY, A. S.; AL-MOMEN, A. HARAKATI, M. Hydroxyrea for treatment of sickle cell disease. **Acta Haematol.**, v. 88, n, 4, p. 170-174, 1992.

ELLIOT, L.; ASHLEY-KOCH, A. E.; DE CASTRO, L.; JONASSAINT, J.; PRICE, J.; ATAGA, I. K.; LEVESQUE, M. C.; WEINBERG, J. B.; ECKMAN, J. R.; ORRINGER, E. P.; VANCE, J. M.; TELEN, M, J. Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. **Brit. J. of Haematol.**, v. 137, n. 3, p. 262-267, 2007.

FABRY, M. E.; KAUL, D. K. Sickle cell vaso-occlusion. **Hematol\Oncol. Clin. N. Am.**, n. 5, p. 375-398, 1991.

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, n. 6, p. 2081-2095, 1989.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J. S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J. Clin. Invest.**, v. 102, n. 7, p. 1369-1376, 1998.

FATHALLAH, H.; ATWED, G. F. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. **Hemat. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.** p.58-62, 2006.

FRAGOSO, J. M.; DELGADILLO, H.; CEDILLO-JUAREZ, T.; PEREZ-RODRIGUEZ, J. M.; VALLEJO, M.; PEREZ-MENDEZ, O.; ALVAREZ-LEON, E.; PENA-DUQUE, M. A.; MARTINEZ-RIOS, M. A.; VARGAS-ALARCON, G. The Interleukin 6 -572 G>C (rs1800796) Polymorphism is associated with the risk of developing acute coronary syndrome. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers.**, v. 14, n. 6, p. 759-763, 2010.

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

GORRELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R.A. Mechanism of transforming growth factor β - induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **J. Exp. Med.**, v. 195, p. 1499-1505, 2002.

GOSAIN, A.; GAMELLI, R. L. A primer in cytokines. **J. Burn Care Rehabil.**, v. 26, n. 1, p. 7-12, 2005.

GUSTAFSSON, C. Local immune regulation in human pregnancy with focus on decidual macrophages. 76 f, Medical Dissertations - Department of Clinical and Experimental Medicine Faculty of Health Sciences, Linköping University, 2007.

HAJJER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNF α gene polymorphisms on TNF- α production and disease. **Hum. Immunol.**, v. 62, n.11, p. 1191-1199, 2001.

- HARLAN, J. M. Introduction: anti-adhesion therapy in sickle cell disease. **Blood.**, v. 95, n. 2, p. 365-367, 2000.
- HAWRYLOWICZ, C. M.; O'GARRA, A. Potential role of interleukin-10- secreting regulatory T cells in allergy and asthma. **Nat. Ver. Immunol.**, v. 5, p. 271-283, 2005.
- HEBBEL, R. P. Adeshive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 11, p. 83-86, 1997.
- HEBBEL, R. P.; OSAROGIAGBON, R.; KAUL, D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and chronic vasculopathy. **Microcirculation.**, v. 11, n. 2, p. 129-151, 2004.
- HENAO, M. I.; MONTES, C.; PARÍS, S. C.; GARCÍA, L. F. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with different clinical presentations of tuberculosis. **Tuberculosis.**, v. 86, p. 11-19, 2006.
- HERMANN, S. M.; RICARD, S.; NICAUD, V.; MALLET, C.; ARVEILER, D. et al. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 28, p. 59-66, 1998.
- HORWITZ, D. A.; ZHENG, G. S.; GRAY, D. J. Natural and TGF- β - induced Foxp3 CD4+ CD25+ regulatory T cells are not mirror images of each other. **Trends in Immunol.**, v. 29, n. 8, p. 429-435, 2008.
- HOOPE, C.; KLITZ, W.; CHENG, S, et al. Gene interactions and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Blood.**, v. 103, n.6, p. 2391-2396, 2004.
- HOOPE, C.; KLITZ, W.; D'HARLINGUE, K, et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. **Stroke.**, v.38, n.8, p. 2241-2246, 2007.
- IKUTA, T.; ADEKILE, A. D.; GUSTSAEVA, D. R.; PARKERSON, J. B.; YERIGENAHALLY, S. D.; CLAIR, B.; KULTLAR, A.; ODO, N.; HEAD, A. The proinflammatory cytokine GM-CSF downregulates fetal hemoglobin expression by attenuating the cAMP-dependent pathway in sickle cell disease. **Blood Cells, Molecules, and Diseases.**, v. 47, n. 4, p. 235-242, 2011.
- JOANNES, M. O.; LOKO, G.; DELOUMEAUX, J.; CHOUT, R.; MARIANNE-PEPIN, T. Association of the +874 T/A interferon gamma polymorphism with infections in sickle cell disease. **Int. J. Immunogenet.**, v. 37, n. 4, p. 219-223, 2010.
- JOSS, A.; AKDIS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, A. C. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 6, 2000.
- KAMANAKA, M.; KIM, S. T.; WAN, Y. Y.; SUTTERWALA, M.; LARA-TEJERO, J. E.; GALÁN, J. E.; HARJAD, E.; FLAVEL, R. A. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. **Immunity.**, v. 25, p. 941-962, 2006.

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

KELLER, J. R.; SING, G. K.; ELLINGSWORTH, L. R.; RUSCETTI, F. W. Transforming growth factor beta: possible roles in the regulation of normal and leukemic hematopoietic cell growth. **J Cell Biochem.** v. 39, p. 175-184, 1988.

KEMNA, E.; PICKKERS, P.; NEMETH, E. et al. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. **Blood.**, v. 106, p. 1864-1866, 2005.

KIM, D.H.; LEE, N. Y.; SOHN, S. K.; BAEK, J. H.; KIM, J. G.; SUH, J. S.; LEE, K. B.; SHIN, I. H. IL-10 promoter gene polymorphism associated with the occurrence of chronic GVHD and its clinical course during systemic immunosuppressive treatment for chronic GVHD after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. **Transplantation.**, v. 79, p. 1615-1622, 2005.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: From basic science to medicine- 40 years in Immunology. **Annu. Rev. of Immunol.**, v. 23, p. 1-21, 2005.

KOOS, K.; SATSANGI, J.; FANNING, G. C.; WELSH, K. I.; JEWELL, D. P. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. **Genes and immunity.**, v. 1, n. 3, p. 185-190, 2000.

KUBISTOVA, S.; MRAZEK, F.; PETREK, M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic, v.153, p. 93-102, 2009.

KUTLAR, A.; KUTLAR, F.; TURKER, I.; TURAL, C. The methylene tetrahydrofolate reductase (C677T) mutation as a potential risk factor for avascular necrosis in sickle cell disease. **Hemoglobin.**, v.25, n.2, p. 213-217, 2001.

KUTLAR, A. Sickle Cell Disease: A Multigenic Perspective of a Single-Gene Disorder. **Med. Princ. Pract.**, v. 14, n. 1, p. 15-19, 2005.

LAN, R. Y.; ANSARI, A. A.; LIAN, Z. X.; GERSHWIN, M. E. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. **Autoimmun. Rev.**, v. 4, n. 6, p. 351-363, 2005.

LAOUAR, Y.; SUTTERWALA, F. S.; GORELIK, L.; FLAVELL, R. A. Transforming growth factor- β controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 600-607, 2005.

LAVELLE, D. E. The molecular mechanism of fetal hemoglobin reactivation. **Semin Hematol.**, v. 41, p.3-10, 2004.

LIANG, S. C.; TAN, X. Y.; LUXENBERG, D. P.; KARIN, R.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; COLLINS, M. et al. Interleukin (IL) -22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and

- cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2271-2279, 2006.
- LI, M.O.; WAN, Y.Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A.K.; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 99–146, 2006.
- LIMA, Luana Nepomuceno Gondim Costa. Estudo do polimorfismo dos genes das citocinas TNF α , IFN γ , TGF β , IL-6 e IL-10 em Hanseníase. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- LOPÉZ-MADERUELO, D.; ARNALICH, F.; SERANTES, R.; GONZÁLEZ, A.; CODOCEO, R.; MADERO, R.; VÁSQUEZ, J. J.; MONTIEL, C. Interferon- γ and interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis. **Am. J. Respr. Crit. Care Med.**, v. 167, p. 970-975, 2003.
- LOREY, F. W.; ARNOPP, J.; CUNNINGHAM, G. C. Distribution of hemoglobinopathy variants by ethnicity in a multiethnic state. **Genet. Epidemiol.**, v. 13, p. 501-512, 1996.
- MADIGAM, C.; MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part I: Sickle cell disease. **Expert Rev. Mol. Med.**, v. 8, n. 9, p. 1-23, 2006.
- MAKHATADZE, N. J. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. **Hum. Immunol.**, v. 59, n. 9, p. 571-579, 1998.
- MALAVÉ, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E.; ANCHUSTEGUI, M.; MALAVÉ, H. Level of Tumor Necrosis Factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematol.**, v. 90, p. 172-176, 1993.
- MANGAN, P. R.; HARRINGTON, L. E.; O'QUINN, D. B.; HELMS, W. S.; BULLARD, D. C.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WAHL, S. M.; SCHOEB, T. R.; WEAVER, C. T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H) 17 lineage. **Nature.**, v. 441, p. 231-234, 2006.
- MATSUMOTO, K.; OKI, A.; SATOH, T.; OKADA, S.; MINAGUCHI, T.; ONUKI, M.; OCHI, H.; NAKAO, S.; SAKURAI, M.; ABE, A.; HAMADA, H.; YOSHIKAWA, H. Interleukin-10 –1082 Gene Polymorphism and Susceptibility to Cervical Cancer Among Japanese Women. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 40, n. 11, p. 1113-1116, 2010.
- McCURDY, P. R.; SHERMAN, A. S. Irreversibly sickled cells and red cell survival ins sickle cell anemia: a study with both DF32P AND 51 CR. **Am. J. Med.**, v. 64, p.253-258, 1978.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Manual de Anemia Falciforme para a População – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bull World Health Organ.**, v. 86, p. 480-487, 2008.

- MOHANDAS, N.; EVANS, E. Rheological and adherence properties of sickle cells: Potential contribution to hematologic manifestations of the disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 565, p. 327-337, 1989.
- MOORE, K. W.; DE WAAL, M. R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MOREIRA, L. S.; de ANDRADE, T. G.; ALBUQUERQUE, D. M. CUNHA, A. F.; FATTORI, A.; SAAD, S. T.; COSTA, F. F. Identification of differentially expressed genes induced by hydroxiurea in reticulocytes from sickle cell anaemia patients. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 35, p. 651-655, 2008.
- MOREIRA NETO, F.; LOURENÇO, D. M.; NOGUTI, M.A.; MORELLI, V.M.; GIL, I.C.P.; BELTRÃO, A.C.S.; FIGUEIREDO, M.S. The clinical impact of MTHFR polymorphism on the vascular complications of sickle cell disease. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n.10, p.1291-1295, 2006.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, p. 2348-2357, 1986.
- NAGEL, R. L.; RANNEY, H. M. Genetic epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. **Seminars in hematology.**, v. 27, p. 342-359, 1990.
- NAOUM, P.C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. **Boletim da Soc. Bras. de Hemat. e Hemot.**, v. 18, p. 75-81, 1996.
- NEMETH, E.; RIVERA, S.; GABAYAN, V. et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1271-1276, 2004.
- O'GARRA, A.; BARRAT, F. J.; CASTRO, A. G.; VICARI, A.; HAWRYLOWICZ, C. Strategies for use of IL-10 for its antagonists in human disease. **Immunol Rev.**, v. 223, n. 1, p. 114-131, 2008.
- OKPALA, I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red disorder. **Blood Reviews.**, v. 18, p. 63-73, 2004.
- ONISHI, R.M.; GAFFEN, S.L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. **Immunol.**, v. 129, n. 3, p. 311-321, 2010.
- PAGNIER, J.; MEARS, G.; DUNDA-BELKHODJA, O.; SCHAEFER-REGO, K. E.; BELDJORD, C.; NAGEL, R. L.; LABIE, D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in Africa. **Proc. Natl. Acad. Sci .USA.**, v. 81, p. 1771-1773, 1984.
- PERREY, C.; PRAVICA, V.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. Genotyping for polymorphisms in interferon-gama, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumor necrosis factor-alpha genes: a technical report. **Transpl. Immunol.**, v.36, n. 3, p. 193-197, 1998.

- PERUTZ, M. F.; ROOSMAN, M. G.; CULLIS, A. F. MUIRHEAD, H.; WILL, G.; NORTH, A. C. T. Structure of hemoglobin. **Nature**, v. 185, p. 416-420, 1960.
- PINHEIRO, L. S.; GONÇALVES, R. P.; TOME, C. A. S.; ALCÂNTARA, A. E. E.; MAEQUES, A. R. C; DA SILVA, M. M. Prevalência de HbS em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 28, n. 2, p.122-125, 2006.
- POWARS, D. R.; HITI, A. "Sickle cell anemia. Beta s gene cluster haplotypes as genetic markers for severe disease expression". **Am. J. Dis. Child.**, v. 147, n. 11, p.1197-1202, 1993.
- POWARS, D. R."Beta s-gene-cluster haplotyps in sickle cell anemia. Clinical and hematologic features. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 5, n. 3, p.475-473, 1991.
- RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within Th1/Th2/Th3 paradigm. **Semin. Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 219-227, 2001.
- ROBERTS, A. B. Molecular and cell biology of TGF- β . **Miner Electrolyte Metab.**, v. 24, p. 111-119, 1998.
- RODGERS, G. P. Spectrum of fetal hemoglobin responses in sickle cell patients treated with hydroxyurea: The national Institutes of Health experience. **Semin. Oncol.**, v. 19, n. 3, p. 67-73, 1992.
- ROMAGNANI, S. Human Th17 cells. **Arthritis Research & Therapy.**, v.10, p. 1-8, 2008.
- ROSSE, W. F.; NARLA, M.; PETZ, L. D.; STEINBERG, M. H. New views of sickle cell disease pathophysiology and treatment. **Hemat. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, p. 2-17, 2000.
- RUND, D.; FUCHAROEN, S. "Genetic modifiers in hemoglobinopathies." **Curr. Mol. Med.**, v. 8, n.7, p.600-608, 2008.
- SALEH, A. W.; HILLEN, H. F.; DUITZ, A. J.; Levels of endothelial, neutrophil and platelet specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. **Acta Haematol.**, v. 102, n.1, p. 31-37, 1999.
- SCHANDENE, L.; ALONSO-VEGA, C.; WILLEMS, F.; GERARD, C.; DELVAUX, A.; VELU, T.; DEVOS, R.; DE BOER, M.; GOLDMAN, M. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. **J. Immunol.**, v. 152, n. 9, p. 4368-4374, 1994.
- SCHNOG, J. B.; DUITZ, A. J.; MUSKIET, F. A. J.; TEN CATE, H.; ROJER, R. A.; BRANDJES, D. P. M. Sickle cell disease: a general overview. **Neth. J. Med.**, v. 62, p. 364-374, 2004.
- SEBASTIANI, P.; RAMONI, M.F.; NOLAN, V.; BALDWIN, C.T.; STEINBERG, M.H. Genetic dissection and prognostic modeling of overt stroke risk in children with sickle cell anemia. **Nat. Genet.**, v. 37, n. 4, p. 435-440, 2005.

SEBASTIANI, P.; NOLAN, V. G.; BALDWIN, T. C.; ABAD-GRAU, M. M.; WANG, L. ADEWOYE, A. H.; McMAHON, L. C.; FARRER, L. A.; TAYLOR IV, J. G.; KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood.**, v. 110, p. 2727-2735, 2007.

SERJEANT, G. R.; Natural history and determinants of clinical severity of sickle cell disease. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 2, n. 2, p.103-108, 1995.

SOLOVEY, A.; LIN, Y.; BROWNE, P.; CHOONG, S.; WAYNER, E.; HEBBEL, R. P. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, p. 1584-1590, 1997.

STEINBERG, M. H.; BRUGNARA, C. Pathophysiological-Based approaches to treatment of Sickle Cell Disease. **Annua. Rev. of Medicine.**, v. 54, p. 89-112, 2003.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br. J. Haematol.** v. 129, n.4, p.465-481, 2005.

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **Scientific World Journal.**, v. 9, p. 46-67, 2009.

STEINBERG, M. H.; ADEWOYE, A. H. Modifier genes and sickle cell anemia. **Curr. Opin. In Hematol.**, v. 13, n. 3, p. 131-136, 2006.

STEINBERG, M. H.; BARTON, F.; CASTRO, O. et al. Effect of Hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **Am. J. Med.**, v. 289, n. 13, p. 1645-51, 2003.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. **Sickle Cell Disease. Lancet.**, v. 364, p. 1343-1360, 2004.

SUN, F.; SUN, Y.; ZHANG, D.; ZHANG, J.; SONG, B.; ZHENG, H. Association of Interleukin-10 Gene Polymorphism with Cachexia in Chinese Patients with Gastric Cancer. **Annals of Clinical & Laboratory Science.**, v. 40, n. 2, p. 149-155, 2010.

TAYLOR, J. G.; NOLAN, V. G.; MENDELSONHN, L.; KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Chronic hyperhemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with infrequent vasoocclusive pain. **PLoS ONE.** v. 3, p. 2095, 2008.

THOMAS, P. W.; HIGGS, D. R.; SERJEANT, G. R. Benign clinical course in homozygous sickle cell disease: a search for predictors. **J. Clin. Epidemiol.**, v. 50, n. 2, p.121-126, 1997.

TRACEY, K. J.; LOWRY, S. F.; BEUTLER, B. et al. Cachectin/tumor necrosis factor mediates changes of skeletal muscle plasma membrane potential. **J. Exp. Med.**, v. 164, n. 4, p. 1368-1373, 1986.

TREJAUT, J. A.; TSAI, Z. U.; LEE, H. L.; CHEN, Z. X.; LIN, M. Cytokine gene polymorphisms in Taiwan. **Tissue Antigens.**, v. 64, n. 4, p. 492-499, 2004.

TSIAVOU, A.; HATZIAGELAKI, E.;CHAIDAROGLOU, A.; KONIAVITOU, K.; DEGIANNIS, D.; RAPTIS, A. S. Correlation between intracellular interferon-gamma (IFN-

gamma) production by CD4+ and CD8+ lymphocytes and IFN-gamma gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). **Cytokine.**, v. 31, p. 135-141, 2005.

TURHAN, A.; WEISS, L. A.; MOHANDAS, N.; COLLER, B. S.; FRENETTE, P. S. Primary role for adherent leucocytes in cell vascular occlusion: a new paradigm. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 3047-3051, 2002.

TURNER, D.M.; WILLIAMS, D. M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur. J. Immunogenet.**, v. 24, p. 1-8, 1997.

VANDEBORGHT, P. R.; MATOS, H. J.; SALLES, A. M.; VASCONCELOS, S. E.; SILVA-FILHO, V. F.; HUIZINGA, T. W.; OTTENHOFF, T. H.; SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; SANTOS, A. R.; MORAES, M. O. Single nucleotide polymorphisms at -208 and -308 positions in the TNFalpha promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 72, n. 2, p. 143-148, 2004.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER, B. TGFb in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity.**, v. 24, p. 179-189, 2006.

VICARI, P.; SILVA, G.S.; NOGUTTI, M. A.; NETO, F. M.; DOS SANTOS, N. J.; MASSARO, A. R.; FIGUEIREDO, M. S. Absence of association between TNF-alpha polymorphism and cerebral large vessel abnormalities in adults with sickle cell anemia. **Acta Haematol.**, v. 125, n. 3, p. 141-144, 2011.

VISENTAINER, J. E. L.; SELL, A. M.; FRANCESCHI, D. A.; LIEBER, S. R.; SOUZA, L. A. Importância de polimorfismos de genes reguladores citocinas em transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. **Rev. Bras. Cienc. Farmac.** v. 44, n. 4, p. 739-748, 2008.

WAGENER, F. A. D. T. G.; ABRAHAM, N. G.; KOOYK, Y. V.; WITTE, T.; FIGDOR, C.G. Heme-induced cell adhesion in the pathogenesis of sickle cell disease and inflammation. **TRENDS in Pharmacol. Sciences.**, v. 22, p. 52-54, 2001.

WAHL, S. M.; HUNT, D. A.; WAKEFIELD, L. M.; McCARTNEY-FRANCIS, N. WAHL, A.; ROBERTS, B.; SPORN, M. B. Transforming growth-factor beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 84, p. 5788-5792, 1987.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bull World Health Organ.**, v. 79, p. 704-712, 2001.

WEAVER, C. T.; et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity.**, v. 24, p. 677-688, 2006.

WEISS, G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1790, p. 682-693, 2009.

WILSON, A. G.; SYMONS, J. A.; MCDOWELL, T. L.; MCDEVITT, H. O.; DUFF, G. W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, n.7. p. 3195-3199, 1997.

YOUNG, H. A.; HARDY, K. J. Role of interferon- γ in immune cell regulation. **Journal of Leukocyte Biology.**, v. 58, p. 373-381, 1995.

YU, H.; ZHU, Q. R.; GU, S. Q.; FEI, L.E. Relationship between IFN γ gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. **World J. Gastroenterol.**, v.12, p. 2928-2931, 2006.

ZAMBON, C. F.; BASSO, D.; NAVAGLIA, F.; BELLUCO, C.; FALDA, A.; FOGAR, P.; GRECO, E.; GALLO, N.; RUGGE, M.; Di MARIO, F.; PLEBANI, M.; Pro- anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and Helicobacter pylori infection: interections influence outcome. **Cytokine.**, v. 29, p. 141-152, 2005.

APÊNDICE A – FICHA CLÍNICO-LABORATORIAL

1. Identificação do paciente			
Nome:		Prontuário:	
Data de nascimento: __/__/____	Sexo: () M () F	Identidade: _____	
Endereço:			
Cidade:	UF:	Telefone:	Celular:
E-mail:			
2. Diagnóstico de anemia falciforme			

Data do diagnóstico: ___/___/___

Concentração de HbF ao diagnóstico: _____

Eletroforese de hemoglobina (data e resultado): _____

Hemograma

Data	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___	___/___/___
Hemácias					
Hb					
Ht					
VCM					
HCM					
CHCM					
RDW					
Leucócitos					
Bastões					
Segmentados					
Eosinófilos					
Basófilos					
Linfócitos					
Monócitos					
Metamielócitos					
Mielócitos					
Promielócitos					
Blastos					

3. Dados clínicos

Ano/frequência	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
-----------------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

AVC									
Priapismo									
Sd. torácica aguda									
Úlceras em pernas									
Colelitíase									
Necrose avascular do fêmur									
Data da última transfusão: ___/___/___									
4.Tratamento									
Data do início do tratamento: ___/___/___									
Seguimento do tratamento									
<u>Data</u>	<u>Dose hidroxiuréia</u>					<u>[] HbF</u>			

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada **“INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMO NAS CITOCINAS TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-6 e IL-10 NA ANEMIA FALCIFORME”**, que tem como objetivo principal pesquisar a presença de uma alteração das células do sangue que pode estar relacionada com uma doença que muda a forma das hemácias, pesquisando na célula qual a causa desta modificação.

Convido o Sr(a), participar da pesquisa, em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, que reside na rua Pereira Valente, 640, Apto 701, bairro Meireles, Fortaleza,CE. Fone: (0xx85)-33668264. Para informações sobre questões éticas relacionadas a esse estudo, o senhor(a) poderá dirigir-se ao: Comitê de Ética em Pesquisa na Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60 430-370 – (85) 3366. 8167– Fortaleza – Ceará. Para tanto, necessitamos que a Senhor (a) autorize a obtenção da coleta de 5 mL de sangue venoso, coleta esta que será realizada por profissionais experientes, com material descartável e com todos os cuidados necessários para que não ofereçam nenhum risco ao

paciente. A coleta de sangue será realizada no Hemocentro do Estado do Ceará-HEMOCE, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto(a) a nenhum risco, podendo desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com a pesquisadora.

Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifestos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura de quem obteve o termo