



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LICIANA HELENA FURIGO CARDOSO

“ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CCL5 E CCL11
ASSOCIADOS A COMPLICAÇÕES PULMONARES EM CRIANÇAS
PORTADORAS DE ANEMIA FALCIFORME”

*“POLYMORPHISMS IN CCL5 AND CCL11 GENES ASSOCIATED WITH
RESPIRATORY COMPLICATIONS IN CHILDREN WITH SICKLE CELL ANEMIA”*

CAMPINAS
2013

LICIANA HELENA FURIGO CARDOSO

“ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CCL5 E CCL11 ASSOCIADOS A
COMPLICAÇÕES PULMONARES EM CRIANÇAS PORTADORAS DE ANEMIA
FALCIFORME”

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências na área
de concentração Clínica Médica.

ORIENTAÇÃO: PROF.^a DR.^a CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO CO-
ORIENTAÇÃO: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR LICIANA
HELENA FURIGO CARDOSO E ORIENTADA PELA PROF.^a
DR.^a CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO.

CAMPINAS

2013

AGÊNCIA FINANCIADORA: CAPES – COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR

NÚMERO DO PROCESSO (RECEBIMENTO DO AUXÍLIO): 01P-03883-2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Corrêa, Liciane Helena Furigo Cardoso, 1984-
C817e Estudo de polimorfismos nos genes CCL5 e CCL11 associados a complicações pulmonares em crianças portadoras de anemia falciforme / Liciane Helena Furigo Cardoso Corrêa. -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Carla Fernanda Franco Penteado.
Coorientador : Fernando Ferreira Costa.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Quimiocina CCL5. 2. Quimiocina CCL11. 3. Pneumopatias - Complicações. 4. Anemia falciforme. I. Penteado, Carla Fernanda Franco. II. Costa, Fernando Ferreira, 1950-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Polymorphisms in CCL5 and CCL11 genes associated with respiratory complications in children with sickle cell anemia

Palavras-chave em inglês:

Chemokine CCL5

Chemokine CCL11

Lung Diseases, Complications Anemia,
Sickle cell

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Carla Fernanda Franco Penteado [Orientador] Mônica
Barbosa de Melo

Anderson Ferreira da Cunha

Data de defesa: 30-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LICIANA HELENA FURIGO CARDOSO

ORIENTADOR: CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO

COORIENTADOR: FERNANDO FERREIRA COSTA

MEMBROS:

1. PROF. DR. CARLA FERNANDA FRANCO PENTEADO

2. PROF. DR. MÔNICA BARBOSA DE MELO

3. PROF. DR. ANDERSON FERREIRA DA CUNHA

Programa de Pós-Graduação em CLÍNICA MÉDICA da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 30/08/2013

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Carlos e Mercedes
que sempre apoiaram os meus
sonhos e objetivos!*

*Ao meu noivo Samuel pelo constante amor,
compreensão e incentivo!*

*Aos meus sobrinhos:
Lucas, Vitor e Pedro.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a dádiva da vida!

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, pela oportunidade concedida em realizar essa pesquisa.

À Minha orientadora, Dr^a Carla Fernanda Franco Penteado pela oportunidade, ensinamentos e confiança em mim depositada.

Ao Dr. Aderson Araújo e ao Dr. Marcos André (Fundação HEMOPE), pela disponibilidade das amostras do grupo de pacientes pediátricos, as quais se fundamentaram o atual estudo.

À Dr^a Dulcinéia (Dú), pela constante ajuda e ensinamentos únicos, os quais foram de crucial importância para a concretização dessa pesquisa.

Ao Dr. Magnun, pela prontificação em me ajudar e pela disponibilização das amostras do grupo controle para a finalização desse trabalho.

Ao Dr Andrey, à Dr^a Carolina e à “Ucha”, pela atenção e empenho durante todo o transcorrer desse estudo.

À Dr^a Galina Ananina pela prontificação, incentivo e ensinamentos durante as análises estatísticas para a conclusão desse trabalho.

Às colegas da Fundação HEMOPE Betânia Lucena, pelo auxílio em submeter o atual trabalho no CEP de Recife, à Luana e principalmente à Nara Barbosa pelo intermédio no envio de informações dos pacientes para a elucidação desse estudo.

À querida amiga Telmishélen (Telma) pela valiosa ajuda no momento em que mais necessitei de seu auxílio! E evidentemente pela sua amizade, carinho, apoio e momentos de descontração!

Às colegas de laboratório Regiane, Flávia (marmota), Thais e Flávia Lopes, que sempre estavam prontas a me ajudar durante o desenvolvimento deste trabalho. À Flavia Costa pelo intermédio do envio das amostras dos pacientes do programa de triagem neonatal da Fundação HEMOPE.

As queridas meninas: Simone Sene (Si), Daniela Pinheiro (Dani), Dilmara (Dil) e Lena, que sempre estavam dispostas a prestar auxílio! Obrigada pelo carinho, apoio e amizade! Que de forma direta ou indiretamente, participaram desta conclusão!

À Sílvia (Silvinha) pela constante ajuda, empenho e insistência na conquista de uma bolsa de estudos!

A todos os colegas e funcionários do HEMOCENTRO da UNICAMP, que com o mais simples ato cooperaram para o término desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Augusto Luchessi (UNICAMP – Limeira/SP) pela oportunidade de estagiar como PED (Programa de Estágio Docente), o qual muito contribuiu para o meu crescimento acadêmico.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Em especial, aos meus pais Carlos, pelo apoio e incentivo, para o desenvolvimento desse estudo! E à minha amada mãe Mercedes (Chê) que com sua virtude de ajudar incalculavelmente, também faz parte dessa conclusão!

Ao meu noivo Samuel (Samuka), pelo amor, carinho, apoio e principalmente pela compreensão nos momentos que estive ausente durante a finalização desse estudo (parte escrita...rs)!

Aos meus queridos irmãos Carlinhos, Rafael e Lívia. As minhas cunhadas Jô, Carina e ao meu cunhado Taciano, respectivamente, pelo apoio, carinho e incentivo.

À minha querida prima e “dinda” Ana Laura (Roró) pela sua excelente recepção e

acolhimento! Nunca nos sentíamos sozinhas, pois sempre estávamos acompanhadas com seus diversos bichos de estimação, inclusive o falecido “Sidney” (rs). Muito obrigada, pelo carinho, amor, amizade e pelas muitas gargalhadas. Você também faz parte desse término!

À minha afetuosa “prima-irmã” Thais Furigo, que com seu eterno e contagiante entusiasmo, também faz parte dessa conquista!

A toda minha querida família que sempre torcem por mim, os meus sinceros agradecimentos!

Aos meus inesquecíveis amigos de transporte “Neguinho” e “Marquinhos”, os quais sempre com ótimo humor me proporcionaram locomoção de Jaguariúna (SP) à UNICAMP, durante o período final dessa pesquisa.

À Gleidis (Gleidy), pela amizade, respeito e momentos de descontração. Estendeu sua mão amiga me proporcionando ajuda, compreensão e total apoio, os quais foram fundamentais para a finalização desse trabalho! Muito obrigada! Deus te abençoe!!!

Aos pacientes do programa de triagem neonatal da Fundação HEMOPE, os quais viabilizaram essa pesquisa!

A todos, o meu muito obrigada!!!

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é a doença hereditária mais prevalente no Brasil e no mundo, decorrente de uma mutação de ponto no códon 6 do gene da globina beta (GAG>GTG) e tem por consequência a troca do resíduo ácido glutâmico pela valina, levando a produção de uma hemoglobina anômala, a hemoglobina S. Uma das características marcantes da AF é a variabilidade clínica observada nesses pacientes, o que contribui para a complexidade no entendimento da sua fisiopatologia. O pulmão é um dos órgãos mais acometidos e as complicações na AF resultam em significativa morbimortalidade na faixa pediátrica. As complicações pulmonares são multifatoriais e influenciadas por polimorfismos genéticos. As eotaxinas e o RANTES são quimiocinas da família CC (resíduos de cisteína) que estimulam a migração de eosinófilos dos vasos sanguíneos para os pulmões e apresentam papel crucial na resposta inflamatória das doenças do trato respiratório. Inicialmente descritas como citocinas quimiotáticas, atualmente sabe-se que essas moléculas exercem múltiplos papéis no processo inflamatório, incluindo a regulação do tráfego e a imunomodulação da ativação dos leucócitos, fibrose, angiogênese, hematopoese e o estabelecimento e manutenção da hiperresponsividade. Polimorfismos no gene CCL11 (Eotaxina1) e no gene CCL5 (RANTES) têm sido frequentemente associados às complicações respiratórias. Este estudo teve por objetivo investigar polimorfismos gênicos da eotaxina-1 e RANTES em um grupo de 160 pacientes pediátricos com AF diagnosticados e acompanhados no HEMOPE-Pernambuco, e correlacioná-los às manifestações clínicas (asma, síndrome torácica aguda e infecção pulmonar). A análise molecular para identificação dos SNPs rs16969415 (-426C>T), rs17809012 (-384A>G) e rs1129844 (67G>A) no gene CCL11 e dos SNPs (-28C>G) rs2280788, (-403G>A) rs2107538 e (IN1.1C>T) rs2280789 no gene CCL5, foi realizada por PCR-RFLP. A presença do polimorfismo (IN1.1C>T) no gene da quimiocina RANTES está significativamente associado à presença de infecção pulmonar em crianças com anemia falciforme.

Palavras-Chaves: CCL5, CCL11, Complicações Pulmonares e Anemia Falciforme

ABSTRACT

Sickle Cell Anemia (SCA) is the most common inherited genetic disorder in Brazil and in the world. It is an autosomal recessive condition and is caused by a single point mutation in the gene encoding the β -globin chain of hemoglobin. The mutation (GAG→GTG) causes the substitution of a valine residue for glutamic acid at position 6 in the β -globin chain, resulting in a hemoglobin called hemoglobin S. One of the striking features of SCA is the clinical variability observed in these patients, which contributes to the complexity in understanding its pathophysiology. The lungs are one of the most affected organs and the consequences of SCA result in significant morbidity and mortality rates in pediatric patients. Pulmonary complications are multifactorial and influenced by genetic polymorphisms. Eotaxin 1 and RANTES are members of the CC chemokine family (cysteine residue) involved in the recruitment of eosinophils from blood vessels to the lungs, and have a crucial role in inflammatory diseases of the respiratory tract. Initially described as chemotactic cytokines, it is currently known that these molecules have multiple roles in the inflammatory process, including leukocyte traffic regulation, immunomodulation of leukocyte activation, fibrosis, angiogenesis, hematopoiesis, and the establishment and maintenance of hyperresponsiveness. *CCL11*(Eotaxin-1) and *CCL5*(RANTES) gene polymorphisms have often been associated with respiratory complications. In this study, we have retrospectively investigated the correlation between these genetic polymorphisms and clinical manifestations (asthma, acute chest syndrome, and pulmonary infection) in a group of 160 pediatric patients with SCA from the HEMOPE Foundation in Pernambuco, Brazil. The polymorphisms, namely rs16969415 (-426C> T), rs17809012 (-384A> G), rs1129844 and (67G> A) of *CCL11* gene and SNPs rs2280788 (-28C> G), rs2107538 (-403G> A) and rs2280789 (IN1.1C> T) of *CCL5* gene were analyzed by PCR-RFLP. In our study, children with sickle cell anemia carrying the IN1.1C>T RANTES variant were more likely to have had pulmonary infections.

Keywords: CCL5, CLL11, Pulmonary Complications and Sickle Cell Anaemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vaso-oclusão na anemia falciforme	21
Figura 2. Ciclo da Síndrome Torácica Aguda.....	27
Figura 3. Localização dos polimorfismos de nucleotídeo único no gene da eotaxina: -426 C→T, -384 A→G e 67 G→A.....	35
Figura 4. Localização dos polimorfismos no gene do RANTES.....	38
Figura 5. Fotografia sob luz ultravioleta do gel de agarose. Fragmentos que flanqueiam o SNP rs2107538 gene CCL5	49
Figura 6. Fotografia sob luz ultravioleta do gel de agarose. Fragmentos que flanqueiam o SNP rs2107538 gene CCL5. PCR seguida de RFLP.....	53
Figura 7. Fotografia sob luz ultravioleta do gel de agarose. Fragmentos que flanqueiam o SNP rs2107538 gene CCL5. PCR seguida de RFLP	54
Figura 8. Validação dos resultados obtidos através da técnica de PCR-RFLP mediado por sequenciamento automático.....	57
Figura 9. Desequilíbrio de Ligação	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> que foram utilizados para amplificação dos genes CCL11 (Eotaxina-1) e CCL5 (RANTES)	45
Tabela 2. Identificação e volume das endonucleases de restrição utilizadas na digestão enzimática para investigação das regiões polimórficas nos genes CCL11 e CCL5.....	50
Tabela 3. Condições da digestão enzimática no reconhecimento das regiões polimórficas dos genes CCL11 e CCL5.....	51
Tabela 4. Frequência Genotípica do SNP rs17809012 no gene CCL11 em crianças portadoras de Anemia Falciforme e em indivíduos saudáveis.....	59
Tabela 5. Frequência Genotípica do SNP rs16969415 no gene CCL11 em crianças portadoras de Anemia Falciforme.....	60
Tabela 6. Frequência Genotípica do SNP rs1129844 no gene CCL11 em crianças portadoras de Anemia Falciforme.....	61
Tabela 7. Frequência Genotípica do SNP rs2280788 no gene CCL5 em crianças portadoras de Anemia Falciforme.....	62
Tabela 8. Frequência Genotípica do SNP rs2107538 no gene CCL5 em crianças portadoras de Anemia Falciforme e em indivíduos saudáveis.....	64

Tabela 9. Frequência Genotípica do SNP rs2280789 no gene CCL5 em crianças	
portadoras de Anemia Falciforme.....	65
Tabela 10. Associação dos Haplótipos TG, CA e TA à Asma.....	69
Tabela 11. Associação dos Haplótipos TG, CA e TA à STA	70
Tabela 12. Associação dos Haplótipos TG, CA e TA a Infecção Pulmonar.....	71
Tabela 13. Análise de associação do SNP rs17809012 (A→G) no gene CCL11 à ASMA em crianças portadora de Anemia Falciforme.....	73
Tabela 14. Análise de associação do SNP rs17809012 (A→G) no gene CCL11 à STA em crianças portadora de Anemia Falciforme.....	74
Tabela 15. Análise de associação do SNP rs17809012 (A→G) no gene CCL11 à Infecção Pulmonar em crianças portadora de Anemia Falciforme.....	75
Tabela 16. Análise de associação do SNP rs16969415 (C→T) no gene CCL11 à ASMA em crianças portadora de Anemia Falciforme.....	76
Tabela 17. Análise de associação do SNP rs16969415 (C→T) no gene CCL11 à STA em crianças portadora de Anemia Falciforme.....	77
Tabela 18. Análise de associação do SNP rs16969415 (C→T) no gene CCL11 à Infecção Pulmonar em crianças portadora de Anemia Falciforme.....	78
Tabela 19. Análise de associação do SNP rs2107538 (G→A) no gene CCL5 à asma em crianças portadora de Anemia Falciforme.....	79

Falciforme 80

Falciforme 81

Falciforme 82

Falciforme 83

Falciforme 84

Sumário

1) INTRODUÇÃO	18
1.1 Doença Falciforme	18
1.2 Anemia Falciforme	18
1.3 Os Haplótipos do Gene da Globina Beta	22
1.4 Complicações Pulmonares na Anemia Falciforme	24
1.4.1 Síndrome Torácica Aguda.....	24
1.4.2 HIPERTENSÃO PULMONAR.....	28
1.4.3 Infecção Pulmonar	29
1.4.4 Asma.....	30
1.5 Quimiocinas.....	31
1.6 Atividade funcional da Eotaxina e RANTES nas complicações respiratórias.....	33
1.7 Genética das Quimiocinas: Eotaxina e RANTES.....	34
1.7.1 Eotaxina.....	34
1.7.2 RANTES.....	37
2) OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3) MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Pacientes	40
3.2 Controles	40
3.3 Coleta de Sangue Periférico	40
3.4 Envio das Amostras	41
3.5 Aspectos Éticos da Pesquisa	41
3.6 Desenho do Estudo	41
3.7 Análise Estatística.....	42
3.8 SNPs selecionados para o Gene CCL11.....	42
3.9 SNPs selecionados para o Gene CCL5.....	43
3.10 Desenho dos primers para amplificação dos genes CCL11	43
(Eotaxina-1) e CCL5 (RANTES) através da técnica de PCR.....	43
3.11 Extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico.....	46
3.12 Quantificação e Armazenamento da Amostra de DNA.....	47
3.13 Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR)	48

3.14 Análise de Restrição (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism)	50
3.15 Preparo do Gel de Agarose	52
3.16 Eletroforese em Gel de Agarose.....	52
3.17 Sequenciamento	54
4) RESULTADOS	58
4.1 Investigação de SNPs no gene CCL11	58
4.1.2 Frequência Genotípica do SNP rs17809012	58
4.1.3 Frequência Genotípica do SNP rs16969415	60
4.1.4 Frequência Genotípica do SNP rs1129844	61
4.2 Investigação de SNPs no gene CCL5	62
4.2.1 Frequência Genotípica do SNP rs2280788	62
4.2.2 Frequência Genotípica do SNP rs2107538	63
4.2.3 Frequência Genotípica do SNP rs2280789	65
4.3 Desequilíbrio de Ligação	Error! Bookmark not defined.
4.4 Frequência de Haplótipos	68
4.4.1 Associação de Haplótipos a Complicações Pulmonares.....	68
4.4.2 Haplótipos versus Asma	68
4.4.3 Haplótipos versus Síndrome Torácica Aguda	70
4.4.4 Haplótipos versus Infecção Pulmonar	71
4.5 Associação de Polimorfismos a Complicações Pulmonares	72
4.5.1 SNPs no gene CCL11 associados a complicações pulmonares	72
4.5.1.1 Associação do SNP rs17809012 no gene CCL11 à Asma	72
4.5.1.2 Associação do SNP rs17809012 no gene CCL11 à STA	74
4.5.1.3 Associação do SNP rs17809012 no gene CCL11 à Infecção.....	75
Pulmonar	75
4.5.1.4 Associação do SNP rs16969415 no gene CCL11 à Asma	76
4.5.1.5 Associação do SNP rs16969415 no gene CCL11 à STA	77
4.5.1.6 Associação do SNP rs16969415 no gene CCL11 à Infecção Pulmonar	78
4.5.2 SNPs no gene CCL5 associados a complicações pulmonares	79
4.5.2.1 Associação do SNP rs2107538 no gene CCL5 à Asma	79
4.5.2.2 Associação do SNP rs2107538 no gene CCL5 à STA	80
4.5.2.3 Associação do SNP rs2107538 no gene CCL5 à Infecção Pulmonar	81
4.5.2.4 Associação do SNP rs2280789 no gene CCL5 à Asma	82
4.5.2.5 Associação do SNP rs2280789 no gene CCL5 à STA	83
4.5.2.6 Associação do SNP rs2280789 no gene CCL5 à Infecção Pulmonar	84
5) DISCUSSÃO	85

6) CONCLUSÕES.....	92
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
8) ANEXOS	107

1) INTRODUÇÃO

1.1 Doença Falciforme

A doença falciforme pertence a um grupo de hemoglobinopatias em que a associação da hemoglobina S (HbS) com outra alteração de hemoglobina (Hb), estrutural ou talassêmica, leva a um quadro clínico similar ao da anemia falciforme (AF) (homozigose do gene da HbS –SS). As doenças falciformes compreendem vários diferentes genótipos, entre os principais podemos citar: a anemia falciforme (SS), doença da HbSC (heterozigoto composto para os genes da HbS e HbC) e a S- β talassemia (heterozigose composta para o gene da HbS e talassemia β)¹. As hemoglobinopatias constituem as doenças genéticas mais prevalentes no Brasil e no mundo².

Uma das características marcantes das DF é a variabilidade de suas manifestações clínicas, e as razões para essa heterogeneidade ainda não são completamente entendidas³, variando de formas quase assintomáticas até clinicamente graves, responsáveis por alta mortalidade na infância^{4,5}. Vários fatores genéticos têm grande importância na modulação do quadro clínico das DF. Entre os mais conhecidos estão as variações nos níveis da Hb Fetal (HbF), o tipo de haplótipo ligado ao *cluster* da globina β e a presença de talassemia- α ^{3,5}. Os níveis de HbF são inversamente proporcionais à gravidade da doença¹.

1.2 Anemia Falciforme

A anemia falciforme é uma doença genética decorrente a uma mutação de ponto que resulta na substituição de um único aminoácido na subunidade beta da hemoglobina, a principal molécula transportadora de oxigênio dos glóbulos vermelhos. Essa substituição ocorre no códon 6 do gene da globina beta, onde uma adenina (A) é substituída por uma

timina (T), levando conseqüentemente à substituição do aminoácido ácido glutâmico pela valina, com conseqüente produção de uma hemoglobina anômala – a hemoglobina S (Hb S), uma variável estrutural que é muito menos solúvel que a hemoglobina normal quando desoxigenada^{6,7}.

O evento fundamental na patogenia da anemia falciforme é a polimerização da HbS. A polimerização da desoxi-HbS (única forma passível de se polimerizar) depende de alguns fatores, tais como: concentração de oxigênio, pH, concentração de HbS,^{8,9} temperatura, pressão, força iônica e presença de hemoglobinas normais. As conseqüências da polimerização são: deformação, enrijecimento e perda da flexibilidade das células vermelhas, o que resulta em anemia hemolítica, eventos vaso-oclusivos e^{10,11,12} asplenia funcional, causando um aumento na susceptibilidade a infecções.

Além disso, a membrana dos eritrócitos que contém HbS é constantemente exposta a danos mecânicos que causam a sua ruptura e originam um estado de anemia hemolítica intravascular crônica. Este processo hemolítico causa a liberação da Hb livre e arginase no plasma, diminuindo a disponibilidade de óxido nítrico (NO) endotelial no plasma, produzindo um estado de disfunção endotelial, proliferação vascular, estresse oxidativo e inflamatório. Esses mecanismos geram uma vasculopatia proliferativa que pode afetar as⁴ circulações cerebral, renal e pulmonar.

Estima-se que em todo o mundo aproximadamente 250.000 crianças nascem com anemia⁴ falciforme todo ano e, segundo a Organização Mundial da Saúde, 2.500 crianças nascem no Brasil com a doença. Complicações pulmonares são responsáveis por uma parcela significativa dos óbitos associados à anemia falciforme^{13, 14, 15, 16}. De acordo com o *Cooperative Study of Sickle Cell Disease*, em um estudo multicêntrico e prospectivo de 3.764 pacientes, mais de 20% dos adultos sofreram de complicações pulmonares. A vaso-oclusão é a complicação aguda mais comum em crianças, que conduz ao potencial quadro

de dor ocasionado pelo mecanismo de falcização desses eritrócitos e uma complexa interação de diferentes tipos celulares como reticulócitos, células endoteliais anormalmente ativadas, leucócitos, plaquetas e fatores do plasma^{8,17,18}, (Figura 1).

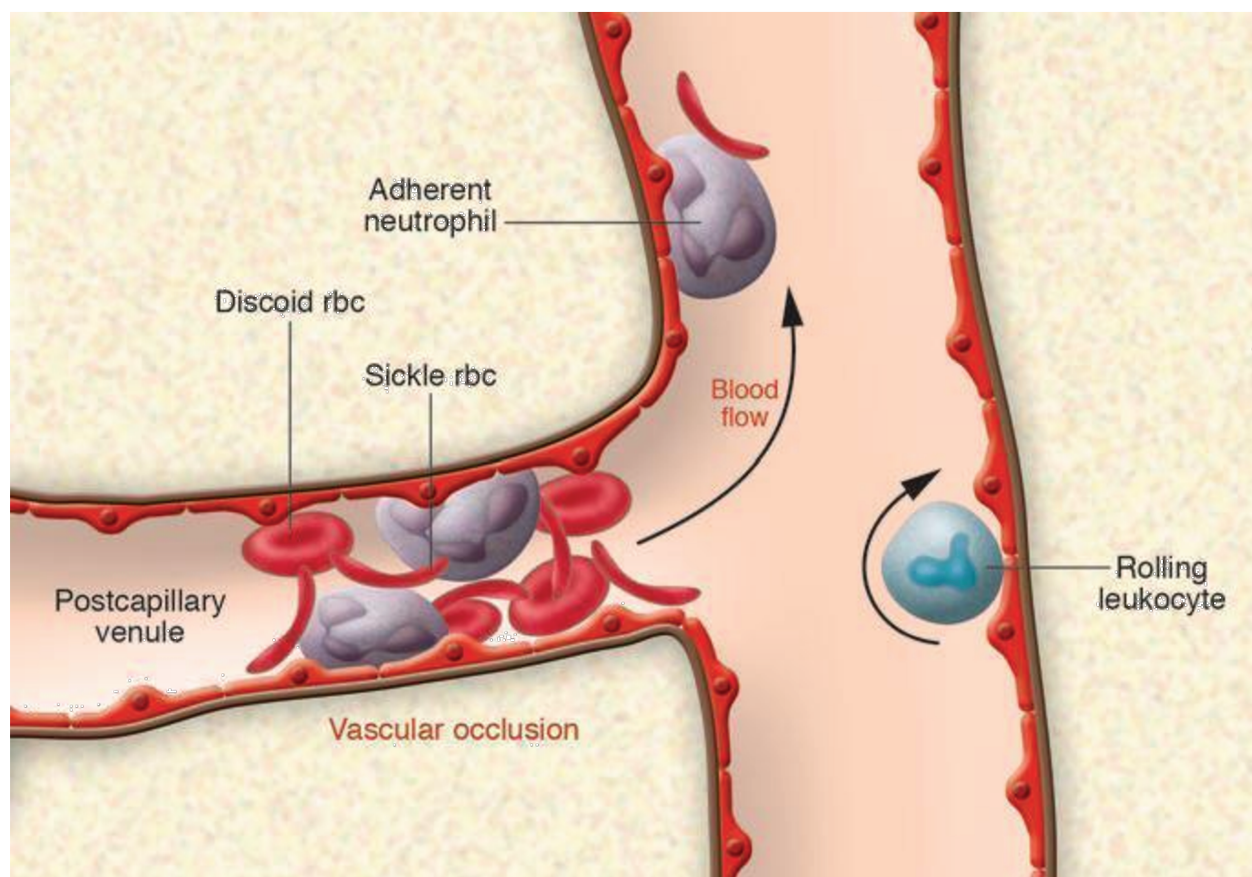


Figura 1. Vaso-oclusão na anemia falciforme. Participam dos eventos vaso-oclusivos uma complexa interação de diferentes tipos celulares como: células falcizadas densas e desidratadas, reticulócitos, células endoteliais anormalmente ativadas, leucócitos, plaquetas e fatores do plasma. Os leucócitos, principalmente os neutrófilos, tendem a se aderir ao endotélio e os eritrócitos falciformes a eles, devido à presença de citocinas inflamatórias como: $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, GM-CSF e endotelina-1, que contribuem para a ativação do endotélio e possibilitam a oclusão vascular¹⁹.

1.3 Os Haplótipos do Gene da Globina Beta

Com exceção aos gêmeos idênticos, sabe-se que a sequência de nucleotídeos no DNA humano é geneticamente diferente entre indivíduos e que algumas dessas diferenças apresentam alterações genéticas patológicas²⁰.

O *locus* da globina beta (β), um dos mais amplamente estudados dentre todos os *locus* humanos, está situado em uma região que tem sofrido uma série de transformações ao longo do tempo. Este *locus* apresenta mais de 20 sítios de base única de restrição Fragment Length Polymorphism (RFLP), localizado ao longo de 80kb no cromossomo 11^{20,21}.

Polimorfismos gênicos representam a classe de variabilidade genética mais frequente na estrutura do gene das globinas α ou β . Estas alterações ocorrem aproximadamente a cada cem bases ao longo do genoma. O perfil de combinação dos sítios polimórficos para qualquer cromossomo é denominado de haplótipo²².

Dentre os moduladores fenotípicos da anemia falciforme estão os haplótipos do gene da globina- β . Utilizando-se uma série de enzimas de restrição, que identificam alterações específicas a sequência de um gene, é possível verificar as regiões adjacentes ao *locus* β . Haplótipos específicos são encontrados no cromossomo portador do alelo β^S ^{20,23,24}.

A elucidação dos haplótipos do gene β^S apresentou-se como crucial elemento de estudo antropológico para levantamento das composições populacionais, assim como ferramenta de avaliação clínica, que pode fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e de seu nível de gravidade²⁵.

Em pelo menos cinco diferentes regiões a mesma mutação β^S ocorreu independentemente²⁶.

Os haplótipos foram nomeados de acordo com a localização geográfica em que predominam a mutação no gene da globina- β . Eles são classificados em cinco diferentes tipos: 1) o haplótipo Benin tem sido associado à África Ocidental; 2) o Bantu ou República Africana (CAR) à África Oriental Centro - Sul; 3) o Senegal à África Atlântico Ocidental, 4) o Índia-Arábia Saudita (Saudi) à Índia e Península Arábica Oriental 5) e um menos frequente, o Camarões (Cam), que é restrito na África ao grupo étnico Eton na Costa Ocidental Africana^{23,27,28,29,30}.

Os diferentes haplótipos da anemia falciforme também estão associados a um quadro clínico e níveis de HbF variados, sendo que o haplótipo Senegal está associado a níveis elevados de HbF (>15%) e curso clínico menos grave da doença; o Benin a níveis medianos de HbF (5 a 15%) e curso clínico intermediário e o CAR a níveis diminuídos de HbF (< 5%) e quadro clínico mais grave. Os portadores do haplótipo Saudi apresentam níveis elevados de HbF e curso clínico heterogêneo^{23,25,31}.

In vitro, os diferentes haplótipos são comumente detectados por um grupo de endonucleases de restrição (enzimas que reconhecem uma sequência específica no DNA), correspondentes à região que constitui o conjunto de genes da globina- β . A maioria dos cromossomos com o gene β^S , apresenta um dos cinco haplótipos acima descritos, entretanto, existe uma minoria de cromossomos (aproximadamente 5%), associado com haplótipos menos comuns, designados como haplótipos atípicos. A maioria dos haplótipos atípicos é decorrente de cruzamentos simples ou duplo entre dois haplótipos β^S típicos ou muito mais frequentemente, entre um haplótipo β^S típico e um haplótipo β^A ³.

1.4 Complicações Pulmonares na Anemia Falciforme

As complicações pulmonares são as principais causas de morbidade e mortalidade na anemia falciforme e incluem síndrome torácica aguda (STA), infecções e hipertensão pulmonar. Síndrome torácica aguda e hipertensão pulmonar são complicações pulmonares de crucial importância, uma vez que estão associadas às maiores taxas de mortalidade nessa população³³.

As alterações pulmonares podem ser induzidas pelos fenômenos vaso-oclusivos e infecções. Crianças e adolescentes portadores de anemia falciforme frequentemente apresentam complicações respiratórias de via aérea superior e inferior, que podem propiciar redução da oferta^{34,35} de oxigênio.

Alguns trabalhos têm sugerido que a asma está associada com STA e crises de dor em pacientes com anemia falciforme, principalmente crianças. As crianças com anemia falciforme diagnosticadas com asma têm o primeiro episódio de STA mais cedo, requerem mais transfusões e os episódios de dor são mais frequentes nesses pacientes^{36,37}.

1.4.1 Síndrome Torácica Aguda

A Síndrome Torácica Aguda (STA) é responsável por grande parte da morbidade da doença falciforme, considerada a segunda causa mais comum de hospitalização e é a principal causa de morte nesses indivíduos. É caracterizada por febre, sintomas^{14,38} respiratórios, infiltrado pulmonar, hipóxia, dispneia e queda do nível de hemoglobina (Figura 2).

Os médicos pioneiros ao uso do termo "síndrome torácica aguda" para esta complicação, reconheceram as dificuldades em determinar sua patogênese³⁹. A doença

clínica e os achados radiológicos se assemelham à pneumonia bacteriana. Além da febre, há presença de leucocitose, dor torácica pleurítica, derrame pleural e tosse, sintomas que podem persistir de dez a doze dias⁴⁰. A STA é um espectro de manifestações clínicas que variam dos níveis moderados aos muito graves⁴¹.

A etiologia é multifatorial, sendo consideradas causas infecciosas e não infecciosas. Nas causas infecciosas, destacam-se bactérias, microrganismos atípicos e vírus. Além disso, três principais causas da síndrome torácica aguda têm sido propostas: infecção pulmonar, embolização de gordura da medula óssea e sequestro pulmonar intravascular de hemácias falcizadas, resultando em lesão pulmonar e infarto⁴² (Figura 2).

Eventos recorrentes de STA podem culminar à doença pulmonar crônica, assim como a hipertensão pulmonar. Os fatores de risco incluem o genótipo homozigoto (Hb SS), concentrações diminuídas de Hb F e níveis basais altos de hemoglobina e leucócitos^{40,43}.

A incidência de STA está diretamente ligada à idade e ao genótipo, sem diferença entre os sexos. Ela é cerca de três vezes mais comum em crianças quando comparada aos adultos, entretanto, a gravidade clínica é mais severa em adultos^{43,44}.

A STA está intimamente associada com crises dolorosas agudas, especialmente em adultos. Aproximadamente 50% dos episódios de STA ocorrerem após a admissão hospitalar decorrente as crises dolorosas^{40,45}.

Embora geralmente auto-limitada, alguns episódios podem progredir rapidamente para insuficiência respiratória aguda levando a óbito ou a morbidade substancial. Como já descrito, a STA é a segunda causa mais comum de internação hospitalar após a crise vaso-oclusiva. Antes do reconhecimento da hipertensão pulmonar, a STA foi considerada a principal causa de morte prematura, representada por 25% de mortalidade nesses pacientes^{40,46,47,48,49}.

O Estudo Cooperativo da Doença Falciforme (*Cooperative Study of Sickle Cell Disease-CSSC*) é um programa de colaboração multicêntrico e iniciou-se em 1979 nos Estados Unidos. Apresenta como objetivo, a análise de pacientes portadores de doença falciforme para melhor compreensão da história natural da doença e suas complicações⁵⁰. É um estudo prospectivo da evolução clínica dos portadores de doença falciforme⁵¹.

No Estudo Cooperativo da Doença Falciforme nos Estados Unidos, realizado com 3.751 indivíduos portadores de anemia falciforme com mais de 2 anos de idade, foi relatado uma incidência de 29% de STA, o que representa 12,8 episódios a cada 100 pacientes para a doença HbSS. A taxa de mortalidade em pacientes com anemia falciforme foi de 1,1% em crianças e de 4,3% em adultos⁴⁴.

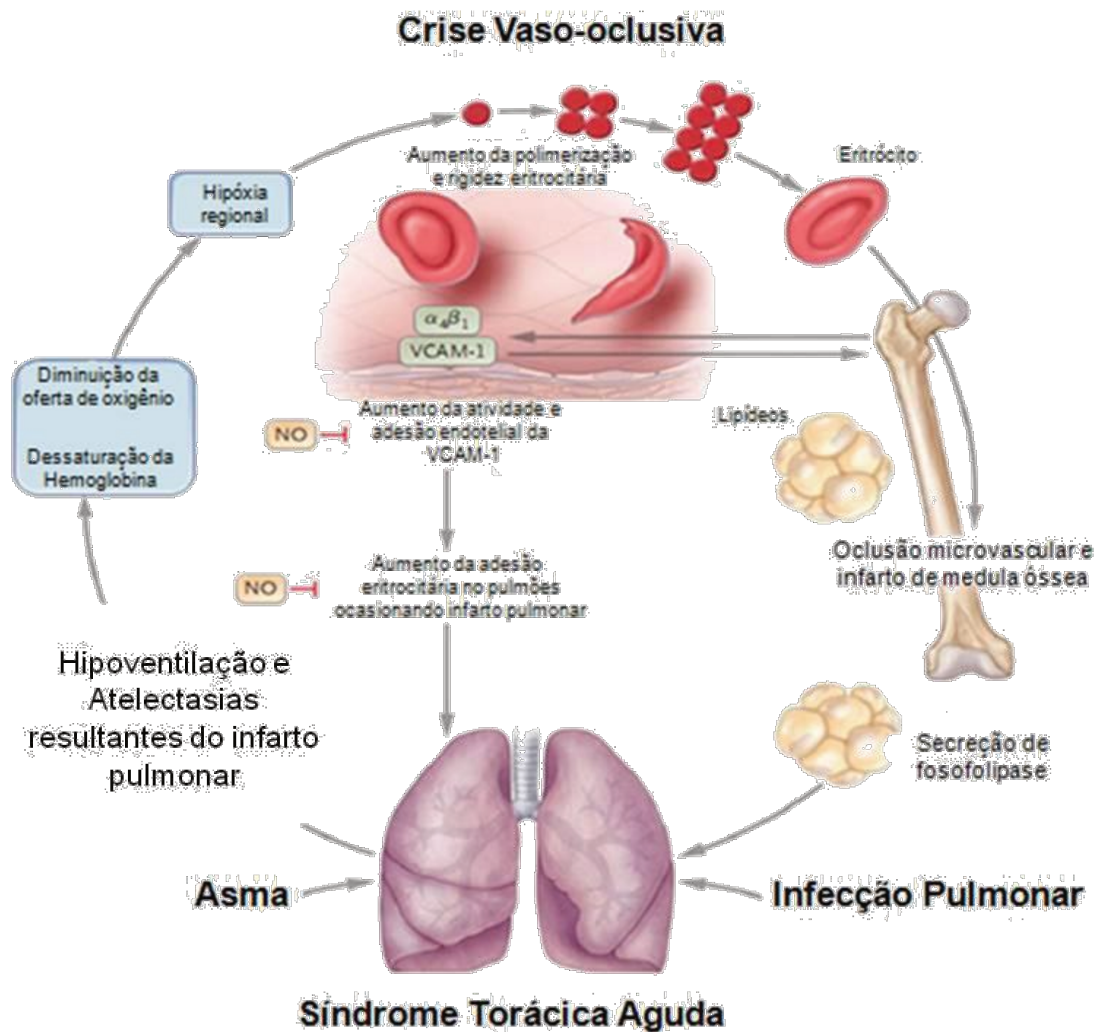


Figura 2. Ciclo da Síndrome Torácica Aguda. A síndrome torácica aguda é uma lesão pulmonar iniciada por três fatores desencadeantes: infecção pulmonar, embolização de gordura da medula óssea e seqüestro intrapulmonar de células vermelhas, que causam lesão pulmonar e infarto. A injúria pulmonar resulta em defeito na ventilação-perfusão pulmonar e hipoxemia, induzindo o aumento da desoxigenação da hemoglobina S, seguido da polimerização da hemoglobina e vaso-oclusão, que por sua vez promovem infarto da medula óssea e a vaso-oclusão pulmonar ⁴².

1.4.2 HIPERTENSÃO PULMONAR

Dentre as complicações cardiopulmonares crônicas, a hipertensão pulmonar representa um dos maiores riscos ao bem-estar e à longevidade de pacientes com anemia falciforme. Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão pulmonar na doença falciforme incluem hemólise, causando disfunção endotelial e estresse oxidativo/inflamatório, hipóxia crônica, tromboembolismo crônico, doença hepática crônica, sobrecarga de ferro e asplenia. A hemólise resulta na liberação de hemoglobina no plasma, esta reage e consome óxido nítrico (NO) causando um estado de resistência aos efeitos vasodilatadores dependentes de NO. Além disso, a hemólise também causa a liberação de arginase no plasma, o que diminui a concentração de arginina, substrato para a síntese de NO. Outros efeitos associados à hemólise que podem contribuir para a patogênese da hipertensão pulmonar incluem: aumento da expressão celular de endotelina, formação de radicais livres, ativação plaquetária e aumento da expressão de moléculas mediadoras de adesão endotelial⁵².

Um importante fator de risco para a hipertensão pulmonar na doença falciforme é a gravidade da anemia hemolítica, que pode ser determinada através dos níveis de hemoglobina e de lactato desidrogenase, bilirrubina indireta, e reticulócitos^{52,53,54,55,56}.

Uma associação entre o desenvolvimento de hipertensão pulmonar e a intensidade da anemia hemolítica foi observada em três estudos prospectivos de triagem em adultos com doença falciforme^{53,55,56} e em um crescente número de estudos em crianças^{57,58,59}.

1.4.3 Infecção Pulmonar

A causa mais comum da síndrome torácica aguda em portadores de anemia falciforme é a infecção por patógeno pulmonar adquirido na comunidade, o que estimula uma resposta inflamatória excessiva, o oposto do que deveria resultar em uma infecção respiratória leve⁴².

Decorrente a asplenia funcional em resposta a repetidos episódios de crises esplênicas, os portadores de anemia falciforme encontram-se com maior suscetibilidade à infecções. Durante a infância, a infecção é a principal causa responsável pela morbidade e mortalidade na anemia falciforme e representa a principal causa de hospitalização durante esse período de vida⁶⁰.

Crianças com anemia falciforme apresentam um risco 400 vezes maior para desencadear septicemia pneumocócica fulminante quando comparada a crianças saudáveis ou pacientes com outras anemias hemolíticas⁶¹.

O Grupo de Estudo Nacional de Síndrome Torácica Aguda analisou 671 episódios da STA em 538 pacientes com doença falciforme para determinar a causa, resultados e resposta para terapia respiratória. Expectoração das vias aéreas e espécimes de lavado broncoalveolar foram analisados para diagnosticar infecções virais e bacterianas. Um agente infeccioso foi identificado em 54% dos pacientes que foram hospitalizados. As bactérias e os vírus atípicos foram os patógenos mais predominantes nesse estudo. As bactérias encapsuladas adquiridas na comunidade foram isoladas em menos de 10% dos casos, embora a função normal fagocítica do baço seja bastante rara nesses indivíduos⁴⁰.

Estudos têm demonstrado que camundongos transgênicos para o gene da hemoglobina S humana são suscetíveis ao processo de inflamação quando comparados a

camundongos selvagens. Desencadeadores inflamatórios, tais como, lipopolissacarídeo e exposição episódica à hipóxia ambiental, desenvolveram lesão no pulmão dos camundongos transgênicos, resposta diferente dos camundongos do tipo selvagem que não sofreram nenhum tipo de lesão pulmonar^{62,63}.

1.4.4 Asma

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas e células como mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e elementos celulares desempenham um papel importante nesse processo. Em indivíduos suscetíveis, esta inflamação causa episódios recorrentes de chiado e aperto no peito, falta de ar e tosse, particularmente à noite ou no início da manhã⁶⁴.

A asma é uma doença frequente, principalmente em crianças. A reação inflamatória crônica observada na asma é mediada por quimiocinas (proteínas com importância crucial no processo inflamatório⁶⁵ e caracterizada pela obstrução variável ao fluxo aéreo e hiperresponsividade brônquica⁶⁶. A manifestação clínica de etiologia pouco conhecida é desencadeada por alguns fatores, como os episódios recorrentes de obstrução das vias aéreas, os quais que regredem de forma espontânea ou como resultado de tratamento; como resposta broncoconstritora exacerbada a estímulos, conhecida como hiperresponsividade e inflamação das vias aéreas⁶⁷.

Asma e doença falciforme são doenças crônicas comuns que podem existir como condição de co-morbidade⁶⁸. O diagnóstico médico da asma em indivíduos com doença falciforme é associado ao aumento de morbidade e mortalidade: crianças asmáticas quando admitidas em hospitais, em decorrência de episódios de dor, apresentam fator de risco aumentado para desenvolverem síndrome torácica aguda³⁶. A asma na doença

falciforme é associada com síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral e mortalidade precoce³⁷.

Durante as crises de asma, a ocorrência de broncoconstrição e como consequência o descompasso da perfusão e ventilação pulmonar, propiciam um microambiente de hipóxia e acidose, evento que induz uma mudança na dissociação do oxigênio, promovendo assim aumento da falcização, que pode levar à síndrome torácica aguda, uma das complicações dos anêmicos falcêmicos⁶⁹.

Como na anemia falciforme, os mecanismos que contribuem para a asma são complexos, multifatoriais e influenciados por polimorfismos genéticos, assim como fatores desencadeantes infecciosos e ambientais. Uma vez estabelecida a associação da asma com inflamação, estresse oxidativo e hipoxemia, sabe-se que esses fatores contribuem para a vasculopatia na doença falciforme e as consequências conhecidas desses fatores em eritrócitos falcizados provavelmente contribuem para um ciclo vicioso de falcização e subsequente complicação da doença falciforme³⁷.

1.5 Quimiocinas

Quimiocinas e citocinas são proteínas solúveis com similaridade estrutural (são tridimensionais) e funções sobrepostas^{70,71}. As quimiocinas compõem uma grande família de pequenos peptídeos homólogos de 8 a 15 kDa, que tipicamente promovem a quimiotaxia de leucócitos. As quimiocinas são subdivididas em quatro famílias de acordo com a posição de seus resíduos de cisteína, essas famílias são: CC, CXC, CX3C e XC, onde a letra C descreve o aminoácido cisteína e a letra X corresponde a outros diversos tipos de aminoácidos. Na família CXC um aminoácido separa as primeiras duas cisteínas,

enquanto que na família CC os primeiros dois resíduos de cisteína são adjacentes um ao outro. Cada família possui seu próprio receptor e tem funções diferenciadas uma da outra. As quimiocinas CXC são quimiotáticas para neutrófilos, enquanto que a CC não atuam neste grupo celular, mas sim, são quimioatraentes para monócitos, basófilos e linfócitos⁷². As famílias de quimiocinas CC e CXC são os grupos mais descritos na literatura quando comparados com os grupos XC e CX3C⁷¹.

As quimiocinas ligam-se aos seus receptores por afinidade em concentrações nanomolares e são capazes de se ligarem com mais de um receptor, como ocorre com a CCL5 que se liga ao receptor CCR1, CCR3 e CCR5. O receptor CCR3 ainda apresenta afinidade de ligação com CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL24 e CCL26⁷³.

Esses marcadores são secretados durante a resposta inflamatória pela intervenção do sistema imunológico. As citocinas regulam a produção de outros mediadores inflamatórios, considerando que, as quimiocinas secretadas atuam como moléculas regulatórias que atraem os leucócitos ao foco inflamatório e desempenham um papel crucial juntamente com seus receptores, induzindo a migração dos eosinófilos e linfócitos⁷⁰ dos vasos sanguíneos ao espaço broncoalveolar em indivíduos com asma. Em múltiplos modelos de extravasamento de leucócitos, foi evidenciado que as quimiocinas são importantes não somente na ativação de integrinas (moléculas de adesão), mas também no direcionamento dos leucócitos para o interior dos diferentes⁷⁴ compartimentos teciduais.

A eotaxina humana (também nomeada CCL11) é uma quimiocina que corresponde à família CC com 8.4 kDa, e apresenta-se em três isoformas: eotaxina-1, eotaxina-2 e eotaxina-3^{75 76,77,78}, questionam em relação às diferenças entre as três formas da eotaxina, uma vez que estas apresentam características funcionalmente análogas. Entretanto, há estudos que pré-supõe que essas três formas podem ser diferencialmente expressas em distintos tecidos⁷⁹. Em ensaio experimental, foi demonstrada a clara

evidência de que os níveis de mRNA de eotaxina -1 e eotaxina-2 podem ser co-expressos em pulmões de indivíduos asmáticos⁸⁰.

A RANTES (*Regulated upon Activation, normal T cell-Expressed and Secreted* – também conhecida como CCL5) pertence a uma grande família de citocinas pró-inflamatórias^{81,82,83,84}. É a proteína mais extensivamente estudada dentre as quimiocinas CC. Apresenta função quimiotática também para eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. A RANTES é expressa em linfócitos T ativados, células epiteliais de vias aéreas, plaquetas, fibroblastos e células do epitélio renal e mesenquimal durante a atividade da inflamação intersticial⁶⁶. A RANTES é liberada de plaquetas estimuladas com trombina e induz a liberação de histamina dos basófilos⁸⁵.

Durante o processo inflamatório nas vias aéreas, há uma predominância de citocinas Th2, incluindo as interleucinas (IL) 4,5 e 13 (IL 4,5,e 13) e aumento da regulação das quimiocinas RANTES, eotaxinas e proteínas quimioatraentes para monócitos^{73,86}. Estas citocinas e quimiocinas causam influxo dos eosinófilos nas vias aéreas, que por sua vez liberam mediadores inflamatórios, tais como leucotrienos (potentes broncoconstritores) e proteínas dos grânulos dos eosinófilos os quais causam inflamação das vias aéreas^{87,88}.

1.6 Atividade funcional da Eotaxina e RANTES nas complicações respiratórias

As citocinas como Eotaxina, RANTES, a quimiocina IL-8, dentre outras, atuam na resposta inflamatória das complicações respiratórias, como na asma intensificando e amplificando o fenômeno inflamatório no interior das vias aéreas⁶⁷.

A eotaxina é responsável pelo recrutamento e ativação principalmente dos eosinófilos, nas desordens alérgicas, como ocorrem nas desordens respiratórias. Mas

pode também atuar na migração de basófilos e linfócitos Th2 para o local da inflamação^{65,79,89}. Em estudos de lavado de fluido broncoalveolar foram detectados níveis aumentados de eotaxina plasmática, após inalação de alérgeno em portadores de asma⁹⁰. Adicionalmente, indivíduos com sintomas de asma aguda e obstrução das vias aéreas, apresentaram níveis plasmáticos de eotaxina mais elevados, comparando-se com aqueles portadores de asma estável. Sendo assim, níveis aumentados de eotaxina plasmática, tem sido correlacionado com a severidade da asma mesmo na administração de tratamentos esteróides^{91,92}.

Assim como a eotaxina, a RANTES, (como já descrito anteriormente) também recruta eosinófilos e células T no interior das vias aéreas durante o processo inflamatório⁶⁶. Sabe-se que a RANTES é um importante mediador inflamatório por ser uma proteína quimioatrente para eosinófilos, monócitos e células T (células de “memória” CD45RO/CD4+)^{93,94}.

1.7 Genética das Quimiocinas: Eotaxina e RANTES

1.7.1 Eotaxina

O gene da Eotaxina humana está situado no cromossomo 17q21.1-q21.2 e apresenta três éxons⁹⁵. Têm sido observados polimorfismos na região promotora desse gene onde ocorre a substituição de um único nucleotídeo C → T na posição -426 (-426 C→T) e outra substituição de A→G na posição -384 (-384 A→G). Já na região de codificação (éxon 1) a substituição ocorre entre G→A na posição 67 (67 G→A), promovendo assim uma mudança de aminoácido não -conservativo da Alanina na posição 23 para Treonina (Ala 23 Thr)⁹⁷ (Figura 3).

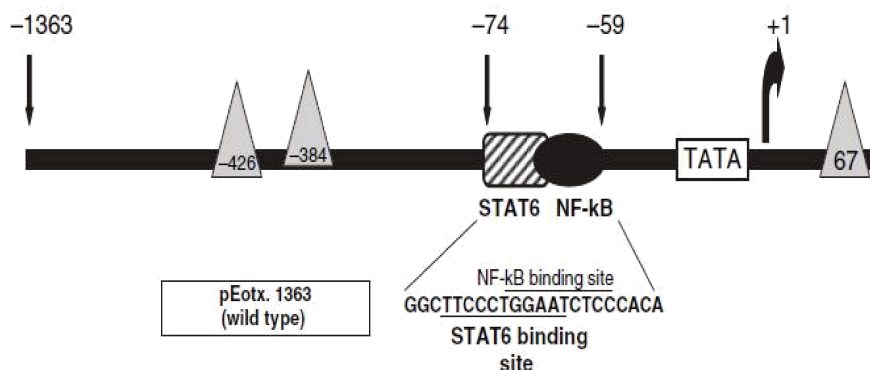


Figura 3. Localização dos polimorfismos de nucleotídeo único no gene da eotaxina:

-426 C→T, -384 A→G e 67 G→A⁹⁷.

É esperado que as variações na sequência da região promotora e na região de codificação no gene da Eotaxina-1 alterem os níveis na produção do mRNA, nos níveis proteicos ou na função da proteína que podem ser implicados na expressão dos fenótipos intermediários da asma. A expressão gênica da eotaxina humana está aumentada no lavado broncoalveolar de biópsia de vias aéreas de ⁹⁷pacientes asmáticos⁹⁸.

Trabalhos têm demonstrado a associação desses polimorfismos com a predisposição à asma. Além disso, SNPs na região promotora como o polimorfismo da eotaxina -384 A→G apresentaram-se significativamente associados a níveis plasmáticos aumentados de eotaxina-1 em ⁹⁸indivíduos asmáticos⁹⁸.

Até o momento, não há estudos que avaliaram os polimorfismos nos genes da

eotaxina -384 A→G, -426 C→T e 67 G→A em portadores de anemia falciforme associados a complicações respiratórias.

1.7.2 RANTES

A extensão do gene RANTES é de aproximadamente 7.1 kb; e este é composto por três éxons, de 133, 112 e 1075 pares de bases. No gene RANTES há dois introns, de aproximadamente 1.4 e 4.4 kb, com limite de posição entre éxon e intron conservada, em relação a outros membros da família da quimiocina CC^{81,82,83,84}.

Três polimorfismos no gene RANTES foram identificados, localizados no cromossomo 17, dos quais dois estão presentes na região promotora na posição -403 (-403 G→A) e -28 (-28 C→G)^{99,100}. Na região de intron foi identificado o polimorfismo no gene RANTES 1.1 (In1.1 T →C)¹⁰¹ (Figura 4).

Estudos demonstraram a associação do alelo -403A RANTES a maior suscetibilidade para desenvolver asma¹⁰². Outra investigação evidenciou que o alelo -28G RANTES está associado com a gravidade da asma em crianças chinesas¹⁰³. Ainda, o polimorfismo do gene RANTES -403G/A é transmitido com asma atópica e alérgica, embora, esses dados sugestivos parece relacionarem-se mais com atopia do que com asma e hiperresponsividade brônquica⁶⁶. Sabe-se que, o alelo -28G (RANTES -28C→G) eleva a atividade da região promotora com conseqüente aumento da expressão da proteína RANTES¹⁰⁰. Além disso, células mononucleares de indivíduos que apresentavam o alelo -28G produziram níveis da quimiocina RANTES significativamente maiores do que as células de indivíduos que não apresentavam esse alelo¹⁰⁴.

Foi descrito uma possível associação do polimorfismo RANTES In1.1(In1.1 T→C) com processos infecciosos em pacientes com anemia falciforme. Os dados demonstraram que a presença do polimorfismo RANTES In1.1(In1.1 T→C) em portadores de anemia falciforme promovem um efeito protetor contra infecções bacterianas recorrentes¹⁰⁵.

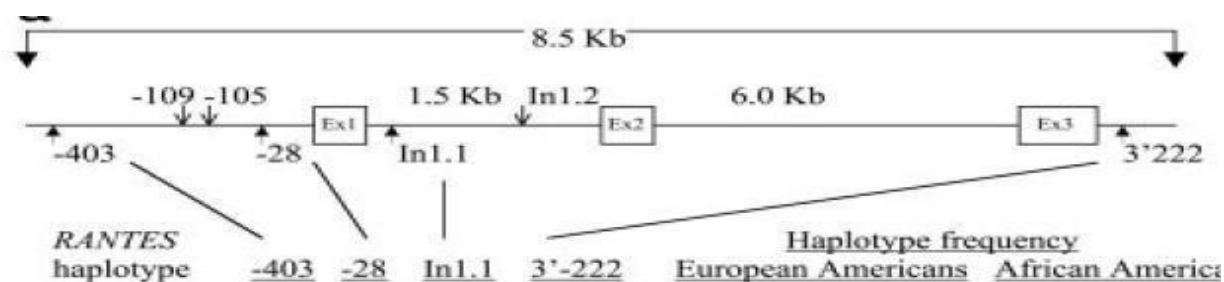


Figura 4. Localização dos polimorfismos no gene do RANTES¹⁰¹.

2) OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a frequência dos polimorfismos nos genes CCL5 (RANTES) e CCL11 (Eotaxina-1) e investigar associação às complicações pulmonares: asma, síndrome torácica aguda e infecção pulmonar em crianças portadoras de anemia falciforme.

2.2 Objetivos Específicos

Em crianças portadoras de anemia falciforme e indivíduos controles saudáveis:

- Investigar a frequência dos polimorfismos na região promotora (-28C→G) rs2280788, (-403G→A) rs2107538 e na região intrônica (In1.1C→T) rs2280789 do gene CCL5 (RANTES);
- Investigar a frequência dos polimorfismos na região promotora (-384→C) rs17809012, - (426C→T) rs16969415 e na região do éxon1 (67 G→A) rs1129844 do gene CCL11 (Eotaxina-1);
- Avaliar uma possível associação desses polimorfismos com as complicações pulmonares como asma, síndrome torácica e infecção pulmonar em crianças portadoras de anemia falciforme.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Para o estudo foram selecionados 160 pacientes com Anemia Falciforme (HbSS) com idades entre 07 meses-10 anos, diagnosticados através do Programa de Triagem Neonatal do serviço de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco (HEMOPE).

A investigação laboratorial foi realizada através de eletroforese de hemoglobina e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (Bio-Rad, *Hercules, CA, USA*). As mutações no gene da globina β foram identificadas por sequenciamento, utilizando *primers* específicos que flanqueiam o gene. O sequenciamento de DNA foi realizado em sequenciador automático através de eletroforese capilar (*Applied Biosystems 3500 GeneticAnalyzer*).

3.2 Controles

O grupo controle foi composto por doadores de sangue provenientes do Estado de Pernambuco. Os 100 doadores de sangue do serviço de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco (HEMOPE), apresentaram idades entre 18-50 anos. As amostras foram submetidas à cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) para confirmação da normalidade do padrão eletroforético HbAA.

3.3 Coleta de Sangue Periférico

Mediante a colaboração científica existente entre a Fundação HEMOPE e o Hemocentro da UNICAMP, os pacientes foram convocados através de telefone ou

telegrama, por intermédio de profissionais responsáveis atuantes na Fundação HEMOPE, para a coleta de sangue. A coleta do grupo controle foi realizada durante a doação de sangue e com o consentimento do doador. Para a análise molecular foram coletados de cada paciente e de cada indivíduo controle 5 ml de sangue periférico em tubo estéril tipo *Vacutainer* contendo etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante.

3.4 Envio das Amostras

Após a coleta, as amostras foram condicionadas em caixas de isopor contendo gelo seco e imediatamente enviadas via correio sob responsabilidade de profissionais da Fundação HEMOPE para o Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro da UNICAMP, para a realização dos experimentos. A data do recebimento das amostras foi de um dia após a data da coleta.

3.5 Aspectos Éticos da Pesquisa

O presente estudo foi realizado após aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), sob o registro nº 921/2011 e desenvolvido baseando-se nos princípios éticos estabelecidos na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os pais ou os responsáveis legais pelos pacientes e os indivíduos saudáveis que, após informação, estiveram de acordo em participar da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.6 Desenho do Estudo

Estudo analítico do tipo caso-controle foi realizado no período de agosto/2011 a

Julho/2013.

3.7 Análise Estatística

- A comparação entre as frequências alélicas dos SNPs no gene CCL11 (rs17809012) e no gene CCL5 (rs2107538) nos pacientes versus controle, foi estabelecida através do Teste Chi-Quadrado;
- O Desequilíbrio de Ligação dos SNPs no gene CCL11 (rs17809012; rs16969415) e no gene CCL5 (rs2107538; rs2280789), foi analisado através do software HaploView versão 4.1;
- Através do software HaploView, foi realizada a inferência da frequência dos haplótipos e suas associações a complicações pulmonares;
- A análise de associação dos SNPs no gene CCL11 (rs17809012; rs16969415) e no gene CCL5 (rs2107538; rs2280789) a complicações pulmonares, foram realizadas através do Teste Exato de Fisher;
- Como teste de correção por teste múltiplo, foi aplicado o teste de Bonferroni.

3.8 SNPs selecionados para o Gene CCL11

Foram selecionados três polimorfismos para o gene CCL11 (Eotaxina -1): rs17809012, rs16969415 e rs1129844.

O SNP rs17809012 localizado na região promotora na posição -384 é proveniente de uma substituição de transição entre as bases puricas A→G. Ainda na região promotora na posição -426, situa-se o SNP rs16969415, onde uma substituição de transição também ocorre entre as bases pirimídicas C→T. Na região do éxon 1 localiza-se o SNP rs1129844 na posição 67, ocasionado por uma mutação de transição que acontece entre as bases puricas G→A promovendo assim, como já descrito anteriormente, uma mudança de aminoácido não-conservativo da Alanina na posição 23 para Treonina (Ala 23 Thr).

3.9 SNPs selecionados para o Gene CCL5

Para o gene CCL5 (RANTES), foram escolhidos três SNPs: rs2280788, rs2107538 e rs2280789.

O SNP rs2280788 encontrado na região promotora na posição -28 é resultante de uma substituição por transversão entre a base pirimídica C e a base purica G. Outro polimorfismo também pertencente a região promotora é o SNP rs2107538, ocasionado por uma substituição de transição entre as bases puricas G→A. Na região de intron na posição está o SNP rs2280789, também decorrente a uma substituição de transição entre as bases pirimídicas C→T.

Os seis SNPs escolhidos para o estudo foram fundamentados em trabalhos já descritos na literatura, associados a complicações pulmonares (conforme previamente citado) que ocorrem na anemia falciforme, como a asma.

As sequências dos SNPs selecionados encontram-se disponíveis no banco de dados de SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

3.10 Desenho dos primers para amplificação dos genes CCL11 (Eotaxina-1) e CCL5 (RANTES) através da técnica de PCR

As sequências dos genes CCL11 e CCL5 presentes no banco de dados NCBI (disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/22538399?report=fasta> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/22538813?report=fasta>, respectivamente), foram utilizadas para o desenho dos *primers* (iniciadores) para a técnica de PCR, com o objetivo

de amplificar as regiões polimórficas dos SNPs no gene CCL11 (rs17809012; rs16969415; rs1129844) e no gene CCL5 (rs2280788; rs2107538; rs2280789).

Os *primers* foram desenhados através do software *Gene Runner* (encontrado em <http://www.generunner.net/>), o qual também foi utilizado para verificar a inexistência de dímeros formados pelos pares de *primers* e para averiguar possível anelamento dentro do mesmo iniciador.

Alguns cuidados foram atribuídos, como a porcentagem das bases entre 20-80% e temperatura de anelamento (T_m) dos pares de *primers* próximas, obtendo-se assim, uma sequência de boa qualidade sem perda de informação necessária. Foram gerados seis pares de *primers* (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* que foram utilizados para amplificação dos genes CCL11 (Eotaxina-1) e CCL5 (RANTES)

Gene	SNP	Sequência 5' → 3'	Direção	Tamanho do Amplicon
CCL11	rs17809012	GGTTTCCTTGCTCCTTTCCTC	→	203 pb
		GCAGAACAGAAGAGAGGCAAG	←	
	rs16969415	AAGACCACCATGTGAACACAGG	→	267 pb
		GCAGAACAGAAGAGAGGCAAG	←	
	rs1129844	GAATCTCCCACAGTGTCTGC	→	247 pb
		CTCTGGAGGTGGTTACCTTAC	←	
CCL5	rs2280788	ACTCCCCTTAGGGGATGCCCG	→	174 pb
		GCGCAGAGGGCAGTAGCAAT	←	
	rs2107538	ATATCTTGTGAAAAGGTTCCC	→	179 pb
		CTGCTTATTCATTACAGATCGTA	←	
	rs2280789	CCTGGTCTTGACCACCACA	→	343 pb
		GCTGACAGGCATGAGTCAGA	←	

Tabela 1. Sentido dos primers durante a duplicação do DNA *in vitro*: “*forward*” (extremidade 5’) e “*reverse*” (extremidade 3’).

Para confirmar a especificidade das sequências dos *primers* evitando assim o anelamento dos mesmos em regiões inespecíficas, foi utilizado o programa *BLAT* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) potencializando desta forma, a qualidade da técnica de PCR.

3.11 Extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir dos leucócitos através da técnica de fenol-clorofórmio modificado¹⁰⁶.

As amostras de sangue periférico (5ml) que foram coletadas em tubos contendo EDTA 10%, foram transferidas para tubos Falcon de 15ml e centrifugadas a 2000rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente, para separação do plasma. Logo após, foi realizada a lise das hemácias com solução hipertônica na diluição 1:10 de NH_4HCO_3 0,011M e NH_4Cl 0,144M, respectivamente, completando o volume para 12ml. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas à 2200rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, quando necessário, foi realizada uma nova lise para que permanecessem apenas os leucócitos.

Ao *pellet* foi adicionado 5ml da solução de TKM1 (10mM de Tris-HCl pH=7,6; 10mM de KCl; 10mM MgCl_2 e 20mM de EDTA) e 1 gota de Triton (emulsificante de moléculas lipoprotéicas), agitando por inversão. Foi centrifugado a 2200rpm por 15 minutos, desprezando em seguida o sobrenadante e adicionando 1ml de TKM1. O *pellet* foi dividido em 2 ependorff's com 1ml cada e centrifugado por mais 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido, cuidadosamente, com 400µl de

TKM2 (10mM de Tris-HCl pH=7,6; 10mM de KCl; 0,4M NaCl; 10mM de MgCl₂ e 20mM de EDTA); em seguida, foram adicionados 25µl de SDS 10%. O tubo foi incubado a 55°C por 30 minutos e, após a incubação, foram adicionados 180µl de solução de NaCl 5M, seguido de repouso por 20 minutos.

Logo após, o tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido (que contém a molécula de DNA) para outro ependorff. Em seguida, foram adicionados 450µl da solução de clorofórmio/álcool isoamílico (Allkimia) e 450µl de fenol (Allkimia) com o vórtex, para homogeneização da amostra. Uma nova centrifugação foi realizada a 12.000 rpm por 5 minutos, para retirar o sobrenadante contendo o DNA e transferido para outro ependorff. Acrescentou-se 1ml da solução de clorofórmio/álcool isoamílico. O tubo foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos para transferência do sobrenadante. Em cerca de 10% do volume do sobrenadante, acrescentou-se acetato de sódio 3M pH= 5,2 e 1ml de etanol absoluto gelado (Allkimia), para precipitação da molécula de DNA por inversão.

O ependorff foi centrifugado novamente por 5 minutos a 12.000 rpm para formação do *pellet* de DNA. O sobrenadante foi desprezado e o tubo deixado aberto e invertido durante 12 horas em temperatura ambiente, para evaporação do excesso de álcool. O *pellet* foi ressuspendido em água deionizada e estéril (o volume variou de 20 a 100µl de água).

3.12 Quantificação e Armazenamento da Amostra de DNA

Para analisar a qualidade e a integridade do DNA, foi realizada sua quantificação por espectrofotometria no equipamento *NanoDrop®ND-1000* (*NanoDrop*

Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA).

A leitura da absorbância foi realizada a 260 nm (A_{260}). Sendo assim, a relação entre as leituras obtidas nos comprimentos de ondas A_{260}/A_{280} que evidencia um parâmetro da pureza do ácido nucléico e da concentração do DNA extraído, foram avaliadas.

A solução contendo o DNA extraído e quantificado foi padronizada para atingir uma concentração que variou entre 200 e 500ng/ μ l DNA. Posteriormente, as amostras de DNA foram armazenadas no freezer à temperatura de -20°C para garantir a sua integridade. Ao término dos experimentos, as amostras foram estocadas no freezer à temperatura de -80°C no Banco de DNA de Hemoglobinopatias do Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro da UNICAMP.

3.13 Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificação das regiões polimórficas nos genes CCL11 e CCL5.

A reação foi preparada para um volume final de 30 μ l. Os reagentes utilizados foram: 3,0 μ l de PCR *Buffer 10x*, 1,2 μ l MgCl_2 50mM, 0,5 μ l de dNTP 10mM, 0,6 μ l de cada *primer 10 μ M*, 0,12 μ l de *Taq DNA Polimerase* 50U/ μ l, 0,5 μ l de DNA genômico equantidade de água estéril e deionizada suficiente para completar um volume final de 30 μ l. A concentração do DNA genômico utilizado foi entre 200-500ng/ μ l. O *master-mix* de PCR realizado em microtubo, posteriormente foi distribuído em placa para PCR e por último foi adicionada a amostra de DNA. A reação foi submetida ao termociclador *Veriti - Biosystem Applied*, em ciclagens e temperaturas distintas.

Como técnica confirmatória da amplificação da PCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (a proporção do brometo de etídeo é

de 2,0 μ L/100 ml tampão TAE). Em seguida, os fragmentos amplificados foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta (Figura 5).

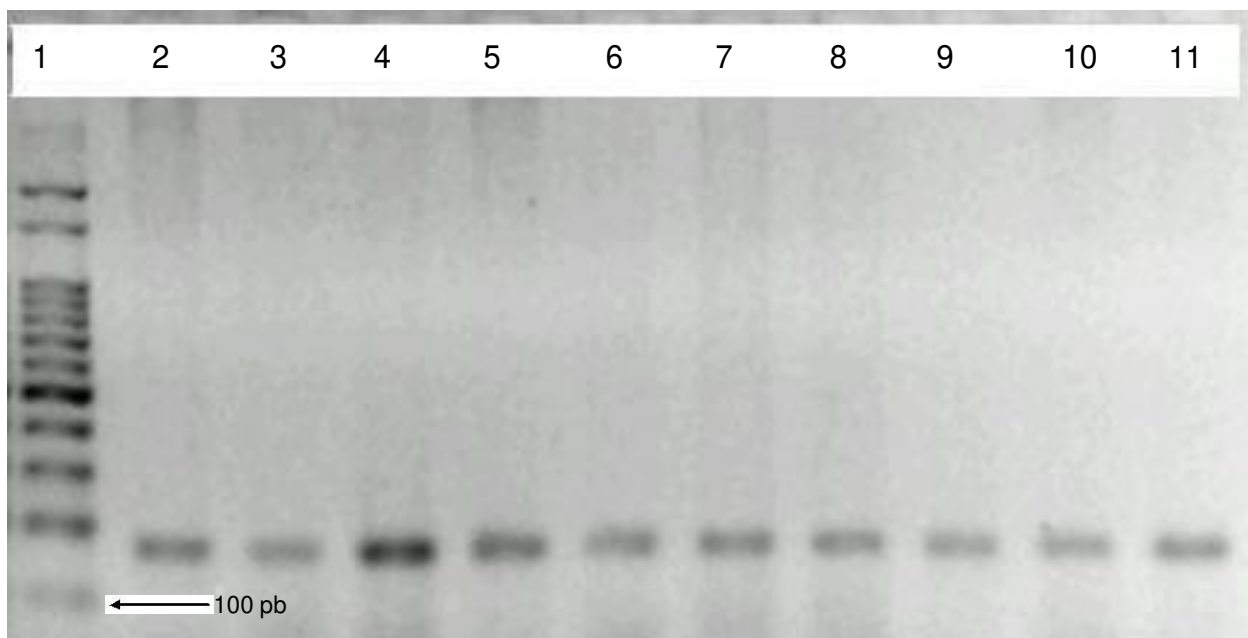


Figura 5. Fotografia sob luz ultravioleta do gel de agarose. Fragmentos que flanqueiam o SNP rs2107538 no gene CCL5.

1: Marcador de peso molecular de 100pb;

2-11: Amostra de Pacientes. Tamanho do fragmento: 179 pb.

3.14 Análise de Restrição (RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism)

A investigação das regiões polimórficas nos genes CCL11 e CCL5 foram realizadas através da atividade de endonucleases de restrição.

Para a análise de restrição, foram utilizados 8,0µl do produto da PCR, adicionados de 1,2µl de *buffer* apropriado para cada enzima. As endonucleases de restrição e os volumes utilizados variaram entre 0,15 e 0,60µl (Tabela 4). A quantidade de água deionizada e estéril utilizada foi suficiente para completar o volume final de 12µl. Para os SNPs do gene CCL11 (rs17809012 e rs16969415) foi diluído o BSA100X (Albumina de Soro Bovino) 1:10 e utilizados 1,2µl na reação.

Tabela 2. Identificação e volume das endonucleases de restrição utilizadas na digestão enzimática para investigação das regiões polimórficas nos genes CCL11 e CCL5

Gene	SNP	Enzima	Concentração U/ml
CCL11	rs17809012	<i>Taq I</i>	20
	rs16969415	<i>Taq I</i>	20
	rs1129844	<i>Bsr I</i>	5
CCL5	rs2280788	<i>Hinc II</i>	10
	rs2107538	<i>Rsa I</i>	10
	rs2280789	<i>Mbol I</i>	5

O produto da PCR submetido à digestão enzimática foi incubado à 37 ou à 65°C durante um período de incubação de 30 minutos , com endonucleases de restrição específicas (Tabela 3).

Tabela 3. Condições da digestão enzimática no reconhecimento das regiões polimórficas dos genes CCL11 e CCL5

SNP	Tamanho Fragmento (pb)	Enzima de Restrição (<i>Fast</i>)	T (° C)	Período Incubação	Sítio Restrição	Alelo Clivado	Fragmentos Gerados (pb)
rs17809012 A→G	203 pb	<i>Taq I</i>	65	30'	T/CGA	G	183 e 20
rs16969415 C→T	267 pb	<i>Taq I</i>	65	30'	T/CGA	C	224 e 43
rs1129844 G→A	247 pb	<i>Bsr I</i>	65	30'	ACTGGN/N	A	192 e 55
rs2280788 C→G	174 pb	<i>Hinc II</i>	37	30'	CTY/RAC	C	151 e 23
rs2107538 G→A	179 pb	<i>Rsa I</i>	37	30'	GT/AC	G	157 e 22
rs2280789 C→T	343 pb	<i>MbolI</i>	37°C	30'	GAAGAN8 N	C	225 e 118

3.15 Preparo do Gel de Agarose

O produto digerido foi aplicado em gel de agarose (1000) em uma concentração de 4%. Para o preparo do gel, foram pesados 4g de agarose a qual foi completamente dissolvida em 100 ml de tampão TAE 1x (Tris, Acetato e EDTA) sob aquecimento de micro-ondas durante 3 minutos. Após atingir temperatura aproximada à 37°C, a agarose ainda líquida, foi imediatamente corada com 2,0µl de brometo de etídio (intercalante de DNA). Em seguida, o gel foi vertido em suporte de acrílico para sua solidificação. Posteriormente, foi realizada a inserção dos “pentos” com o intuito de formarem os poços para a aplicação das amostras. Após sua polimerização, o gel foi submerso em tampão TAE em cuba de eletroforese e logo após, as amostras acrescidas com 2 µl de azul de bromofenol, foram aplicadas com auxílio de uma micropipeta, na seguinte sequência:

- 1) 3,0µl de DNA de peso molecular (*Ladder*—com intervalo para identificação de fragmentos de DNA entre 100 e 500 pares de bases);
- 2) 2,0µl do Produto da PCR não digerido;
- 3) 12µl da reação da digestão enzimática.

3.16 Eletroforese em Gel de Agarose

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar, identificar e purificar moléculas eletricamente carregadas, como o DNA¹⁰⁷.

Após a aplicação das amostras no gel de agarose, a cuba foi conectada a fonte de eletroforese e sob influência de um campo elétrico as amostras migraram do ânodo para o cátodo, durante 70 minutos. Ao término da corrida de eletroforese, os resultados

realizados através da técnica de PCR-RFLP foram obtidos mediante fotografia do gel de agarose sob luz ultravioleta para visualização e determinação dos genótipos. (Figuras 6 e 7).

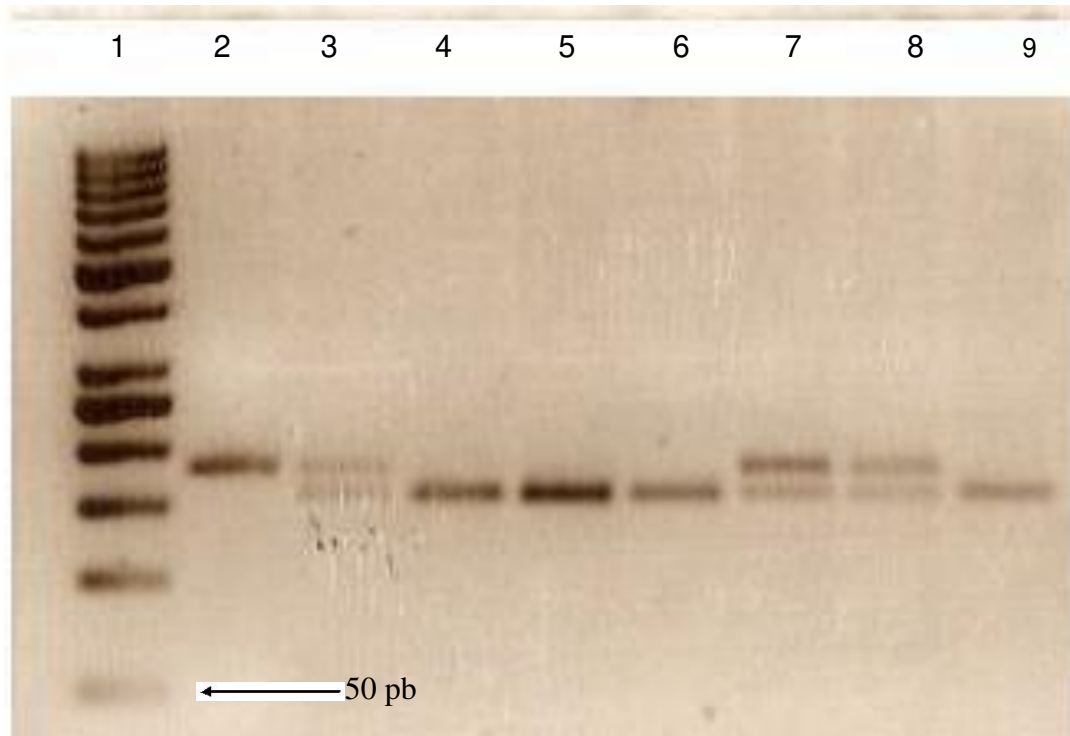


Figura 6. Fotografia sob luz ultravioleta do gel de agarose. Fragmentos que flanqueiam o SNP rs2107538 no gene CCL5. PCR seguida de RFLP:

- 1 – Marcador de peso molecular de 50pb;
- 2 - Produto da PCR não digerido. Tamanho do fragmento: 179pb;
- 3 – Controle heterozigoto. Fragmentos gerados com 157e 22pb;
- 4, 5, 6 e 9 – Pacientes com perfil de genótipo homozigoto GG.
- 7 e 8 – Pacientes com perfil de genótipo heterozigoto. Fragmentos gerados com 157e 22pb.

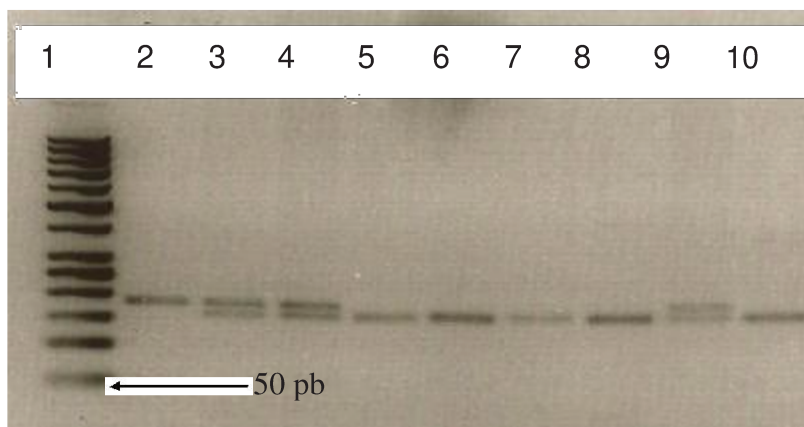


Figura 7 Fotografia sob luz ultravioleta do gel de agarose. Fragmentos que flanqueiam o SNP rs2107538 no gene CCL5. PCR seguida de RFLP:

- 1 – Marcador de peso molecular de 50pb;
- 2 - Produto da PCR não digerido. Tamanho do fragmento: 179pb;
- 3 – Controle heterozigoto. Fragmentos gerados com 157e 22pb;
- 4 e 9 – Pacientes com perfil de genótipo heterozigoto. Fragmentos gerados com 157e 22pb.
- 5, 6, 7, 8 e 10 – Pacientes com perfil de genótipo homozigoto GG.

3.17 Sequenciamento

Para validar os resultados obtidos através da técnica de PCR-RFLP foi realizado o sequenciamento de DNA. Os sequenciamentos de amostras escolhidas aleatoriamente corresponderam aos resultados prévios estabelecidos pela técnica molecular mediada por endonucleases de restrição (Figura 8).

Para a reação de sequenciamento foram utilizados os seguintes reagentes: 2,0µl de tampão “*Save Money*”, 0,5 µl de primer *forward* ou *reverse* 10µM, 1,0 µl do mix “Big Dye”, 0,5 µl da PCR e quantidade de água estéril e deionizada suficiente para completar

um volume final de 10 µl. O mix “Big Dye” contém: Deoxinucleotídeos (dNTPs), Dideoxinucleotídeos (ddNTPs), *Taq* DNA polimerase, MgCl₂ e tampão Tris-HCl.

Posteriormente, a reação foi submetida a diferentes ciclagens e temperaturas no termociclador (*Veriti – Biosystem Applied*), a saber:

- | | | |
|--|---|-----------|
| <ul style="list-style-type: none"> • 95°C → 2 horas • 95°C → 15 segundos • 58°C → 15 segundos • 60°C → 4 minutos | } | 25 Ciclos |
|--|---|-----------|

Após a reação, os produtos foram purificados para a precipitação do fragmento marcado e remoção dos nucleotídeos não incorporados e demais reagentes, para não interferirem na leitura quando submetidos à eletroforese em sequenciador automático.

Para a realização da purificação, a reação foi precipitada com 40 µl de etanol a 80% e mantida em repouso durante 20 minutos. Para que a reação fosse protegida da luz, a placa foi revestida com papel alumínio. Após o repouso, a reação foi centrifugada a 4.000 rpm durante 45 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir, foi realizado um “*spin*” invertido (inserindo-se papel toalha sobre a placa) por 5 segundos a 200 rpm. Logo após, foram adicionados 100 µl de etanol a 70% à reação e esta centrifugada a 4.000 rpm durante 15 minutos. Consequentemente, o sobrenadante gerado foi descartado e realizado novamente um “*spin*” invertido a 200 rpm por 10 segundos. A secagem da placa foi realizada em termociclador, durante 10 minutos a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 10 µl de formamida (para a manutenção da desnaturação da fita) e realizada a desnaturação em termociclador a 95°C durante 5 minutos. Finalmente, a reação foi

submetida à eletroforese em sequenciador automático através de eletroforese capilar (*3500 Genetic Analyzer - Biosystem Applied*) (Figura 8).

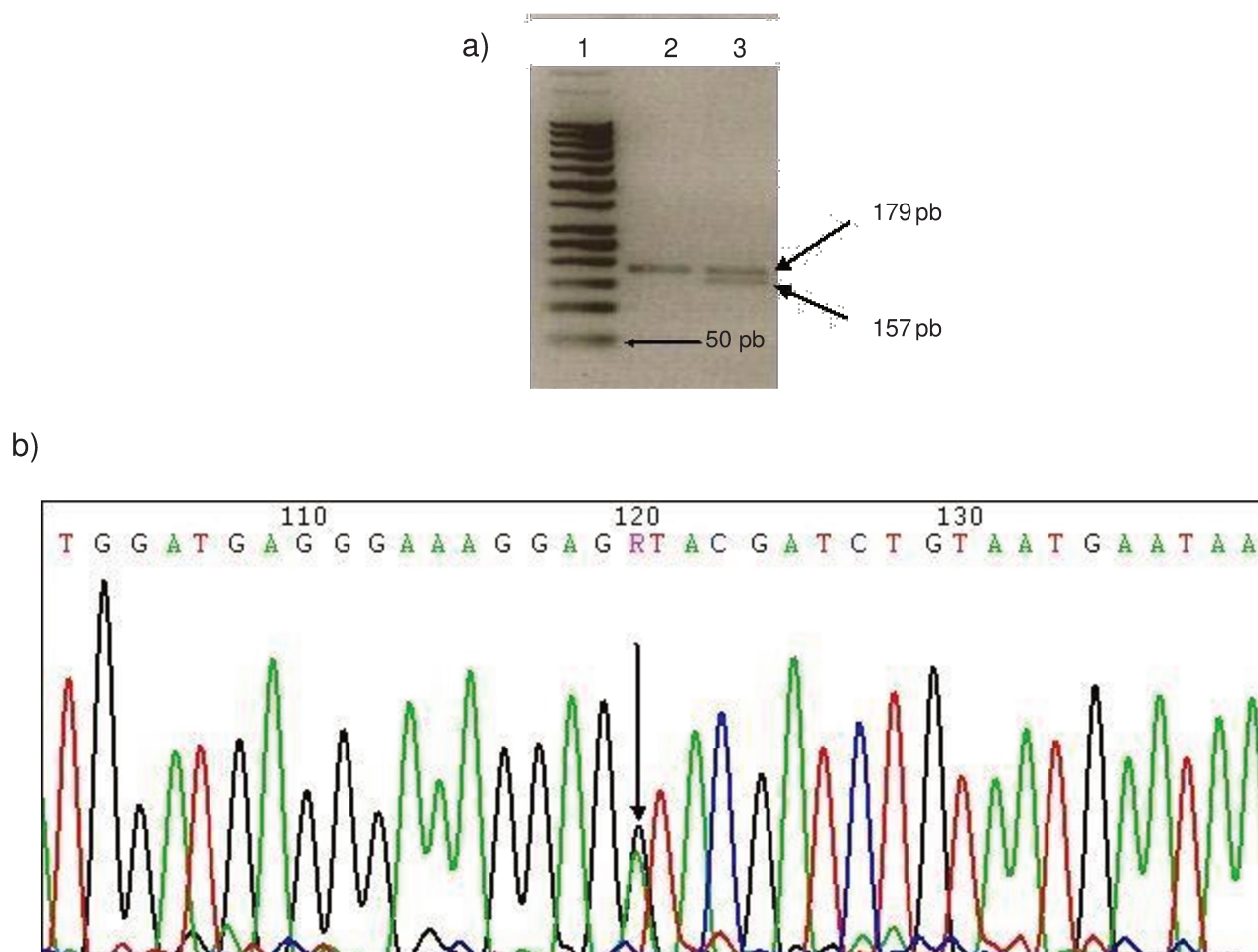


Figura 8. Validação dos resultados obtidos através da técnica de PCR -RFLP mediado por sequenciamento automático. Investigação do SNP rs2107538 (G → A) no gene CCL5. a) Perfil Eletroforético de genótipos estabelecidos através de endonucleases de restrição: 1- DNA de peso molecular de 50pb; 2 - Produto da PCR não digerido (179pb) e 3 – Paciente 239: Heterozigoto para o polimorfismo estudado. Fragmentos gerados com 157e 22pb. b) Cromatograma do paciente 239 gerado pelo sequenciador automático. Os picos sobrepostos indicado pela seta, demonstram o alelo G (pico preto) e o alelo A (pico verde). Confirmando assim o perfil heterozigótico (GA) do paciente 239 para esse SNP.

4) RESULTADOS

4.1 Investigação de SNPs no gene CCL11

4.1.2 Frequência Genotípica do SNP rs17809012

Entre os 157 pacientes investigados 51,5 % apresentaram o genótipo selvagem (AA) para o SNP rs17809012 (Eotaxina -384A→G) (81/157), enquanto que 33,7% desses pacientes foram heterozigotos (53/157) e 14,6% homozigotos recessivos (23/157) (Tabela 4).

De acordo com a frequência de homozigose recessiva (14,6%), esse polimorfismo foi selecionado para ser investigado também em indivíduos controle. Em uma casuística de 100 indivíduos saudáveis investigados, 41% apresentaram o genótipo selvagem (AA) (41/100), não obstante, 48% desses indivíduos foram heterozigotos (48/100) e 11% homozigotos recessivos (11/100) (Tabela 4).

A análise estatística revelou que a amostra de pacientes não está em equilíbrio segundo Hardy-Weinberg, (teste $\chi^2 = 7,47$ e $p=0,02$), apesar da localização genotípica, refere-se a uma amostra geneticamente heterogênea (entre casos e controles). Entretanto, a amostra do grupo de indivíduos saudáveis está (teste $\chi^2 = 0,30$ e $p=0,85$).

Não foi observada diferença significativa ao comparar a frequência alélica entre os pacientes e os controles (teste $\chi^2 = 0,67$ e $p=0,414054$) (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência Genotípica do SNP rs17809012 no gene CCL11 em crianças portadoras de Anemia Falciforme e em indivíduos saudáveis.

Gene	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica (%)		p
			Pacientes	Controle	
			% (n)	% (n)	
			(n=157)	(n=100)	
CCL11	rs17809012 (A→G)	AA	51,5 (81)	41 (41)	0.414054
		AG	33,7 (53)	48 (48)	
		GG	14,6 (23)	11(11)	
		Frequência Alélica (%)			
		Alelo	Pacientes	Controle	
		A	9	13	
		G	17	27	

4.1.3 Frequência Genotípica do SNP rs16969415

O outro polimorfismo estudado localizado na região promotora do gene CCL11 foi o SNP rs 16969415 (Eotaxina -426C→T).

Dentre os 159 pacientes analisados 87,4% apresentaram o genótipo homozigoto selvagem (CC) (139/159) e 12,5% heterozigotos (20/159) (Tabela 5).

Não foi realizada a investigação genotípica para esse polimorfismo no grupo de indivíduos saudáveis, uma vez que, não foi encontrada a ocorrência do genótipo TT para esse SNP na amostra de pacientes.

A amostra de pacientes estudada para esse polimorfismo encontra-se em equilíbrio segundo Hary-Weinberg (teste $X^2 = 0,02$ e $p=0,87$).

Tabela 5. Frequência Genotípica do SNP rs16969415 no gene CCL11 em crianças portadoras de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica(%)
			Pacientes (n=159)
	rs16969415	CC	87
CCL11	(C→T)	CT	13
		TT	0

4.1.4 Frequência Genotípica do SNP rs1129844

Foi analisado também o SNP rs1129844 (Eotaxina 67G>A), localizado no códon 23 e responsável pela substituição de uma alanina por treonina nessa posição.

Dentre os 160 pacientes estudados para esse polimorfismo, 158 foram homozigotos para o genótipo G (98,7%) e apenas 2 pacientes apresentaram o genótipo GA (1,2%) (Tabela 6). Houve ausência de homozigose recessiva para esse polimorfismo e a frequência de heterozigose revelou apenas 1,2% na amostra de pacientes. Sendo assim, não foi realizada a investigação genotípica para esse SNP no grupo de indivíduos saudáveis e nem aplicado o teste de χ^2 .

Tabela 6. Frequência Genotípica do SNP rs1129844 no gene CCL11 em crianças portadoras de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica (%)
			Pacientes (n=160)
	rs1129844	GG	98,7
CCL11	(G→A)	GA	1,3
		AA	0

4.2 Investigação de SNPs no gene CCL5

4.2.1 Frequência Genotípica do SNP rs2280788

Dentre os 54 pacientes analisados para o SNP rs2280788 (RANTES - 28C→G), 62,9% apresentaram o genótipo selvagem (CC) (34/54) e 37% desses pacientes foram heterozigotos (20/54) (Tabela 7).

Devido a casuística reduzida e pela não ocorrência do genótipo GG para essa região polimórfica, não foi realizada a investigação desse SNP em indivíduos saudáveis e nem aplicado o teste X^2 para esse polimorfismo.

Tabela 7. Frequência Genotípica do SNP rs2280788 no gene CCL5 em crianças portadoras de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica (%)
			Pacientes (n=54)
	rs2280788	CC	63
CCL5	(C→G)	CG	37
		GG	0

4.2.2 Frequência Genotípica do SNP rs2107538

Foi selecionado ainda outro polimorfismo situado na região promotora do gene CCL5 SNP rs2107538 (RANTES -403G→A).

Em 156 pacientes genotipados para esse polimorfismo, 56,4% revelaram genótipo homozigoto selvagem (GG) (88/156), 38,4% heterozigotos (60/156) e 5,1% de homozigoto recessivo (8/156) (Tabela 8).

Após rastrear as frequências genotípicas dos SNPs rs2280788, rs2107538 e rs2280789 no gene CCL5 em crianças portadoras de anemia falciforme, foi possível observar que o SNP rs2107538 (RANTES -403G→A) apresentou maior incidência do genótipo AA, quando comparado com o SNP rs2280789 (T>C).

Sendo assim, o SNP rs2107538 foi o selecionado para ser investigado também em indivíduos saudáveis. Ao término da análise molecular para esse polimorfismo em 100 indivíduos saudáveis, foi verificada uma frequência de 51% de homozigoto selvagem (GG) (51/100), 46% heterozigotos (46/100) e 3% de homozigoto recessivo (3/100) (Tabela 8).

Em relação a esse SNP, tanto a amostra de pacientes quanto o grupo de indivíduos saudáveis não encontram-se em equilíbrio segundo Hary-Weinberg: Amostra de pacientes (teste $\chi^2 = 0,30$ e $p = 0,86$) e amostra do grupo controle (teste $\chi^2 = 3,82$ e $p = 0,14$). Não foi verificada nenhuma diferença estatística ao comparar a frequência alélica entre os pacientes e o grupo controle, $p=0.858$ (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência Genotípica do SNP rs2107538 no gene CCL5 em crianças portadoras de Anemia Falciforme e em indivíduos saudáveis

Gene	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica(%)	
			Pacientes	Controle
			(n=156)	(n=100)
CCL5	(G→A)	GG	56,4	51
		GA	38,4	46
		AA	5,1	3
		Frequência Alélica (%)		p
		Alelo	Pacientes	Controle
	G	2	3	0.858
A	5	7		

4.2.3 Frequência Genotípica do SNP rs2280789

Totalizaram-se 156 pacientes analisados para o SNP rs2280789 (RANTES IN1.1 C/T), localizado na região intrônica 1.1.

Desses, 112 foram homozigotos para o genótipo T (71,7%) e 44 pacientes apresentaram o genótipo CT (28,2%) (Tabela 9).

Como já descrito anteriormente, de acordo com o banco de dados do NCBI esse polimorfismo apresenta três alelos selvagens: C (C>T), T (T>C) e A (A>G). Portanto, não seria viável considerar a frequência do genótipo T (71,7%) como homozigose recessiva. Desta forma, esse SNP não foi analisado no grupo de indivíduos saudáveis.

De acordo com o teste χ^2 , a amostra de pacientes está em equilíbrio segundo Hardy-Weinberg (teste $\chi^2 = 0,32$ e $p = 0,57$).

Tabela 9. Frequência Genotípica do SNP rs2280789 no gene CCL5 em crianças portadoras de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	Frequência Genotípica (%)
			Pacientes (n=156)
CCL5	(C→T)	rs2280789 CC	0
		CT	28,3
		TT	71,7

4.3 Desequilíbrio de Ligação

Através do software HaploView foi analisado o Desequilíbrio de Ligação (DL) dos SNPs no gene CCL11 (Eotaxina -1): rs16969415; rs17809012; e no gene CCL5 (RANTES) rs2280789 e rs2107538.

Observando-se a figura 9 é possível verificar que os SNPs rs2280789 e rs2107538 no gene CCL5 estão em DL. O coeficiente D' varia de 0 a 1 (ou 0-100%). Os dados revelaram o valor D' significativo= 0,96%, demonstrando uma segregação dependente, isto é, eles mantêm o padrão de herança semelhante entre si, significância evidenciada pelo losango em vermelho.

Entretanto, os SNPs rs16969415 e rs17809012 no gene CCL11 não estão em DL. A segregação independente foi indicada através do valor $D'=0,56\%$, demonstrado na figura 8 pelo losango branco.

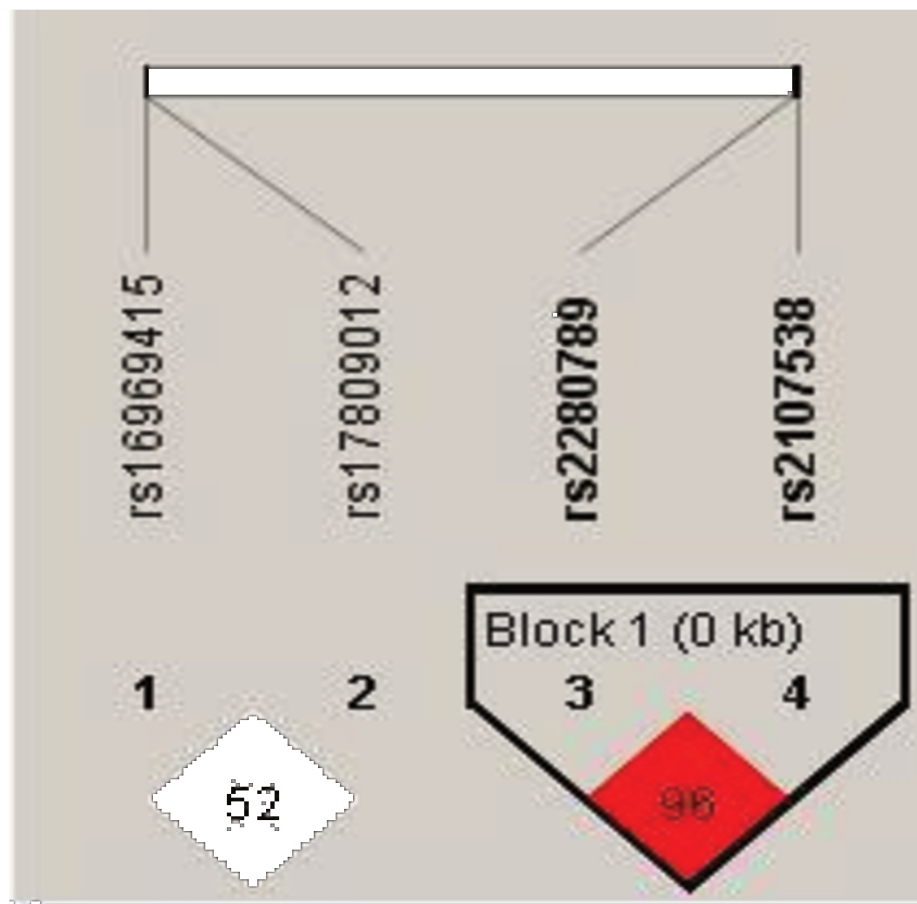


Figura 9. Desequilíbrio de Ligação. Os números 52 e 96 demonstram o valor D'. Valor D' não significativo=0,52% (losango branco). Valor D' significativo=0,96% (losango vermelho).

4.4 Frequência de Haplótipos

Após determinar a frequência genotípica dos SNPs no gene CCL11 (Eotaxina-1): rs16969415 (C>T); rs17809012 (A>G); e no gene CCL5 (RANTES) rs2280789 (C>T) e rs2107538 (G>A) o software HaploView realiza a inferência da frequência dos haplótipos.

A ocorrência de três haplótipos foi encontrada: TG, CA e TA. Para o haplótipo TG foi encontrada a frequência mais incidente em 75,3%. Uma frequência de 13,6% foi constatada para o haplótipo CA e para o haplótipo TA foi revelada uma frequência de 10,7%.

4.4.1 Associação de Haplótipos a Complicações Pulmonares

A análise de associação dos haplótipos TG, CA e TA a complicações pulmonares como asma, STA e infecção pulmonar, foram realizadas através do software Haploview.

4.4.2 Haplótipos versus Asma

Não houve associação significativa em relação aos haplótipos TG, CA e TA à asma, onde o p corresponde a 0,68; 0,58 e 0,98, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10. Associação dos Haplótipos TG, CA e TA à Asma

Haplótipos	Frequência de Haplótipo (%)	Teste X^2	p Haplótipo X Asma
TG	75,3	0,16	0,68
CA	13,6	0,292	0,58
TA	10,7	0,0	0,98

4.4.3 Haplótipos versus Síndrome Torácica Aguda

Em relação aos haplótipos TG, CA e TA não foi possível observar associação significativa à complicação pulmonar de STA. O p para o haplótipo TG foi de 0,97, para o haplótipo CA de 0,33 e para o haplótipo TA de 0,32 (Tabela 11).

Tabela 11. Associação dos Haplótipos TG, CA e TA à Síndrome Torácica Aguda

Haplótipos	Frequência de Haplótipo (%)	Teste X^2	p Haplótipo X STA
TG	75,3	0,0010	0,97
CA	13,6	0,933	0,33
TA	10,7	0,975	0,32

4.4.4 Haplótipos versus Infecção Pulmonar

A tabela 12 demonstra que os haplótipos TG e CA revelaram associação significativa à infecção pulmonar, onde o p para o haplótipo TG foi de 0,0064 e para o haplótipo CA de 0,0018. Entretanto, o haplótipo TA não foi associado à infecção pulmonar ($p=0,8583$).

Tabela 12. Associação dos Haplótipos TG, CA e TA à Infecção Pulmonar

Haplótipos	Frequência do Haplótipo (%)	Teste X^2	p Haplótipo X Infecção Pulmonar
TG	75,3	7,43	0,0064
CA	13,6	9,72	0,0018
TA	10,7	0,03	0,8583

4.5 Associação de Polimorfismos a Complicações Pulmonares

A análise de associação dos SNPs no gene CCL11 (rs17809012; rs16969415) e no gene CCL5 (rs2280788; rs2280789) a complicações pulmonares como asma, STA e infecção pulmonar, foram realizadas através do Teste Exato de Fisher. Aplicando-se o Teste de Correção Bonferroni, foram considerados p significativos os menores que 0,00416.

4.5.1 SNPs no gene CCL11 associados a complicações pulmonares

4.5.1.1 Associação do SNP rs17809012 no gene CCL11 à Asma

Dentre as 23 (23/157) crianças genotipadas com o genótipo mutante para o polimorfismo rs17809012 (A→G), apenas 2 (8,69%) foram diagnosticadas com asma. Entre as 53 (53/157) crianças com o perfil heterozigoto para esse SNP, 8 (15,09%) apresentaram asma.

Dos 81 (81/157) pacientes detectados com o genótipo AA para esse polimorfismo 5 (6,17%) indivíduos foram portadores de asma.

Não foi possível incluir 2 pacientes na análise de associação desse polimorfismo à asma, pela indisponibilidade de informação da manifestação clínica por motivo de óbito.

Não houve associação significativa desse SNP à asma, demonstrado através do $p=0.2144$ (Tabela 13).

Tabela 13. Análise de associação do SNP rs17809012 (A→G) no gene CCL11 à ASMA em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	ASMA		p
			Acometidos (n=15)	Não Acometidos (n=140)	
CCL11	rs17809012 (A→G)	AA	5	76	0.2144
		AG	8	44	
		GG	2	20	

4.5.1.2 Associação do SNP rs17809012 no gene CCL11 à STA

Houve apenas 1 diagnóstico (4,35%) de STA dentre os 23 (23/157) pacientes detectados com o genótipo homozigoto mutante (GG) para o polimorfismo rs17809012 (A→G).

Das 53 (53/157) crianças diagnosticadas com o genótipo AG somente 3 (5,66%), foram portadoras de STA.

Não foi detectada nenhuma criança com a manifestação clínica da STA dentre os 81 pacientes (81/157) estabelecidos com a homozigose do alelo A para esse polimorfismo.

Não foi possível incluir 2 pacientes na análise de associação desse polimorfismo à asma, pela indisponibilidade de informação da manifestação clínica por motivo de óbito.

Não ocorreu associação significativa para esse SNP à STA ($p=0.05514$) (Tabela 14).

Tabela 14. Análise de associação do SNP rs17809012 (A→G) no gene CCL11 à STA em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	STA		p
			Acometidos (n=4)	Não Acometidos (n=151)	
CCL11	rs17809012 (A→G)	AA	0	81	0.05514
		AG	3	49	
		GG	1	21	

4.5.1.3 Associação do SNP rs17809012 no gene CCL11 à Infecção

Pulmonar

Na somatória dos 23 (23/157) pacientes homozigotos mutantes para o polimorfismo rs17809012 (A→G) 13 (56,52%) revelaram o diagnóstico de infecção pulmonar.

Entre os 53 (53/157) portadores do genótipo AG para esse SNP, 33 (62,26%) foram acometidos com a infecção pulmonar.

Dentre as 81 (81/157) crianças com o genótipo selvagem (AA), 37 (45,67%) evidenciaram a clínica de infecção pulmonar. Decorrente à restrição de amostras de 3 (3/86) crianças com infecção pulmonar, não foi realizada a investigação de genótipo para esse polimorfismo.

Não foi possível observar associação significativa desse SNP à infecção pulmonar ($p=0.1184$) (Tabela 15).

Tabela 15. Análise de associação do SNP rs17809012 (A→G) no gene CCL11 à Infecção Pulmonar em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	Infecção Pulmonar		p
			Acometidos (n=86)	Não Acometidos (n=72)	
CCL11	rs17809012 (A→G)	AA	37	44	0.1184
		AG	33	19	
		GG	13	9	

4.5.1.4 Associação do SNP rs16969415 no gene CCL11 à Asma

Na totalidade dos 20 (20/159) pacientes com o genótipo heterozigoto C>T para o SNP rs16969415, somente 1 (5%) revelou o diagnóstico de asma.

Entre as 139 (139/159) crianças portadoras do genótipo selvagem CC, 13 pacientes (9,35%) foram detectados como asmáticos. Devido a não disponibilidade da amostra de 1 (1/15) paciente com asma, não foi realizada a investigação genotípica para esse SNP.

Não foi verificada associação significativa para esse polimorfismo à asma ($p= 1$) (Tabela 16).

Tabela 16. Análise de associação do SNP rs16969415 (C→T) no gene CCL11 à

ASMA em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	ASMA		p
			Acometidos (n=15)	Não Acometidos (n=140)	
CCL11	rs16969415 (C→T)	CC	13	125	1
		CT	1	19	
		TT	0	0	

4.5.1.5 Associação do SNP rs16969415 no gene CCL11 à STA

Dentre os 20 (20/159) pacientes genotipados com o perfil heterozigoto para o SNP rs16969415 (C $\rightarrow$ T), 2 crianças (10%), apresentaram STA.

Entre os 139 pacientes (139/159) com o genótipo selvagem (CC) para esse polimorfismo, 2 (1,43%) revelaram a enfermidade de STA.

Não ocorreu associação significativa desse SNP à STA, determinado pelo $p=0.07835$ (Tabela 17).

Tabela 17. Análise de associação do SNP rs16969415 (C $\rightarrow$ T) no gene CCL11 à STA

em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	STA		p
			Acometidos (n=4)	Não Acometidos (n=151)	
CCL11	rs16969415 (C $\rightarrow$ T)	CC	2	136	0.07835
		CT	2	18	
		TT	0	0	

4.5.1.6 Associação do SNP rs16969415 no gene CCL11 à Infecção Pulmonar

Das 20 (20/159) crianças com o genótipo CT para o SNP rs16969415 (C $\rightarrow$ T) 11 (55%), apresentaram infecção pulmonar.

Dentre as 139 (139/159) portadoras do genótipo CC para esse polimorfismo, 74 (53,23%) foram diagnosticadas com infecção pulmonar. Mediante indisponibilidade de amostra, não foi possível realizar a genotipagem de 1 paciente (1/86) com infecção pulmonar para esse polimorfismo.

Não foi observada associação significativa desse SNP à infecção pulmonar ($p=1$) (Tabela 18).

Tabela 18. Análise de associação do SNP rs16969415 (C $\rightarrow$ T) no gene CCL11 à

Infecção Pulmonar em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	Infecção Pulmonar		p valor
			Acometidos (n=86)	Não Acometidos (n=72)	
CCL11	rs16969415 (C $\rightarrow$ T)	AA	74	64	1
		AG	11	9	
		GG	0	0	

4.5.2 SNPs no gene CCL5 associados a complicações pulmonares

4.5.2.1 Associação do SNP rs2107538 no gene CCL5 à Asma

Em 8 (8/156) pacientes determinados pelo genótipo homozigoto recessivo AA para o SNP rs2107538 (G $\rightarrow$ A) apenas 1 criança (12,5%), apresentou asma.

Em relação aos 60 pacientes (60/156) determinados pelo perfil heterozigoto para esse polimorfismo, 6 (10%) apresentaram asma.

Dentre os 88 (88/156) pacientes com o genótipo selvagem (AA), 7 (7,95%) evidenciaram asma. Um paciente asmático (1/15) não foi analisado para esse polimorfismo, devido a não disponibilidade de amostra. Não houve associação significativa desse SNP à asma ($p = 0.7136$) (Tabela 19).

Tabela 19. Análise de associação do SNP rs2107538 (G $\rightarrow$ A) no gene CCL5 à asma em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	ASMA		p
			Acometidos (n=15)	Não Acometidos (n=140)	
CCL5	rs2107538 (G $\rightarrow$ A)	GG	6	80	0.7136
		GA	7	53	
		AA	1	7	

4.5.2.2 Associação do SNP rs2107538 no gene CCL5 à STA

Nenhuma das 8 (8/156) crianças homozigotas recessivas (AA) para o polimorfismo rs2107538 (G→A) apresentaram STA.

Dentre os 60 (60/156) pacientes com o perfil heterozigoto para esse SNP, 2 (3,33%) apresentaram STA.

Na totalidade dos 88 (88/156) portadores do genótipo GG 2 (2,27%), revelaram a clínica de STA.

Não ocorreu associação significativa deste polimorfismo à STA ($p=1$) (Tabela 20).

Tabela 20. Análise de associação do SNP rs2107538 (G→A) no gene CCL5 à STA em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	STA		p
			Acometidos (n=4)	Não Acometidos (n=151)	
CCL5	rs2107538 (G→A)	GG	2	85	1
		GA	2	57	
		AA	2	8	

4.5.2.3 Associação do SNP rs2107538 no gene CCL5 à Infecção Pulmonar

Dentre os 8 (8/156) pacientes genotipados com homozigose recessiva (AA) para o SNP rs2107538 (A→G), 7 (87,50%) foram diagnosticados com infecção pulmonar.

Dos 60 (60/156) portadores do genótipo GA, 36 (60%) apresentaram infecção pulmonar.

Entre os 88 (88/156) com o genótipo selvagem GG para esse polimorfismo 39 (44,31%) crianças foram detectadas com infecção pulmonar. Quatro pacientes (4/86) acometidos com infecção pulmonar não foram submetidos à investigação molecular.

De acordo com os princípios do teste de correção múltiplo de Bonferroni, o $p=0,02274$ indicado na tabela 21, não é considerado significativo para a associação desse SNP à infecção pulmonar.

Tabela 21. Análise de associação do SNP rs2107538 (G→A) no gene CCL5 à

Infecção Pulmonar em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	Infecção Pulmonar		p
			Acometidos (n=86)	Não Acometidos (n=72)	
CCL15	rs2107538 (G→A)	GG	39	48	0,02274
		GA	36	23	
		AA	7	1	

4.5.2.4 Associação do SNP rs2280789 no gene CCL5 à Asma

Entre os 112 (112/156) pacientes portadores do genótipo TT para o polimorfismo rs2280789 (C→T), 10 (8,92%) apresentaram asma.

Dos 44 (44/156) indivíduos genotipados com o perfil heterozigoto, 5 (11,36%) foram diagnosticados com asma.

Não houve associação significativa deste SNP à asma ($p= 0.559$) (Tabela 22).

Tabela 22. Análise de associação do SNP rs2280789 (C→T) no gene CCL5 à Asma em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	ASMA		p
			Acometidos (n=15)	Não Acometidos (n=140)	
CCL15	rs2280789 (C→T)	CC	0	0	0.559
		CT	5	38	
		TT	10	103	

4.5.2.5 Associação do SNP rs2280789 no gene CCL5 à STA

Dentre as 112 (112/156) crianças homozigotas para o genótipo T para o SNP rs2280789 (C→T), apenas 2 (1,78%) pacientes foram portadores de STA.

Dos 44 (44/156) pacientes que revelaram o genótipo CT, somente 2 (4,54%), pacientes apresentaram STA.

Não foi observada associação significativa desse polimorfismo à STA ($p=0.3047$) (Tabela 23).

Tabela 23. Análise de associação do SNP rs2280789 (C→T) no gene CCL5 à STA em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	STA		p
			Acometidos (n=4)	Não Acometidos (n=151)	
CCL5	rs2280789 (C→T)	CC	0	0	0.3047
		CT	2	41	
		TT	2	111	

4.5.2.6 Associação do SNP rs2280789 no gene CCL5 à Infecção Pulmonar

Na somatória dos 112 (112/156) pacientes com o genótipo TT para o polimorfismo rs2280789 (C→T), 51 (45,53%) indivíduos foram acometidos com infecção pulmonar.

Entre os 44 (44/156) perfis heterozigotos, 33 (75%) crianças foram diagnosticadas com infecção pulmonar. Dois pacientes (2/86) detectados com infecção pulmonar, não foram investigados para esse SNP.

A tabela 24 revela associação significativa desse polimorfismo à infecção pulmonar, evidenciada através do $p=0.0005508$. Aplicando-se o teste de correção múltiplo de Bonferroni, o p valor mantém-se significativo. Há diferença significativa entre os grupos acometidos e não acometidos com infecção pulmonar ($p=0.0005508$).

Tabela 24. Análise de associação do SNP rs2280789 (C→T) no gene CCL5 à

Infecção Pulmonar em crianças portadora de Anemia Falciforme

Gene	SNP	Genótipo	Infecção Pulmonar		p
			Acometidos (n=86)	Não Acometidos (n=72)	
CCL15	rs2280789 (C→T)	CC	0	0	0.0005508
		CT	33	10	
		TT	51	62	

5) DISCUSSÃO

A anemia falciforme é reconhecida como um estado inflamatório crônico, que é caracterizada pelo elevado número de leucócitos, alterações nos níveis de citocinas inflamatórias, lesões vasculares das células endoteliais e aumento da adesividade de células vermelhas, leucócitos e plaquetas^{108,109}. Pesquisas demonstraram que pacientes com anemia falciforme apresentam aumento no número de eosinófilos no sangue periférico e as propriedades adesivas dessas células é maior quando comparados com indivíduos saudáveis¹¹⁰.

Sabe-se que os pulmões são particularmente vulneráveis aos eventos vaso-oclusivos devido a sua anatomia e que os eosinófilos participam intensamente de processos inflamatórios das vias aéreas. As complicações pulmonares como síndrome torácica aguda (STA), infecções e hipertensão pulmonar, são as principais causas de morbidade e mortalidade na anemia falciforme. Além disso, o diagnóstico de asma brônquica em pacientes com doença falciforme está associado ao aumento de crises alérgicas, síndrome torácica aguda e morte. Estudos demonstram que crianças com asma brônquica têm risco aumentado de desenvolver síndrome torácica aguda quando admitidas no hospital com crise alérgica⁵². Entretanto, a relação de asma e síndrome torácica aguda não está bem documentada na população adulta. Acredita-se que se trata de duas doenças inflamatórias. A inflamação das vias aéreas na asma levaria à potencialização da inflamação vascular resultando em vaso-oclusão. Outro mecanismo proposto seria a baixa ventilação/perfusão, levando à hipóxia e, conseqüentemente, à vaso-oclusão³⁶.

Sabe-se que as quimiocinas RANTES (Regulada por Ativação, Normal T Expressa e Secretada) e Eotaxina-1 atuam na resposta inflamatória das complicações respiratórias, intensificando e amplificando o fenômeno inflamatório no interior das vias aéreas. Dados

obtidos no nosso laboratório mostraram que a Eotaxina-1 e o RANTES encontra-se significativamente aumentados no sangue periférico de pacientes com anemia falciforme e sugerem que essas quimiocinas podem contribuir para a ativação dos eosinófilos na anemia falciforme¹¹¹. Além disso, os processos que culminam para o desenvolvimento das complicações pulmonares são complexos, multifatoriais e podem ser influenciados por polimorfismos genéticos^{37,67}.

Vários estudos têm demonstrado a importância de elevados níveis de HbF, da presença de talassemia α e do tipo de haplótipo β na modulação da gravidade da anemia falciforme, porém, há um consenso de que outros moduladores, genéticos e ambientais, possam estar envolvidos^{1,3,5}.

Trabalhos têm demonstrado a associação de polimorfismos no gene CCL11 (Eotaxina-1) e CCL5 (RANTES) à suscetibilidade a doenças pulmonares como, por exemplo, a asma¹¹². Os polimorfismos no gene CCL11 (Eotaxina -1) que estão localizados na região promotora do cromossomo 17, ocorrem através da substituição de um único nucleotídeo C $\rightarrow$ T na posição -426 (rs16969415) e na substituição do nucleotídeo A $\rightarrow$ G na posição -384 (rs17809012). Na região do éxon 1 a substituição ocorre entre G $\rightarrow$ A na posição 67 (rs1129844) culminando na mudança de aminoácido não-conservativo da Alanina na posição 23 para Treonina (Ala 23 Thr).

Pesquisa realizada em indivíduos Coreanos correlacionou significativamente o SNP rs17809012 (Eot-384 A $\rightarrow$ G), aos níveis plasmáticos de eotaxina- 1 em pacientes asmáticos e sugerem que essa quimiona pode ter um papel importante na síntese de IgE e na gravidade da asma⁹⁹. Avaliando o SNP rs1129844 (Eot 67 G $\rightarrow$ A), foi demonstrado que tanto os portadores do genótipo mutante para o polimorfismo rs1129844 (Eot 67 G $\rightarrow$ A) quanto os heterozigotos para esse SNP, apresentaram um provável efeito protetor à

gravidade da asma quando comparado com os portadores do alelo selvagem (GG). Além disso, a concentração plasmática da Eotaxina-1 foi significativamente mais alta em indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem (GG) quando comparada com os pacientes com o perfil homozigoto mutante ou heterozigoto para esse polimorfismo em asmáticos provenientes de Taiwan⁶⁵.

No entanto, não há estudos que avaliaram a associação dos polimorfismos da eotaxina-1 e as manifestações clínicas da anemia falciforme. Desta forma, no presente estudo, ao investigarmos os 2 polimorfismos citados acima, encontramos apenas o genótipo GG para o SNP rs 17809012 (Eot-384 A→G). Porém, a presença desse genótipo mutante não está associada as manifestações clínicas investigadas (asma, infecção e síndrome torácica aguda) em crianças portadoras de anemia falciforme. Não podemos descartar o possível envolvimento da presença desse polimorfismo com outras manifestações clínicas da doença falciforme que não foram avaliadas no presente trabalho.

Sabe-se que a quimiocina RANTES recruta leucócitos (eosinófilos) e células T para as vias aéreas na asma e doenças alérgicas. Em adição, a RANTES ativa o canal de Gardos via DARC receptor (Duffy Antígeno/Receptor para quimiocinas) e a ativação desse canal causa a perda de potássio e água, levando a desidratação das células vermelhas. Esse mecanismo resulta no aumento da falcização das células vermelhas e consequentemente leva a vaso-oclusão^{113,114}.

A relação dos polimorfismos no gene CCL5 (RANTES) tem sido relatada em diversas complicações respiratórias. Situados na região do cromossomo 17, encontra-se o SNP rs2107538 (RANTES -403 G→A) e o SNP rs2280788 (RANTES -28C→G)^{100,101}. Estudo realizado em crianças asmáticas provenientes da Tunísia relatou que o polimorfismo

rs2107538 (RANTES -403 G>A), bem como o SNP rs2280788 (RANTES - 28C>G) estão associados ao risco de desencadear a doença. Os alelos A e G respectivamente para ambos os polimorfismos -403 G/A e -28 C/G, estavam presentes (no seu estado heterozigoto ou homozigoto), em uma proporção significativamente maior nos asmáticos quando comparada aos indivíduos controle¹¹⁵. Há relatos de estudos que demonstram que a expressão de RANTES em macrófagos alveolares pode ser aumentada em indivíduos com genótipo homozigoto mutante para o SNP rs2107538 (RANTES -403 AA), em comparação com outros genótipos, devido a um aumento da transcrição do gene de RANTES¹¹⁶. Em contraste, pesquisa realizada em indivíduos asmáticos originários da Espanha não relatou associação significativa desses SNPs (rs2107538 RANTES -403 G>A e rs2280788 RANTES -28C>G) aos diferentes tipos de asma, como asma atópica e no tratamento da asma não atópica¹¹⁷. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de 40 indivíduos asmáticos Libaneses, onde esses polimorfismos não estão associados à obstrução pulmonar desses indivíduos¹¹⁸. Esses dados corroboram com os achados do presente estudo, onde não observamos associação significativa do SNP rs2107538 (RANTES -403 G>A) à asma em crianças portadoras de anemia falciforme (Tabela 21). Os resultados contraditórios encontrados na investigação dos SNPs (rs2107538 RANTES -403 G>A e rs2280788 RANTES -28C>G) em crianças asmáticas provenientes da Tunísia¹¹⁵, pode ser explicado com base na epigenética, uma vez que, as populações avaliadas são provenientes de diferentes regiões geográficas e encontram-se em diferentes ambientes e alérgenos que podem estar implicados nos mecanismos fisiopatológicos da asma.

Nos últimos anos, tem sido sugerido que a asma predispõe a complicações da doença falciforme, tais como as crises de dor, hipertensão pulmonar, acidente vascular¹¹⁹.

cerebral e síndrome torácica aguda⁶⁰. A síndrome torácica aguda ocorre em crianças em uma proporção três vezes maior que adultos⁶⁰. Portanto, nós também avaliamos uma possível associação dos polimorfismos da quimiocina RANTES com a síndrome torácica aguda. No entanto, não encontramos associação do polimorfismo RANTES -403 G>A com a síndrome torácica na população de crianças com anemia falciforme.

Outra importante complicação na doença falciforme é a infecção. A infecção em crianças com anemia falciforme é a principal causa da morbidade e mortalidade nos primeiros anos de vida⁶⁰. Recentemente, uma pesquisa realizada na Tunísia, investigou 100 indivíduos com anemia falciforme para determinar possível associação do SNP rs2107538 (RANTES -403 G>A), a infecções e crises dolorosas¹²⁰. Entretanto, não houve correlação desse polimorfismo com essas manifestações clínicas. Resultados semelhantes foram evidenciados no atual estudo, onde não encontramos associação significativa do polimorfismo rs2107538 (RANTES -403 G>A), a infecção pulmonar em crianças portadoras de anemia falciforme.

Além desses, outro polimorfismo situado na região intrônica 1.1 do gene CCL5 (RANTES IN 1.1 C>T, rs 2280789) pode estar associado a infecções. Em 2009, um estudo realizado por um grupo Francês, revelou uma possível associação do polimorfismo rs2280789 (RANTES In1.1 C >T) aos processos infecciosos em pacientes adultos com anemia falciforme provenientes de Paris e de Benin. Os resultados demonstraram que a presença desse polimorfismo em portadores de anemia falciforme promove um efeito protetor contra infecções bacterianas recorrentes¹⁰⁶. Conforme já mencionado, estudo recente realizado em indivíduos adultos com anemia falciforme na Tunísia, não foi relatado nenhuma associação significativa desse SNP rs2280789 (RANTES IN 1.1 C >T) a

infecções e também crises dolorosas ¹²⁰ . Desta forma, avaliamos esse polimorfismo na nossa população e encontramos uma associação significativa do polimorfismo rs2280789 (RANTES IN 1.1 C >T) à presença de infecção pulmonar em crianças acometidas com anemia falciforme (Tabela 24).

Assim, nossos dados sugerem que a presença do alelo C>T está correlacionada a maior incidência de infecções em crianças com anemia falciforme. Embora nosso resultado seja contrário ao encontrado na literatura, sugerimos que esta discrepância se deve ao fato da população brasileira apresentar maior frequência o alelo T (71,7%). De acordo com o banco de dados do NCBI esse polimorfismo não apresenta uma distribuição uniforme na população mundial. Portanto, dentro da nossa população não seria viável considerar a frequência do genótipo T (71,7%) como homozigose recessiva. É possível que resultados diferentes possam ser encontrados em outras populações ou grupos raciais. Como diferenças étnicas e raciais são comuns em sistemas polimórficos, alelos variantes ou grupos de genes interagindo, induzem a expressão do fenótipo clínico em diferentes populações. Talvez esse conceito possa explicar os resultados diferentes do polimorfismo RANTES IN 1.1 e a susceptibilidade a infecções na doença falciforme.

Para avaliar o padrão de herança genética entre os SNPs rs16969415 e rs17809012 (Eotaxina -426 e -384, respectivamente) e os SNPs rs rs2280789 e rs2107538 (RANTES IN1.1) foi aplicado o teste de desequilíbrio de ligação (DL). As análises mostram que os SNPs rs2280789 e rs2107538 no gene CCL5 estão em DL, uma vez que, o coeficiente D' (coeficiente de medir o DL) varia de 0 a 1 (ou 0-100%), e o valor do D' foi de 96% (significativo). Esses dados mostram que os dois SNPs rs2280789 e rs2107538 no gene CCL5 mantêm o padrão de herança semelhante entre si (são co-herdados juntos), demonstrando uma segregação dependente. No entanto, os SNPs rs16969415 e

rs17809012 no gene CCL11 não estão em DL (D' em 0,56%), portanto não apresenta uma segregação dependente e sim uma segregação independente.

Este é o primeiro estudo que investigou os polimorfismos nos genes CCL5 (RANTES) e CCL11 (Eotaxina-1) em crianças portadoras de anemia falciforme no Brasil. Nossos dados sugerem uma possível associação do polimorfismo rs2280789 (IN 1.1 C→T) da quimiocina RANTES à infecção pulmonar observada na doença falciforme.

6) CONCLUSÕES

-Foi observada uma frequência de 1,3% para o genótipo GA do SNP rs1129844 (Eotaxina 67 G→A), de 13% para o perfil heterozigoto CT correspondente ao SNP rs16969415 (Eotaxina -426C→T) e 37% de heterozigotos para o SNP rs2280788 (RANTES -28C→G) na população brasileira investigada;

- Foi encontrada uma frequência de 14,6% (23/157) para o polimorfismo rs17809012 (Eotaxina -384A→G), de 5,1% (3/156) para o rs2107538 (RANTES -403G→A) e 71,7% (112/156) para o rs2280789 (RANTES in 1.1 C→T);

- Os polimorfismos dos rs2107538 no gene CCL5 (RANTES) e rs17809012 no gene CCL11 (Eotaxina-1) não mostraram associação com as complicações pulmonares: asma, síndrome torácica aguda e infecção pulmonar;

- O alelo C→T (RANTES IN 1.1) está associado como fator de risco para o aparecimento de infecções pulmonares em crianças portadoras de anemia falciforme.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Steinberg MH, Adewoye AH. Modifier genes and sickle cell anemia. *Curr Opin Hematol.* 2006;13(3):131-6.
2. Bandeira FMGC, Bezerra MAC, Santos MNN, Gomes YM, Araújo AS, Abath FGC. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina S. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29(2):179-84.
3. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN, Orkin SH. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1LMYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11869-74.
4. Serjeant GR. Sickle-cell disease. *Lancet.* 1997;350(9079):725-30.
5. Higgs DR, Wood WG. Genetic Complexity in Sickle Cell Disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(33):11595-6.
6. Serjeant GR. The emerging understanding of sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2001;112(1):3-18.
7. Steinberg MH, Rodgers GP. Pathophysiology of Sickle Cell Disease: Role of Cellular and Genetic Modifiers. *Semin Hematol.* 2001;38(4):299-306.
8. De Franceschi L, Corrocher R. Established and experimental treatments for sickle cell disease. *Haematologica.* 2004;89(3):348-56.
9. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet.* 2004;364(9442):1343-60.
10. Kasschau MR, Barabino GA, Bridges KR, Golan DE. Adhesion of sickle neutrophils and erythrocytes to fibronectin. *Blood.* 1996;87(2):771-80.
11. Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J,

Fishlock K, Brown KA. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood*. 1998;91(1):266-74.

12. Rosse WF, Narla M, Petz LD, Steinberg MH. New Views of Sickle Cell Disease Pathophysiology and Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000;2-17.

13. Gray A, Anionwu EN, Davies SC, Brozovic M. Patterns of mortality in sickle cell disease in the United Kingdom. *J Clin Pathol*. 1991;44(6):459–63.

14. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med*. 1994;330(23):1639-44.

15. Powars D, Weidman JA, Odom-maryon T, Niland JC, Johnson C. Sickle cell chronic lung disease: prior morbidity and the risk of pulmonary failure. *Medicine (Baltimore)*. 1988;67(1):66-76.

16. Thomas AN, Pattison C, Serjeant GR. Causes of death n sickle-cell disease in Jamaica. *Br Med J Clin Res*. 1982;285(6342):633-5.

17. Dampier C, Lieff S, Lebeau P, Rhee S, McMurray M, Rogers Z, Smith-Whitley K, Wang W. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(3):485-94.

18. Ballas SK, Smith ED. Red blood cell changes during the evolution of sickle cell painful crisis. *Blood*. 1992;79(8):2154-63.

19. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: Old discoveries, New concepts, and Future promise. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(4):850-858.

20. Salzano MF, Bortolini MC. The Evolution an Genetics of Latin American population. Cambridge University Press. 2002;215-227.

21 .Bordin S, Crespi VG, Duarte ASS, Basseres DS, Melo MB, Zilli -Vieira AP, Saad STO,

- Costa FF. DNAase I hypersensitive site 3' to the β -globin gene cluster contains a TAA insertion specific for β^S -Benin haplotype. *Haematologica*. 2002;87(3):246-249.
- 22 .Antonarakis SE, Boehm CD, Serjeant GR, Theisen CE, Dover GJ, Kasazian HHJr. Origin of the β^S globin in Blacks: the contribution of recurrent mutation or gene conversion or both. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1984;81(3):853-856.
23. Nagel RL. The Origin of the Hemoglobin S Gene: Clinical, Genetic, and Anthropological Consequences. *The Einstein Quarterly Journal of Biology and Medicine* 1984;53(2):53 -62.
- 24 .Labie D, Pagnier J, Lapoumeroulie C, Rouabhit F, Dunda-Belkhodja O, Chardin P, Beldjordt C, Wajcman H, Fabry ME, Nagel RL. Common haplotype dependency of high γ -globin gene expression and high Hb F levels in β -thalassemia and sickle cell anemia patients. *Genetics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985;82(7):2111-2114.
- 25 .Powars, DR. β^S gene cluster haplotypes in sickle cell anemia: clinical and hematologic features. *Hematol. Oncol. Clin*. 1991;5(3):475-493.
26. Costa FF. Anemia Falciforme. *In*: Zago MA, Falcão RP, Paasquini R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. São Paulo: Ed. Atheneu. 2004:289-308.
27. Fabron AJ. Clínica e Tratamento das Doenças Falciformes. *In* Naoum PC. *Hemoglobinopatias e Talassemias*. São Paulo. Ed. Sarvier.1997:48-60.
28. Pagnier J, Mears G, Dunda-Belkodja O, Schaefer-Rego KE, Beldjord C, Nagel RL, Labie D. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in África. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1984;81(6):1771-1773.
29. Sutton M, Bouhassira EE, Nagel RL. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of β -like globin gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*. 1989;32(1):66-69.
30. Lapoumèroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobé M, Bodo JM,

Carnevale P, Labie D, Elion J, Krishnamoorthy R. A novel sickle gene of yet another origin in Africa: the cameroon type. *Human Genetics*. 1992;89(3):333-337.

31. Rahgozar S, Porrfathollah AA, Moafi AR, Old JM. β^S gene in Central Iran is in linkage disequilibrium with the Indian-Arab haplotype. *American Journal of Hematology*. 2000;65(3):192-195.

32. Zago MA, Silva-Jr WA, Gualandro S, Yokumizu IK, Araujo AG, Tavela MH, 40Gerard N, Krishnamorrthy R, Elion J. Rearrangements of the β -globin gene cluster in apparently typical β^S haplotypes. *Haematologica*. 2001;86(2):142 -145.

33. Miller AC, Gladwin MT. Pulmonary complications of sickle cell disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(11):1154-65.

34. Minter KR, Gladwin MT. Pulmonary complications of sickle cell anemia: a need for increased recognition, treatment and research. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(11):2016-2019.

35. Moreira GA. Respiratory repercussions of sickle cell anaemia. *J Bras P Pneumol*. 2007;33(3):18-20.

36. Field JJ, Debaun MR. Asthma and sickle cell disease: two distinct diseases or part of the same process? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;2009(1):45-53.

37. Morris RJ. Are breastfeeding and diet strategies overrated for the prevention of atopy? *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2008;101(2):113.

38. Vichinsky, E. Comprehensive care in sickle cell disease: its impact on morbidity and mortality. *Seminars in Hematology*. 1991;28(3):220-6.

39. Charache S, Scott JC, Chararache P. "Acute chest syndrome" in adults with sickle cell anemia. *Arch Intern Med*. 1979;139(1):67-9.

40. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette T, Dean D, Nickerson B,

Orringer E, Mckie V, Bellevue R, Daeachner C, Mancini EA. Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. *N Engl J Med*. 2000;342(25):1855-65.

41. Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Luty GA, Dampier C, Osunkwo I, Wang WC, Hoppe C, Hagar W, Darbari DS, Malik P. Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. *Scientific World Journal*. 2012;949535.

42. Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2254-2265.

43. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA.; Scott RB, Gillette P, Vera JC, Levy PS. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1994;84(2):643-9.

44. Vichinsky EP, Styles LA, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Blood*. 1997;89(5):1787–1792.

45. Styles LA, Schalkwijk CG, Aarsman AJ, Vichinsky EP, Lubin BH, Kuypers FA. Phospholipase A2 levels in acute chest syndrome of sickle cell disease. *Blood*. 1996;87(6):2573–2578.

46. Fartoukh M, Lefort Y, Habibi A, Bachir D, Galacteros F, Godeau B, Maitre B, Brochard L. Early intermittent noninvasive ventilation for acute chest syndrome in adults with sickle cell disease: a pilot study. *Intensive Care Med*. 2010;36(8):1355–1362.

47. Boyd JH, Moinuddin A, Strunk RC, DeBaun MR. Asthma and acute chest in sickle-cell disease. *Pediatr Pulmonol*. 2004;38(3):229–232.

48. Sylvester KP, Patey RA, Broughton S, Rafferty GF, Rees D, Thein SL, Greenough A.

Temporal relationship of asthma to acute chest syndrome in sickle cell disease. *Pediatr Pulmonol*. 2007;42(2):103–106.

49. Reagan MM, DeBaun MR, Frei-Jones MJ. Multi-modal intervention for the inpatient management of sickle cell pain significantly decreases the rate of acute chest syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(2):262–266.

50. Gaston M, Rosse WF. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease: Review of study design and objectives. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1982;4(2): 197-201.

51. Farber MD, Koshy M, Kinney TR. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease: Demographic and socioeconomic characteristics of patients and families with sickle cell disease. *J Chronic Dis*. 1985;38(6):495-505.

52. Gregory J. Kato, Onyinye C. Onyekwere, and Mark T. Gladwin. Pulmonary hypertension in Sickle Cell Disease: relevance in children. *Pediatr Hematol Oncol*. 2007;24(3):159-70.

53. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. *N Engl J Med*. 2004;350(9):886-95.

54. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor JVI, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM Jr, Gladwin MT. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006;107(6):2279-85.

55. De Castro LM, Jonassaint JC, Graham FL, Ashley-Koch. Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: clinical endpoints and disease outcomes. *Am J Hematol*. 2008;83(1):19-25.

56. Ataga KI, Moore CG, Jones S, Olajide O, Strayhorn D, Hinderliter A, Orringer EP. Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: a longitudinal study. *Br J Haematol*. 2006;134(1):109-15.
57. Ambrusko Gunawardena S, Sakara A, Windsor B, Lanford L, Michelson P, Krishnamurti. Elevation of tricuspid regurgitant jet velocity, a marker with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*.
58. Liem RI, Young LT, Thompson AA. Tricuspid regurgitant jet velocity is associated with hemolysis in children and young adults with sickle cell disease evaluated for pulmonary hypertension. *Haematologica*. 2007;92(11):1549-52.
59. Onyekwere OC, Campbell A, Teshome M, Onyeagoro S, Sylvan C, Akintilo A, Hutchinson S, Ensing G, Gaskin P, Kato G, Rana S, Kwagyan J, Gordeuk V, Williams J, Castro O. Pulmonary hypertension in children and adolescents with sickle cell disease. *Pediatr Cardiol*. 2008;29(2):309-12.
60. Ballas SK. Sickle Cell Disease: Clinical Management. *Bailliere's Clinical Haematology*. 1998;11(1):185-214.
61. Overturf GD. Infections and immunizations of children with sickle cell disease. *Adv Pediatr Infect Dis*. 1999;14:191–218.
62. Holtzclaw JD, Jack D, Aguayo SM, Eckman JR, Roman J, Hsu LL. Enhanced pulmonary and systemic response to endotoxin in transgenic sickle mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(6):687-95.
63. Sabaa N, de Franceschi L, Bonnin P, Castier Y, Malpeli G, Debbabi H, Galaup A, Maier-Redelsperger M, Vandermeersch S, Scarpa A, Janin A, Levy B, Girot R, Beuzard Y, Leboeuf C, Henri A, Germain S, Dussaule JC, Tharaux PL. Endothelin receptor

antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1924-33.

64. Clinical Practice Guidelines. NHLBI. Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. National Asthma Education and Prevention Program. National Heart, Lung and Blood Institute, Bethesda, MD, 2007. Report :07-4051.

65. Wang TN, Chiang W, Tseng HI, Chu YT, Chen WY, Shih NH, Ko YC. The polymorphisms of Eotaxin 1 and CCR3 genes influence on serum IgE, Eotaxin levels and mild asthmatic children in Taiwan. *Allergy*. 2007;62(10):1125–1130.

66. Sohn MH, Kim SH, Kim KW, Jee HM, Park HS, Kim KE. RANTES gene promoter polymorphisms are associated with bronchial hyperresponsiveness in Korean children with asthma. *Lung*. 2008;186(1):37-43.

67. Nakamura H, Luster AD, Nakamura T, In KH, Sonna LA, Deykin A, Israel E, Drazen JM, Lilly CM. Variant eotaxin: its effects on the asthma phenotype. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(6):946-53.

68. Bernaudin F, Strunk RC, Kamdem A, Arnaud C, Torres P, Delacourt M, DeBAUN MR. Asthma is associated with acute chest syndrome, but not with an increased rate of hospitalization for pain among children in France with sickle cell anemia: a retrospective cohort study. *Haematologica*. 2008;93(12):1917-8.

69. Knight-Madden J, Forrester T , Lewis N, Greenough A. Asthma in children with sickle cell disease and its association with acute chest syndrome. *Thorax*. 2005;60(3):206-10.

70. Broide D, Sriramaraio P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. *Immunol Rev*. 2001;179()163-72.

71. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in

immunity. *Immunity*. 2000;12(2):121-7.

72. Mélik-Parsadaniantz S, Rostène William . Chemokines and neuromodulation. *Journal of Neuroimmunology*. 2008;198(1):62 -68.

73. Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL -13. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111(2):227–242.

74. Doerschuk, CM. Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. *Respir Res*. 2000;1(3):136-40.

75. Forssmann U, Uguccioni M, Loetscher P, Dahinden CA, Langen H, Thelen M, Baggiolini M. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med*. 1997;185(12):2171-6.

76. Kitauro M, Suzuki N, Imai T, Takagi S, Suzuki R, Nakajima T, Hirai K, Nomiyama H, Yoshie O. Molecular cloning of a novel human CC chemokine (Eotaxin-3) that is a functional ligand of CC chemokine receptor 3. *J Biol Chem*. 1999; 274(39):27975-80.

77. Shinkai A, Yoshisue H, Koike M, Shoji E, Nakagawa S, Saito A, Takeda T, Imabeppu S, Kato Y, Hanai N, Anazawa H, Kuga T, Nishi T. A novel human CC chemokine, eotaxin-3, which is expressed in IL-4-stimulated vascular endothelial cells, exhibits potent activity toward eosinophils. *J Immunol*. 1999;163(3):1602-10.

78. Bandeira-Melo C, Herbst A, Weller PF. Eotaxins Contributing to the Diversity of Eosinophil Recruitment and Activation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2001;24(6):653-7.

79. Rothenberg ME. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21(3):291-5.

80. Berkman N, Ohnons S, Chung FK, Breuer R. Eotaxin-3 but not eotaxin gene expression is upregulated in asthmatics 24 hours after allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;(6):682-7.
81. Wolpe SD, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.* 1989;3(14):2565-73.
82. Sherry B, Cerami A. Small cytokine superfamily. *Curr Opin Immunol.* 1991;3(1):56-60.
83. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:617-48.
84. Schall TJ, Simpson NJ, Mak JY. Molecular cloning and expression of the murine RANTES cytokine: structural and functional conservation between mouse and man. *Eur J Immunol.*
85. Heger P, Wolf G, Meyers D, Sun MJO, Farrell SC, Krensky AM, Neilson E G. Isolation and characterization of cDNA from renal tubular epithelium encoding murine Rantes. *Kidney Int.* 1992;41(1):220-5.
86. Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003;111(3):450–463.
87. Racheelefsky G. Childhood asthma and allergic rhinitis: the role of leukotrienes. *J. Pediatr.* 1997;131:348–355.
88. Hallstrand TS, Henderson WRJr. An update on the role of leukotrienes in asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2010;10(1):60–66.
89. Miyamasu M, Yamaguchi M, Nakajima T, Misaki Y, Morita Y, Matsushima K, Yamamoto K, Hirai K. Th1-derived cytokine IFN-gamma is a potent inhibitor of eotaxin synthesis in vitro. *Int Immunol.* 1999;1(6):1001-4.

90. Brown JR, Kleimberg J, Marini M, Sun G, Bellini A, Mattoli S. Kinetics of eotaxin expression and its relationship to eosinophil accumulation and activation in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after allergen inhalation. *Clin Exp Immunol*. 1998;114(2):137-46.
91. Nakamura H, Weiss ST, Israel E, Luster AD, Drazen JM, Lilly CM. Eotaxin and impaired lung function in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(6):1952-6.
92. Tateno H, Nakamura H, Minematsu N, Nakajima T, Takahashi S, Nakamura M, Fukunaga K, Asano K, Lilly CM, Yamaguchi K. Plasma eotaxin level and severity of asthma treated with corticosteroid. *Respir Med*. 2004;98(8):782-90.
93. Kameyoshi Y, Dörschner A, Mallet AI, Christophers E, Schröder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med*. 1992;176(2):587-92.
94. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990;347(6294):669-71.
95. Hein H, Schlüter C, Kulke R, Christophers E, Schröder JM, Bartels J. Genomic organization, sequence, and transcriptional regulation of the human eotaxin gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(3):537-42.
96. Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, Tsuchiya N, Tokunaga K, Hirai K. Variations in the human CC chemokine eotaxin gene. *Genes Immun*. 2001;2(8):461-3.
97. Chang HS, Kim JS, Lee JH, Cho JI, Rhim TY, Uh ST, Park BL, Chung IY, Park CS, Shin HD. A Single Nucleotide Polymorphism on the Promoter of *eotaxin1* Associates with

Its mRNA Expression and Asthma Phenotypes. The American Association of Immunologists. 2005;174(3):1525-31.

98. AL-SHARIF, OLLIER, W. E.; HAJEER, A. H. A rare polymorphism at position -28 in the human RANTES promoter. *Eur J Immunogenet.* 26(5):373-4, 1999.

99. Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X, Takamatsu JK, Saito H, Ishikawa Y, Akaza T, Juji T, Takebe Y, Ohishi T, Fukutake K, Maruyama Y, Yashiki S, Sonoda S, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(8):4581-5.

100. Böger CA, Fischereder M, Deinzer M, Aslanidis C, Schmitz G, Stubanus M, Banas B, Krüger B, Riegger GA, Krämer BK. RANTES gene polymorphisms predict all-cause and cardiac mortality in type 2 diabetes mellitus hemodialysis patients. *Atherosclerosis.* 2005;183(1):121-9.

101. Fryer AA, Spiteri MA, Bianco A, Hepple M, Jones PW, Strange RC, Makki R, Tavernier G, Smilie FI, Custovic A, Woodcock AA, Ollier WE, Hajeer AH. The -403 G>A promoter polymorphism in the RANTES gene is associated with atopy and asthma. *Genes and Immunity.* 2000;1(8):509-514.

102. Yao TC, Kuo ML, See LC, Chen LC, Yan DC, Ou LS, Shaw CK, Huang JL. The RANTES promoter polymorphism: a genetic risk factor for near-fatal asthma in Chinese children. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(6):1285-92.

103. Hizawa N, Yamaguchi E, Konno S, Tanino Y, Jinushi E, Nishimura M. A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the development of late-onset asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166(5):686-90.

104. Dossou-Yovo OP, Zaccaria I, Benkerrou M, Hauchecorne M, Alberti C, Rahimy MC, Elion J, Lapoumeroulie C. Effects of RANTES and MBL2 gene polymorphisms in sickle cell disease clinical outcomes: Association of the g.In1.1T>C RANTES variant with protection against infections. *Am J Hematol*. 2009;84(6):378-380.
105. Davis LG, Dibner MD, Battey JF(editores). Basic Methods. In: Molecular Biology. Elsevier Science Publishing Company. 1986;29(6):336.
106. Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. In: Frisch EF, Sambroock J: Biochemical Education. New York. Cold Spring Harbor Laboratory. 20^a edição.1982;11(2):82.
107. Platt OS. Sickle cell anemia an inflammatory disease. *J Clin Invest*, 2000;106(3):337:8.
108. Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses*. 2001; 57(1):46-50.
109. Canalli AA, Conran N, Fattori A, Saad ST, Costa FF. Increased adhesive properties of eosinophils in sickle cell disease. *Exp Hematol*. 2004;32(8):728-34.
110. Pallis FR, Conran N, Fertrin KY, Olalla Saad ST, Costa FF, Franco-Penteado CF. Hydroxycarbamide reduces eosinophil adhesion and degranulation in sickle cell anaemia patients. *Br J Haematol*. 2014;164(2):286-95.
111. Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, Tsuchiya N, Tokunaga K, Hirai K. Variations in the human CC chemokine eotaxin gene. *Genes Immun*. 2001;2(8):461-3.
112. Rivera A, Jarolim P, Brugnara C. Modulation of Gardos channel activity by cytokines in sickle erythrocytes. *Blood*. 2002;99(1):357-603.
113. Durpès MC, Hardy-Dessources MD, El Nemer W, Picot J, Lemonne N, Elion J,

Decastel M. Activation state of alpha 4beta1 integrin on sickle red blood cells is linked to the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expression. *J Biol Chem.* 2011; 286(4):3057-64.

114. Lachheb J, Chelbi H, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association between RANTES polymorphisms and asthma severity among Tunisian children. *Hum Immunol.* 2007;68(8):675-80.

115. Takada T, Suzuki E, Ishida T, Moriyama H, Ooi H, Hasegawa T, Tsukuda H, Gejyo F. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects extent of sarcoidosis in a Japanese population. *Tissues Antigens.* 2001;58(5):293-8.

116. Muro M, Marín L, Torio A, Pagan JA, Alvarez-López MR. CCL5/RANTES chemokine gene promoter polymorphisms are not associated with atopic and nonatopic asthma in a Spanish population. *International Journal of Immunogenetics.* 2008;35(1):19–23.

117. Nahas R, Fakhoury HM, Chmairie HN, Makki RF. Study of the association between -403G/A and -28C/G RANTES gene polymorphisms and asthma in Lebanon. *Annals of thoracic Medicine.* 2012;7(1):16-20.

118. Newaskar M, Hardy KA, Morris CR. Asthma in sickle cell disease. *Scientific World Journal.* 2011;26;11:1138-52.

119. Kalai M, Chaouch L, Mansour IB, Hafsia R, Ghanem A, Abbes S. Frequency of three polymorphisms of the CCL5 gene (rs2107538, rs2280788 and rs2280789) and their implications for the phenotypic expression of sickle cell anemia in Tunisia. *Pol J Pathol.* 2013;64(2):84-9.

8) ANEXOS

Estudo de Polimorfismos nos Genes CCL5 e CCL11 Associados a Complicações Pulmonares em Crianças Portadoras de Anemia Falciforme

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CRIANÇA

Eu, _____ declaro ter recebido todas as informações relativas à pesquisa “Estudo de Polimorfismos nos Genes CCL5 e CCL11 Associados à Asma em Crianças Portadoras de Anemia Falciforme”. Como responsável pelo menor _____ autorizo a coleta de 1 tubo de 2ml contendo EDTA que serão utilizadas nesse estudo.

Outros pontos importantes foram enfatizados:

- 1- Ampla liberdade de recusar o menor (acima citado) a participar do estudo ou retirar meu consentimento em qualquer fase deste, sem penalização ou prejuízo da continuidade do tratamento.
- 2- Garantia de esclarecimentos sobre o estudo, mesmo durante o seu decorrer.
- 3- Garantia de sigilo que assegure a privacidade do menor (acima citado) quanto aos dados confidenciais envolvidos no estudo, quando da sua divulgação ou publicação científicas.
- 4- Garantia de acesso ao responsável pelo estudo e ao respectivo comitê de ética institucional, quando necessário.

Portanto, permito a participação do menor (acima citado) no estudo autorizando a equipe responsável, à manipulação dos dados e ao armazenamento de material biológico. As amostras só serão utilizadas em estudos futuros depois de submetidos ao CEP e ao CONEP.

Dr^a Carla Penteado (19) 7810-7419; Liciane Furigo (19) 8819-5154.
Consentimento para participação no estudo:

Paciente

Pesquisador responsável

Testemunha

Impressão Digital



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.facom.unicamp.br/etica

CEP, 13/01/12
(Grupo B)

PARECER CEP: Nº 921/2011 (orig. nº 004) em caráter de complementação de Parecer CEP nº 003/2011
CAAE: 0330.6.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CCL3 E CCL11 ASSOCIADOS À ASMA EM CRIANÇAS PORTADORAS DE ANEMIA FALCIFORME".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Lúcia Helena Figueira Cardoso

INSTITUIÇÃO: Hemocentro UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/04/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 13/01/12 (o relatório encontra-se no ato ético).

II - OBJETIVOS:

Investigar a frequência dos polimorfismos RANTES e Eotaxina nos genes CCL3 e CCL11, respectivamente, em pacientes com anemia falciforme. Investigar a possível associação destes polimorfismos com a asma, nestes pacientes.

III - SUMÁRIO:

Projeto de Mestrado. No presente estudo, os autores propõem determinar a frequência e as possíveis associações de alguns polimorfismos dos genes CCL3 e CCL11 (RANTES e EOTAXINA-1, respectivamente), em pacientes com anemia falciforme. Será extraído DNA genômico a partir de leucócitos de sangue periférico. A amostragem será constituída por 200 pacientes com idade entre 7 meses e 10 anos, cujo diagnóstico foi firmado no serviço de Hematologia de Pediatria (HEMOPED). As análises serão feitas no Lab. de Hemocentro-UNICAMP. Há anuência de ambas as instituições para a realização do estudo. Orçamento de R\$9.000,00, com auxílio FAPESP/CNPq. Antes, este estudo foi registrado na plataforma Lattes. O pesquisador responsável pela coleta deverá assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para realização das coletas e o estudo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido contempla ainda previsão de armazenamento do material biológico.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP:

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Prof. Tereza Valente Damasceno, DR
Out: 10/01/2012
13854-87 Campinas - SP

FOXE (031) 351-5331
FAX: (031) 351-7177
cep@foc.unicamp.br



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

www.fcm.unicamp.br/etp/pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometerem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.2), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de setembro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER FINAL : Nº. 040/2011

Título do Projeto: Estudo de polimorfismos nos genes CCL5 e CCL11 associados à asma em crianças portadoras de anemia falciforme.

Instituição Solicitante: Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco- HEMOPE e Faculdade de Ciências Médicas de São Paulo-UNICAMP

Pesquisadora: Liciane Helena Furigo Cardoso

Identidade: 43013194 **CPF:** 318.284.078-95 **Telefone:** 19- 8819-5154

Endereço: Rua. Carolina Pasquini Antonioli, 245- Barão Geraldo- Campinas- SP- CEP: 13084-130

Orientadora: Dra. Carla Fernanda Franco Penteado

Co-orientador: Dr. Fernando Ferreira Costa

Responsável técnico da Fundação Hemope: Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Local de Desenvolvimento do Projeto: Diretoria de Hematologia- UNILAB- Laboratório de Hemoglobinopatias e Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro da UNICAMP

Finalidade: Dissertação de Mestrado.

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Analisar a frequência dos polimorfismos nos genes CCL5 (RANTES) e CCL11 (Eotaxina) e investigar possível associação com asma em crianças portadoras de anemia falciforme, que estão em tratamento no Serviço de Hematologia e Hemoterapia.

3 - PARECER DO RELATOR: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hemope (CEP), em cumprimento aos dispositivos da Resolução 196/96 e complementares, após acatar as considerações do relator, membro deste Comitê, relativamente às exigências apontadas no Parecer nº. 040/2011, considera APROVADO o protocolo de pesquisa supracitado, uma vez que este não colide, aparentemente com os princípios básicos da bioética – a não maleficência, a beneficência, a autonomia e a justiça, além do sigilo.

4 - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 196/96 – Item IV.1.f), devendo receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após serem analisadas as razões da descontinuidade, pelo CEP, que o aprovou (Res. CND Item III, 1.x), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou, quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3).
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave, ocorrido – mesmo que tenha sido em outro centro e enviar notificação ao CEP e ANVISA, junto com o seu posicionamento.



- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-los também à ANVISA, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Homologado na Reunião do CEP de 24/8/2011


Ana Lúcia de Sena
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE